



- **Estándares:**
  - Toxina pertúsica: estándar internacional o estándar interno
  - FHA: estándar interno

**Procedimiento operativo**

- Puntos generales

Cada muestra se debe titular por duplicado, con y sin colesterol.

Incluir un control negativo (PBS + glóbulos rojos) en cada placa de prueba.

Colocar en cada serie un estándar (interno o internacional)

- Preparación de las muestras

Diluir las muestras a las siguientes concentraciones proteicas:

- FHA: 500 µg/mL de proteínas en CTW, luego ajustar a 10 µg/mL en PBS.
- Toxina pertúsica: 500 µg/mL de proteínas en CTW, luego ajustar a 50 µg/mL en PBS.
- Distribución en placas de 96 pocillos
  - en una primera placa con colesterol (placa marcada (+)),
  - en una segunda placa sin colesterol (placa marcada (+)),

Distribuir 100 µL del producto diluido que se analizará por duplicado.

En las placas marcadas (+), distribuir 50 µL de solución de trabajo de colesterol (20 µg/mL) en cada pocillo vacío.

En las placas marcadas (-), reemplazar la solución de colesterol por PBS en cada pocillo vacío (50 µL por pocillo).

- Dilución de las muestras

Preparar diluciones dobles en serie.

- Adición de suspensión de glóbulos rojos

Distribuir 50 µL de suspensión de glóbulos rojos de ganso al 0,7 % en cada pocillo.

Sacudir las placas suavemente durante unos minutos.

Dejar las placas a temperatura ambiente durante una hora.

**Lectura, cálculo, resultados**

- Lectura

Hemaglutinación (+)

Hemaglutinación (-) microgránulo de glóbulos rojos

Anote el resultado n de cada producto (n = número de pocillos (+) para cada producto)

- Interpretación de los resultados



Calcular el título en unidades de hemaglutinación: UHA

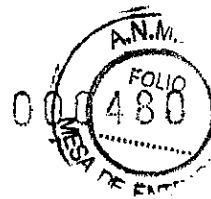
título (UHA/mL) =  $2^n \times 10 \times$  (dilución)

- Efecto inhibidor del colesterol en el producto:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{título sin colesterol} - \text{título con colesterol}}{\text{título sin colesterol}} \times 100$$

- Actividad específica (SA):

$$SA = \frac{\text{título sin colesterol}}{\text{título de las proteínas en mg/mL}}$$



#### Crterios de validez

Título del estándar incluido en los valores históricos.

Número de pocillos positivos menor que 10 pocillos.

### 3.2.6 Antigenicidad: titulación de la FHA y del toxoide pertúsico (PTxd) por ELISA

#### Principio

El método se basa en la reacción del antígeno (FHA o PTxd) con el anticuerpo ovino correspondiente (anti-FHA o antitoxina) unido a los pocillos de microtitulación. Luego se agrega a los pocillos un anticuerpo secundario (anticuerpo de ratón anti-FHA o anticuerpo de ratón antitoxina pertúsica).

A continuación, se agrega anticuerpo de cabra antirratón conjugado con fosfatasa alcalina, seguido por sustrato. La intensidad del color es proporcional a la concentración del antígeno (FHA o PTxd).

#### Equipo

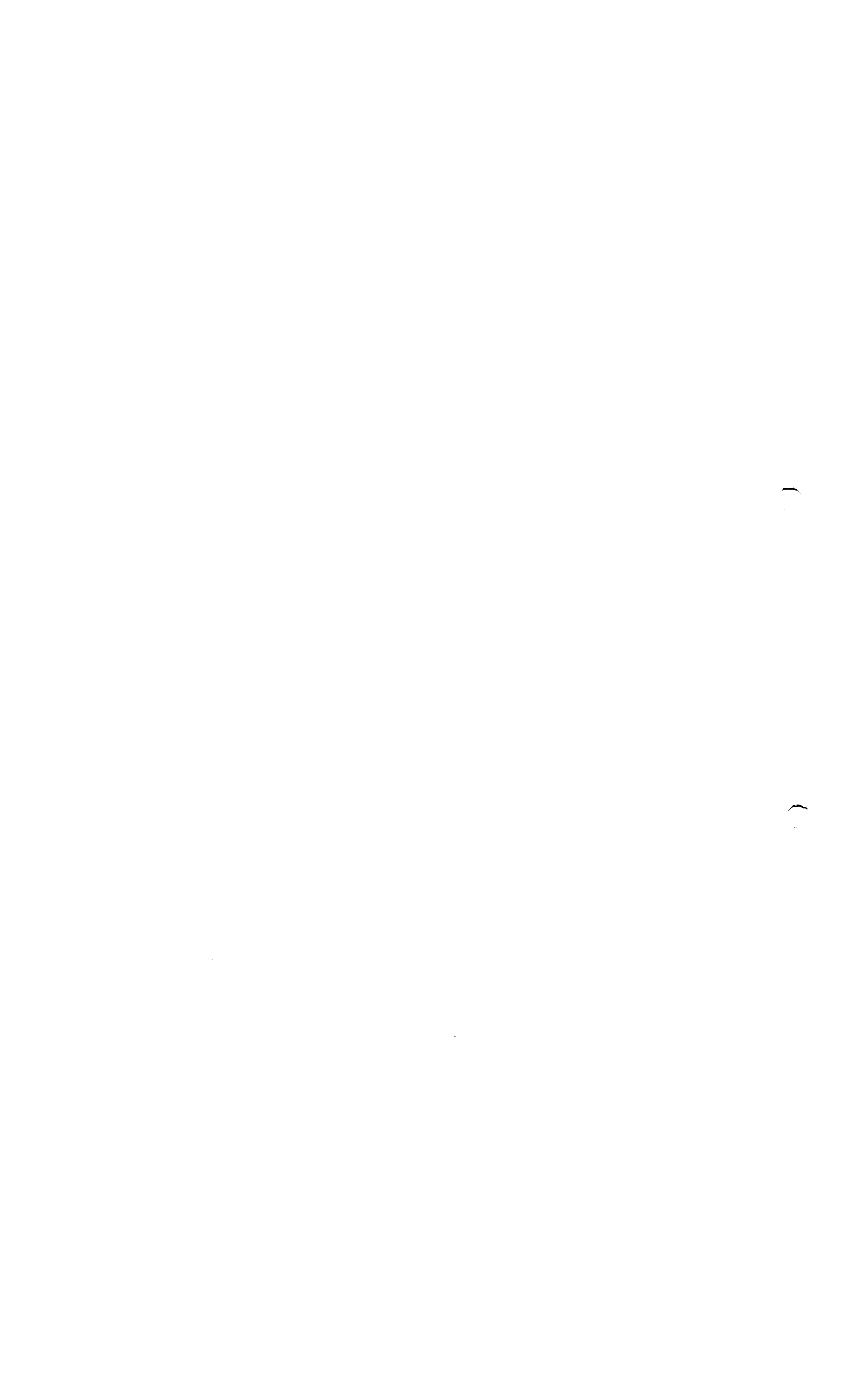
- Equipo estándar de laboratorio.
- Placas de microtitulación
- Incubadora a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
- Lavador de microplacas
- Lectora de microplacas

#### Reactivos

Los reactivos biológicos utilizados en la prueba de antigenicidad se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7: Reactivos usados en la prueba de antigenicidad

Reactivos	Titulación de la FHA	Titulación del PTxd
Anticuerpo de recubrimiento	Producción interna de suero de cabra anti-FHA	Suero de oveja antitoxina pertúsica (referencia internacional)



Reactivos	Titulación de la FHA	Titulación de la PT
Albúmina bovina	Solución de albúmina bovina al 10 % o dilución adecuada	Solución de albúmina bovina al 10 % o dilución adecuada
Antígeno estándar	FHA interna en solución	Toxoide pertúsico interno estabilizado en glicerol al 50 % v/v
Control positivo	FHA interna en solución	Toxoide pertúsico interno en solución
Anticuerpo secundario	Suero interno de ratón anti-FHA	Suero interno de ratón antitoxina
Conjugado	Fragmentos (Fab') <sub>2</sub> y Fc del anticuerpo de cabra antiratón etiquetado con fosfatasa alcalina	Fragmentos (Fab') <sub>2</sub> y Fc del anticuerpo de cabra antiratón etiquetado con fosfatasa alcalina
Sustrato cromogénico	pNPP (fosfato de p-nitrofenilo, disódico)	pNPP (fosfato de p-nitrofenilo, disódico)

### Procedimiento operativo

- Titulación ELISA

Las placas se lavan con tampón de PBS Tween entre cada uno de los pasos que se describen a continuación.

Las microplacas se recubren con anticuerpos diluidos con tampón de carbonato y se incuban durante la noche a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la FHA y durante una noche a  $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la PT.

Los pocillos se saturan con solución de tampón de fosfato-BSA durante una hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Se agregan los antígenos estándar, el control positivo y el producto sometido a prueba. Las microplacas se incuban durante 1,5 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Se agregan los anticuerpos secundarios y las microplacas se incuban durante 1,5 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Se agrega el conjugado y las microplacas se incuban durante 1,5 horas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

El complejo se realiza mediante la adición del sustrato cromogénico se incuban a temperatura ambiente ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 30 minutos.

La reacción se detiene con una solución de hidróxido de sodio.

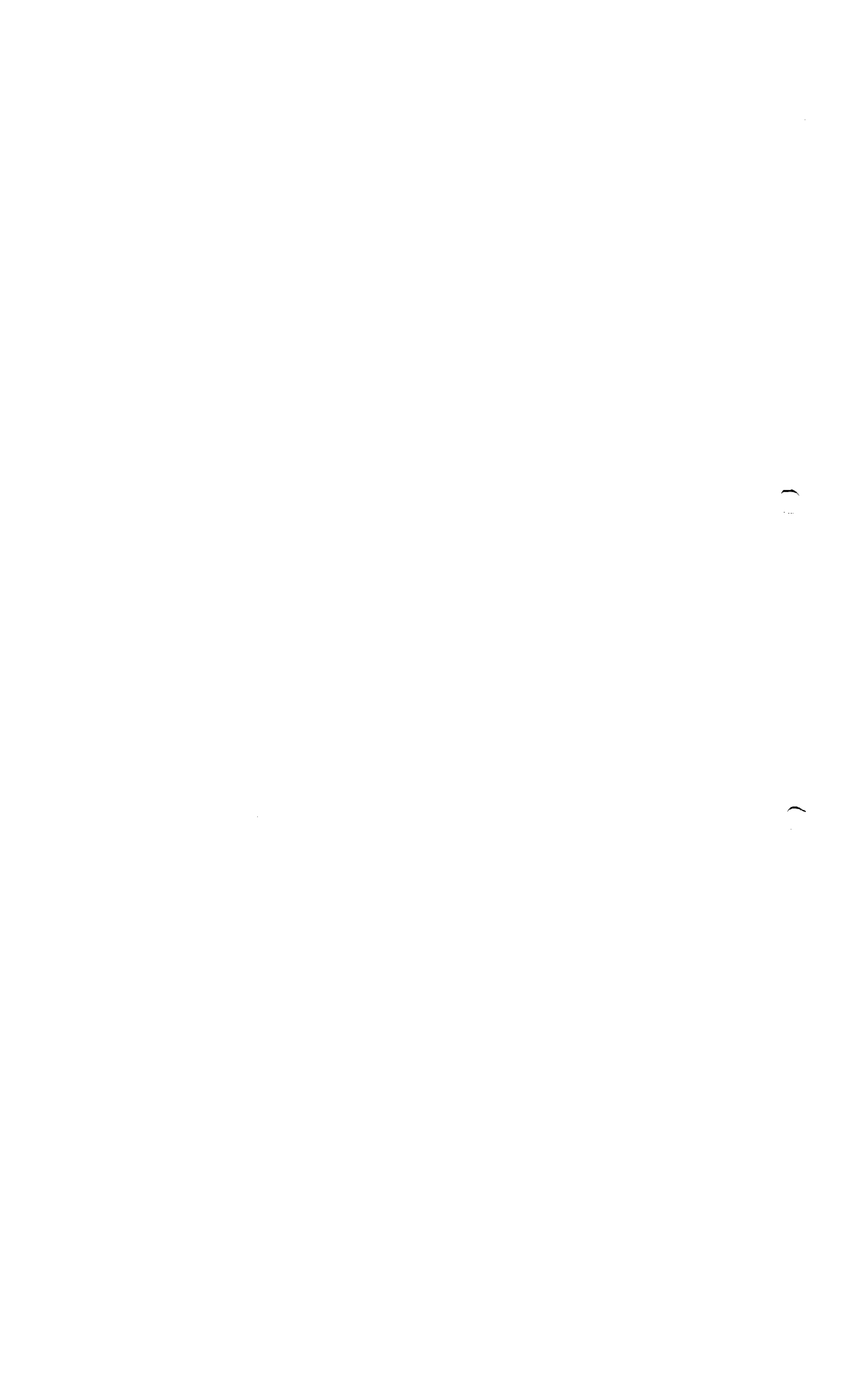
- Resultados

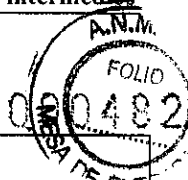
La absorbancia de cada pocillo se registra a 405 nm y a 620 nm. La curva de la absorbancia del antígeno estándar se grafica como función de la concentración del antígeno en UE/mL usando un programa de regresión lineal/logarítmica.

Los valores de la absorbancia y las diluciones correspondientes de las muestras se ingresan para que el programa calcule automáticamente las concentraciones. El título de la proteína de la muestra de prueba se toma en cuenta para que el título se exprese en UE/mg.

### Criterios de validez

Los criterios de validez se resumen en la tabla 8.





**Tabla 8: Criterios de validez aplicados a la prueba de antigenicidad**

Para la titulación de la FHA	Para la titulación del PTxd
El coeficiente de correlación de la curva de referencia no debe ser menor que 0,811 para un mínimo de 6 puntos y no debe ser menor que 0,878 para un mínimo de 5 puntos.	El coeficiente de correlación de la curva de referencia no debe ser menor que 0,754 para un mínimo de 7 puntos. Utilice las tablas de Fisher y Yates para menos de 7 puntos.
El título del control positivo interno en UE/mg se debe encontrar dentro de los límites de confianza superiores e inferiores definidos históricamente en 95 %.	Luego, el título de control positivo interno en UE/mg se debe encontrar dentro de los límites de confianza superiores e inferiores definidos históricamente en 99 %.
El valor de la pendiente estándar se debe encontrar dentro de los límites de confianza superiores e inferiores definidos en 99 %.	El valor de la pendiente estándar se debe encontrar dentro de los límites de confianza superiores e inferiores definidos en 99 %.
La densidad óptica (DO) del testigo no debe ser mayor que 0,2	La densidad óptica (DO) del testigo no debe ser mayor que 0,2
El coeficiente de variación de la concentración no debe ser mayor que el 30 %.	El coeficiente de variación de la concentración no debe ser mayor que el 30 %.

**3.2.7 Contenido de endotoxinas**

Esta prueba se realiza de acuerdo con Ph. Eur 2.6.14 “Bacterial endotoxins” (ensayo LAL, método de cinética cromogénica).

**3.2.8 Contenido de glutaraldehído residual**

*Principio*

El glutaraldehído (GTA) produce un color amarillo con un fenol al 20 % en etanol y ácido sulfúrico concentrado. La intensidad de este color, que es proporcional a la concentración de GTA, se puede medir utilizando un espectrofotómetro a 482 nm.

*Equipos*

- Equipo estándar de laboratorio.
- Espectrofotómetro.

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

- Ácido sulfúrico concentrado
- Solución de fenol de aproximadamente el 20 % en etanol puro

Fenol ..... 2,1 mL  
Etanol puro ..... hasta 10 mL

Prepare inmediatamente antes de usarla.

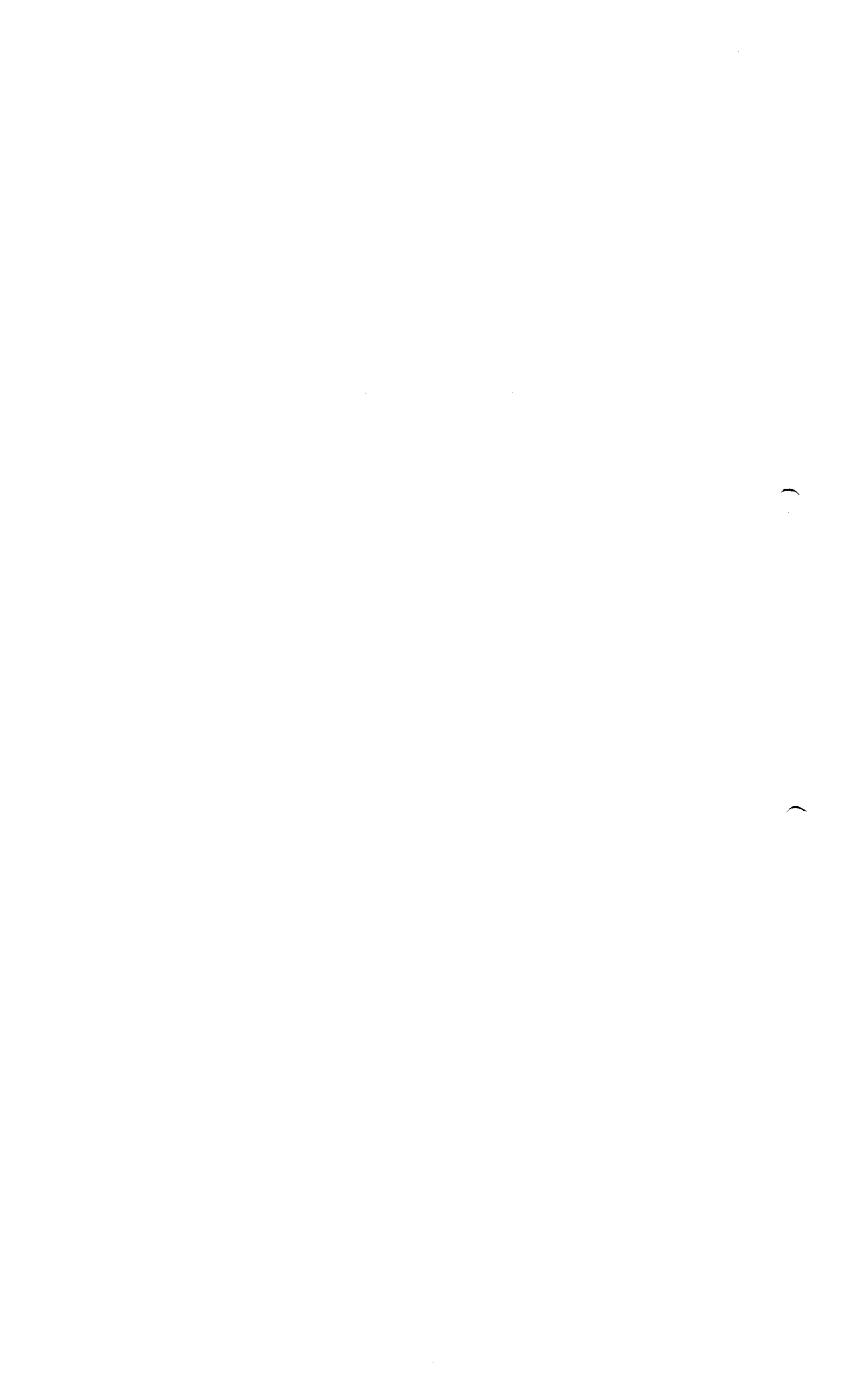
- Solución de referencia primaria de glutaraldehído (25 %)

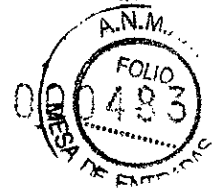
GTA al 25 %

Conserve a <-20 °C. No congele.

ROXANA MONTEILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





- Solución de referencia secundaria de glutaraldehído (40 µg/mL)  
Prepare diluciones en serie de la solución primaria al 25 %.

- Solución ① (dilución 1/50)

Solución primaria al 25 % ..... 0,5 mL  
Agua purificada ..... hasta 25 mL

- Solución ② (dilución 1/25)

Solución ① ..... 1 mL  
Agua purificada ..... hasta 25 mL

- Solución ③ (dilución 1/5)

Solución ② ..... 4 mL  
Agua purificada ..... hasta 20 mL

**Procedimiento operativo**

- Diluciones previas para la curva estándar

Tubos	1	2	3	4	5
40 µg/mL de solución estándar (mL)	0,5	1	1,5	2	2,5
Agua purificada	Hasta 10 mL				
GTA (µg/mL)	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0

Realice 4 pruebas por muestra.

Realice una carga adicional: producto puro (150 µL) + dilución 8 µg/mL

- En los tubos, introduzca:

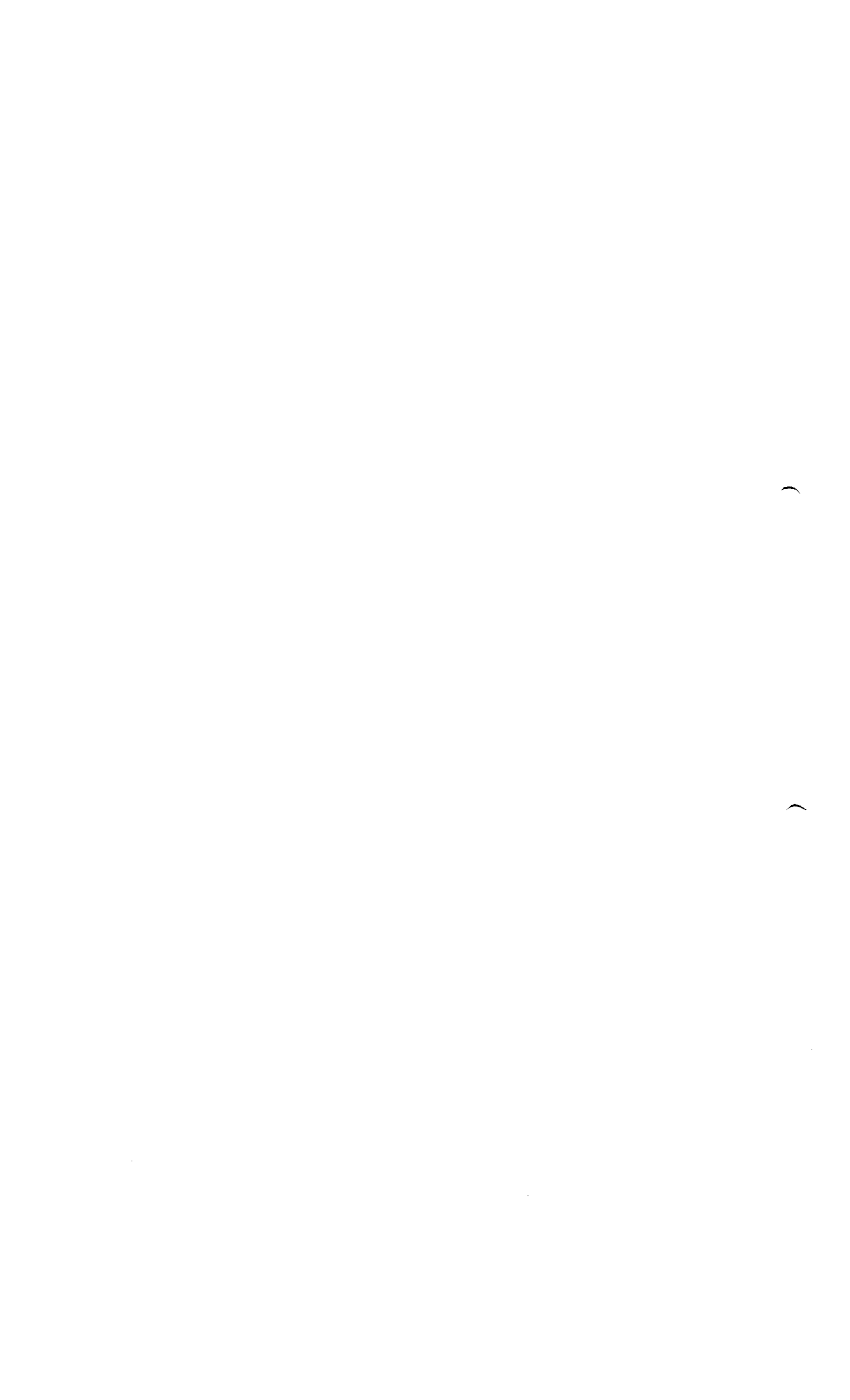
	Control	1	2	3	4	5	Ensayo
Diluciones	-	300	300	300	300	300	-
Agua purificada	300	-	-	-	-	-	-
Muestra	-	-	-	-	-	-	150
Dilución 8 µg/mL (tubo 4) (µL)	-	-	-	-	-	-	150
Fenol al 20 % (µL)	40	40	40	40	40	40	40
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 96% (µL)	750	750	750	750	750	750	750
GTA (µg/mL)	-	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	a

Homogeneice. Enfríe. Tome la lectura de cada tubo a 482 nm en contraste con agua purificada.

**Lectura, cálculos, resultados**

Reste la densidad óptica del control de cada densidad óptica.

Trace la línea de regresión lineal, DO = f (glutaraldehído µg/mL).



Mida la densidad óptica de cada muestra. Deduzca la concentración de glutaraldehído de la muestra.

Los resultados se expresan:

Concentración de GTA ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) = [prueba de carga adicional ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) - carga adicional teórica ( $4\mu\text{g}/\text{mL}$ )]  $\times$  2

donde 2: factor de dilución

#### *Criterios de validez*

- El coeficiente de correlación de la curva estándar no es menor que 0,990
- La desviación estándar relativa entre los ensayos es menor que el 10 %
- La recuperación entre la carga adicional y el valor teórico es de entre el 80 % y el 120 %.

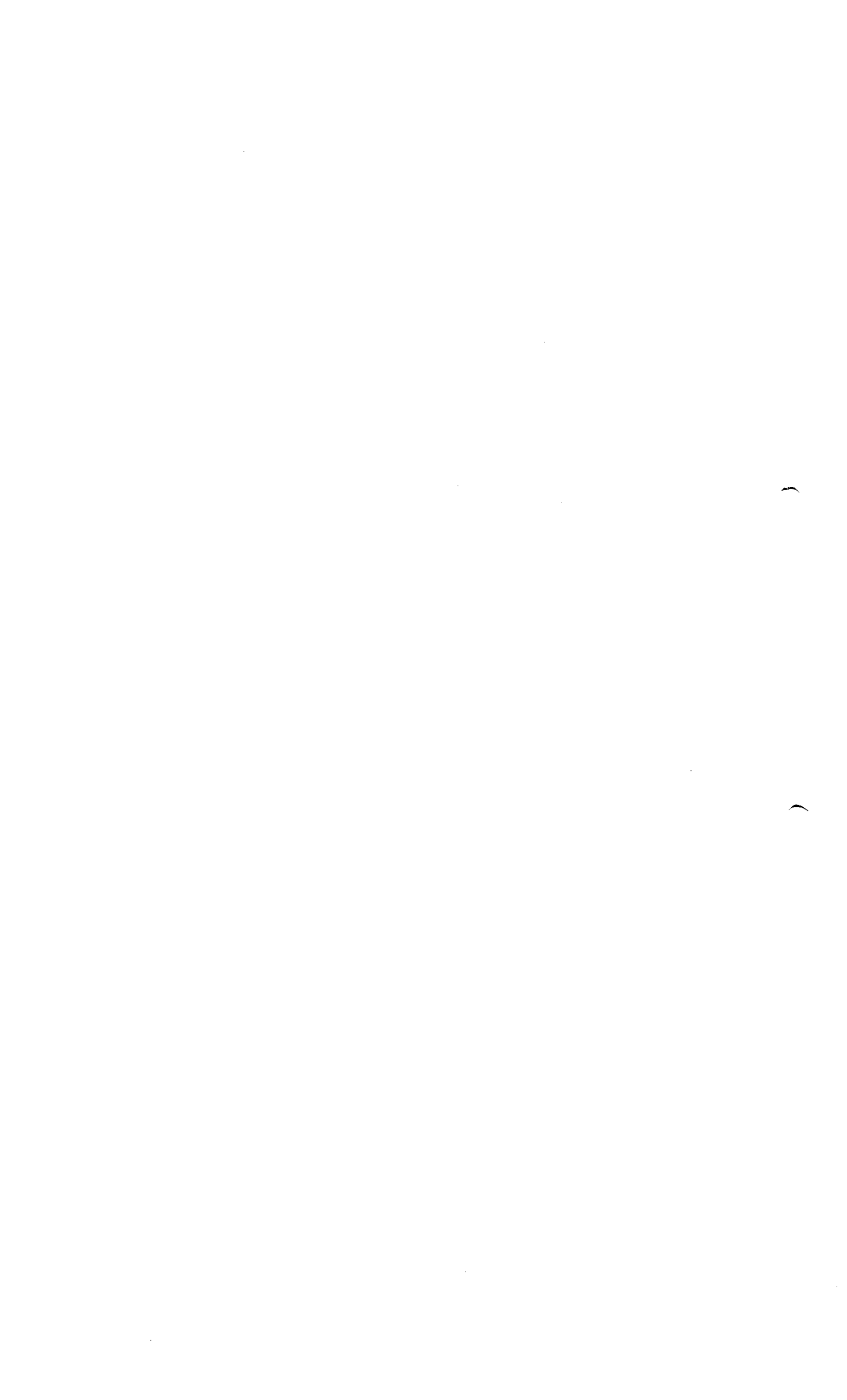
El límite de cuantificación es 2,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (primer punto de la curva estándar).

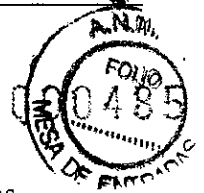
#### **3.2.9 Prueba de irreversibilidad para el toxoide pertúsico**

Esta prueba se realiza de acuerdo con la monografía 1356 de la Ph. Eur. (vacuna contra la tos ferina, de componentes acelulares, adsorbida).

La irreversibilidad del toxoide pertúsico se realiza en el toxoide pertúsico purificado adsorbido en solución y la ausencia de toxina pertúsica residual (actividad de sensibilización a la histamina) se realiza en el producto final a granel (vea 3.2.P.5.2 Procedimientos analíticos).







### 3.3 Validación de los procedimientos analíticos

Los resultados de la validación se suministran para las pruebas utilizadas para liberar los intermedios y que no se describen en la Ph. Eur:

- Identificación de la FHA y del toxoide pertúsico.
- Actividad de agrupamiento en células CHO.
- Actividad de hemaglutinación.
- Antigenicidad: titulación del toxoide pertúsico y de la FHA por el método ELISA
- Contenido de glutaraldehído residual.

La validación se realizó de acuerdo con ICH Q2 (R1) "Validation analytical procedures: text and methodology" (Procedimientos analíticos de validación: texto y metodología").

#### 3.3.1 Identificación de la FHA y de la toxina pertúsica

##### 3.3.1.1 Principio

El antígeno y el anticuerpo se difunden en gel de agarosa. Durante la difusión, se forman gradientes de la concentración y, si el antígeno y el anticuerpo se unen en concentraciones relativas óptimas, se forma una línea de precipitación.

Debido a que el método es una prueba cualitativa y de identificación, la única característica estudiada es la especificidad.

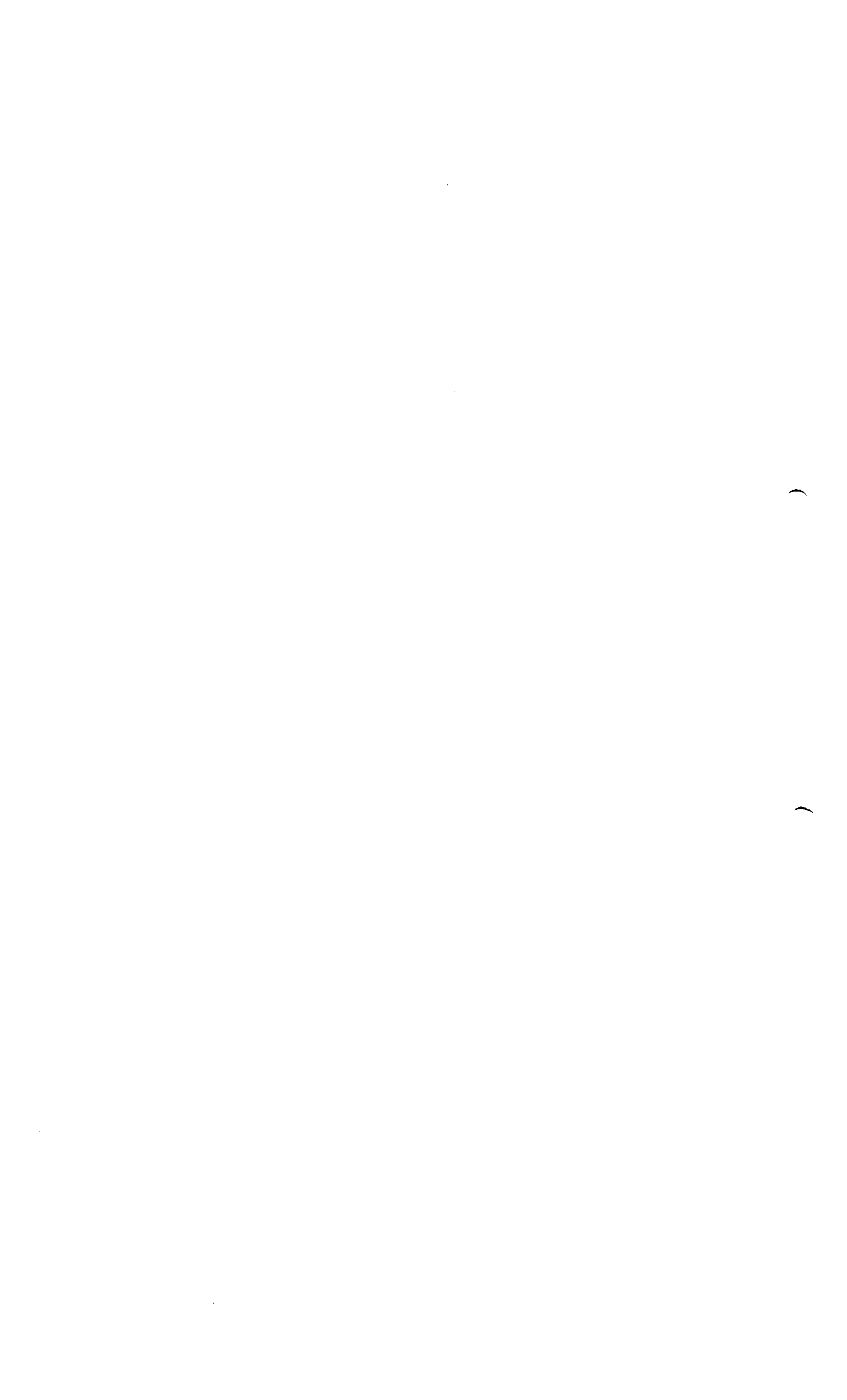
##### 3.3.1.2 Especificidad

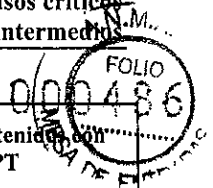
El antisuero de la FHA y el antisuero de la PT se analizaron contra su referencia estándar homóloga y contra los antígenos heterólogos.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 9.

**Tabla 9: Resultados de validación obtenidos sobre la especificidad para los antisueros de la FHA y de la PT**

Antígeno	Resultados obtenidos con anti-FHA	Resultados obtenidos con anti-PT
Toxina pertúsica	Negativo	Positivo
FHA	Positivo	Negativo
Toxoide tetánico	Negativo	Negativo
Toxoide diftérico	Negativo	Negativo
Vacuna Typhim	Negativo	Negativo
Vacuna contra la <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	Negativo	Negativo





Antígeno	Resultados obtenidos con anti-FHA	Resultados obtenidos con anti-PT
Vacuna contra la poliomielitis	Negativo	Negativo
Vacunas contra la rabia	Negativo	Negativo
Inmunoglobulina antirrábica (humana)	Negativo	Negativo
Vacuna contra la gripe	Negativo	Negativo
Vacuna contra la hepatitis A	Negativo	Negativo
Vacuna contra la hepatitis B	Negativo	Negativo
Vacuna contra el sarampión, la parotiditis y la rubéola	Negativo	Negativo

### 3.3.1.3 Conclusión

Para cada antisuero analizado, la única línea de precipitación se obtiene con el estándar de referencia homólogo. Ninguna línea de precipitación se obtiene con antígenos heterólogos.

El método de Ouchterlony es válido para identificar los antígenos de la PT y FHA en la etapa purificada nativa.

### 3.3.2 Actividad de agrupamiento en células CHO

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

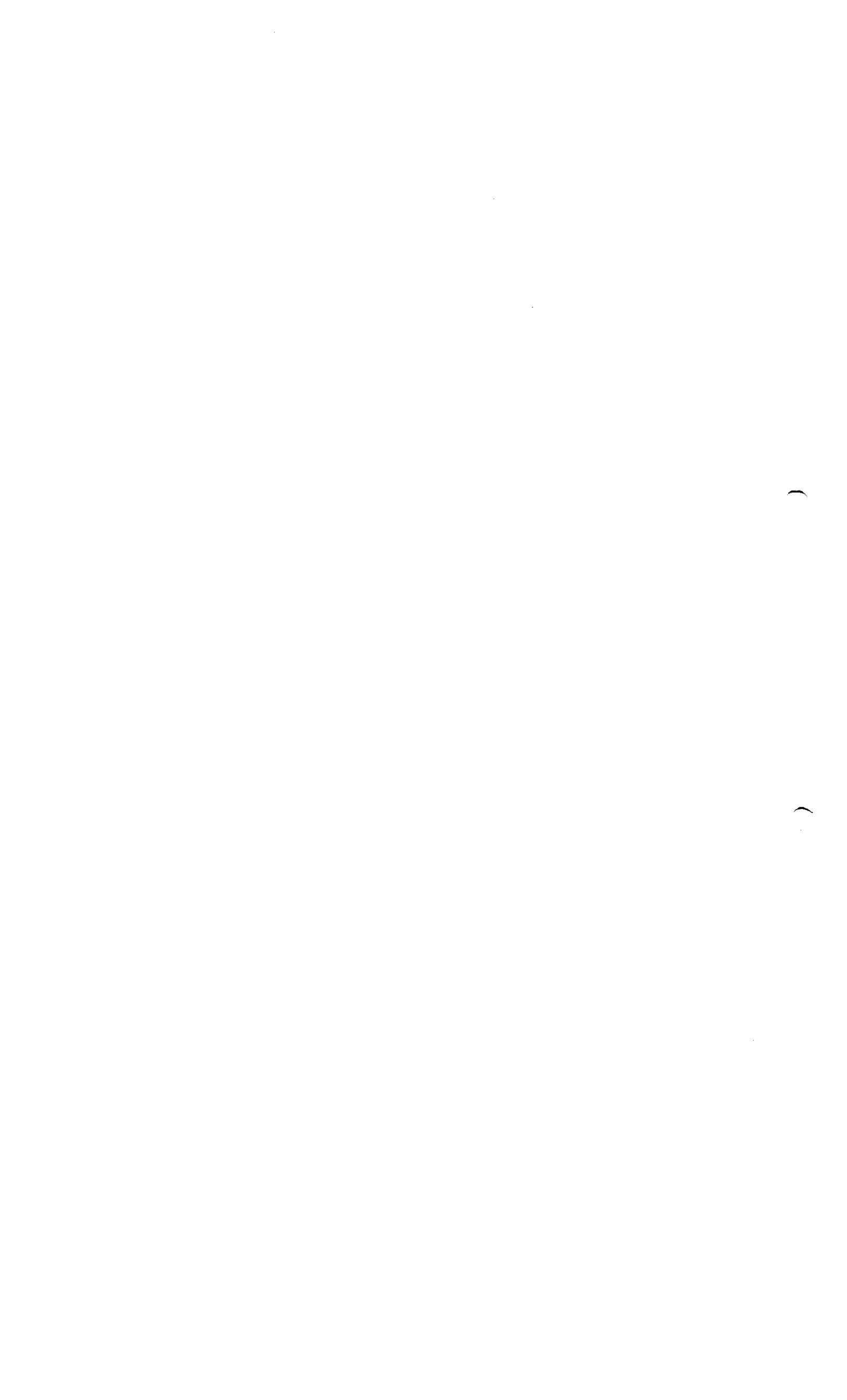
La FHA y el toxoide pertúsico no producen agrupamientos en las células CHO.

#### 3.3.2.1 Validación en la toxina pertúsica purificada nativa

##### *Panorama*

Debido a que el procedimiento es un ensayo cuantitativo, las características estudiadas son la linealidad, la exactitud y la precisión. La especificidad no se estudia debido a que la capacidad para formar agrupamientos se describe como una propiedad específica en la Ph. Eur. monografía n.º 1356 "Pertussis vaccine - acellular, component, adsorbed".

En la tabla 10, se suministra un resumen de validación.





**Tabla 10: Actividad de agrupamiento en células CHO en la etapa de toxina pertúsica purificada nativa: resumen de validación**

Características	Criterios de aceptación	Resultados
<b>Linealidad</b>	$P_{\text{linealidad}} < 0,01$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} > 0,05$	Después de un ajuste lineal en una escala log-log en la que Y = concentración medida (expresado en dilución inversa) en función de X = concentración teórica, se destaca la siguiente relación: $P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{desviación de la linealidad}} = 0,96$ $Y = 2,867 + 0,786 X$ Donde X = concentración teórica log y Y = concentración medida en log. <b>Coefficiente de la correlación lineal <math>r = 0,9454</math> con 10 grados de libertad</b> Rango de linealidad: [4000 – 1462000] CPU/ $\mu$ g de proteínas
<b>Exactitud</b>	El porcentaje de recuperación promedio calculado para los 4 niveles de concentración teórica debe estar entre el 50 % y el 200 %.	El porcentaje de recuperación promedio y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: - <b>Factor de concentración teórica 0,0625: 208 %</b> - <b>Factor de concentración teórica 0,25: 148 %</b> - <b>Factor de concentración teórica entre 4 y 16: 75 % [41 % a 110 %]</b>
<b>Precisión</b>	El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia es $\leq x/\pm 2$	- intervalos de confianza del 95% de la precisión intermedia para 1 serie con 4 mediciones: $\pm 0,274$ es decir, $x/\pm 1,88$ en forma aritmética

**Linealidad**

El diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores realizaron tres series de manera independiente, en 3 días diferentes. Cada serie incluyó un rango de 5 diluciones de la toxina de referencia.

- Resultados analíticos

Los datos analizados se expresan en diluciones inversas con el 100 % de los agrupamientos expresados en  $\mu$ g/mL (vea la tabla 11)

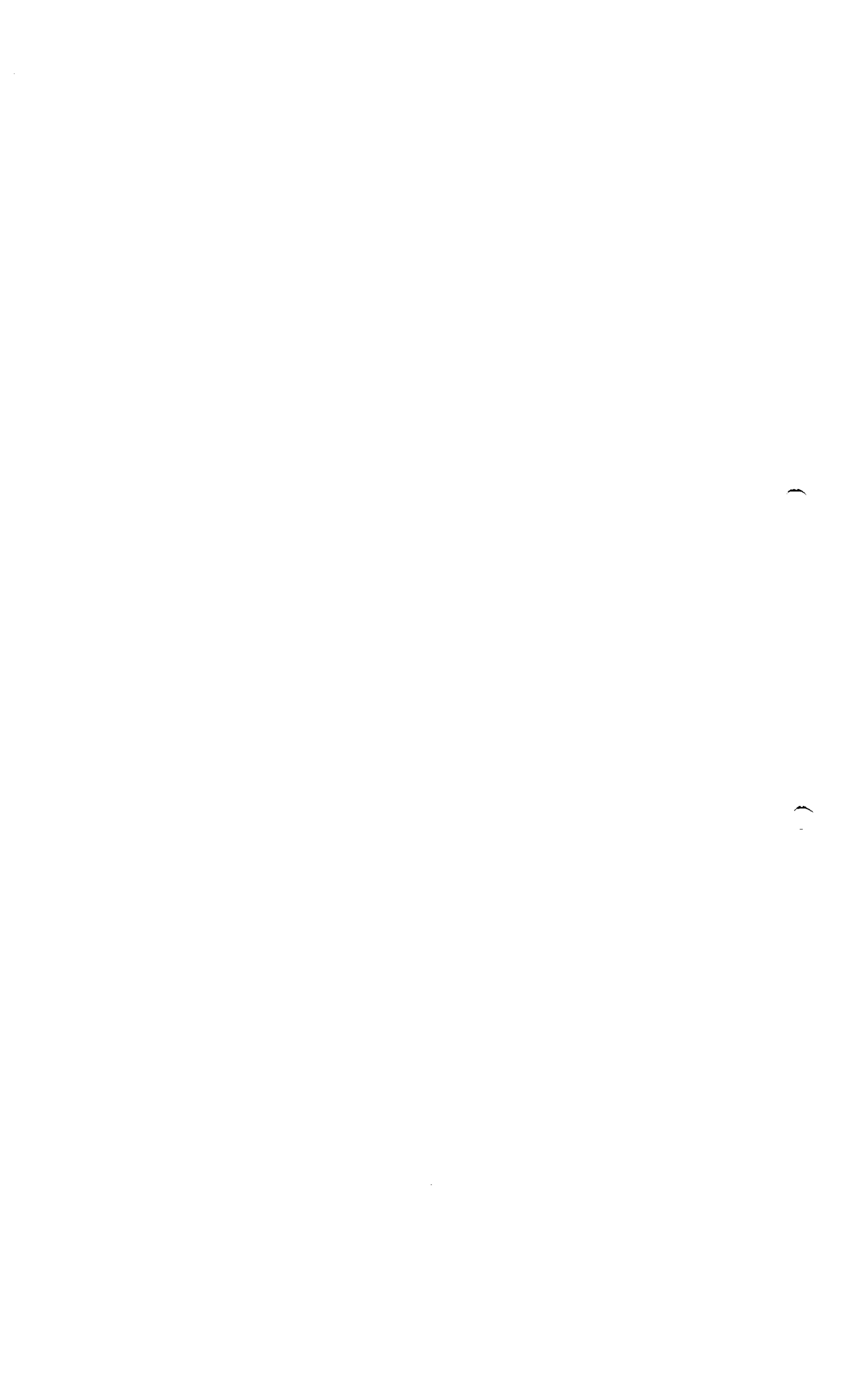
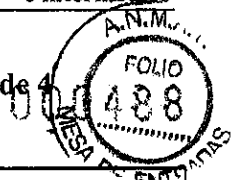


Tabla 11: Linealidad, dilución inversa con 100 % de agrupamientos (promedio de 4 determinaciones)



Concentración (µg/mL)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0,0125*	32	23	23
0,0500	108	54	64
0,2000	256	161	181
0,8000	1218	609	362
3,2000	4096	1218	1218

\* Este nivel no se tuvo en cuenta para el análisis de linealidad, ya que la exactitud no fue satisfactoria.

• Análisis estadístico

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos presentados en la tabla 11.

La homogeneidad de las varianzas vinculadas se verifica con la prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. La dependencia entre las cantidades previstas y las cantidades medidas 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 de la linealidad no significativa.

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas de todos los niveles de cantidad teóricos son homogéneas.

El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente y del ajuste correcto de la regresión lineal. Existe una dependencia lineal entre las cantidades previstas obtenidas (en logaritmos) y las cantidades medidas (en logaritmos).

La ecuación de la recta de regresión es:

$$Y = (2,867 \pm 0,149) + (0,786 \pm 0,191) \cdot X$$

donde:

- X = concentración teórica en log
- Y = concentración medida en log
- Coeficiente de la correlación lineal:  $r = 0,9454$  con 10 grados de libertad
- Rango de linealidad: [18 - 7310] en dilución inversa que equivale a [3518 - 1462009] CPU/µg de proteínas

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.

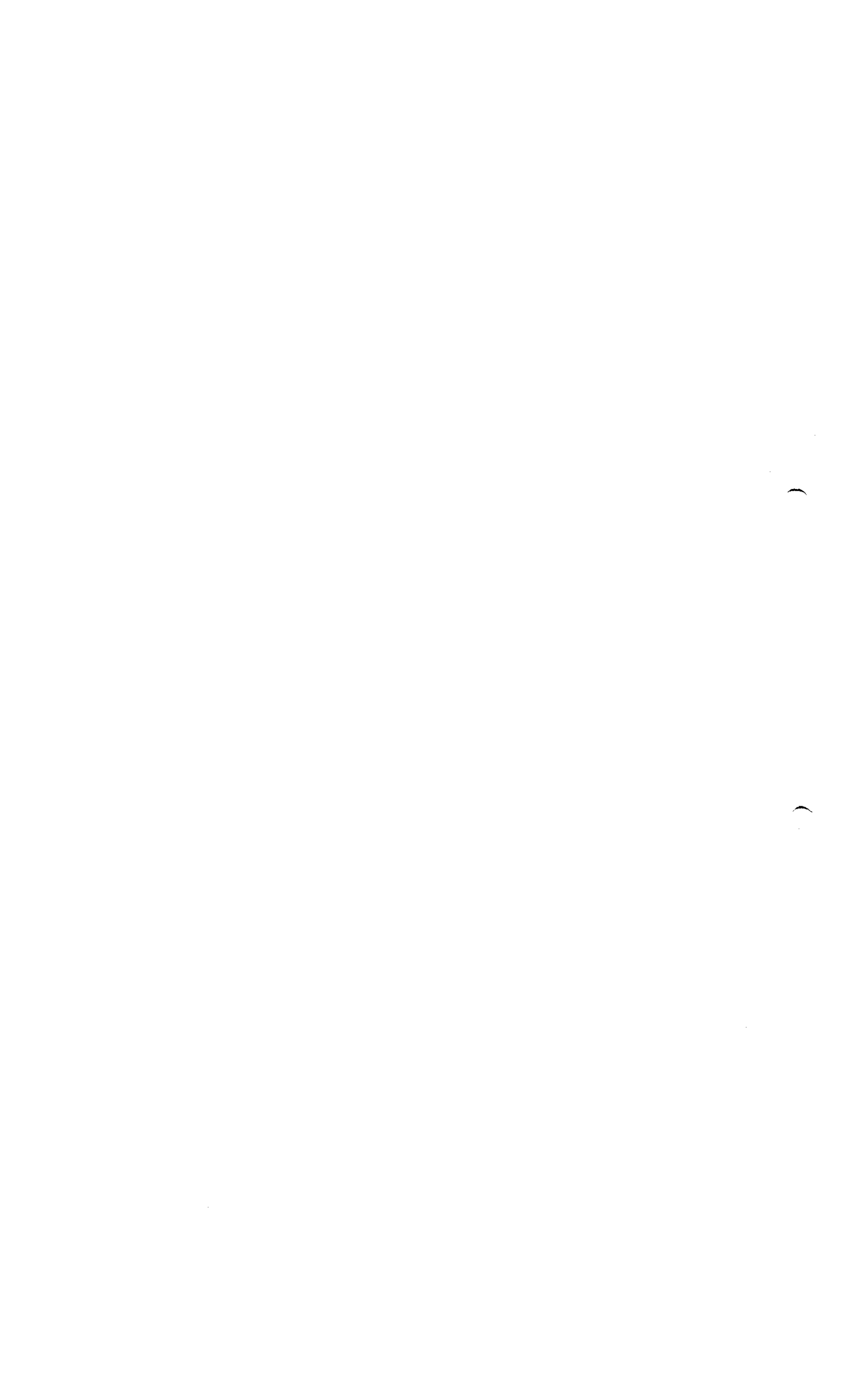
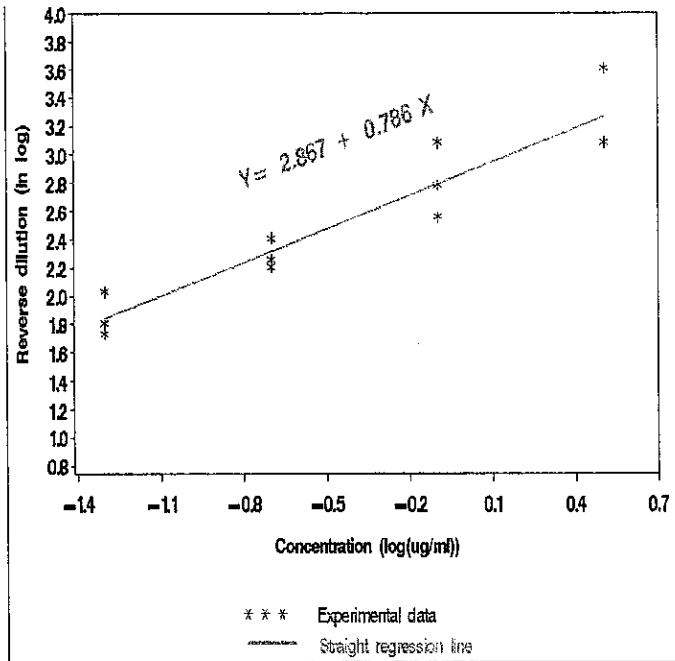




Figura 1: Actividad de agrupamiento en células CHO en la etapa de toxina pertúsica purificada nativa, gráfico de linealidad



El método es lineal en el rango [3518 - 1462009] CPU/ $\mu$ g de proteínas. Se cumplen todos los criterios de aceptación; por lo tanto, el método es lineal.

**Exactitud**

El diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores independientes realizaron tres series de manera independiente, en 3 días diferentes. Cada serie incluyó un rango de 5 diluciones de la toxina de referencia.

• Resultados analíticos

Se calculó la concentración medida habitualmente que corresponde a 0,2  $\mu$ g/mL, la proporción entre la dilución inversa con 100 % de agrupamiento de acuerdo con las diferentes concentraciones y la dilución inversa con el 100 % de agrupamientos para 0,2  $\mu$ g/mL.

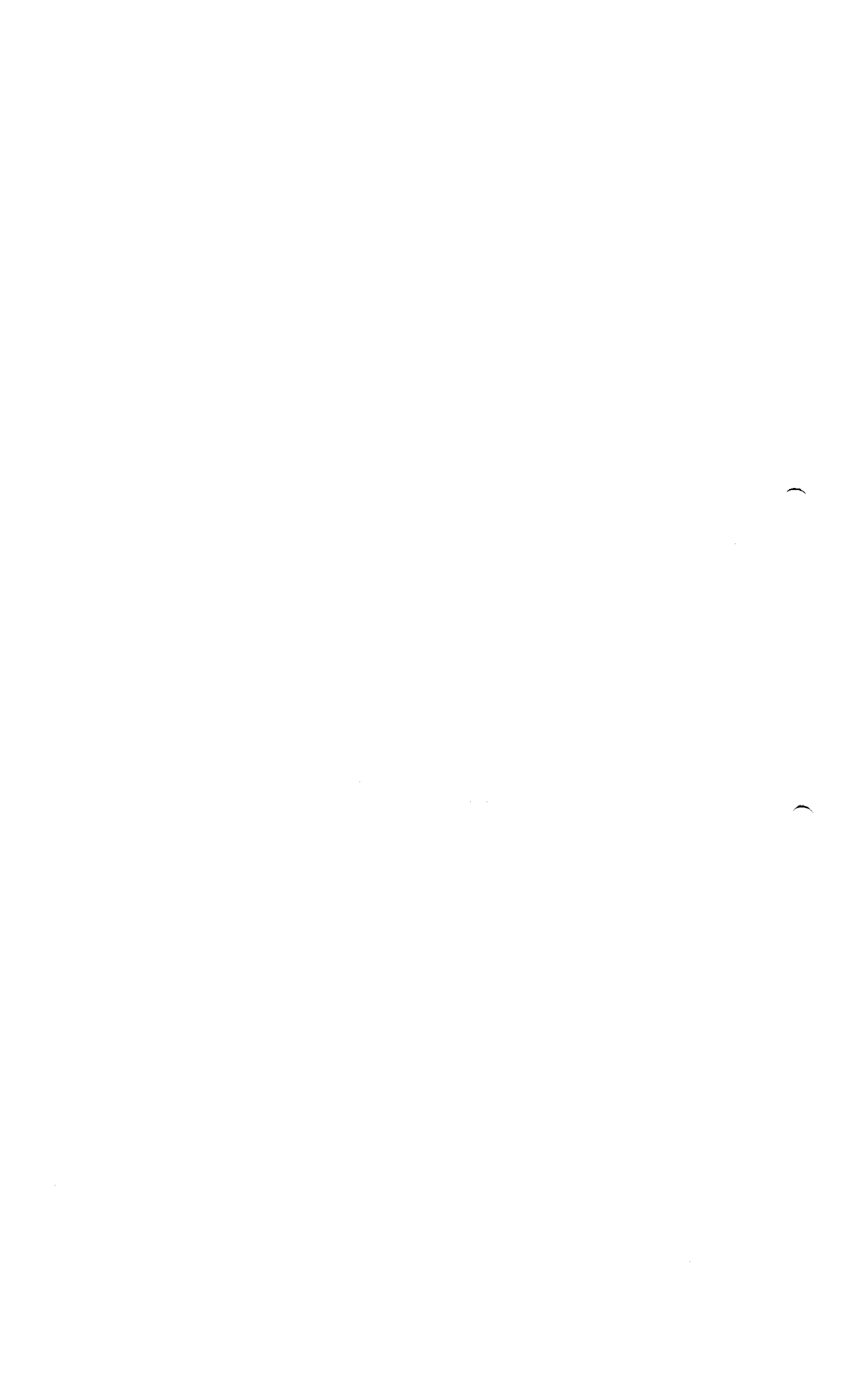
Ejemplo: Concentración de 0,0125  $\mu$ g/mL. Grupo 1:  $\frac{32}{256} = 0,1250$

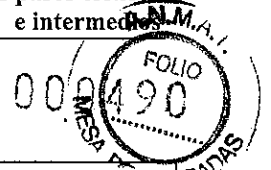
El porcentaje de recuperación se obtiene mediante la expresión de la proporción en comparación con el factor teórico previsto.

Los resultados se presentan en la tabla 12.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.





**Tabla 12: Exactitud, factor de concentración calculado**

Factor de concentración teórica (µg/mL)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0,0625	0,13	0,14	0,13
0,25	0,42	0,33	0,35
4	4,76	3,78	2,00
16	16,00	7,55	6,73

• **Análisis estadístico**

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos presentados en la tabla 12.

El porcentaje de recuperación se calcula para cada nivel de concentración y para cada grupo. La homogeneidad de las varianzas intraniveles se verifica con la prueba de Cochran. Al adquirir la homogeneidad, la no significancia de las diferencias entre los niveles de concentración teórica se demuestra mediante un análisis de varianza. Cuando se comprueba la igualdad de las medias interniveles, el porcentaje de recuperación promedio se calcula con los límites de confianza del 95 %.

El porcentaje de recuperación promedio se debe encontrar entre el 50 % y el 200 %.

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas de los 4 niveles de adición son homogéneas.


Debido a que el análisis de varianza no permite llegar a una conclusión sobre la igualdad de las medias interniveles, los cálculos se realizan para el factor 0,0625 por un lado, para el factor 0,25 por otro lado, y para los factores 4,0 y 16,0; cuyos resultados son homogéneos de manera conjunta. El porcentaje de recuperación promedio se calcula con los límites de confianza del 95 % (vea la tabla 13).


**Tabla 13: Exactitud, porcentaje de recuperación medio**

Factor	Porcentaje de recuperación	Límites de confianza del 95 %
0,0625	208,16	/
0,25	147,70	/
4 a 16	75,42	[40,89 - 109,95]%

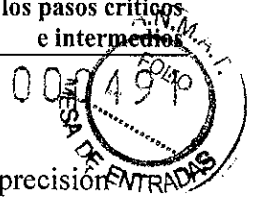
El porcentaje de recuperación promedio se incluye entre el 50 % y el 200 %, excepto para el factor 0,0625.

Por lo tanto, el rango de linealidad se restringió a [0,05 - 3,2] µg/mL, que equivale a [3518 - 1462009] CPU/µg. Este intervalo cumple con los valores medidos de manera rutinaria.

  
 ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.

  
 CHRISTIAN DOMINGUEZ  
 APODERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.





**Precisión**

El diseño experimental fue el siguiente: se realizaron 3 grupos bajo condiciones de precisión intermedia: los ensayos fueron llevados a cabo, de manera independiente, por 3 operadores, utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, en 3 días diferentes. Para la repetibilidad, en cada grupo, el mismo operador realizó 12 ensayos de manera independiente, utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo, el mismo día. Cada ensayo consiste en 2 mediciones de la muestra.

- Resultados analíticos

El dato analizado es la actividad de la toxina expresada en CPU/ $\mu$ g de proteínas (vea la tabla 14).

**Tabla 14: Precisión, actividad de la toxina (CPU/ $\mu$ g de proteínas)**

Ensayo	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1	51200	51200	51200
	25600	25600	51200
2	51200	25600	51200
	51200	25600	51200
3	25600	25600	51200
	51200	25600	102400
4	51200	25600	51200
	51200	25600	51200
5	51200	51200	51200
	25600	51200	51200
6	25600	25600	51200
	51200	25600	102400
7	51200	25600	51200
	51200	25600	51200
8	51200	51200	51200
	51200	25600	51200
9	51200	25600	51200
	25600	25600	51200
10	51200	51200	51200
	51200	51200	51200
11	25600	25600	51200
	51200	25600	51200
12	51200	25600	51200
	51200	25600	51200

Debido a que la distribución de los datos es logarítmica normal, todos los cálculos se realizan en logaritmos.



- Análisis estadístico

La precisión del método se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la tabla 14.

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 media general es 4,617, es decir, 41427 CPU/ $\mu$ g de proteínas, en notación aritmética.

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas de los 3 grupos son homogéneas.

Las características de repetibilidad y precisión intermedia, y el intervalo de confianza del 95 % para 1 serie (4 mediciones: 2 ensayos independientes con 2 mediciones por ensayo) realizados habitualmente se presentan en la tabla 15.

**Tabla 15: Precisión, características de repetibilidad y precisión intermedia**

Características	Varianza	Desviación estándar	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,014228	0,119	/
Características de precisión intermedia	0,029577	0,172	$\pm 0,274$ es decir, $x/\pm 1,88$ en notación aritmética

Debido a que los intervalos de confianza del 95 % de la precisión intermedia son menores que  $x/\pm 2$ , el método es preciso.

**Conclusión**

El método es lineal en el rango: [4000 - 1462000] CPU/ $\mu$ g de proteínas.

La exactitud se prueba en el mismo rango con una recuperación promedio del 148 % para el nivel 0,05  $\mu$ g/ mL y del 75 % para los niveles 0,8 y 3,2  $\mu$ g/mL.

El método es preciso, ya que el intervalo de confianza de la precisión intermedia es  $x/\pm 1,88$  para una serie realizada habitualmente.

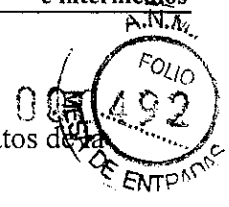
El método es válido para medir la actividad de agrupamiento en las células CHO en la etapa de toxina pertúsica purificada nativa.

**3.3.2.2 Validación en la FHA purificada nativa y en el toxoide pertúsico purificado en solución**

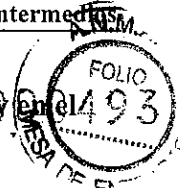
**Panorama**

Debido a que el procedimiento es una prueba de límites, la única característica estudiada fue el límite de detección. La especificidad no se estudia debido a que la capacidad de formación de agrupamientos se describe como una propiedad específica en la Ph. Eur. monografía n.º 1356 "Pertussis vaccine - acellular, component, adsorbed".

En la tabla 16, se suministra un resumen de validación.







**Tabla 16: Actividad de agrupamiento en células CHO en la FHA purificada nativa y en el toxoide pertúsico purificado en solución, resumen de validación**

Características	Criterio de aceptación	Resultados
Límite de detección	Última dilución que demuestra algunos agrupamientos	<b>Etapa de FHA purificada nativa:</b> Límite de detección = 0,005 µg/mL <b>Etapa de toxoide pertúsico purificado en solución:</b> Límite de detección = 0,00125 µg/mL

**Límite de detección**

El diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores realizaron, de manera independiente, 3 ensayos con 2 mediciones independientes, en 3 días diferentes. Cada ensayo consiste en agregar 4 cantidades desconocidas de toxina a una cantidad fija de FHA o de toxoide pertúsico.

Los datos analizados son los últimos pocillos positivos que muestran algún agrupamiento. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 17 para la FHA purificada nativa y en la tabla 18 para el toxoide pertúsico purificado en solución.

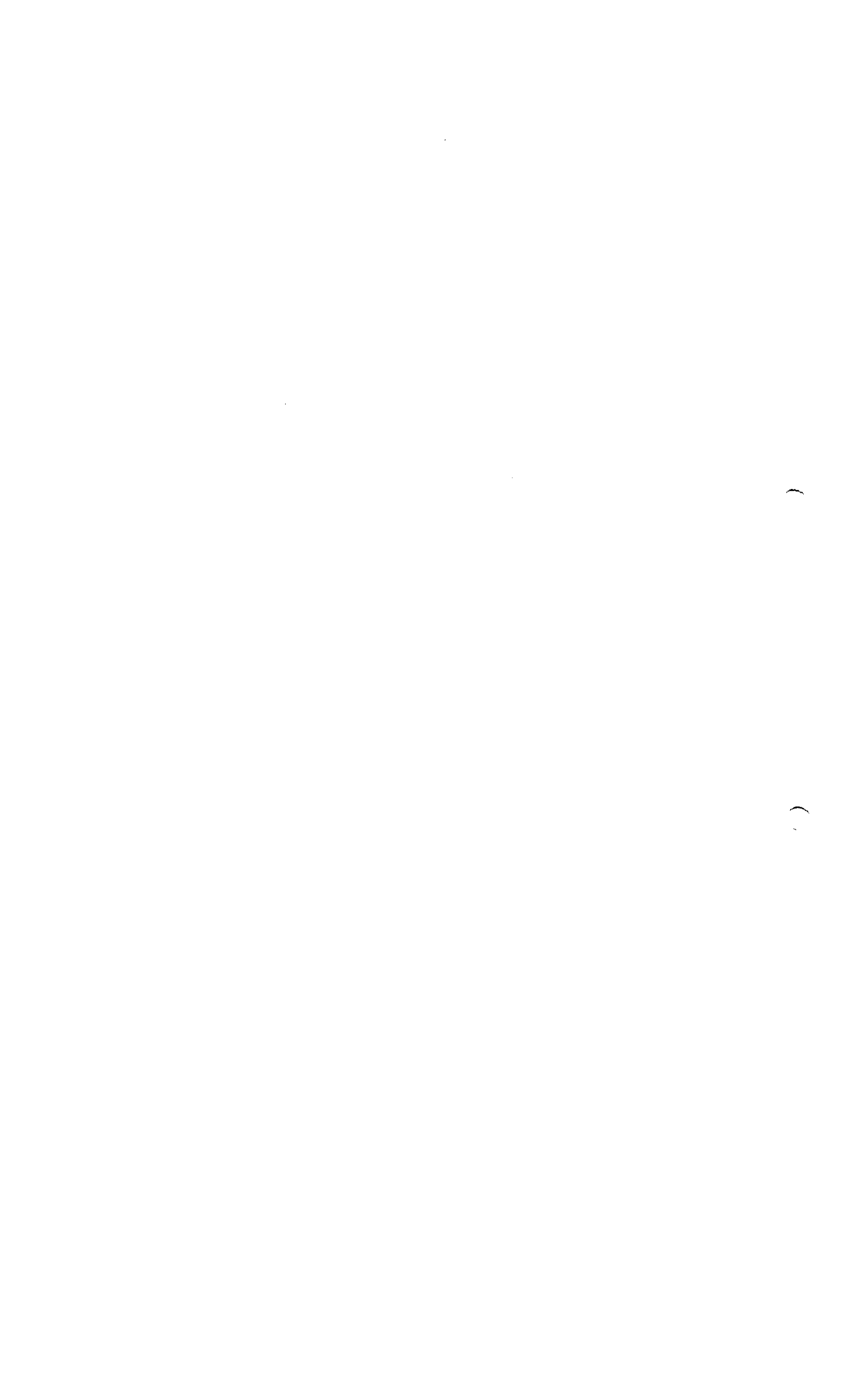
**Tabla 17: Datos sin procesar en la etapa de la FHA purificada nativa**

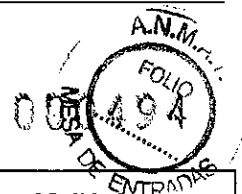
	Grupo	Medida 1	Medida 2
FHA purificada nativa a razón de 200 µg/mL adicionada con 0,02 µg/mL de toxina	Grupo 1	7	7
	Grupo 2	6	/
	Grupo 3	6	6
FHA purificada nativa a razón de 200 µg/mL adicionada con 0,005 µg/mL de toxina	Grupo 1	/	5
	Grupo 2	5	/
	Grupo 3	5	5
FHA purificada nativa a razón de 200 µg/mL adicionada con 0,00125 µg/mL de toxina	Grupo 1	/	/
	Grupo 2	/	/
	Grupo 3	/	/
FHA purificada nativa a razón de 200 µg/mL adicionada con 0,0003125 µg/mL de toxina	Grupo 1	/	/
	Grupo 2	/	/
	Grupo 3	/	/

El límite de detección se define como la cantidad más baja que muestra algunos agrupamientos.

Para cada grupo:

- para el agregado de 0,005 µg/mL, se observan agrupamientos,
- para el agregado de 0,00125 µg/mL, no se observa agrupamiento.





**Tabla 18: Datos sin procesar en la etapa de toxoide pertúsico purificado**

	Grupo	Medida 1	Medida 2
Toxoide pertúsico purificado a razón de 100 µg/mL adicionado con 0,02 µg/mL de toxina	Grupo 1	7	6
	Grupo 2	7	6
	Grupo 3	6	6
Toxoide pertúsico purificado a razón de 100 µg/mL adicionado con 0,005 µg/mL de toxina	Grupo 1	6	5
	Grupo 2	5	5
	Grupo 3	4	5
Toxoide pertúsico purificado a razón de 100 µg/mL adicionado con 0,00125 µg/mL de toxina	Grupo 1	3	3
	Grupo 2	2	2
	Grupo 3	2	2
Toxoide pertúsico purificado a razón de 100 µg/mL adicionado con 0,0003125 µg/mL de toxina	Grupo 1	/	/
	Grupo 2	/	/
	Grupo 3	/	/

Para cada grupo:

- para el agregado de 0,00125 µg/mL, se observan agrupamientos,
- para el agregado de 0,0003125 µg/mL, no se observa agrupamiento.

**Conclusión**

El límite de detección (DL) se establece en: DL = 0,005 µg/ mL para la FHA purificada nativa y en DL = 0,00125 µg/ mL para el toxoide pertúsico purificado en solución.

El método es válido para medir la actividad de agrupamiento en las células CHO en la etapa de toxina pertúsica purificada nativa y en la etapa de toxoide pertúsico purificado en solución.

**3.3.3 Actividad de hemaglutinación**

**3.3.3.1 Panorama**

El método de control de la actividad de hemaglutinación permite cuantificar los antígenos que componen la vacuna acelular contra la tos ferina gracias a las propiedades de hemaglutinación frente a glóbulos rojos del ganso.

Debido a que el método es un ensayo semicuantitativo, las características estudiadas son la especificidad, la linealidad, la exactitud y la precisión.

Los resultados de la validación se resumen en la tabla 19.

ROXANA MONTEMILONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
 APODERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.



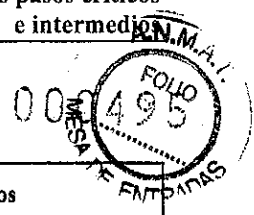


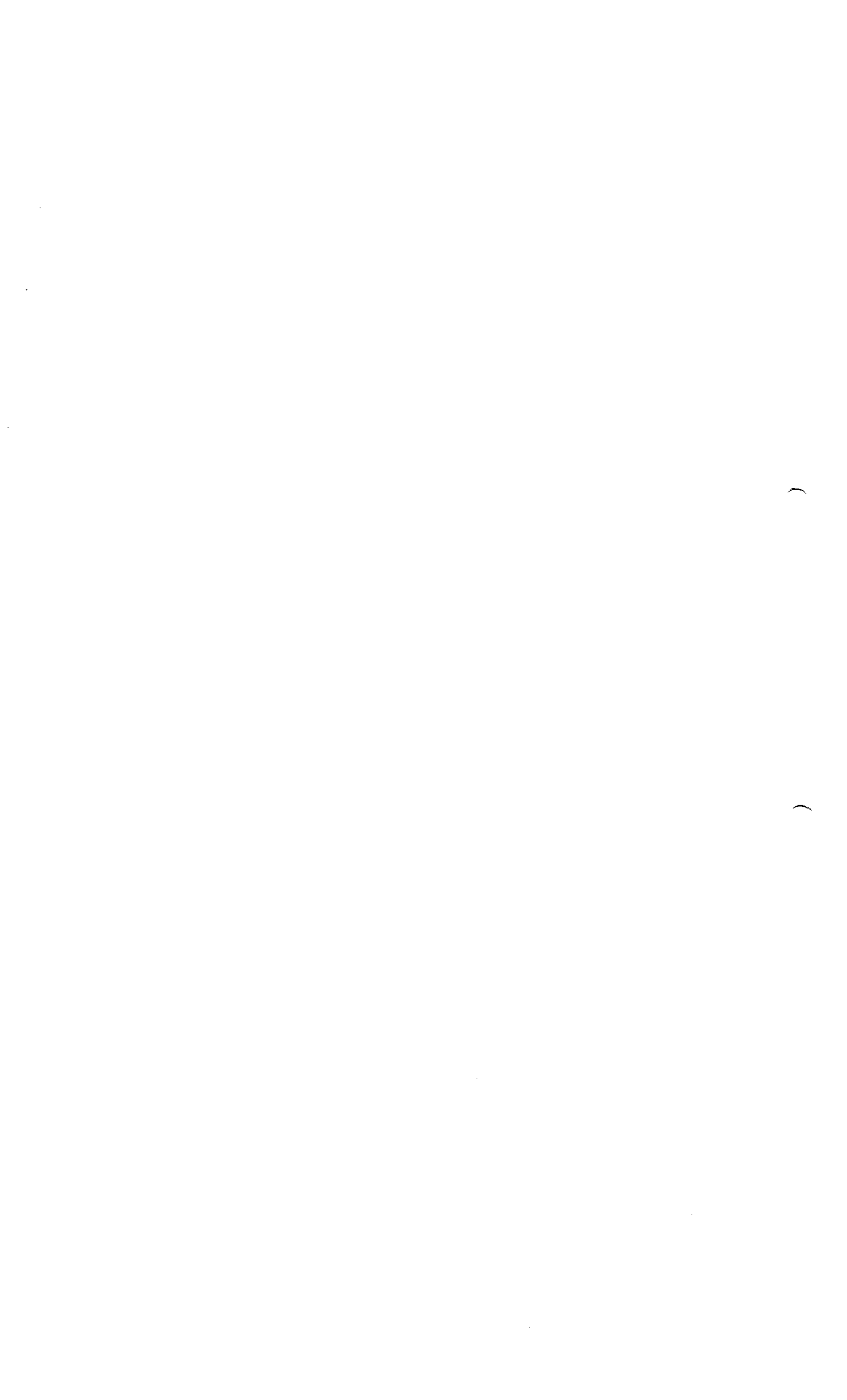
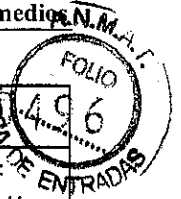


Tabla 19: Actividad de hemaglutinación, resumen de validación

Características	Criterios de aceptación	Resultados
<b>Especificidad</b>	En presencia y ausencia de colesterol, el porcentaje de inhibición debe ser $\leq 20\%$ para la etapa de toxina pertúsica purificada nativa y $\geq 80\%$ para la etapa de FHA purificada nativa.	Para todos los ensayos: el porcentaje de inhibición es $\leq 20\%$ para la etapa de toxina pertúsica purificada nativa y $\geq 80\%$ para la etapa de FHA purificada nativa.
<b>Linealidad</b>	$P_{\text{linealidad}} < 0,01$	<p>Toxina pertúsica purificada nativa:</p> <p><math>P_{\text{linealidad}} &lt; 0,0001</math></p> <p><math>Y = -0,214 + 1,027 \cdot X</math></p> <p>Donde X = actividad de hemaglutinación teórica (log UHA/mg de proteína) e Y = actividad de hemaglutinación medida (log UHA/mg de proteínas).</p> <p><math>R^2 = 0,9473</math></p> <p>Rango de linealidad: [ 3,46 ; 5,17 ]                      es decir, [ 2 874 ; 146 227 ] UHA/mg de proteínas</p> <p>FHA purificada nativa:</p> <p><math>P_{\text{linealidad}} &lt; 0,0001</math></p> <p><math>Y = -1,436 + 1,232 \cdot X</math></p> <p>Donde X = actividad de hemaglutinación teórica (log UHA/mg de proteína) e Y = actividad de hemaglutinación medida (log UHA/mg de proteínas).</p> <p><math>R^2 = 0,8840</math></p> <p>Rango de linealidad: [ 4,74 ; 6,83 ]                      es decir, [ 54 795 ; 6 757 202 ] UHA/mg de proteínas</p>


  
 ROXANA MONTEMILONE      CHRISTIAN DOMINGUEZ  
 DIRECTORA TÉCNICA      APODERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.      SANOFI PASTEUR S.A.





Características	Criterios de aceptación	Resultados									
Exactitud	El porcentaje de recuperación promedio calculado para los niveles de concentración teórica previstos se debe incluir entre el 50 % y el 200 %.	Toxina pertúsica purificada nativa: Todos los porcentajes de recuperación se incluyen entre el 50 % y el 200 %: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Nivel de dilución</th> <th>Porcentaje de recuperación (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1:2</td> <td>72</td> </tr> <tr> <td>1:5</td> <td>78</td> </tr> <tr> <td>1:12</td> <td>83</td> </tr> </tbody> </table>	Nivel de dilución	Porcentaje de recuperación (%)	1:2	72	1:5	78	1:12	83	
		Nivel de dilución	Porcentaje de recuperación (%)								
		1:2	72								
		1:5	78								
		1:12	83								
		FHA purificada nativa: Todos los porcentajes de recuperación se incluyen entre el 50 % y el 200 %:									
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Nivel de dilución</th> <th>Porcentaje de recuperación (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1:2</td> <td>117</td> </tr> <tr> <td>1:5</td> <td>78</td> </tr> <tr> <td>1:8</td> <td>67</td> </tr> </tbody> </table>		Nivel de dilución	Porcentaje de recuperación (%)	1:2	117	1:5	78	1:8	67
		Nivel de dilución	Porcentaje de recuperación (%)								
		1:2	117								
		1:5	78								
1:8	67										
Precisión	La diferencia entre el mínimo y el máximo de los resultados debe ser $\leq 2$ cúpulas positivas (2 diluciones de razón 2)	Toxina pertúsica purificada nativa: Mínimo: 51 138 UHA/mg de proteínas, es decir, 7 cúpulas positivas. Máximo: 153 414 UHA/mg de proteínas, es decir, 9 cúpulas positivas. Diferencia máximo - mínimo = 2 cúpulas positivas.									
		FHA purificada nativa: Mínimo: 512 195 UHA/mg de proteínas, es decir, 8 cúpulas positivas. Máximo: 2 048 780 UHA/mg de proteínas, es decir, 10 cúpulas positivas. Diferencia máximo - mínimo = 2 cúpulas positivas.									

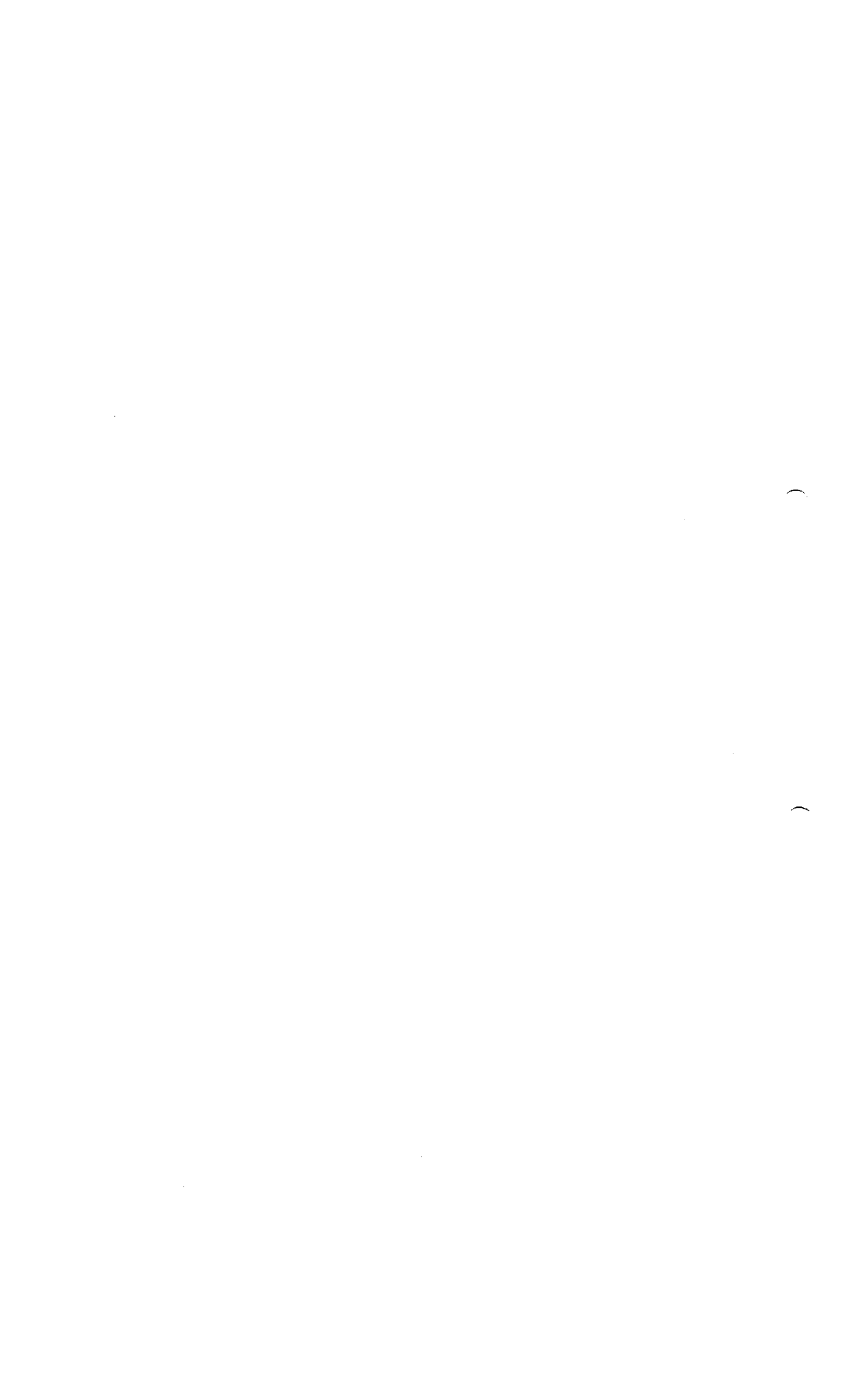
### 3.3.3.2 Especificidad

Para la toxina pertúsica purificada nativa y la FHA purificada nativa, el diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores realizaron 3 series separadas en días diferentes. Cada serie incluyó el ensayo de un rango de 4 concentraciones de hemaglutinina (3 diluidas en 1 sin diluir: lotes FA334436 para la toxina pertúsica purificada nativa y FA348081 para la FHA purificada nativa del principio activo vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes).

Nota: Los lotes utilizados para el estudio de linealidad son representativos de la producción.

La especificidad consiste en el siguiente paso:


  
 ROXANA MONTEMLONE DIRECTORA TÉCNICA SANOFI PASTEUR S.A.  
 CHRISTIAN DOMINGUEZ APODERADO SANOFI PASTEUR S.A.





Para todos los ensayos realizados en los estudios de linealidad y exactitud: en presencia y ausencia de colesterol, el porcentaje de inhibición debe ser  $\leq 20\%$  para la etapa de toxina y  $\geq 80\%$  para la etapa de FHA. Los resultados se suministran en la tabla 20.



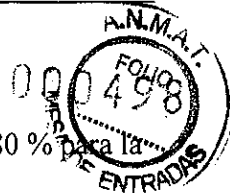
**Tabla 20: Especificidad, porcentaje de inhibición para la PT purificada nativa y para la FHA purificada nativa (%)**

	Dilución	Inhibición de la PT (%)	Inhibición de la FHA (%)
Grupo 1	1/1	INV*	98
	1/1	INV	98
	1/2	0	99
	1/2	0	99
	1/5	0	98
	1/5	0	97
	1/8 (FHA) 1/12 (PT)	0	98
	1/8 (FHA) 1/12 (PT)	0	98
Grupo 2	1/1	0	98
	1/1	0	98
	1/2	0	98
	1/2	0	98
	1/5	0	98
	1/5	0	97
	1/8 (FHA) 1/12 (PT)	0	94
	1/8 (FHA) 1/12 (PT)	0	94
Grupo 3	1/1	0	97
	1/1	0	97
	1/2	0	94
	1/2	0	94
	1/5	0	94
	1/5	0	88
	1/8 (FHA) 1/12 (PT)	0	88
	1/8 (FHA) 1/12 (PT)	0	88

\* INV = Valor inválido


  
 ROXANA MONTEMILONE      CHRISTIAN DOMINGUEZ  
 DIRECTORA TÉCNICA      APODERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.      SANOFI PASTEUR S.A.





**Conclusión:**

Para todos los ensayos: el porcentaje de inhibición es  $\leq 20\%$  para la etapa de PT y  $\geq 80\%$  para la etapa de FHA.

Por lo tanto, el método es específico.

**3.3.3.3 Linealidad**

Para la PT purificada nativa y para la FHA purificada nativa, el diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores realizaron 3 series separadas, en días diferentes. Cada serie incluyó el ensayo de un intervalo de 4 concentraciones de hemaglutinina (3 diluidas y 1 sin diluir: lotes FA334436 para la PT purificada nativa y FA348081 para la FHA purificada nativa del principio activo vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes). En cada concentración, se realizaron 2 mediciones.

Nota: Los lotes utilizados para el estudio de linealidad son representativos de la producción.

**Para la PT purificada nativa**

- Resultados analíticos

Los datos analizados son la concentración de la hemaglutinina presente en la PT, expresada en UHA/mg de proteínas.

En la tabla 21, se resumen los resultados del estudio.


La concentración promedio de la hemaglutinina de la muestra sin diluir (nivel 0) equivale a 88 574 UHA/mg de proteínas (media geométrica de las 3 series).

Por lo tanto, la concentración teórica prevista de hemaglutinina en la muestra de PT se calcula de la siguiente manera:

$$\text{concentración teórica prevista (UHA/mg de proteínas)} = (\text{Concentración de hemaglutinina en el nivel 0}) \times (\text{dilución}).$$

**Tabla 21: Linealidad; PT purificada nativa, concentraciones medidas en comparación con las concentraciones teóricas previstas (UHA/mg de proteínas)**

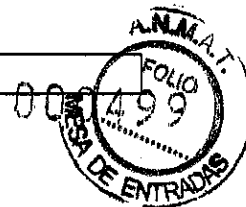
Nivel	Concentración teórica prevista UHA/mg de proteínas	Concentración medida (UHA/mg de proteínas)		
		Serie 1	Serie 2	Serie 3
0	88 574	INV* INV*	102 276 102 276	76 707 76 707
-1 (dilución 1:2)	44 287	38 354 51 138	25 569 25 569	25 569 25 569
-2 (dilución 1:5)	17 715	19 177 12 785	12 785 12 785	12 785 12 785
-3	7 381	6 392	6 392	6 392


  
 ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA GENERAL SANOFI PASTEUR S.A.  
 CHRISTIAN DOMINGUEZ APODERADO SANOFI PASTEUR S.A.



(dilución 1:12)		6 392	6 392	4 794
-----------------	--	-------	-------	-------

INV\*: valor inválido



Nota: Todos los ensayos se basan en 2 mediciones independientes.

Debido a que la concentración promedio de hemaglutinina en el nivel 0 se utiliza para calcular las concentraciones teóricas previstas, este nivel no se incluye en los cálculos de exactitud.

Por lo tanto, la linealidad se estudia en 4 niveles de concentración y la exactitud se estudia en 3 niveles de concentración.

- Análisis estadístico

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos presentados en la tabla 21.

La homogeneidad de las varianzas límite se verifica mediante la prueba de Cochran. La dependencia entre la concentración teórica prevista de hemaglutinina y la concentración medida de hemaglutinina, 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.

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas son homogéneas.

Existe una dependencia lineal entre la concentración teórica prevista y la concentración medida (vea la tabla 22).

**Tabla 22: Linealidad; PT purificada nativa, ecuación de la recta de regresión**

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación	Rango de linealidad en UHA/mg de proteínas
$Y = (-0,214 \pm 0,497) + (1,027 \pm 0,113). X$	$R^2 = 0,9473$	[2 874; 146 227]
donde: X= concentración teórica en hemaglutinina (log(UHA/mg de proteínas)) Y = concentración medida en hemaglutinina (log(UHA/mg de proteínas))		

$P_{linealidad} < 0,0001$



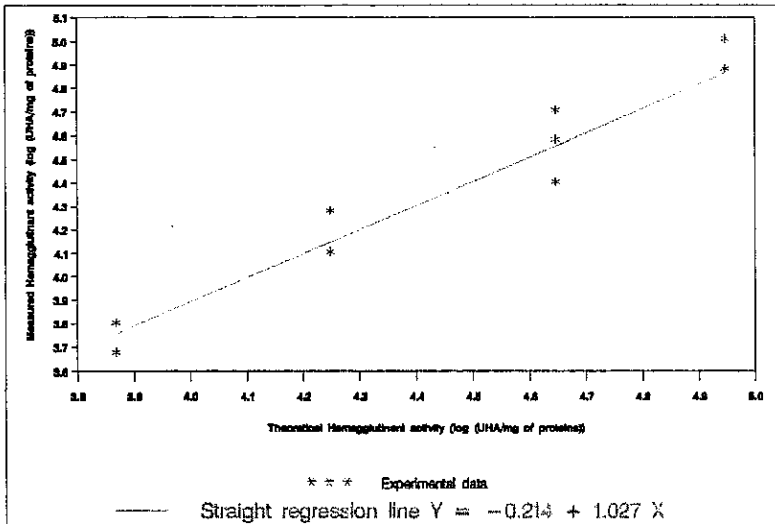

  
 ROXANA MONTEMILONE DIRECTORA TÉCNICA SANOFI PASTEUR S.A.  
 CHRISTIAN DOMINGUEZ APODERADO SANOFI PASTEUR S.A.





Figura 2: Actividad de hemaglutinación de la etapa de PT purificada nativa, gráfico de linealidad



El método es lineal en el rango [2 874 ; 146 227] UHA/mg de proteínas.

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

**Para la FHA purificada nativa**

- Resultados analíticos

El dato analizado es la concentración de hemaglutinina presente en la FHA, expresada en UHA/mg de proteínas.

En la tabla 23, se resumen los resultados del estudio.

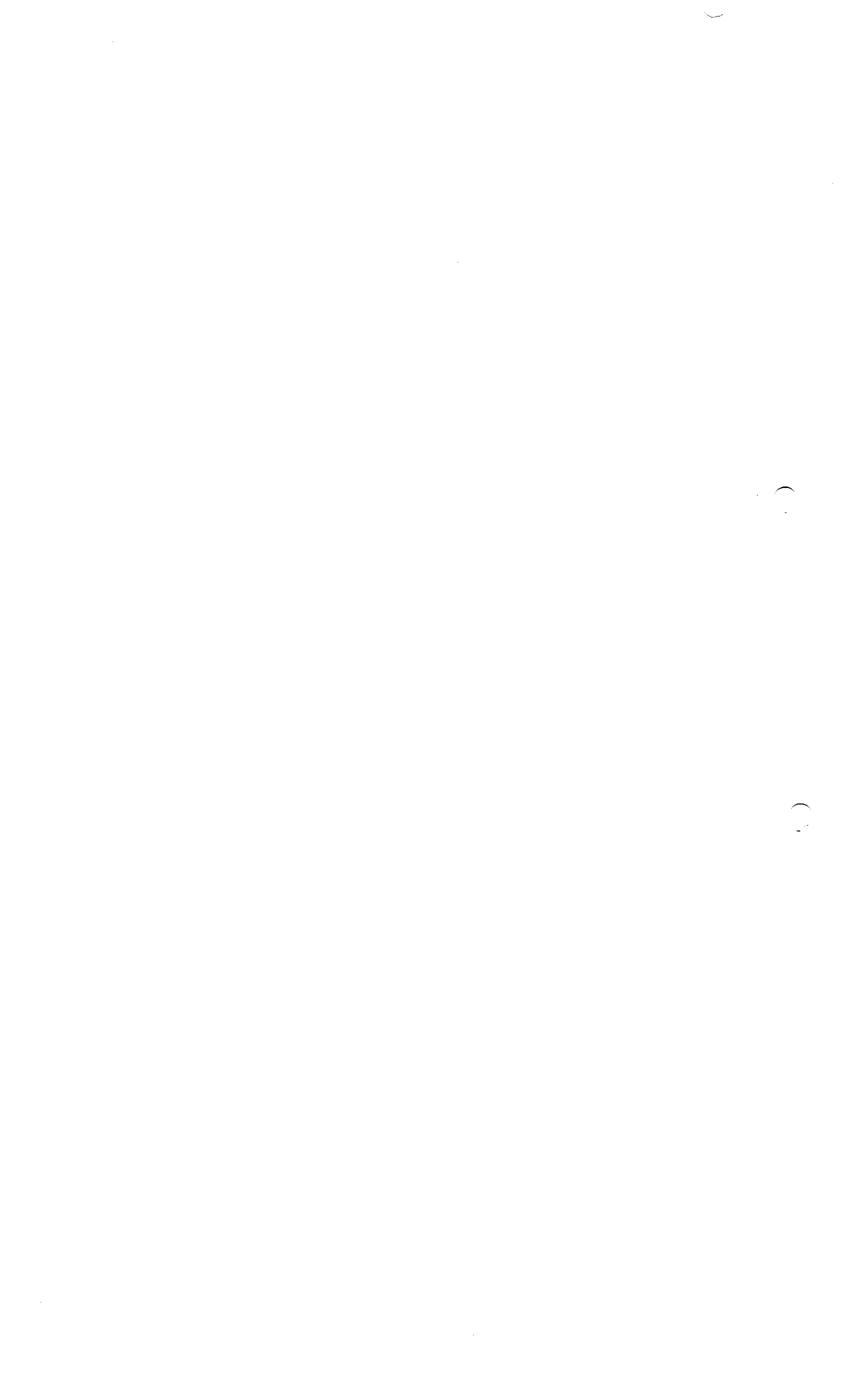
La concentración promedio de hemaglutinina de la muestra sin diluir (nivel 0) equivale a 2 048 780 UHA/mg de proteínas (media geométrica de las 3 series).

Por lo tanto, la concentración teórica prevista de hemaglutinina presente en la muestra de FHA se calcula de la siguiente manera:

$$\text{concentración teórica prevista (UHA/mg de proteínas)} = (\text{Concentración de hemaglutinina en el nivel 0}) \times (\text{dilución}).$$

**Tabla 23: Linealidad; FHA purificada nativa, concentraciones medidas en comparación con las concentraciones teóricas previstas (UHA/mg de proteínas)**

Nivel	Concentración teórica prevista UHA/mg de proteínas	Concentración medida (UHA/mg de proteínas)		
		Serie 1	Serie 2	Serie 3
0	2 048 780	2 048 780 2 048 780	2 048 780 2 048 780	2 048 780 2 048 780





-1 (dilución 1:2)	1 024 390	2 048 780 2 048 780	1 024 390 1 024 390	512 195 512 195
-2 (dilución 1:5)	409 756	512 195 256 098	384 146 256 098	256 098 256 098
-3 (dilución 1:8)	256 098	256 098 256 098	128 049 128 049	128 049 128 049

Nota: Todos los ensayos se basan en 2 mediciones independientes.

Debido a que la concentración promedio de hemaglutinina en el nivel 0 se utiliza para calcular las concentraciones teóricas previstas, este nivel no se incluye en los cálculos de exactitud.

Por lo tanto, la linealidad se estudia en 4 niveles de concentración y la exactitud se estudia en 3 niveles de concentración.

- Análisis estadístico

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos presentados en la tabla 23.

La homogeneidad de las varianzas límite se verifica mediante la prueba de Cochran. La dependencia entre la concentración teórica prevista de hemaglutinina y la concentración medida de hemaglutinina, 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.

La prueba de Cochran utilizada para estudiar la homogeneidad de las varianzas se basa en el límite de significancia. Probablemente, esto se deba a la presencia de una varianza equivalente a 0 (nivel 0). Por lo tanto, esta pequeña heterocedasticidad es aceptable.

Existe una dependencia lineal entre la concentración teórica prevista y la concentración medida (vea la tabla 24).

**Tabla 24: Linealidad; FHA purificada nativa, Ecuación de la recta de regresión**

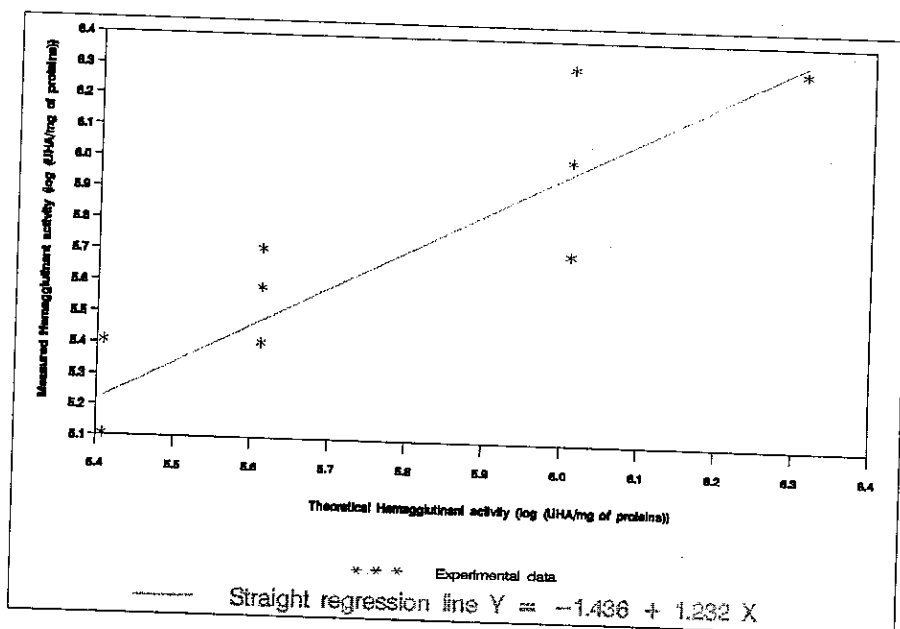
Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación	Rango de linealidad en UHA/mg de proteínas
$Y = (-1,436 \pm 1,154) + (1,232 \pm 0,197) \cdot X$	$R^2 = 0,8840$	[ 54 795 ; 6 757 202 ]
donde: X= concentración teórica en hemaglutinina (log(UHA/mg de proteínas)) Y = concentración medida en hemaglutinina (log(UHA/mg de proteínas))		

$P_{linealidad} < 0,0001$

( )

( )

Figura 3: Actividad de hemaglutinación en la etapa de FHA purificada nativa, gráfico de linealidad



El método es lineal por arriba del rango [ 54 795 ; 6 757 202 ] UHA/mg de proteínas.

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

#### 3.3.3.4 Exactitud

Para la PT purificada nativa y para la FHA purificada nativa, el diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores realizaron 3 series separadas, en días diferentes. Cada serie incluyó el ensayo de un rango de 4 concentraciones de hemaglutinina (3 diluidas y 1 sin diluir: lotes FA334436 para la PT purificada nativa y FA348081 para la FHA purificada nativa del principio activo vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes). En cada concentración, se realizaron 2 mediciones.

Nota: Los lotes utilizados para el estudio de linealidad son representativos de la producción.

#### Para la PT purificada nativa

- Resultados analíticos

El dato analizado es la concentración de hemaglutinina, expresada en UHA/mg de proteínas. El nivel 0 se elimina del análisis, ya que se utiliza para calcular las concentraciones teóricas.

En la tabla 21, se resumen los resultados del estudio.

- Análisis estadístico

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos de la tabla 21.

El porcentaje de recuperación se calcula para cada nivel de concentración teórica prevista y para cada grupo (vea la tabla 25). La homogeneidad de las varianzas intraniveles se verifica mediante

11

12