

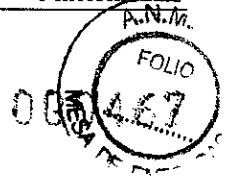
Tabla 74: Resultados del estudio de estabilidad para el lote de toxina pertúsica purificada nativa FA109849 a +5 °C ± 3 °C .....	84
Tabla 75: Resultados del estudio de estabilidad para el lote de toxina pertúsica purificada nativa FA109850 a +5 °C ± 3 °C .....	85
Tabla 76: Resultados del estudio de estabilidad para el lote de toxina pertúsica purificada nativa FA109851 a +5 °C ± 3 °C .....	86
Tabla 77: Resultados del estudio de estabilidad para el lote de toxina pertúsica purificada nativa FA109852 a +5 °C ± 3 °C .....	87
Tabla 78: Resultados del estudio de estabilidad para el lote de toxina pertúsica purificada nativa FA109853 a +5 °C ± 3 °C .....	88
Tabla 79: Resultados del estudio de estabilidad para el lote de toxina pertúsica purificada nativa FA109854 a +5 °C ± 3 °C .....	89



  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.

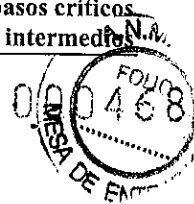




## Lista de figuras

Figura 1: Actividad de agrupamiento en células CHO en la etapa de toxina pertúsica (PT) purificada nativa, gráfico de linealidad .....	29
Figura 2: Actividad de hemaglutinación de la etapa de PT purificada nativa, gráfico de linealidad .....	40
Figura 3: Actividad de hemaglutinación en la etapa de FHA purificada nativa, gráfico de linealidad .....	42
Figura 4: Titulación del PTxd por el método ELISA, gráfico de linealidad .....	52
Figura 5: Titulación de la FHA por el método ELISA, gráfico de linealidad (en el intervalo de la concentración teórica de 54,37 UE/mL a 434,96 UE/mL).....	58





Lista de abreviaturas: vea 2.3 Resumen general de calidad, Introducción.

## 1 Panorama

La vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes (toxoides pertúsicos purificados adsorbidos, PTxd, y FHA purificada adsorbida) se obtienen del mismo proceso de fermentación y se procesan de manera independiente por medio de cromatografía de adsorción y cromatografía de afinidad. Luego, se detoxifica la toxina pertúsica purificada nativa utilizando glutaraldehído (GTA) como agente detoxificador. La FHA purificada, que de manera rutinaria se ha demostrado que no presenta actividades tóxicas, se utiliza en su forma nativa. Posteriormente, los dos antígenos (PTxd purificado en solución y FHA purificada en solución) se adsorben por separado en hidróxido de aluminio.

El proceso de elaboración que se describe en 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación identifica los siguientes intermedios de producción:

- FHA purificada nativa,
- FHA purificada en solución,
- toxina pertúsica purificada nativa (PT),
- toxoide pertúsico purificado (PTxd) en solución.

Los pasos críticos y las descripciones de las especificaciones, los métodos analíticos y los estudios de estabilidad de los intermedios se suministran más adelante en este documento.

## 2 Pasos críticos


Los siguientes pasos describen el proceso de elaboración del principio activo (detallado en 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación):


- Fermentación, incluidos los cultivos previos y el cultivo industrial,
- Separación de las dos proteínas antigénicas por medio de cromatografía de adsorción,
- Purificación de las dos proteínas antigénicas de manera independiente,
- Detoxificación de la toxina pertúsica purificada,
- Adsorción en hidróxido de aluminio para cada proteína purificada.

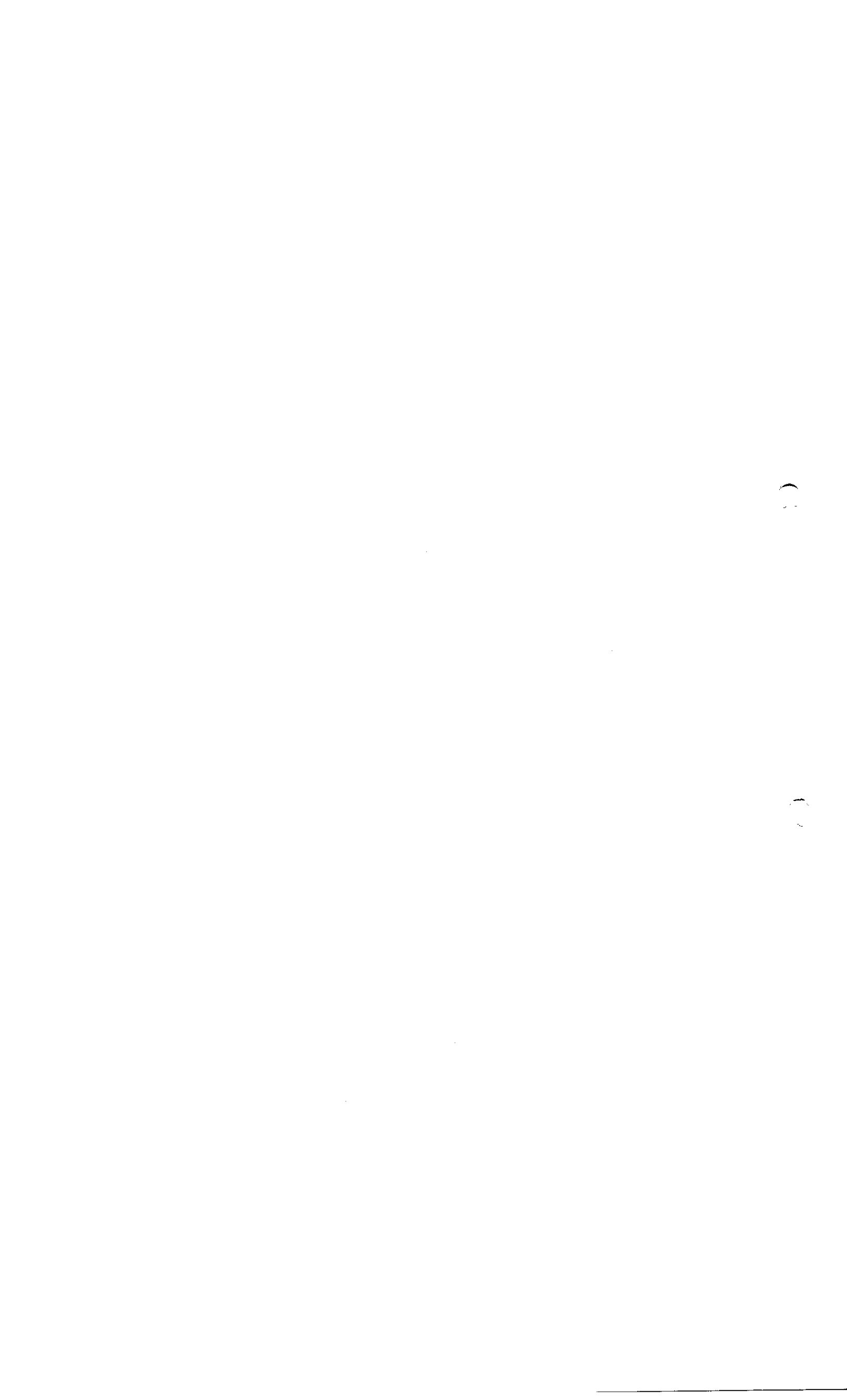
Estos pasos están impulsados por los parámetros de producción y los controles durante el proceso (detallados en 3.2.S.2.2 Cultivo celular y cosecha y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación, y en 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso).

Las especificaciones y los métodos de prueba para el principio activo (FHA y PTxd) se describen en 3.2.S.4.1 Especificación y 3.2.S.4.2 Procedimientos analíticos.

Según los resultados de validación, que demuestran que el proceso de elaboración se puede reproducir y está bajo control (vea 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso), los pasos suministrados en la tabla 1 se consideran críticos para el proceso de elaboración de la vacuna

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTOR GENERAL  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.



contra la tos ferina, acelular, de dos componentes (toxoides pertúsicos purificados [PTxd] y FHA A.N.M. purificada adsorbida).

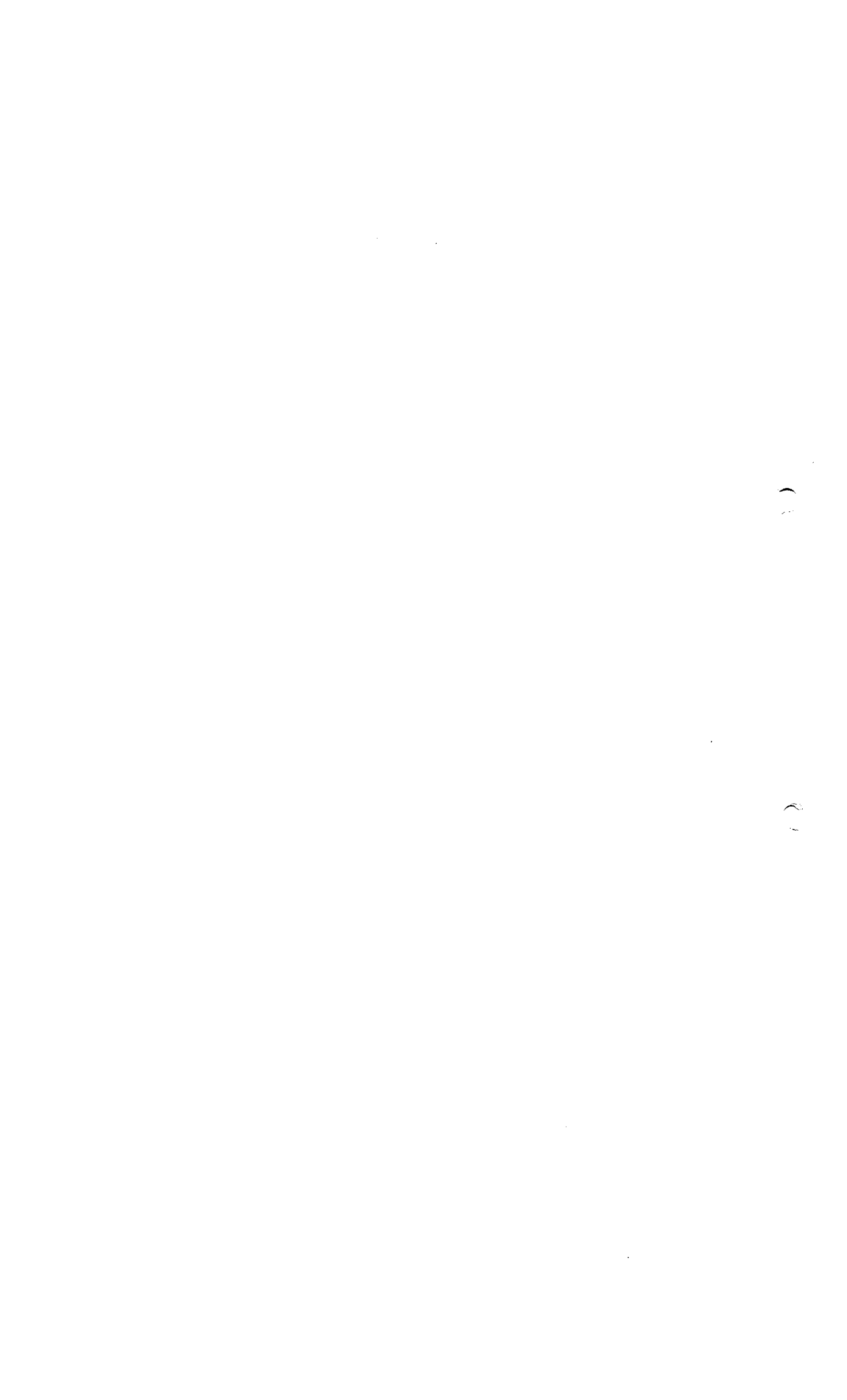


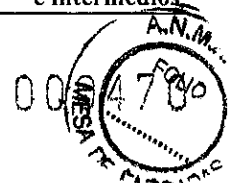
**Tabla 1: Pasos críticos del proceso de elaboración de la vacuna contra la tos ferina, acelular de dos componentes (FHA-PTxd)**

Pasos críticos	Control de criticidad	Objetivo del paso
<b>Detoxificación de la PT con GTA (paso 18)</b>	El paso de detoxificación está controlado por: - el monitoreo de los parámetros de producción y - los datos de validación (vea 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso)	Detoxificar la toxina pertúsica nativa, con el fin de obtener el toxoide pertúsico purificado en solución.
<b>Filtración estéril para obtener el toxoide pertúsico purificado en solución (0,22 µm) (paso 22)</b>	Se realiza una prueba de carga biológica antes de la prueba de filtración estéril. El paso de filtración estéril está controlado por: - los datos de validación (vea 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso) - una prueba de liberación.	La filtración estéril del PTxd en solución se realiza para obtener un producto estéril antes del paso de adsorción en hidróxido de aluminio.
<b>Filtración estéril para obtener FHA purificada en solución (0,22 µm) (paso 15')</b>	Se realiza una prueba de carga biológica antes de la prueba de filtración estéril. El paso de filtración estéril está controlado por: - los datos de validación (vea 3.2.S.2.5 Validación y/o evaluación del proceso) - una prueba de liberación.	La filtración estéril de la FHA en solución se realiza para obtener un producto estéril antes del paso de adsorción en hidróxido de aluminio.

La estabilidad del PTxd purificado adsorbido (final del paso 24b) durante el almacenamiento se controla por el tiempo y la temperatura, con el fin de evitar la degradación. El estudio de estabilidad se presenta en 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones sobre la estabilidad.

La estabilidad de la FHA purificada adsorbida (final del paso 17') durante el almacenamiento se controla por el tiempo y la temperatura, con el fin de evitar la degradación. El estudio de estabilidad se presenta en 3.2.S.7.1 Resumen y conclusiones sobre la estabilidad.





### 3 Intermedios

Los intermedios involucrados en la elaboración de la vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes (toxoides pertúsicos purificados adsorbidos (PTxd) y FHA purificada adsorbida) son los siguientes:

- FHA purificada nativa,
- FHA purificada en solución,
- toxina pertúsica purificada nativa,
- toxoide pertúsico purificado en solución.

Cada intermedio se somete a las pruebas de control de calidad que se especifican a continuación.

#### 3.1 Especificaciones

Las especificaciones de los intermedios se presentan más adelante, de la Tabla 2 a la Tabla 5 del presente documento.

**Tabla 2: Especificaciones para la FHA purificada nativa**

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Contenido proteico	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Según Ph. Eur. 2.5.16 , edición actual (método de Lowry/espectrofotometría a 760 nm)	Para cálculo
SDS-PAGE	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.2.31, edición actual Electroforesis en condiciones de reducción	Perfil electroforético comparable con el perfil de la referencia
Identificación de la FHA	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método de difusión doble de Ouchterlony en gel	Positivo
Actividad de agrupamiento en células CHO	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Observación del efecto citopático de la FHA purificada nativa sobre las células CHO	Sin efecto citopático
Actividad de hemaglutinación	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Según Ph. Eur. 1356, edición actual Actividad de hemaglutinación contra glóbulos rojos de ganso	200 000 a 2 500 000 UHA/mg de proteínas IHA con colesterol $\geq$ 80 %

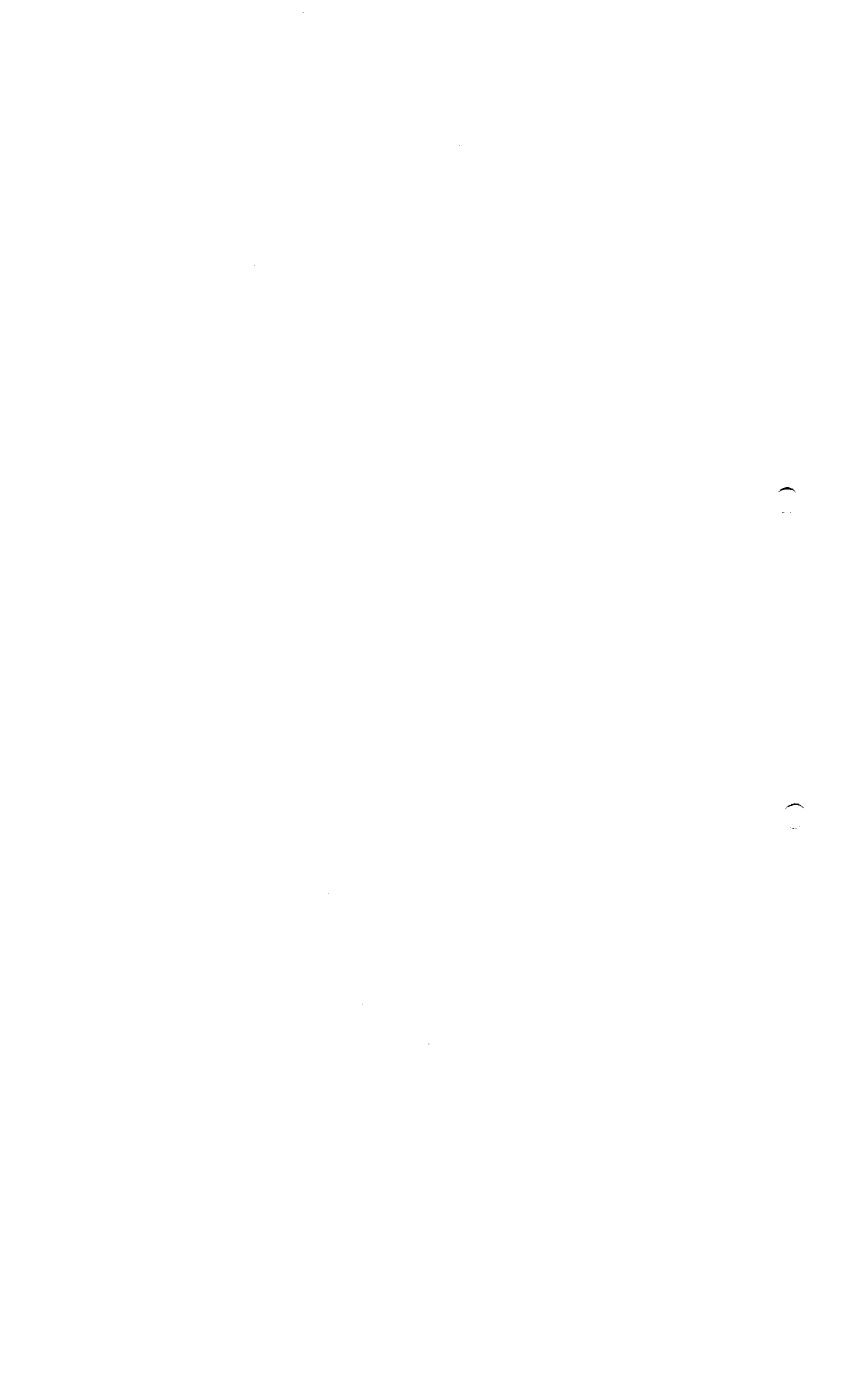


Tabla 3: Especificaciones para la FHA purificada en solución

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Contenido proteico	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Según Ph. Eur. 2.5.16, edición actual (método de Lowry/espectrofotometría a 760 nm)	350 a 2 100 µg/mL
Antigenicidad	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual método ELISA	Actividad específica (UE/mg de proteínas) ≥ límite de confianza inferior (P = 0,95) de la actividad específica de los lotes de producción
Contenido de endotoxinas	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.6.14, edición actual Prueba de cinética cromogénica	≤150 UI/mg de proteína

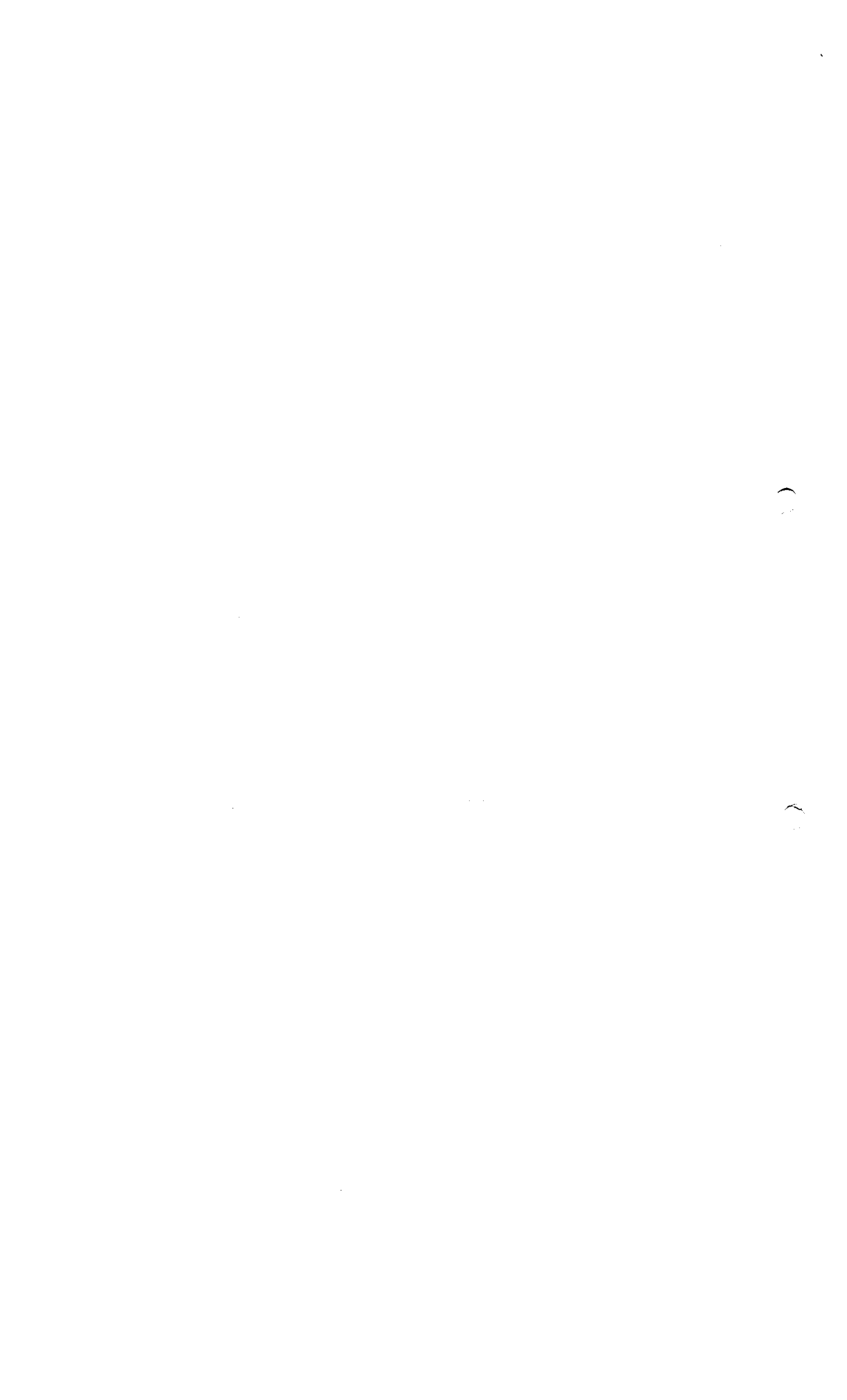
00  
MAY 24 2011  
FOLIO 71  
MONTMILONE

Tabla 4: Especificaciones para la toxina pertúsica purificada nativa

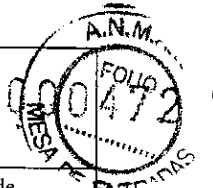
Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Contenido proteico	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Según Ph. Eur. 2.5.16, edición actual (método de Lowry/espectrofotometría a 760 nm)	Para cálculo
SDS-PAGE	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.2.31, edición actual Electroforesis en condiciones de reducción	Perfil electroforético comparable con el perfil de la referencia Posible presencia de banda complementaria de FHA aceptable si representa menos del 2 % de las proteínas totales
Identificación de la toxina pertúsica	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Método de difusión doble de Ouchterlony en gel	Positivo
Actividad de agrupamiento en células CHO	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Observación del efecto citopático de la toxina pertúsica purificada nativa en células CHO	Actividad citopática (CPU/µg de proteína) ≥ límite de confianza inferior (P = 0,95) de actividad citopática de la referencia
Actividad de hemaglutinación	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Según Ph. Eur. 1356, edición actual Actividad de hemaglutinación contra glóbulos rojos de ganso	20 000 a 500 000 UHA/mg de proteínas IHA con colesterol ≤ 20 %

Tabla 5: Especificaciones para el toxoide pertúsico purificado en solución

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Contenido proteico	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Según Ph. Eur. 2.5.16, edición actual (método de Lowry/espectrofotometría a 760 nm)	50 a 180 µg/mL
Contenido de glutaraldehído residual	Ph. Eur. 1934, edición actual	Espectrofotometría a 482 nm	<8 µg/mL



Irreversibilidad del toxoide pertúsico a +5 °C ± 3 °C o a +37 °C ± 2 °C	Ph. Eur. 1934	Según Ph. Eur. 1356, edición actual Actividad de sensibilización a la histamina en ratones	≥95 % de vida
Antigenicidad	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual método ELISA	Actividad específica (UE/mg de proteínas) ≥ límite de confianza inferior (P = 0,95) de la actividad específica de los lotes
Contenido de endotoxinas	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Ph. Eur. 2.6.14, edición actual Prueba de cinética cromogénica	≤3 500 UI/mg de proteína
Actividad de agrupamiento en células CHO	Ph. Eur. 1934, edición actual TRS 878	Observación del efecto citopático del toxoide pertúsico purificado nativo sobre células CHO	Sin efecto citopático



### 3.2 Procedimientos analíticos

Para los procedimientos analíticos descritos en la Ph. Eur., se suministra la referencia y se mencionan detalles específicos, si corresponde.

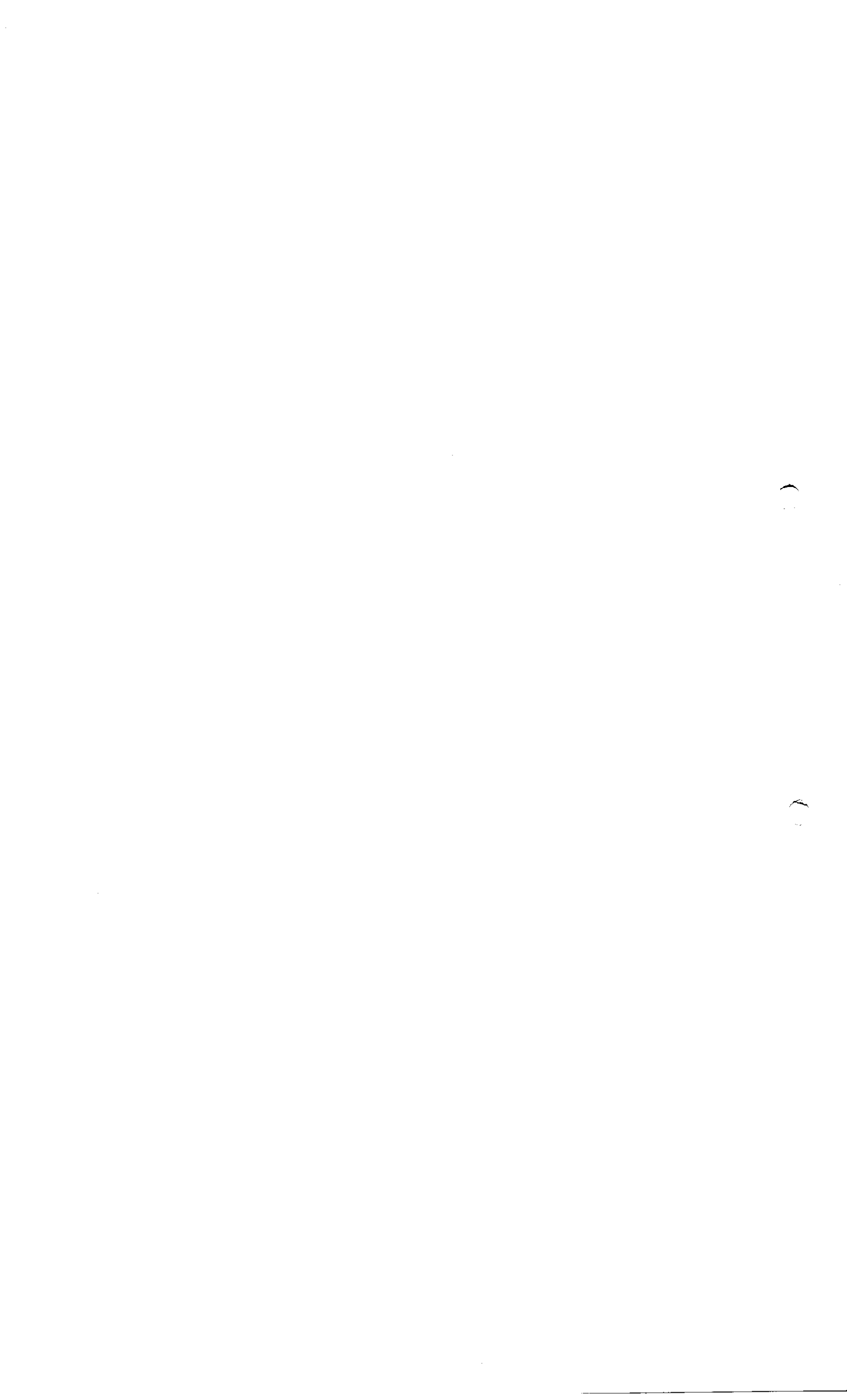
Para los procedimientos analíticos no descritos en la Ph. Eur., los métodos se resumen más adelante en este documento.

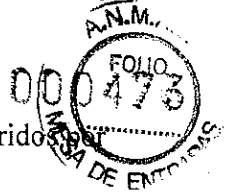
En la tabla 6, se proporciona un panorama de las pruebas realizadas en los intermedios.

Tabla 6: Panorama de las pruebas realizadas en los intermedios

Pruebas	FHA purificada nativa	Toxina pertúsica purificada nativa	FHA purificada en solución	Toxoide pertúsico purificado en solución
Contenido proteico	X	X	X	X
SDS-PAGE	X	X	/	/
Identificación	X	X	/	/
Actividad de agrupamiento en células CHO	X	X	/	X
Actividad de hemaglutinación	X	X	/	X
Antigenicidad	/	/	X	X
Contenido de endotoxinas	/	/	X	X
Contenido residual de glutaraldehído	/	/	/	X
Irreversibilidad del toxoide pertúsico a +5 °C ± 3 °C o a +37 °C ± 2 °C	/	/	/	X

Los métodos analíticos para las pruebas realizadas en los intermedios se proporcionan a continuación.





### 3.2.1 Contenido proteico

El método se basa en la Ph. Eur. monografía 2.5.16 (proteínas en las vacunas de polisacárido) y el método de Lowry).

#### Principio

La adición de una sal de cobre en un medio alcalino, seguida por reactivo de Folin CIOCALTEU, a una solución de proteínas produce un color azul oscuro, su intensidad se mide por espectrofotometría a 760 nm.

#### Equipo

- Equipo estándar de laboratorio.
- Espectrofotómetro para UV visible.

*Reactivos (las cantidades son indicativas y se pueden multiplicar o dividir por un factor determinado si es necesario)*

- NaOH 0,1 N
- Carbonato de sodio al 2 % p/v (reactivo A):

Carbonato de sodio anhidro.....	40 g
Agua purificada .....	400 mL
NaOH.....	8 g
Agua purificada .....	hasta 2000 mL

Conservar a temperatura ambiente

- Sulfato de cobre al 1 % p/v en agua purificada

Conservar a temperatura ambiente

- Tartrato de sodio al 2 % p/v en agua purificada

Conservar a +5 °C ± 3 °C

- Reactivo B:

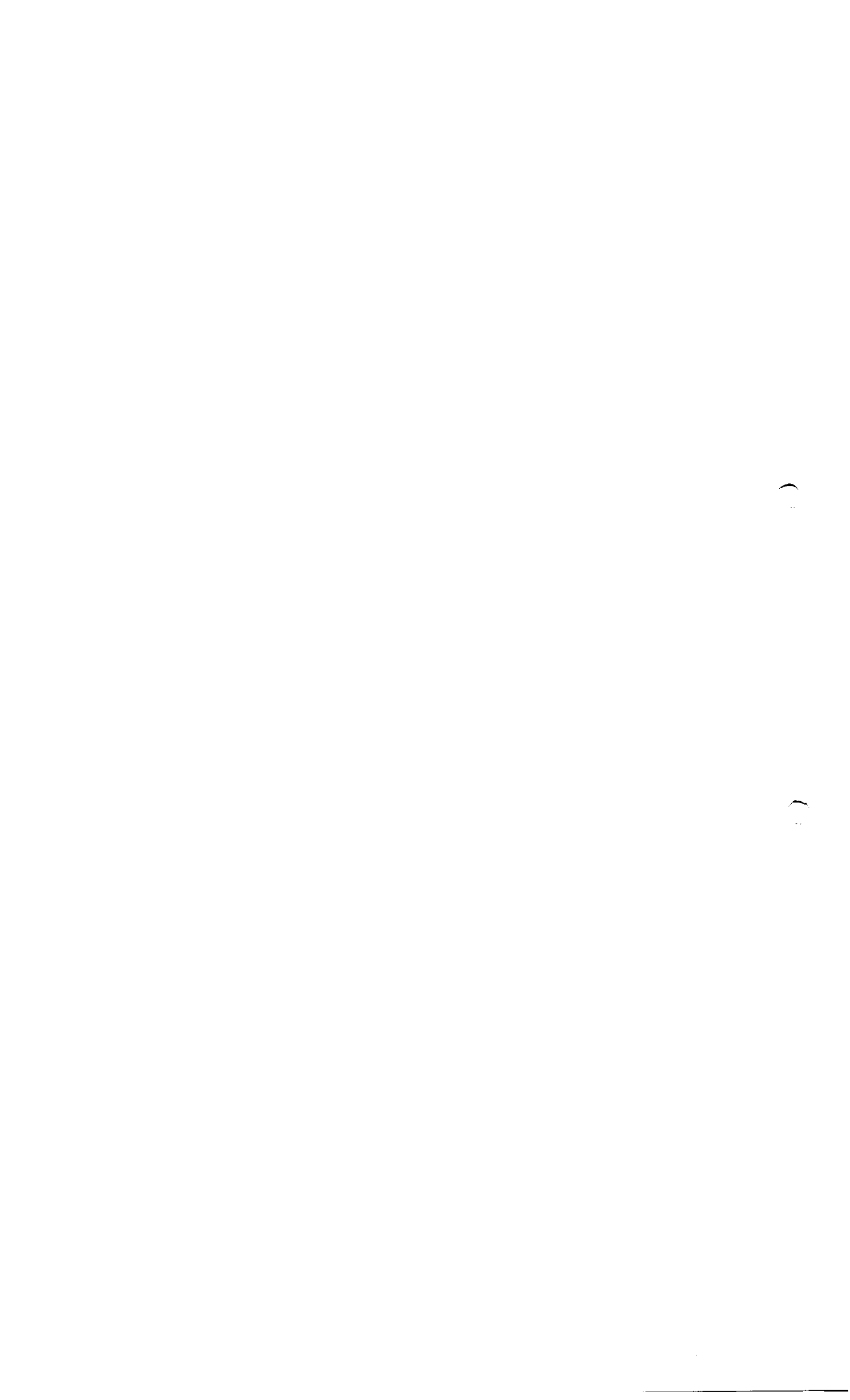
Sulfato de cobre al 1 % + tartrato de sodio al 2 % que se mezclarán extemporáneamente en volúmenes iguales.

Conservar a temperatura ambiente

- Reactivo C: solución alcalina de cobre

50 volúmenes del reactivo A para 1 volumen del reactivo B. Mezclar. Preparar justo antes de usarlo.

- Reactivo Folin CIOCALTEU: el reactivo puro se conserva a +5 ± 3 °C. Se diluirá extemporáneamente a 1/2 en agua purificada.
- Solución estándar de referencia de albúmina a razón de 1 g/L en NaOH 0,1 N



Conservar a -20 °C.

- Solución estándar de referencia de trabajo de albúmina para el rango de calibración (preparar justo antes de usarla)

- *Solución estándar de referencia de trabajo n.º 1 a razón de 50 mg/L*

Solución estándar de referencia de albúmina a razón de 1 g/L ..... 1 mL

NaOH 0,1 N..... hasta 20 mL

- *Solución estándar de referencia de trabajo n.º 2 a razón de 200 mg/L*

Solución estándar de referencia de albúmina a razón de 1 g/L ..... 1 mL

NaOH 0,1 N..... hasta 5 mL

- Solución de control interno de albúmina

Preparar una solución de 80 mg/L en agua purificada de la solución de albúmina al 96 %.

Dividir en alícuotas y conservar a -20 °C.

**Procedimiento operativo**

**Rango de calibración**

	Control	1	2	3	4	5	6
Solución estándar de referencia de trabajo de albúmina (1) mL	/	0,1	0,2	0,4	/	/	/
Solución estándar de referencia de trabajo de albúmina (2) mL	/	/	/	/	0,15	0,2	0,25
NaOH 0,1 N mL	0,4	0,3	0,2	/	0,25	0,2	0,15
Reactivo C mL	2	2	2	2	2	2	2
Mezclar y conservar 10 min. a temperatura ambiente							
Reactivo de Folin 1/2 mL	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Mezclar invirtiendo los tubos.							
Conservar 30 min. a temperatura ambiente en la oscuridad. La coloración es estable durante 60 minutos.							
Albúmina (µg en la muestra de prueba)	0	5	10	20	30	40	50

**Solución de control interno**

Realizar dos análisis comenzando con muestras de prueba de 0,1 mL y 0,4 mL.

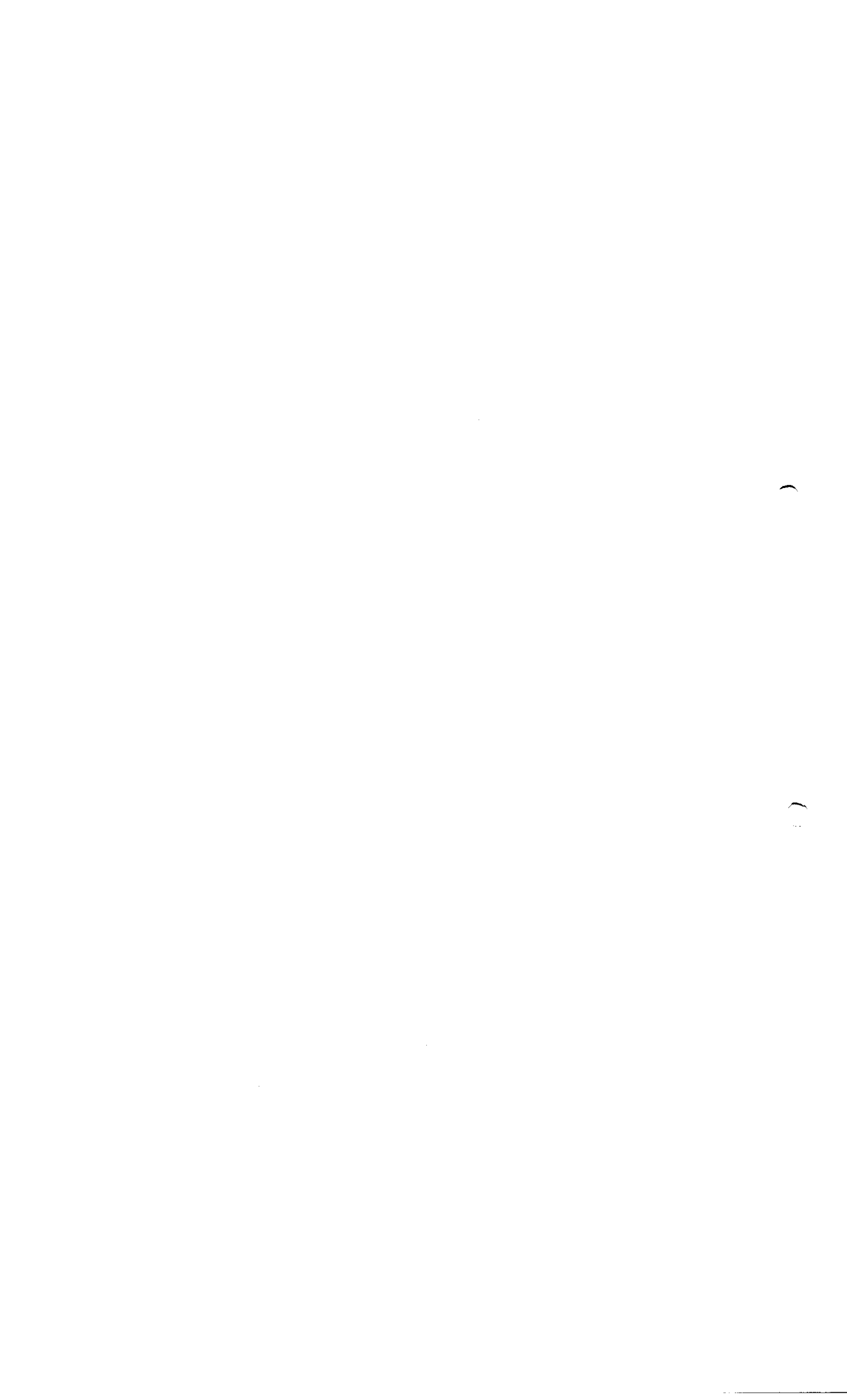
**Muestras**

Tomar 4 muestras de prueba  $x \leq 0,40$  mL con el fin de obtener de 5 a 50 µg de proteínas. Aforar a 0,40 mL con NaOH 0,1 N.

**Lectura, cálculo, resultados**

Grafique la curva de calibración. Mida la DO de cada tubo por fotometría a 760 nm contra el control. Usando la curva de calibración, reste la cantidad A de proteína (µg/TS) de la DO de la muestra de prueba.





### *Criterios de validez*

La prueba se considera válida si:

- El valor del control interno (promedio de dos pruebas) se encuentra dentro de los límites determinados por el gráfico de control de calidad;
- La desviación relativa entre dos pruebas de la misma muestra es menor o igual que 15 %;
- El valor de cada muestra analizada (promedio de cuatro determinaciones) se debe encontrar dentro de los límites de aceptabilidad permitidos para el producto.



### **3.2.2 SDS-Page**

Esta prueba se aplica conforme a los requisitos de la Ph. Eur. 2.2.31 (electroforesis en condiciones de reducción).

### **3.2.3 Identificación de la FHA y de la toxina pertúsica**

#### *Principio*

Los antígenos y los anticuerpos homólogos se difunden en gel de agarosa. Durante la difusión, se forman gradientes de concentración. Si los antígenos y los anticuerpos se encuentran en concentraciones relativas óptimas se forma una línea de precipitación.

#### *Equipo*

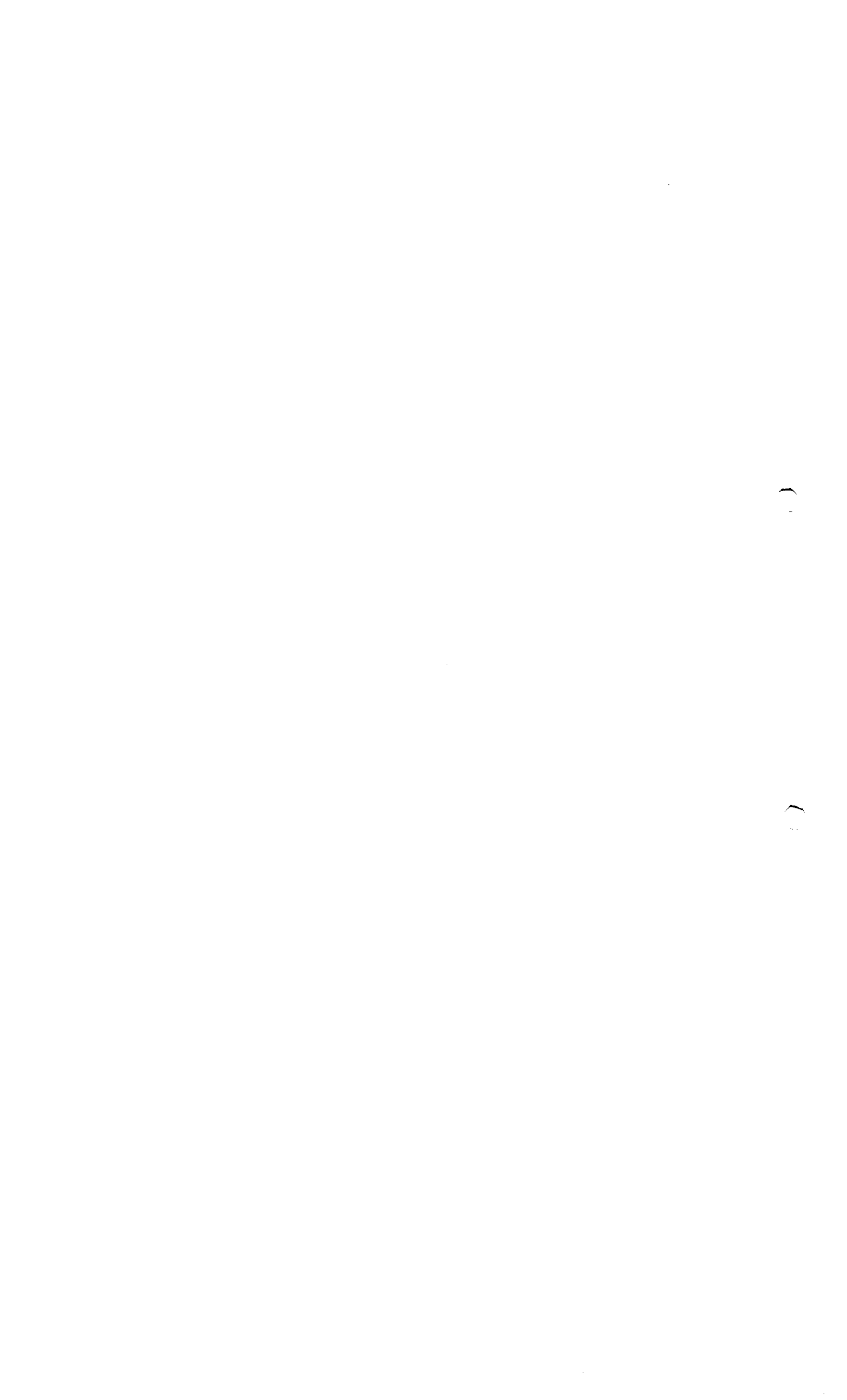
- Equipo estándar de laboratorio.
- Mesa nivelada.
- Cámara húmeda.
- Tanques de tinción/eliminación de tinte.
- Película de agarosa.

#### *Reactivos*

- Antígenos estándar de referencia:
  - Toxina pertúsica purificada nativa,
  - FHA purificada nativa.
- Antisueros específicos:
  - suero anti-FHA (caprino),
  - suero antitoxina pertúsica (caprino),

#### *Procedimiento operativo*

- Preparación de las muestras
  - Estándar de referencia: las referencias se diluyen en un tampón de Tris-Barbital con un pH = 9,2 (diluido a 1/2). Las diluciones correctas se determinan durante la cualificación de cada referencia.



- **Antisueros:** los antisueros se diluyen en un tampón de Tris-Barbital con un pH = 9,2 (diluido a 1/2). Las diluciones correctas se determinan durante la cualificación de cada antisuero.
- **Muestras analizadas:** las muestras se diluyen en un tampón de Tris-Barbital con un pH = 9,2 (diluido a 1/2) a razón de 500 µg/mL de proteínas para la FHA purificada nativa y de 60 µg/mL de proteínas para la PT purificada nativa.



- Realización de la prueba

Las muestras (estándares de referencia, muestras analizadas y antisueros) se cargan en el gel de agarosa y se deja que se difundan durante entre 12 y 24 horas a temperatura ambiente.

El gel se lava con solución de cloruro de sodio, se enjuaga con agua purificada ultrafiltrada, se presiona entre varias capas de papel absorbente bajo un peso de alrededor de 1 kg durante al menos 4 horas y se seca.

Luego el gel se tiñe con solución de tinción de Coomassie y se destiñe usando una solución de ácido acético y metanol.

**Lectura, cálculo, resultados**

Las muestras analizadas y los sueros homólogos deben formar una línea de precipitación idéntica a la de los antígenos de referencia.

**Criterios de validez**

- Presencia de una línea de precipitación entre el estándar de referencia y su antisuero homólogo.
- Ausencia de una línea parásita entre el estándar de referencia y un antisuero no homólogo.
- Ausencia de cualquier línea parásita sobre la línea de interés.

### 3.2.4 Actividad de agrupamiento en las células CHO

**Principio**

La actividad específica de la toxina nativa se estudia en células CHO y se cuantifica en unidades formadoras de grupos por µg de proteínas.

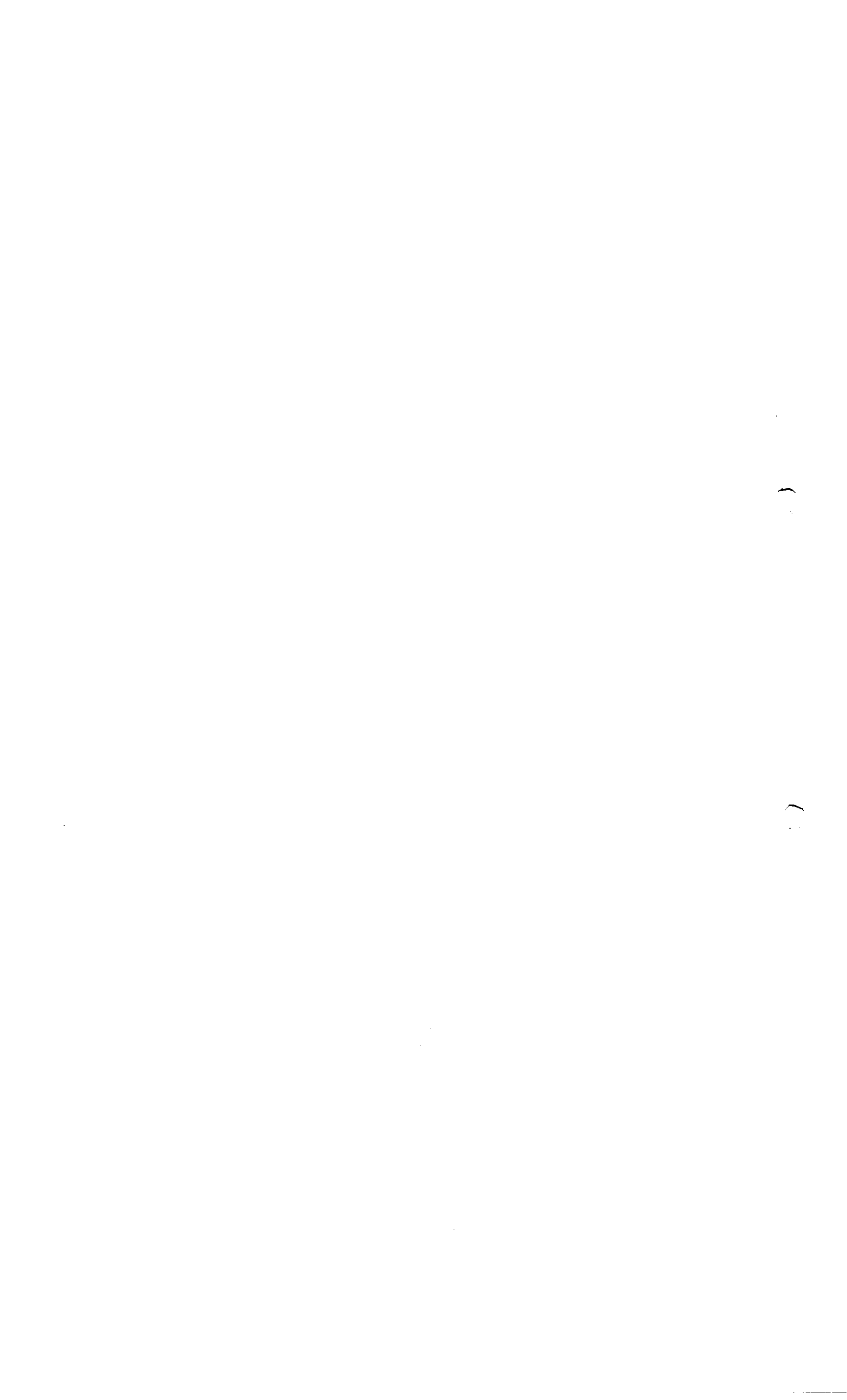
La FHA y el toxoide pertúsico no producen agrupamientos en las células CHO.

**Equipo**

Equipo estándar para laboratorio de virología.

**Reactivos**

- Células
  - Cepa ATCC CCL61 de CHO K1.
- Medios:
  - Medio Ham F12 con L-glutamina, gentamicina, bicarbonato y suero fetal de ternero,
  - Tampón de carbonato Tween (CTW): tampón de carbonato Tween con un pH de 9,6,





- Metanol absoluto,
- Tinte de Giemsa,
- Tripsina.
- Reactivos críticos
  - Control positivo: referencia internacional, referencia interna,
  - Control negativo: referencia interna.

#### *Procedimiento operativo*

- Preparación de las células CHO

Descongele las células CHO y después de lavarlas, siémbrelas en un matraz de 75 cm<sup>2</sup> (o de 175 cm<sup>2</sup>) en medio de Ham F12 con suero fetal de ternero.

Incubar durante 48 a 72 horas a 36 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 %.

- Dilución y siembra de las microplacas

- Reactivos

- Control de validez de la toxina pertúsica nativa: diluir en CTW para obtener 20 µg/mL. A partir de esta dilución de inicio, diluir en CTW para obtener soluciones de toxinas de 0,2 µg/mL.

- Control de validez de la FHA: diluir en PBS para obtener 200 µg/mL.

- Control de validez del toxoide pertúsico: diluir en PBS para obtener 100 µg/mL.

- Lotes para análisis

- FHA purificada nativa: diluir en PBS para obtener 200 µg/mL.

- Toxina pertúsica purificada nativa: diluir en CTW para obtener 20 µg/mL y luego 0,2 µg/mL.

- Toxoide pertúsico purificado: diluir en PBS para obtener 100 µg/mL.

Distribuir 25 µL de medio de Ham F12 en cada pocillo de una microplaca y agregar 25 µL de las diluciones de inicio en el primer pocillo (la prueba se realiza por duplicado).

De la primera fila de pocillos, realizar dos diluciones dobles.

Agregar 50 µL de suspensión de células CHO (10<sup>5</sup> células/mL en medio de Ham F12 + FCS)

Incubar a 36 °C, en CO<sub>2</sub> al 5 % durante una hora, luego agregar 150 µL de medio de Ham F12 al 1% FCS (calentar previamente a 37 °C).

- Incubación

Las microplacas se incuban a 36 °C, en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 48 horas.

- Tinción

Tras la fijación con metanol (5 min.), las células se tiñen con solución de Giemsa (10 %) y se lavan con agua.



### **Lectura, cálculo, resultados**

Lectura en microscopio invertido.

La última dilución positiva es la última dilución que contenga un 100 % de agrupamientos.  
El título de la toxina se expresa en UPC/ $\mu$ g de proteínas.  
Una unidad corresponde a la cantidad mínima de toxina que induce un efecto de agrupamiento.

$$\frac{\text{1 unidad formadora de agrupamiento x última dilución positiva}}{\text{cantidad de proteína en el pocillo en nanog/25 } \mu\text{L}} \times 1000 = \text{X UPC/} \mu\text{g}$$

### **Criterios de validez**

Título de referencia dentro de los límites de confianza.  
Aspecto celular (ausencia de toxicidad celular, uniformidad).

### **3.2.5 Actividad de hemaglutinación**

Esta prueba se aplica conforme a los requisitos de la Ph. Eur. monografía n.º 1356 "*Pertussis vaccine - acellular, component, adsorbed*".

#### **Principio**

El método se basa en la cuantificación de los antígenos de la FHA y de la toxina pertúsica mediante la evaluación de su actividad de hemaglutinación frente a glóbulos rojos de ganso.

La prueba se realiza:

- con colesterol, para estimar la actividad de hemaglutinación de la toxina pertúsica,
- sin colesterol, para estimar la actividad de hemaglutinación de la toxina pertúsica y de la FHA.

#### **Equipo**

Equipo estándar de un laboratorio de cultivo celular.

#### **Reactivos**

- Tampones:
  - Solución de dextrosa gelatina veronal (DGV)
  - Solución salina tamponada con fosfato (PBS)
  - Tampón de carbonato Tween con pH básico (CTW)
- Solución de colesterol:
  - Solución madre: 2 mg/mL en alcohol etílico absoluto
  - Solución de trabajo: diluir extemporáneamente la solución madre en PBS a razón de 20  $\mu$ g/mL (1:100)
- Suspensión de glóbulos rojos de ganso:
  - Solución madre: al 7 % en tampón de DGV; no conservar durante más de una semana.
  - Solución de trabajo: diluir la solución madre 1:10 en PBS, pH 7,2



