



**2.2.2.1.3.2 Análisis**

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la Tabla 31.

- Se calcula el porcentaje de recuperación para cada nivel de concentración teórica y para cada grupo;
- La homogeneidad de las varianzas intraniveles se verifica mediante la prueba de Cochran;
- 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;
- Cuando se comprueba la igualdad de las medias interniveles, se calcula el porcentaje de recuperación promedio con los límites de confianza del 95%.

→ La prueba de Cochran se halla en el límite de significación. Esta pequeña heterocedasticidad es aceptable.

→ El análisis de varianza no permite concluir la igualdad de las medias interniveles.

→ La prueba de Student-Newman-Keuls permite juntar porcentajes de recuperación similares: por una parte, el nivel teórico +1 (2,5 Lf/mL) y, por la otra parte, niveles teóricos de 2 (5,0 Lf/mL) a +5 (20,0 Lf/mL), cuyos resultados son homogéneos juntos.

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

**Tabla 33: Exactitud: porcentaje de recuperación promedio por concentración**

Cálculo de recuperación (%):	
Nivel de concentración teórica	Media
2,5 Lf/mL	115%
5 Lf/mL	101%
10 Lf/mL	99%
15 Lf/mL	103%
20 Lf/mL	102%

Para cada concentración teórica, la recuperación promedio se halla entre el 80 % y el 120 %.

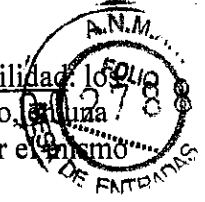
Por lo tanto, el método es preciso.

**2.2.2.1.4 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, la misma 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 nº IND09014 de producto final a granel de Hexaxim, representativo de la producción.

La precisión se estudia en los resultados expresados en Lf/mL (concentración de toxoide tetánico 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:

$$\text{Results \%} = 100 - \frac{\text{Result (Lf/mL)}}{\text{Theoretical concentration of Purified Tetanus Toxoid in vaccine}} \times 100$$

donde: concentración de TT en la vacuna = 10 Lf/dosis, es decir 20 Lf/mL.

Todos los resultados se resumen en la tabla siguiente.

**Tabla 34: Precisión: concentración de toxoide tetánico purificado no adsorbido (Lf/mL) y porcentaje de adsorción**

Serie 1		Serie 2		Serie 3	
Lf/mL	%	Lf/mL	%	Lf/mL	%
13,06	34,7	12,52	37,4	12,41	38,0
12,93	35,4	12,48	37,6	12,07	39,7
13,40	33,0	12,80	36,0	12,09	39,6
13,55	32,3	12,75	36,3	13,27	33,7
12,83	35,9	12,86	35,7	13,24	33,8
14,43	27,9	12,81	36,0	12,85	35,8

#### 2.2.2.1.4.1 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 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;
- Media general = 1,110, que equivale a 12,90 Lf/mL en forma aritmética;
- La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.





**Tabla 35: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia**

Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad (1 corrida)	3,60%	0,016	± 0,033, que equivale a $x/\pm 1,08$ Lf/mL en forma aritmética
Características de precisión intermedia (1 corrida, 1 medición)	4,47%	0,019	± 0,041, que equivale a $x/\pm 1,10$ Lf/mL en forma aritmética

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

**2.2.2.1.4.2 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 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;
- Media general = 35,5%;
- La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

**Tabla 36: Precisión: características de repetibilidad y precisión intermedia**

Características	Desviación estándar relativa	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad (1 corrida)	6,66%	2,363	± 5,036%
Características de precisión intermedia (1 corrida, 1 medición)	8,27%	2,933	± 6,189%

**2.2.2.2 Conclusión**

El método es específico.

El método es lineal en el rango [2,3 - 23,8] Lf/mL.

La precisión se prueba en el mismo rango, ya que todos los porcentajes de recuperación se encuentran entre el 80% y el 120%.

El método es preciso dado que:

- El intervalo de confianza del 95% de la repetibilidad es  $x/\pm 1,08$ ;
- El intervalo de confianza del 95% de la precisión intermedia es  $x/\pm 1,10$ .

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
GERENTE  
SANOFI PASTEUR S.A.





Para los datos analizados expresados en porcentaje de adsorción, la desviación estándar relativa de la repetibilidad y la precisión intermedia es respectivamente de 6,7% y 8,3%, y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es de  $\pm 6\%$  para 1 corrida con 1 medición que se realiza de manera habitual.

El método de inmunoelectroforesis es válido para cuantificar el toxoide tetánico purificado no adsorbido en la vacuna Hexaxim.

### 2.2.3 Ensayo de inmunogenicidad contra IPV en ratas

Esta prueba está basada en Ph. Eur. 2.7.20. Para los ensayos farmacopeicos, los métodos de análisis descritos en una monografía de la farmacopea, como la Ph. Eur. o cualquier otra farmacopea reconocida, no tienen que validarse con respecto a la exactitud y la fiabilidad, pero debe verificarse su idoneidad en las condiciones reales de uso. Puesto que se trata de un método farmacopeico, solo se evaluó la precisión intermedia. Los resultados se resumen en la Tabla 37.

**Tabla 37: Ensayo de inmunogenicidad contra IPV en ratas, resumen de validación**

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Precisión intermedia	Los valores de los títulos de punto final individuales para cada analista en el mismo día no variaron en más de $\pm 2$ veces el título de punto final medio redondeado	Analista 1: < 2 veces Analista 2: < 2 veces

#### 2.2.3.1 Precisión intermedia

La precisión intermedia indica las variaciones dentro de un mismo laboratorio y se demuestra mediante pruebas realizadas en días diferentes, por distintos analistas o utilizando equipos distintos.

La precisión intermedia se evaluó a partir de los resultados obtenidos para el suero estándar interno, analizado por 2 analistas en 2 días distintos en un total de 4 ensayos. Se calculó el punto final para el suero estándar interno para cada analista. Se calcularon los títulos de punto final redondeados para los 2 analistas a fin de obtener un título de punto final medio redondeado. Luego se compararon los resultados. Los valores de los títulos de punto final individuales para cada analista en el mismo día no variaron en más de  $\pm 2$  veces el título de punto final medio redondeado (Tabla 38 y Tabla 39).

La precisión intermedia también se determinó usando los resultados obtenidos por los 2 analistas en los 2 días utilizando 5 concentraciones crecientes de muestras de suero. Se calcularon los títulos  $\log_2$  para cada grupo de 10 ratas para cada serotipo de poliovirus. Se calculó la media de los títulos de los 2 analistas para obtener el título medio y luego se compararon. Se observó que los títulos medios de cada analista eran  $\pm 1$  logaritmo con respecto al título medio (Tabla 40 y Tabla 38).

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
SECRETARIO  
SANOFI PASTEUR S.A.



Tabla 38: Precisión intermedia - Títulos de punto final redondeados para el suero estándar interno, verificación de la prueba número 1

Fecha de la prueba		25 de noviembre de 2004										Diferencia con el título medio			
Número establecido		251101(1)					251101(2)					Título medio de 5 a 7 días			
Analista		1					2					1		2	
Día post-siembra celular		Día 5	Día 6	Día 7	Día 5	Día 6	Día 7	Día 5	Día 6	Día 7	1	2	1	2	
Tipo 1	Título de punto final de la prueba	32	38	41	25	35	33	37	28	32	32	32	<2 veces	<2 veces	
	Título de punto final redondeado	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	<2 veces	<2 veces	
Tipo 2	Título de punto final de la prueba	10	12	10	10	10	9	11	10	8	10	10	<2 veces	<2 veces	
	Título de punto final redondeado	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	<2 veces	<2 veces	
Tipo 3	Título de punto final de la prueba	27	32	38	35	27	38	32	33	32	32	33	<2 veces	<2 veces	
	Título de punto final redondeado	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	<2 veces	<2 veces	

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
GERENTE  
SANOFI PASTEUR S.A.

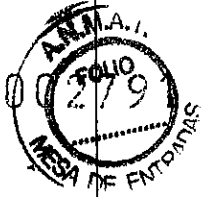




Tabla 39: Precisión intermedia, títulos de punto final redondeados para el suero estándar interno; verificación de la prueba número 2

Fecha de la prueba		25 de noviembre de 2004															
Número establecido		011204(1)					011204(2)					Diferencia con el título medio					
Analista		1					2					1		2			
Día post-siembra celular		Día 5	Día 6	Día 7	Día 5	Día 6	Día 7	Día 5	Día 6	Día 7	Día 5	Día 6	Día 7	Título medio de 5 a 7 días		Título medio entre analistas	
Tipo 1																	
Título de punto final de la prueba		41	45	38	38	29	45	38	32	32	41	37	39	< 2 veces	< 2 veces		
Título de punto final redondeado		32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	< 2 veces	< 2 veces		
Tipo 2																	
Título de punto final de la prueba		17	12	12	13	13	10	16	16	16	14	12	13	< 2 veces	< 2 veces		
Título de punto final redondeado		16	16	16	16	16	8	16	16	16	16	16	16	< 2 veces	< 2 veces		
Tipo 3																	
Título de punto final de la prueba		45	41	54	35	32	38	47	35	41	47	35	41	< 2 veces	< 2 veces		
Título de punto final redondeado		32	32	64	32	32	32	32	32	32	32	32	32	< 2 veces	< 2 veces		

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
GERENTE  
SANOFI PASTEUR S.A.

RA\_0303397





Tabla 40: Precisión intermedia, comparación de anticuerpos; verificación de la prueba número 1

Programa de ratas 472	Analista	Título de anticuerpos Log 2															
		Tipo 1				Tipo 2				Tipo 3							
		Media		Desviación de la media		Media		Desviación de la media		1		2		Media		Desviación de la media	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
	Vacuna																
	Dilución de la vacuna																
	2x No diluida*	6,80	6,25	6,53	0,27	0,28	9,75	8,75	9,25	0,50	0,50	3,80	4,05	3,93	0,13	0,13	
	No diluida	5,15	4,30	4,73	0,43	0,43	9,20	7,50	8,35	0,85	0,85	2,40	1,95	2,18	0,23	0,23	
	1/2	1,60	1,25	1,43	0,18	0,18	8,30	7,20	7,75	0,55	0,55	0,10	0,25	0,18	0,08	0,08	
	1/4	0,55	0,50	0,53	0,03	0,03	8,50	6,60	7,55	0,95	0,95	0,10	0,15	0,13	0,03	0,03	
	1/16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,90	3,95	4,43	0,48	0,48	0,15	0,15	0,15	0,00	0,00	
	2x No diluida	6,25	5,85	6,05	0,20	0,20	8,55	7,45	8,00	0,55	0,55	6,15	5,65	5,90	0,25	0,25	
	No diluida	6,25	5,70	5,98	0,28	0,27	9,25	8,10	8,68	0,57	0,58	6,50	5,60	6,05	0,45	0,45	
	1/2	3,40	3,15	3,28	0,13	0,13	7,15	6,15	6,65	0,50	0,50	4,60	4,35	4,48	0,13	0,13	
	1/4	0,70	0,55	0,63	0,08	0,08	7,45	7,20	7,33	0,13	0,13	2,20	1,90	2,05	0,15	0,15	
	1/16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,40	1,30	1,35	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

\* Se administra a las ratas 2 veces una dosis humana de 50 mL equivalente a 1 mL.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
REGISTRADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





Tabla 41: Precisión intermedia, comparación de anticuerpos; verificación de la prueba número 2

Programa de ratas 479	Analista	Título de anticuerpos Log 2														
		Tipo 1				Tipo 2				Tipo 3						
		1	2	Desviación de la media		1	2	Media	Desviación de la media		1	2	Media	Desviación de la media		
				1	2				1	2				1	2	
	Vacuna	Dilución de la vacuna														
	IPV QCPV202A Referencia	7,40	6,50	6,95	0,45	0,45	9,85	9,65	9,75	0,10	0,10	4,10	4,05	4,08	0,03	0,02
	2x No diluida	4,90	4,45	4,68	0,23	0,23	10,45	9,95	10,20	0,25	0,25	2,60	2,65	2,63	0,02	0,02
	No diluida	4,35	4,25	4,30	0,05	0,05	8,05	7,70	7,88	0,18	0,18	0,60	0,60	0,60	0,00	0,00
	1/2	3,65	3,85	3,75	0,10	0,10	8,60	8,55	8,58	0,03	0,02	1,30	1,35	1,33	0,03	0,02
	1/4	0,00	0,10	0,05	0,05	0,05	2,95	3,10	3,03	0,08	0,07	0,30	0,30	0,30	0,00	0,00
	1/16	6,80	6,85	6,83	0,02	0,03	9,75	9,55	9,65	0,10	0,10	5,95	6,30	6,13	0,18	0,18
	2x No diluida	4,40	4,05	4,23	0,18	0,18	9,10	8,80	8,95	0,15	0,15	3,25	3,50	3,38	0,13	0,13
	No diluida	2,45	2,35	2,40	0,05	0,05	7,85	7,45	7,65	0,20	0,20	1,35	1,75	1,55	0,20	0,20
	1/2	2,15	2,25	2,20	0,05	0,05	8,30	7,60	7,95	0,35	0,35	1,65	1,50	1,58	0,08	0,08
	1/4	0,55	0,50	0,53	0,03	0,03	6,00	5,35	5,68	0,33	0,33	0,35	0,45	0,40	0,05	0,05
	1/16															
	HCPDT-IPV CI362A															

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOIFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
GERENTE  
SANOIFI PASTEUR S.A.

RA\_0303397

Información confidencial/proprietaria  
Página 117 de 120







**2.2.3.2 Conclusión**

Este estudio muestra que se satisfacen los criterios de aceptación para el parámetro de precisión intermedia. Así pues, el ensayo de inmunogenicidad contra IPV en ratas es adecuado para medir los niveles de anticuerpos del suero contra los poliovirus de tipo 1, 2 y 3 en ratas inoculadas con vacunas de poliovirus y vacunas combinadas que contienen poliovirus.

**2.2.4 Prueba de integridad**

Este capítulo describe la validación del ensayo para la prueba de integridad de conformidad con la guía de la ICH.

Los parámetros de validación estudiados son la especificidad, el límite de detección y la cualificación del sistema de sellado.

Para validar este método se utiliza como reactivo la riboflavina. Se preparan tres soluciones de riboflavina:

- Solución A: 25 ppm;
- Solución B: 0,5 ppm;
- Solución C: 5 ppm.

**2.2.4.1 Límite de detección**

**2.2.4.1.1 Análisis**

La evaluación de la matriz de Hexaxim se lleva a cabo añadiendo cantidades conocidas de soluciones B y C para determinar las concentraciones detectables con fluorescencia UV. Se prepara un control negativo a partir de una muestra sin adición de riboflavina. La menor cantidad detectable determina el límite de detección (para esta prueba, con esta matriz):

- Las muestras con adición de riboflavina (correspondiente al límite de detección) deben ser positivas bajo fluorescencia;
- Los controles negativos deben ser negativos bajo fluorescencia.

En la Tabla 42 se indican las soluciones añadidas con los resultados de fluorescencia esperados.

**Tabla 42: Límite de detección: resultados de fluorescencia según las cantidades de soluciones añadidas**

Cantidades añadidas (mL)	0,1	0,5	1
Solución B	Negativo	Positivo	Positivo
Solución C	/	Positivo	Positivo
Control negativo	Negativo	Negativo	Negativo



### 2.2.4.1.2 Resultados analíticos

Los resultados son conformes a estos criterios de aceptación. El límite de detección para la muestra de Hexaxim es de 0,5 ppm de riboflavina.



### 2.2.4.2 Especificidad

#### 2.2.4.2.1 Análisis

La especificidad se evalúa de la manera siguiente:

- 5 muestras positivas añadidas a 0,5 mL de solución B (límite de detección);
- 5 controles negativos (sin adición de riboflavina)

En la Tabla 43 se muestran los resultados de la prueba de integridad llevada a cabo en las muestras positivas y negativas.

Tabla 43: Especificidad: resultados de la prueba de integridad

Muestras	Resultados				
Muestras positivas	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Muestras negativas	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

#### 2.2.4.2.2 Resultados analíticos

Los resultados son conformes a los criterios de aceptación. Esta prueba es específica.

### 2.2.4.3 Cualificación del sistema de sellado

#### 2.2.4.3.1 Análisis

El diseño experimental fue el siguiente: un mínimo de 2 operadores realizaron 3 series separadas de un lote, en días diferentes:

- El control positivo (correspondiente al límite de detección) y las muestras de control de idoneidad del sistema deben ser positivas bajo fluorescencia;
- El control negativo y las muestras del lote deben ser negativas bajo fluorescencia.





Tabla 44: Cualificación del sistema de sellado, resultados de viales y jeringas fluorescentes


	Cantidad de viales o jeringas fluorescentes							
	Control negativo		Control positivo		Idoneidad		Muestras de lotes	
	Vial	Jeringa	Vial	Jeringa	Vial	Jeringa	Vial	Jeringa
Serie 1	0	0	1	1	5	3	0	0
Serie 2	0	0	1	1	5	3	0	0
Serie 3	0	0	1	1	5	3	0	0


**2.2.4.3.2 Resultados analíticos**

Todos los resultados son conformes a estos criterios de aceptación. Se ha demostrado la hermeticidad del sistema de sellado de los envases.

**2.2.4.4 Conclusión**

El método utilizado para la prueba de integridad de 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 ha sido validado y se considera adecuado para el fin previsto.


  
 ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.


  
 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
 GERENTE  
 SANOFI PASTEUR S.A.



3.2.S.6

Sistema de Cierre del Envase - Diftérico

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANIDAD PÚBLICA

  
CHRISTIAN DURÁN  
SANIDAD PÚBLICA



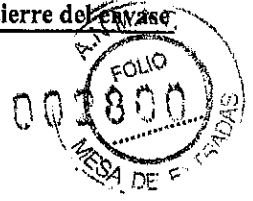


## Sección 3.2.S.6 Sistema de cierre del envase

### Índice


Lista de tablas .....	2
<b>1 Acondicionamiento primario .....</b>	<b>3</b>
1.1 Descripción .....	3
1.2 Especificaciones.....	3
<b>2 Acondicionamiento secundario .....</b>	<b>3</b>
<b>3 Idoneidad.....</b>	<b>3</b>





**Lista de tablas**

Tabla 1: Descripción del sistema de cierre del envase para el PDT.....3

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
GERENTE  
SANOFI PASTEUR S.A.

