

2.1.1.3.2 Fase *in-vitro*: titulación de las muestras de suero para detectar la presencia de anticuerpos

- 1) Cobertura de antígeno: las microplacas se recubren con 5 µg/mL de polisacárido de *haemophilus influenzae* de tipo b. Se llena con 100 µL de esta solución cada pocillo de las microplacas y luego se incuban durante 16-20 horas a +37°C ± 2°C;
- 2) Saturación: los pocillos de las microplacas se saturan con suero de cabra al 10% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X y luego se incuban durante aproximadamente 1 hora a +37°C ± 2°C;
- 3) Titulación de anticuerpos:
 - Las muestras, los controles y los estándares se diluyen a 1/10 con solución PBS-octoxinol 0,1%, suero de cabra 5%;
 - Se distribuye en cada pocillo de las microplacas 100 µL de suero de cabra 5% en solución PBS-Triton 0,1%;
 - Luego se distribuyen, como proceda, en los pocillos de las microplacas 100 µL de las muestras diluidas, los controles negativos diluidos, los estándares diluidos, los controles internos diluidos y los testigos;
 - Las microplacas se incuban bajo agitación durante aproximadamente 1,5 horas a +37°C ± 2°C;
- 4) Adición del conjugado: se distribuyen 100 µL en cada pocillo de las microplacas y a continuación se incuban bajo agitación durante aproximadamente 1,5 horas a +37°C ± 2°C;
- 5) Reacción colorimétrica: el complejo se revela con 100 µl de un sustrato de peroxidasa: OPD. Esta reacción se detiene añadiendo 50 µL de ácido sulfúrico 2 N en cada pocillo de las microplacas.

2.1.1.4 Lectura, cálculos y resultados

2.1.1.4.1 Lectura

Se lee la densidad óptica (DO) a 492 nm y a 620 nm.

2.1.1.4.2 Cálculos

La absorbancia de la curva del estándar de referencia de antisuero de ratón se grafica en función de la concentración anti-PRP usando un programa de regresión lineal/logarítmica. Las distintas concentraciones se calculan a partir de la DO de cada suero. La concentración anti-PRP corresponde a la media de las concentraciones de cada suero, teniendo en cuenta los factores de dilución.

La inmunogenicidad contra Hib se expresa en UE/mL con la fórmula siguiente:

$$DO = d + (a - d) / (1 + (X/c)^b)$$

Donde:

- d: asíntota cuando X se aproxima a 0;



- a: asíntota cuando X se aproxima a infinito;
- X: concentración (UE/mL)
- c y b: parámetros que definen la forma de la curva.

2.1.1.4.3 Resultados

Los ratones se consideran seroconvertidos si su inmunogenicidad contra *haemophilus* no es inferior a 4 veces la del suero de control agrupado.

Los ratones no se consideran seroconvertidos si su inmunogenicidad contra *haemophilus* es inferior a 4 veces la del suero de control agrupado.

2.1.1.5 Criterios de validez

2.1.1.5.1 Criterios de validez para la titulación de anticuerpos

- La densidad óptica del testigo debe ser menor que 0,200. Cuando la media del testigo es superior a 0,200, es posible eliminar 1 resultado aberrante;
- La densidad óptica media de la primera dilución del control negativo debe ser menor que 0,200.

2.1.1.5.2 Criterios de validez para la prueba de inmunogenicidad

- El agrupamiento de sueros de ratones de control no inmunizados debe ser negativo. La densidad óptica de la dilución más baja debe ser menor que 0,200;
- El título medio de un grupo debe calcularse con un mínimo de 6 ratones entre 8.

2.1.2 PT no adsorbido y FHA no adsorbida

El método está basado en Ph. Eur. 2.7.1 (Métodos inmunoquímicos).

2.1.2.1 Principio

- El método se lleva a cabo como prueba de límites.
 - Cuantificación del toxoide pertúsico:

El método se basa en la reacción del toxoide pertúsico con el anticuerpo antipertúsico de oveja unido a los pocillos de microtitulación. Luego se agrega a los pocillos un anticuerpo secundario, que es anticuerpo de ratón anti-toxina pertúsica. A continuación, se agrega anticuerpo de cabra antirratón conjugado con fosfatasa alcalina, seguido por un sustrato.

- Cuantificación de la FHA:

El método se basa en la reacción de la FHA con el anticuerpo de cabra anti-FHA unido a los pocillos de microtitulación. Luego se agrega a los pocillos un anticuerpo secundario,



002768
MESA DE ENTRENAMIENTO

que es un anticuerpo de ratón anti-FHA. A continuación, se agrega anticuerpo de cabra antirratón conjugado con fosfatasa alcalina, seguido por un sustrato.

- Para ambos ELISA, la intensidad del color es proporcional a la concentración de antígeno (toxoides pertúsicos y FHA respectivamente).

2.1.2.2 Reactivos

- Anticuerpo de recubrimiento: anti-toxina *Bordetella pertussis* de oveja: Código NIBSC 97/572 y producción interna de suero de cabra anti-FHA;
- Antígeno de referencia estándar: toxoide pertúsico estabilizado en solución de glicerol y FHA al 50% v/v.
- Anticuerpo secundario: suero de ratón anti-toxina- *Bordetella pertussis* interno y suero de ratón anti-FHA interno.
- Conjugado: fragmentos (Fab') 2 y Fc del anticuerpo de cabra antirratón etiquetado con fosfatasa alcalina;
- PBST: solución salina tamponada con fosfato con Tween 80 al 0,05%;
- Solución de bloqueo: solución salina tamponada con fosfato - Albúmina de suero bovino (BSA) 2% (el porcentaje de BSA puede adaptarse en función del lote de BSA);
- Diluyente de la muestra (testigo): solución PBST con 1% de BSA (el porcentaje de BSA puede adaptarse en función del lote de BSA);
- Sustrato cromogénico: pNPP (fosfato de p-nitrofenilo, disódico)

2.1.2.3 Procedimiento operativo

- Cobertura de antígeno: las microplatas se recubren con anticuerpos de recubrimiento y luego se incuban toda una noche a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para FHA y a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ para PT
- Saturación: los pocillos de las microplacas se saturan con solución de bloqueo y luego se incuban durante 1 hora a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- Con el diluyente de la muestra, se diluye el antígeno de referencia estándar a una concentración de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El producto se centrifuga y el sobrenadante se deposita puro en la placa de ELISA y luego se incuba durante 1,5 horas a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- Anticuerpo secundario: se añade a cada pocillo el anticuerpo secundario y luego se incuba durante 1,5 horas a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- Adición de conjugado: el conjugado se distribuye en cada pocillo de las microplacas y a continuación se incuba durante 1,5 horas a $+37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- Reacción colorimétrica: el pNPP previamente diluido a 1 mg/mL con tampón dietanolamina se vierte en cada pocillo y a continuación se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene añadiendo hidróxido de sodio 2,5 N en cada pocillo de las microplacas.





2.1.2.4 Lectura, cálculos y resultados

Después de la reacción cromogénica con sustrato de fosfatasa alcalina, se registra la absorbancia de cada pocillo a 405 nm y a 620 nm.

- Se compara la DO del producto con la DO media de la referencia estándar a 2,5 µg/mL;
- Si las DO del producto son inferiores a la DO de la referencia estándar, la concentración es inferior a 2,5 µg/mL;
- Si las DO del producto son superiores o iguales a la DO de la referencia estándar, la concentración es superior o igual a 2,5 µg/mL;

2.1.2.5 Criterios de validez

- La densidad óptica (DO) del testigo no debe ser mayor que 0,2
- El coeficiente de variación de la DO de la referencia estándar a 2,5 µg/mL no debe ser superior a 30%;
- La OD de la referencia estándar debe ser mayor que la DO del testigo +3 la desviación estándar relativa determinada históricamente (p.ej., 0,109 para el toxoide pertúsico en solución y 0,116 para la FHA en solución);
- Las dos DO individuales de la muestra deben ser inferiores o superiores a la DO media de la referencia estándar a 2,5 µg/mL.

2.1.3 Porcentaje de adsorción del toxoide tetánico (Rocket)

El porcentaje de adsorción del toxoide tetánico se determina mediante el método de inmunoelectroforesis Rocket de doble gel.

2.1.3.1 Principio

El objetivo de esta prueba es determinar la concentración de toxoide tetánico purificado no adsorbido en el gel de hidróxido de aluminio en la vacuna combinada Hexaxim que contiene tanto fosfato de polirribosil ribitol conjugado con proteína tetánica (PRP) como toxoide tetánico purificado. Este método se basa en la migración bajo un campo eléctrico del sobrenadante de la vacuna en un gel de agarosa al 1% que tiene dos partes distintas.

- Para evitar la interferencia de PRP-T, la primera parte contiene anticuerpos específicos contra *Haemophilus influenzae* tipo b capaces de capturar los antígenos de PRP total (gel 1);
- La segunda parte contiene anticuerpos específicos contra el tétanos, que reaccionan con el toxoide tetánico libre (gel 2) presente en la vacuna de muestra.

Las líneas de precipitina en forma de cohete se forman en la zona de equivalencia. Las alturas de las curvas en forma de cohete en la segunda parte del gel son proporcionales a la cantidad de toxoide tetánico presente en la muestra.



2.1.3.2 Procedimiento operativo

- Preparación del gel

Los geles 1 y 2 se preparan de manera separada a partir de una solución de agarosa al 1% en la que se agrega la cantidad adecuada de cada antisuero (suero de conejo anti-PRP en el gel 1 y suero equino antitetánico en el gel 2). La dilución del antisuero se determina en el paso de cualificación.

Se vierte el gel 1. Tras la solidificación, se vierte el gel 2 al lado del gel 1.

- Preparación de las muestras

El estándar de referencia es la mezcla de 2 referencias:

- Lote de toxoide tetánico purificado interno;
- Lote de PRP interno.

El rango de referencia incluye 4 diluciones: puro, 0,5, 0,25 y 0,125. La muestra de referencia pura se prepara para obtener concentraciones de toxoide tetánico y PRP equivalentes a sus concentraciones respectivas en la vacuna. Para las diluciones se utiliza una solución tampón de barbital 1x. Cada dilución se carga por duplicado en ambos lados de los pocillos con gel de agarosa 1.

Productos analizados: Los productos se centrifugan a 5200 g durante 5 min. a +5°C. Los sobrenadantes se recolectan y cargan puros por duplicado en los pocillos con gel de agarosa 1.

El control de migración utilizado es azul de bromofenol cargado en uno o más pocillos libres.

- Inmunolectroforesis Rocket

Las muestras (estándar de referencia, productos analizados y control de migración) se cargan como se ha descrito anteriormente y se lleva a cabo la inmunolectroforesis.

El gel se lava (con NaCl a 0,9% y agua purificada), se seca con un sistema de aire ventilado, se tiñe con solución de tinción de Coomassie y se destiñe usando una solución de ácido acético y metanol.

2.1.3.3 Lectura, cálculos y resultados

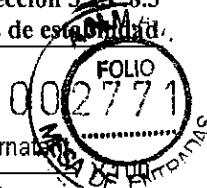
Las alturas de los cohetes se miden en centímetros desde la base inicial de los cohetes del toxoide tetánico hasta el punto culminante de cada cohete.

Los parámetros a (pendiente) y b (intercepción) de la curva estándar se calculan de la manera siguiente:

$\text{Log}_{10} \text{ de la concentración de toxoide tetánico (Lf/dosis)} = a \cdot (\text{log}_{10} \text{ de las alturas de los cohetes (cm)}) + b$

La adsorción del toxoide tetánico en gel de aluminio se expresa en porcentaje de adsorción.

El porcentaje de adsorción del toxoide tetánico en la muestra se calcula de la forma siguiente:



$$\text{Adsorption of Tetanus Toxoid (\%)} = 100 - \frac{\text{Concentration of Tetanus Toxoid measurement in the supernatant}}{\text{Theoretical concentration of Tetanus Toxoid in initial vaccine}}$$

2.1.3.4 Criterios de validez

- La altura del cohete medida en el gel 2 del antígeno de referencia más concentrado es de entre 10 y 40 mm;
- Los cohetes correspondientes a las reacciones de los anticuerpos anti-PRP/PRP visibles en el gel 1 no tienen que superar el valor inicial de los cohetes del tétanos (se puede decir que no deben ser visibles en el gel 2).
- Los cohetes deben haberse teñido correctamente;
- Los bordes de los cohetes tienen que ser claros y contrastados;
- El coeficiente de correlación de la curva de referencia no debe ser inferior a 0,98;
- El porcentaje de CV calculado en la altura del cohete de cada referencia y diluciones de la muestra no debe ser superior a 20%.

2.1.4 Ensayo de inmunogenicidad contra IPV en ratas

El método está basado en Ph. Eur. 2.7.20 (Valoración *in vivo* de la vacuna contra la poliomielitis, inactivada).

2.1.4.1 Principio

El ensayo de la inmunogenicidad en ratas se utiliza para confirmar que la vacuna induce una respuesta de anticuerpos uniforme en las ratas, cuando se compara con animales inyectados con una vacuna de referencia cualificada. Esta prueba está basada en Ph. Eur. 2.7.20 "Valoración *in vivo* de la vacuna contra la poliomielitis, inactivada". Es una prueba de inhibición micrometabólica basada en la premisa de que una vacuna antipoliomielítica inactivada lo suficientemente potente debería inducir la formación de anticuerpos neutralizantes de la poliomielitis en las ratas. Los resultados se comparan con una vacuna de referencia interna.

2.1.4.2 Reactivos

2.1.4.2.1 Fase *in vivo*: inmunización de las ratas

- Muestras de la vacuna;
- Estándar de referencia interno Pediacel (DTaP-IPV-PRP-T);

2.1.4.2.2 Fase *in vitro*: prueba de neutralización del virus

- Virus de desafío: monovalente de poliovirus de cepas Sabin con pasaje a células Hep2;
- Negro azulado de naftol.

ROXANA WUNTEMILOME
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
INGENIERO
SANOFI PASTEUR S.A.

