



2.1.4.3 Procedimiento operativo

2.1.4.3.1 Fase *in vivo*: inmunización de las ratas

- 1) Las muestras de la vacuna a examinar y la vacuna de referencia se diluyen adecuadamente y se inyectan por vía intramuscular a un grupo de 10 ratas hembra para cada dilución. El peso de las ratas debe ser de entre 175 y 250 g;
- 2) Se utiliza como control un grupo de 5 ratas no inyectadas;
- 3) Se extrae sangre de las ratas el día 21 y se recolectan los sueros de cada rata individualmente.

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

- 1) Las muestras de suero se activan mediante calor a aproximadamente +56°C durante unos 30 minutos;
- 2) Los sueros inmunes (0,025 mL) se diluyen en diluciones dobles seriadas según sea necesario y se distribuye en los pocillos de las placas de microtitulación que contienen como células indicadoras 0,15 mL de células Hep2. Se añaden los sueros inmunes a las microplacas para los poliovirus tipo 1, tipo 2 y tipo 3.
- 3) Cada virus (tipo 1: lote R174, tipo 2: lote R227 y tipo 3: lote R371) se prepara para que tenga aproximadamente 50 DICT₅₀^a por 0,025 mL y se agrega a cada pocillo. Las microplacas se incuban a aproximadamente +37°C durante aproximadamente 3 horas y toda la noche entre +2°C y +8°C;
- 4) Se añade a cada pocillo células Hep2 diluidas para contener 1.000 células por pocillo en 0,15 mL. Luego las microplacas se incuban a +37°C ± 1,0°C entre 5 y 7 días.
- 5) Cada placa también incluye sueros estándar para tipos específicos como controles positivos, controles para la toxicidad celular (ausencia de virus), controles de virus y controles de células para garantizar la validez de la prueba;
- 6) Tinción de las placas con una solución de tinción de negro azulado de naftol al 0,1%;
- 7) Cada microplaca también incluye sueros estándar para tipos específicos como controles positivos, controles para la toxicidad celular (ausencia de virus), controles de virus y controles de células para garantizar la validez de la prueba.

2.1.4.4 Lectura, cálculos y resultados

Las monocapas celulares intactas teñidas de negro azulado indican una neutralización específica del virus o la ausencia de actividad viral. La ausencia de monocapas celulares teñidas o pocillos vacíos indica la presencia de actividad viral.

El título del suero se expresa como el log₂ del punto final 50% que es la mayor dilución del suero que provoca la neutralización del virus, indicada por la monocapa celular teñida.

Se calcula para cada suero el punto final 50% y se expresa como título medio (logaritmo en base 2). Los valores de potencia de la vacuna se determinan por comparación con la vacuna de referencia.

^a DICT₅₀: Dosis infecciosa de cultivo celular 50%



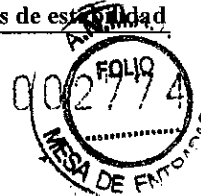


2.1.4.5 Criterios de validez

Para que una prueba se considere válida se deben satisfacer los criterios siguientes:

- Los títulos del suero estándar interno deben estar dentro del rango:
 - Tipo 1: 16-64;
 - Tipo 2: 4-16;
 - Tipo 3: 16-64.
- La dosis viral debe estar en el intervalo de 10 a 1000 DICT₅₀ por 0,025 mL;
- El control del medio no debe presentar ninguna contaminación durante el examen microscópico previo a la tinción;
- Para la tipificación de los virus, los 3 tipos de poliovirus deben estar correctamente tipificados. No debe haber células teñidas en los 4 pocillos que contienen los 2 otros tipos de antisueros;
- El control de la toxicidad no debe ser tóxico. Si se observa toxicidad en el control de la toxicidad, el suero es tóxico y el resultado no es válido en ese nivel. Esto permite garantizar que la neutralización se debe a la respuesta de anticuerpos y que no está causada solo porque el suero sea tóxico para las células;
- El título medio de los sueros de las ratas negativas es inferior a 1/4. Para que el ensayo sea válido, se precisa un mínimo de 3 controles negativos;
- Es necesario que se realice el ensayo en un mínimo de 8 ratas de cada grupo de dilución para que el grupo de dilución sea válido;
- El resultado Probit no es válido si no puede obtenerse una potencia relativa calculada, por ejemplo, un resultado Probit de relación dosis-respuesta no paralela, no lineal o no significativa y/o estimaciones que difieran con respecto a la preparación de referencia de la vacuna.
- El valor de DE₅₀ tanto de la vacuna por examinar como de la vacuna de referencia debe encontrarse comprendido entre las dosis menor y la mayor administradas a los animales;
- El límite de confianza del 95% de la potencia relativa estimada de la muestra debe estar comprendido entre el 25% y el 400% de la potencia estimada.





2.1.5 Toxicidad específica de los componentes diftéricos y tetánicos

La prueba de toxicidad específica se utiliza para confirmar la ausencia de toxicidad diftérica y tetánica residual en la vacuna combinada contra la difteria, el tétanos, la tos ferina acelular, la hepatitis B, la poliomiелitis inactivada (trivalente concentrado) y *haemophilus influenzae* tipo b. Esta prueba se realiza de conformidad con el método descrito en la Serie de Informes Técnicos de la OMS N° 800, 1990, Anexo 2 "Requirements for Diphtheria, Tetanus, Pertussis and Combined Vaccines" y la monografía de la Ph. Eur. 2067 "Diphtheria, tetanus, pertussis (acelular, component), hepatitis B (rDNA), poliomyelitis (inactivated) and *haemophilus* type b conjugate vaccine (adsorbed)".

2.1.5.1 Principio

Esta prueba consiste en inyectar a cobayos la muestra de prueba y observar a los animales durante un periodo de 42 días para detectar pérdidas de peso y cualquier síntoma específico de toxicidad diftérica y tetánica.

2.1.5.2 Procedimiento operativo

Se inyecta por vía subcutánea en el área abdominal a cada uno de los siete cobayos del mismo sexo, con un peso comprendido entre 250 y 350 g. 5 de ellos reciben 2,5 mL de la vacuna a examinar (equivalente a 5 dosis humanas inyectadas por animal) y 2 de ellos reciben un control negativo (cloruro de sodio a 0,9%).

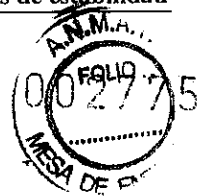
2.1.5.3 Lectura, cálculos y resultados

Se observa a los animales durante 42 días y se pesan regularmente. Se calcula la ganancia de peso de los animales en el periodo.

Asimismo, se examinan diariamente durante 42 días para detectar síntomas de toxicidad diftérica o tetánica. Si un animal muere durante la prueba, se le practica una necropsia para determinar la causa de la muerte.

2.1.5.4 Criterios de validez

- La prueba es válida si al menos el 80 % de los animales tratados sobreviven al período de observación.
- La prueba no es válida si más del 20% de los animales tratados muere o muestra síntomas de enfermedad por causas no específicas o intercurrentes. La prueba debe repetirse en el mismo tipo de animal;
- La posible presencia de un nódulo subcutáneo palpable en el lugar de la inyección se considera normal.



2.1.6 Prueba de integridad

2.1.6.1 Principio

La prueba de integridad del cierre del envase se realiza para demostrar que se mantiene la integridad del envase de las jeringas precargadas y los viales monodosis tras los procesos de llenado y acondicionamiento, y durante el programa de vida útil del producto. El procedimiento de ensayo se indica a continuación.

2.1.6.2 Reactivos

- Solución de riboflavina a 0,1% p/v.

2.1.6.3 Procedimiento operativo

Se utiliza una solución marcadora de riboflavina al 0,1% para sumergir veinte jeringas o viales del producto en posición horizontal junto con 5 (viales monodosis) o 3 (jeringas) envases de control de idoneidad del sistema.

Un envase de control de idoneidad del sistema es un sistema utilizado para comprobar que la prueba es satisfactoria. Con respecto a la prueba de integridad, el envase de control de idoneidad del sistema utilizado, por ejemplo, jeringas o viales con un defecto de integridad intencionado, es específicamente elaborado para esta prueba. Estos envases se ensayan de manera similar a las muestras.

Se cierra la cámara y se retira el aire para obtener una presión de $\leq 0,7$ bares y se mantiene durante 30 ± 1 minutos a temperatura ambiente.

Se precisan 30 minutos para que vuelva a estar a la presión atmosférica. A continuación, los envases se retiran del baño, se enjuagan con agua y se secan.

2.1.6.4 Lectura, cálculos y resultados

- El contenido de los envases se examina con luz ultravioleta con una longitud de onda de 365 nm;
- Se confirma la integridad del envase si no se observa una fluorescencia amarilla.

2.1.6.5 Criterios de validez

Los resultados se consideran válidos si se reúnen las condiciones siguientes:

- Todos los envases con el control de idoneidad del sistema están completamente sumergidos en una solución marcadora colorante;
- El contenido de todos los controles de idoneidad del sistema y del control positivo del producto no expuesto debe mostrar la presencia de fluorescencia cuando se expone a la fuente de UV con una longitud de onda de 365 nm;



- El contenido del control negativo no expuesto no debe presentar ningún rastro de fluorescencia cuando se expone a la fuente de UV con una longitud de onda de







2.2 Resumen de la validación de los procedimientos analíticos

2.2.1 PT no adsorbido y FHA no adsorbida

Esta sección describe la validación del PT no adsorbido y la FHA no adsorbida: determinación como prueba de límites de PTxd y FHA mediante ELISA en el sobrenadante de la vacuna Hexaxim, de conformidad con la guía de la ICH.

La validación se divide en 2 partes: una para cada uno de los componentes de *B. pertussis* (toxóide pertúsico y FHA).

2.2.1.1 Validación del ensayo de límites para la medición del toxóide pertúsico no adsorbido en el sobrenadante de Hexaxim

Puesto que el método es un ensayo de límites, las características estudiadas son la especificidad y el límite de detección.

Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 23:

Tabla 23: Titulación del toxóide pertúsico mediante ELISA en el sobrenadante de Hexaxim, resumen de la validación

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Especificidad	El antígeno PTxd se detecta en presencia de antígeno PTxd en una muestra de sobrenadante de Hexaxim	El antígeno PTxd se detecta si hay PTxd presente en la muestra de sobrenadante de Hexaxim
	El antígeno PTxd no se detecta en ausencia de PTxd en una muestra de sobrenadante de la matriz de Hexaxim (que contiene los demás antígenos)	El antígeno PTxd no se detecta si no hay PTxd presente en la muestra de sobrenadante de la matriz de Hexaxim
Límite de detección	El límite de detención se establecerá en 0,023 µg/mL si la absorbancia del ensayo (sobrenadante de la matriz de Hexaxim con agregado de 0,023 µg/mL de antígeno PTxd) es superior a la absorbancia establecida como umbral de detención.	La absorbancia del ensayo es superior a la absorbancia establecida como umbral de detección. Límite de detección = 0,023 µg/mL
	El límite de detención será satisfactorio si la absorbancia del ensayo (sobrenadante de la matriz de Hexaxim con agregado de 0,023 µg/mL de antígeno PTxd) es inferior a la absorbancia medida para el control positivo (2,5 µg/mL)	La absorbancia del ensayo es inferior a la absorbancia medida para el control positivo. El límite de detección del método es satisfactorio.





2.2.1.1.1 Especificidad

El diseño experimental es:

- Se realiza un ensayo para comprobar la presencia de reacción entre el anticuerpo anti-PTxd y una muestra de sobrenadante de Hexaxim (lote de producción);
- Se realiza otro ensayo para comprobar la ausencia de reacción entre el anticuerpo anti-PTxd y una muestra de sobrenadante de la matriz de Hexaxim sin PTxd (lote BBO-09-083^a).

2.2.1.1.1.1 Resultados analíticos

Los resultados analíticos se presentan en la Tabla 24.

Tabla 24: Absorbancia del sobrenadante de la matriz de Hexaxim sin antígenos PTxd frente a la absorbancia del sobrenadante de la matriz de Hexaxim

Absorbancia establecida como umbral de detección (previamente determinado con 30 valores testigo independientes)	Absorbancia medida para el sobrenadante de la matriz de Hexaxim sin PTxd	Absorbancia medida para el sobrenadante de Hexaxim (lote de producción)
0,109	0,087 0,098	1,440 1,493

2.2.1.1.1.2 Análisis

El antígeno PTxd se detecta en presencia de PTxd en la muestra de Hexaxim.

El antígeno PTxd no se detecta en ausencia de PTxd en la muestra de Hexaxim.

2.2.1.1.2 Límite de detección

Durante el diseño experimental se realizan 3 pruebas para comprobar que la absorbancia medida para una muestra con una concentración de 0,023 µg/mL de PTxd en el sobrenadante de Hexaxim es detectable e inferior al control positivo de la prueba (2,5 µg/mL). El límite de detección se ha establecido basándose en experimentos anteriores y en los requisitos para esta prueba.

2.2.1.1.2.1 Resultados analíticos

Los resultados analíticos se presentan en la Tabla 25.

^a Matriz de hexaxim sin la valencia PTxd



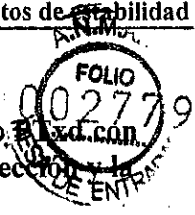


Tabla 25: Absorbancia del sobrenadante de la matriz de Hexaxim sin antígeno PTxd con agregado de 0,023 µg/mL de PTxd frente a la absorbancia en el umbral de detección y la absorbancia del control positivo de PTxd

Absorbancia establecida como umbral de detección (previamente determinado con 30 valores testigo independientes)	Absorbancia medida para el sobrenadante de la matriz de Hexaxim con agregado de 0,023 µg/mL de PTxd	Absorbancia medida para el control positivo de PTxd de 2,5 µg/mL
0,109	0,414	2,430
	0,418	
	0,522	2,450
	0,562	
	0,409	2,512
0,455		

2.2.1.1.2.2 Análisis

Se verifica que el límite de detección para el ensayo del límite de PTxd es de 0,023 µg/mL.

2.2.1.1.3 Conclusión

El método es específico.

Se verifica que el límite de detección es de 0,023 µg/mL y satisface las necesidades del ensayo.

Este método es válido para detectar el PTxd en el sobrenadante de la vacuna Hexaxim.

2.2.1.2 Validación del ensayo de límites para la medición de la FHA no adsorbida en el sobrenadante de Hexaxim

Puesto que el método es una prueba de límites, las características estudiadas son la especificidad y el límite de detección.

Los resultados de la validación se resumen en la Tabla 26:



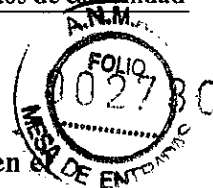


Tabla 26: Resumen de validación de la titulación de la FHA mediante ELISA en el sobrenadante de Hexaxim

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Especificidad	El antígeno FHA se detecta en presencia de FHA en una muestra de sobrenadante de Hexaxim	El antígeno FHA se detecta si hay FHA presente en la muestra de sobrenadante de Hexaxim
	El antígeno FHA no se detecta en ausencia de FHA en una muestra de sobrenadante de la matriz de Hexaxim (que contiene los demás antígenos)	El antígeno FHA no se detecta si no hay FHA presente en la muestra de sobrenadante de la matriz de Hexaxim
Límite de detección	El límite de detención se establecerá en 0,043 µg/mL si la absorbancia del ensayo (sobrenadante de la matriz de Hexaxim con agregado de 0,043 µg/mL de antígeno FHA) es superior a la absorbancia establecida como umbral de detención.	La absorbancia del ensayo es superior a la absorbancia establecida como umbral de detección. Límite de detección = 0,043 µg/mL
	El límite de detención será satisfactorio si la absorbancia del ensayo (sobrenadante de la matriz de Hexaxim con agregado de 0,043 µg/mL de antígeno FHA) es inferior a la absorbancia medida para el control positivo (2,5 µg/mL)	La absorbancia del ensayo es inferior a la absorbancia medida para el control positivo. El límite de detección del método es satisfactorio.

El método es pertinente para medir la FHA no adsorbida en el sobrenadante de Hexaxim.

2.2.1.3 Especificidad

El diseño experimental es:

- Se realiza un ensayo para comprobar la presencia de reacción entre el anticuerpo anti-FHA y una muestra de sobrenadante de Hexaxim (lote de producción);
- Se realiza otro ensayo para comprobar la ausencia de reacción entre el anticuerpo anti-FHA y una muestra de sobrenadante de la matriz de Hexaxim sin FHA (muestra que contiene todos los demás antígenos, sin FHA).

2.2.1.3.1 Resultados analíticos

Los resultados analíticos se presentan en la Tabla 27.

