

**Tabla 34: Especificidad, FHA purificada en solución en comparación con el límite inferior de la curva de calibración (DO)**

Día	Placa	Límite inferior de la curva de calibración	Concentraciones de FHA (µg/ mL)	Media de la DO
1	1	0,359	1	0,006
			0,5	0,003
			0,25	0,005
	2	0,586	1	-0,002
			0,5	-0,005
			0,25	-0,004
3	0,579	1	0,002	
		0,5	0,001	
		0,25	0,001	
4	0,577	1	0,007	
		0,5	0,004	
		0,25	0,003	
5	0,657	1	0,006	
		0,5	-0,001	
		0,25	-0,002	
6	0,611	1	0,005	
		0,5	0,003	
		0,25	0,003	
2	1	0,382	1	0,001
			0,5	-0,003
			0,25	-0,005
	2	0,326	1	0,008
			0,5	0,008
			0,25	0,008
3	0,341	1	0,009	
		0,5	0,000	
		0,25	0,006	
4	0,354	1	0,007	
		0,5	0,005	
		0,25	0,008	
5	0,331	1	0,010	
		0,5	0,005	
		0,25	0,003	
6	0,344	1	0,010	
		0,5	0,005	
		0,25	0,004	
3	1	0,520	1	0,007
			0,5	0,003



Día	Placa	Límite inferior de la curva de calibración	Concentraciones de FHA (µg/ mL)	Media de la
	2	0,493	0,25	0,002
			1	0,010
	3	0,451	0,5	0,004
			0,25	0,003
			1	0,009
	4	0,502	0,5	0,003
0,25			0,004	
1			0,007	
5	0,578	0,5	0,014	
		0,25	0,006	
		1	0,007	
6	0,572	0,5	0,013	
		0,25	0,008	
		1	0,006	

Las respuestas en densidad óptica obtenidas para el antígeno de la FHA son menores que las respuestas en densidad óptica obtenidas para la concentración más baja de la curva de calibración. Debido a que la FHA no se puede detectar en condiciones operativas, el método es específico para cuantificar el toxoide en solución.

**Linealidad**

El diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores realizaron 3 series separadas, en 3 días diferentes. Cada serie incluyó el ensayo de un rango de 6 diluciones dobles de solución de PTxd.

- Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración del antígeno de PTxd, expresada en UE/L. En la tabla 35, se resumen los resultados del estudio.

**Tabla 35: Linealidad, título antigénico medido de la vacuna diluida (UE/L)**

Diluciones	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
1/3808	1,084	1,049	-
1/1904	2,378	1,935	2,054
1/952	4,526	3,990	3,869
1/476	9,366	9,132	8,585
1/238	17,787	19,068	18,477
1/119	-	31,933	34,420

*Nota: Estos títulos fueron calculados a partir del promedio de 6 determinaciones. No obstante, para las diluciones 1/119 y 1/3808, algunos resultados no estaban disponibles (DO fuera del rango estándar): las medias también se calcularon a partir de todos los resultados*



disponibles; no se pudieron calcular las medias para el grupo 1, dilución 1/119 ni para el grupo 3, dilución 1/3808.



- Análisis estadístico

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos presentados en la tabla 35.

La homogeneidad de las varianzas límite se verifica mediante la prueba de Cochran. La dependencia entre la dilución teórica y las concentraciones 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 no significativa de la linealidad.

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 el ajuste correcto de la regresión lineal. Existe una dependencia lineal entre las diluciones teóricas (log) y las concentraciones medidas (log).


La ecuación de la recta de regresión es:

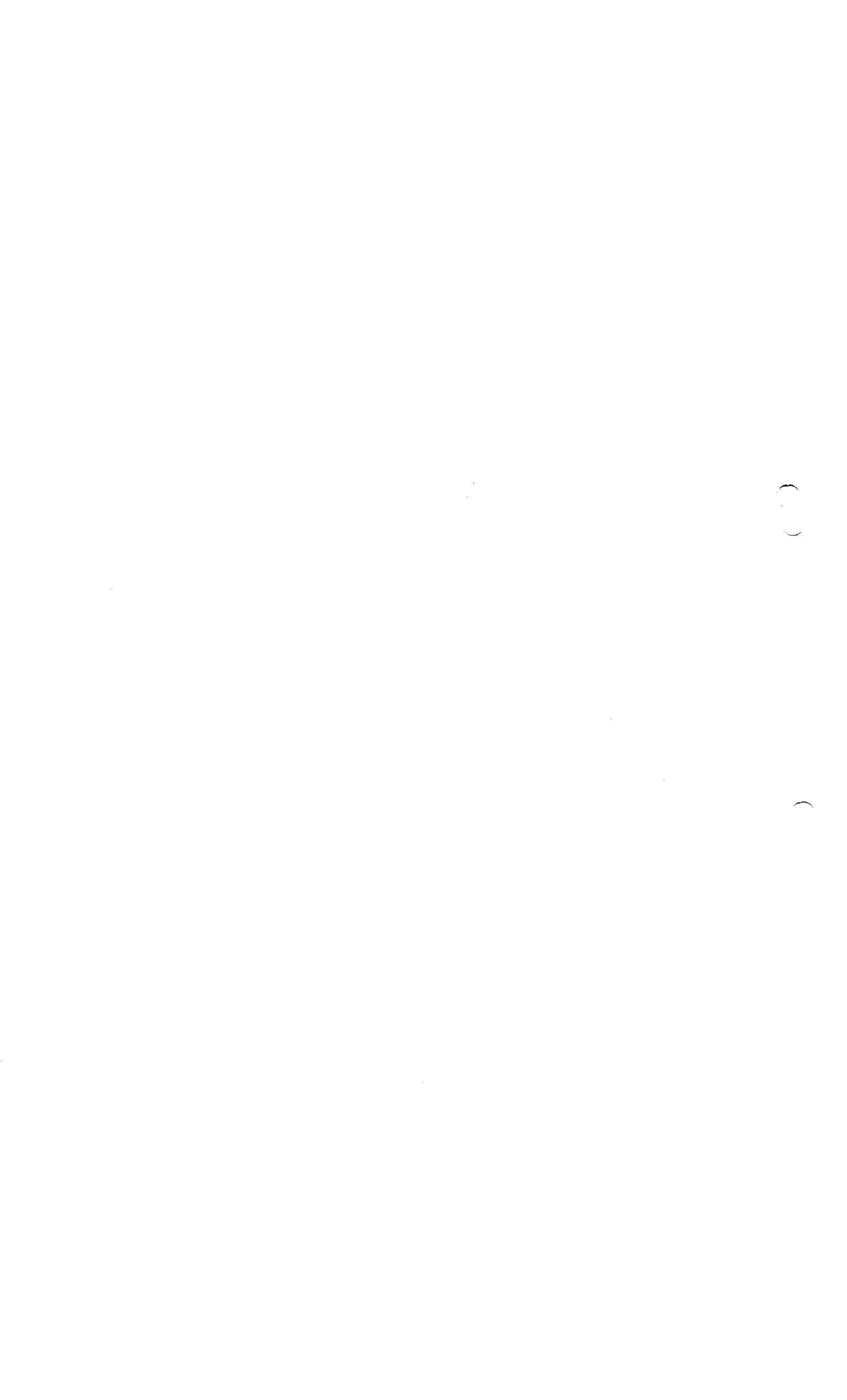
$$Y = (3,653 \pm 0,101) + (1,014 \pm 0,035) \cdot X$$

donde:

- X = dilución teórica en log
- Y = concentración medida en log
- coeficiente de la correlación lineal:  $r = 0,9981$  con 14 grados de libertad
- Rango de linealidad: [0,91 – 40,90] UE/L

  
ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

  
CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.



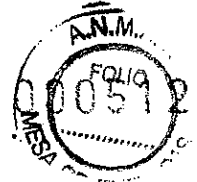
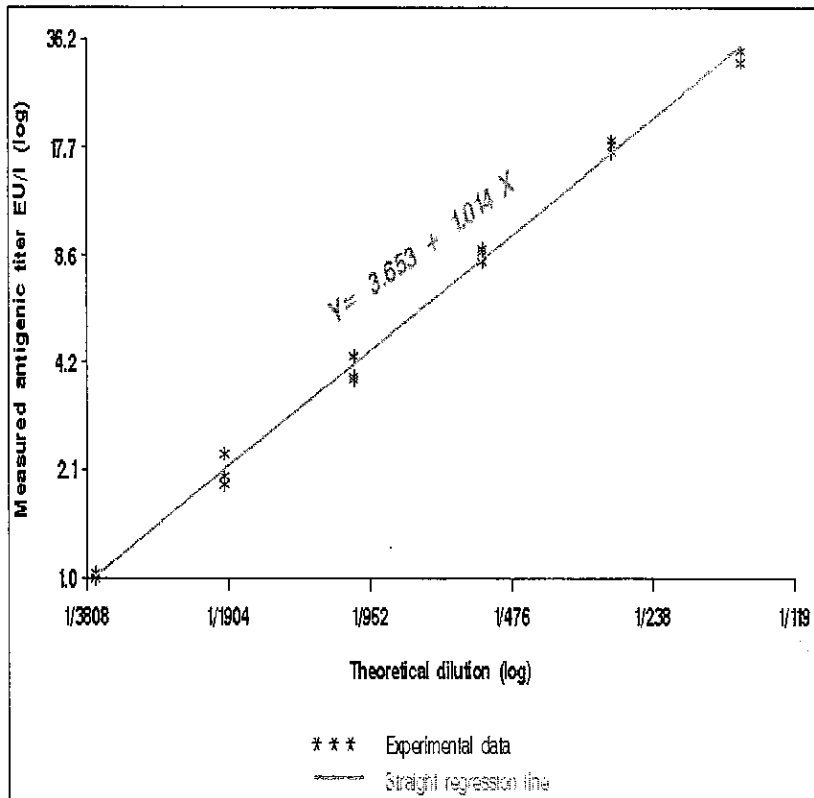


Figura 4: Titulación del PTxd por el método ELISA, gráfico de linealidad



El método es lineal en el rango [0,91 a 40,90] UE/L 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 realizaron 3 series separadas, en 3 días diferentes. Cada serie incluyó el ensayo de un rango de 6 diluciones binarias de solución de PTxd.

- Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración del antígeno de PTxd, expresada en UE/L.

Se calculó la proporción entre el título antigénico de acuerdo con las diferentes diluciones y el título de la vacuna diluida 1/238. Al expresar esa proporción en comparación con el factor de concentración teórica previsto, se obtuvo el porcentaje de recuperación.

Los resultados se suministran en la tabla 36.

( )

( )



**Tabla 36: Exactitud, factor de concentración calculado a partir del ensayo**

Factor de concentración teórica	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0,0625	0,0609	0,0550	-
0,1250	0,1337	0,1015	0,1112
0,2500	0,2545	0,2093	0,2094
0,5000	0,5266	0,4789	0,4646
2,0000	-	1,6747	1,8628

• **Análisis estadístico**

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos presentados en la tabla 36.

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

El porcentaje de recuperación promedio se debe encontrar entre el 85 % y el 115 %.

La prueba de Cochran demuestra que las varianzas de los cinco niveles de titulación teórica prevista son homogéneas.

El análisis de varianza permite concluir la igualdad de las medias interniveles.

El porcentaje de recuperación promedio y sus límites de confianza del 95 % se presentan en la tabla 37.

**Tabla 37: Exactitud, porcentaje de recuperación promedio y límite de confianza del 95 %**

Porcentaje de recuperación	Límites de confianza del 95 %
92,52%	[ 87,32 % - 97,71 %]

Debido a que el porcentaje de recuperación promedio global se encuentra entre el 85 % y el 115 %, el método es exacto.

**Precisión**

El diseño experimental fue el siguiente:

Se realizaron 3 series bajo condiciones de precisión intermedia: 3 operadores llevaron a cabo los ensayos fueron llevados a cabo, de manera independiente, utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, en 3 días diferentes. Para la repetibilidad, en cada serie, el mismo operador realizó 6 ensayos, de manera independiente, utilizando el mismo

11

12



método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo, el mismo día.

• Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración del antígeno de PTxd, expresada en UE/mg de proteínas (vea la tabla 38).

**Tabla 38: Precisión, concentraciones del antígeno PTxd (UE/mg)**

Serie 1	Serie 2	Serie 3
36,52	38,45	34,60
36,01	33,17	34,62
37,71	33,96	34,46
37,75	32,80	34,31
33,98	31,61	32,66
38,61	34,04	32,52

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

• Análisis estadístico

La homogeneidad de las varianzas intragrupos se verifica mediante la prueba de Cochran que se aplica a los datos de la tabla 38. Al adquirir la homogeneidad, se calculan los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia.

La media general es 1,542, que en forma aritmética equivale a: 34,82 UE/mg de proteínas.

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

Las características de repetibilidad y precisión intermedia se muestran en la tabla 39.



**Tabla 39: Precisión, características de repetibilidad y precisión intermedia**

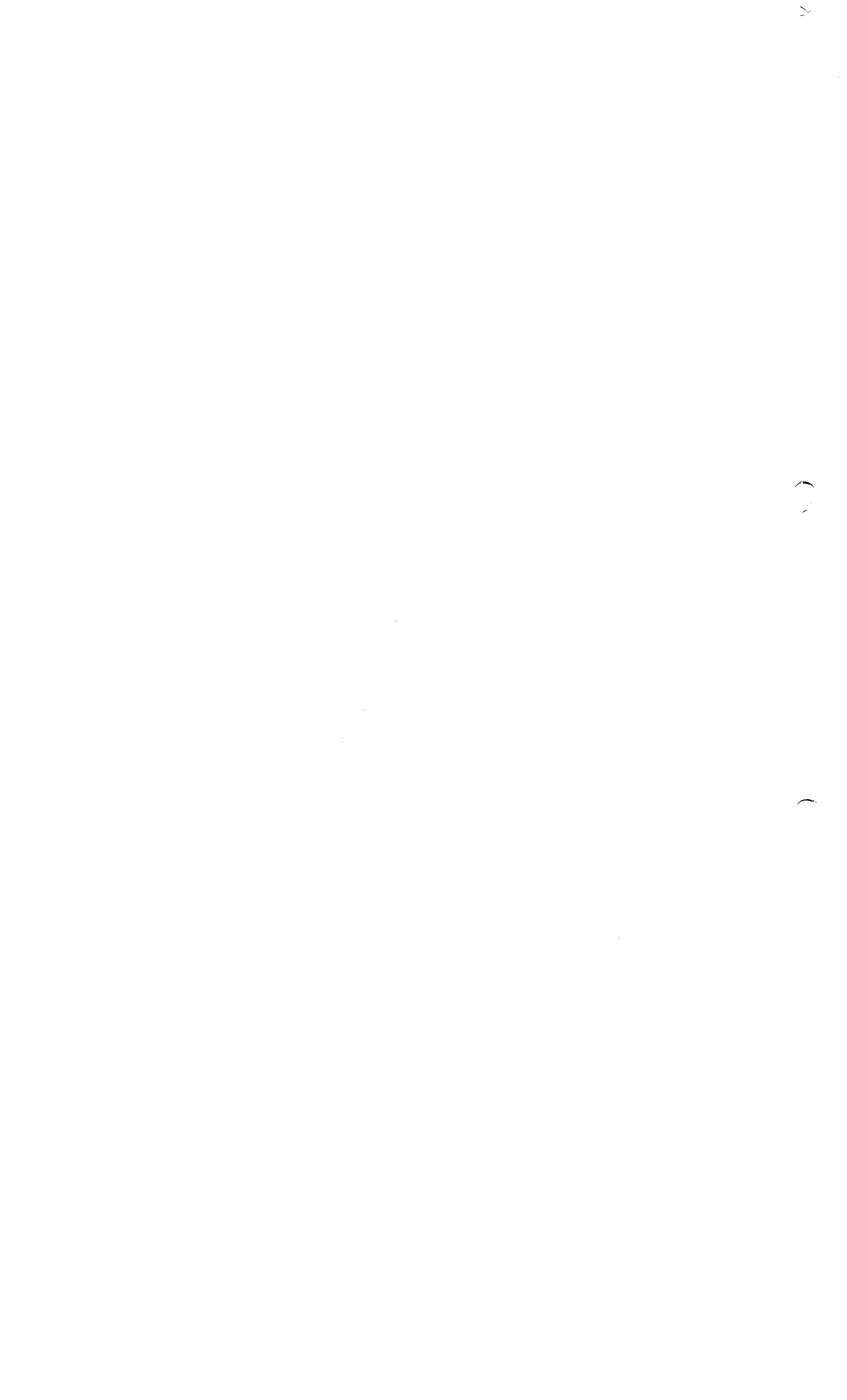
Características	Coefficiente de variación	Desviación estándar	Intervalos de confianza del 95 % con k=1 y n=1
Características de repetibilidad	1,40 %	0,022	
Características de precisión intermedia	1,83 %	0,028	± 0,059 que equivale a x/± 1,15 en forma aritmética

Debido a que el coeficiente de variación de la precisión intermedia es ≤ 10%, el método es preciso.

**Conclusión**

El método es específico.

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





El método es lineal en el rango: [ 0,91 a 40,90 ] UE/mL, en una escala log-log.

La exactitud se comprueba en el mismo rango, con una recuperación promedio del 93 %.

El método es preciso:

- el intervalo de confianza de la precisión intermedia es  $\times/\pm 1,15$  para 1 serie con 1 medición;
- la media general es 34,82 UE/mg de proteínas.

El método ELISA es válido para medir el PTxd en la vacuna contra las tos ferina, acelular, de dos componentes (FHA-PTxd) en la etapa de PTxd purificado en solución.

**3.3.4.2 Validación en la etapa de FHA purificada en solución**



**Panorama**

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

En la tabla 40, se proporciona un resumen de validación.

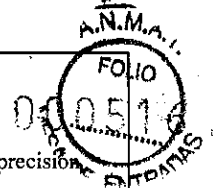
**Tabla 40: Titulación de la FHA por el método ELISA en la etapa de FHA purificada en solución, Resumen de validación**

Características	Criterios de aceptación	Resultados
<b>Especificidad</b>	La especificidad se establecerá si el antígeno de la FHA se detecta en la FHA purificada en solución y si no se detecta en el toxoide pertúsico purificado en solución.	El antígeno de la FHA se detecta en la FHA purificada en solución. El antígeno de la FHA no se detecta en el toxoide pertúsico purificado en solución.
<b>Linealidad</b>	$P_{\text{linealidad}} < 0,01$ $P_{\text{Falta de ajuste}} > 0,05$ (de lo contrario, la curvatura debe ser insignificante)	$P_{\text{linealidad}} < 0,0001$ $P_{\text{LOF}} = 0,18$ $Y = -0,018 + 0,961 \cdot X$ Donde X = concentración teórica prevista del antígeno de FHA (log[UE/mL]) e Y = concentración medida del antígeno de FHA (log[UE/mL]). $R^2 = 0,9587$ Rango de linealidad: [ 30 - 540 ] UE/mL
<b>Exactitud</b>	El porcentaje de recuperación promedio calculado para los niveles de concentración teórica previstos se debe encontrar entre el 70 % y el 130 %	El porcentaje de recuperación promedio global y sus límites de confianza del 95 % son los siguientes: 80% [71% - 88%]


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



<p><b>Precisión</b></p>	<p>El intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia debe ser menor o igual que <math>x/1,7</math></p>	<p>Media general: <math>\bar{m} = 2,317</math> ; forma aritmética: 210 UE/mg La desviación estándar relativa de la repetibilidad y de la precisión intermedia es respectivamente: 8,4% y 24,4% Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 serie con 1 medición: <math>\pm 0,220</math> que equivale a <math>x/\pm 1,66</math> en forma aritmética</p>
-------------------------	--	--



**Especificidad**

El diseño experimental fue el siguiente: 1 operador realiza una prueba de titulación de la FHA por el método ELISA en el toxoide pertúsico purificado en solución. Esta muestra se analiza como si fuera FHA en solución.

Los resultados analíticos se proporcionan en la tabla 41.

**Tabla 41: Especificidad, PTxd purificado en solución en comparación con el primer punto del rango (DO)**

Densidad óptica	DO reducida por medio de obturadores		
	1.º punto del rango	PT en solución (5 diluciones)	
0,073	0,233	0,009	0,007
	0,231	-0,005	-0,008
		-0,004	-0,005
		-0,008	-0,006
		-0,007	-0,002

Nota: se considera que el antígeno de la FHA no se detecta en una muestra determinada si la respuesta de la muestra a la dilución de rutina es menor que el primer punto del rango.

El antígeno de la FHA se detecta en la FHA purificada en solución.

El antígeno de la FHA no se detecta en anatoxina pertúsica en solución.

Por lo tanto, el método es específico para la detección del antígeno de la FHA.

**Linealidad**

El diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores realizaron 3 series separadas, en días diferentes. Cada serie incluyó el ensayo de un rango de 5 concentraciones del antígeno de la FHA, presente en la vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes (FHA-PTxd), en la etapa de FHA purificada en solución. Una muestra se concentra en FHA (muestra adyuvada) y se diluye de acuerdo con el método actual.

- Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración del antígeno de FHA, expresada en UE/mL.

En la tabla 42, se resumen los resultados del estudio.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.



Tabla 42: Linealidad, concentraciones medidas en comparación con las concentraciones teóricas previstas (UE/mL)



Muestra		Adición		Diluyente	Nivel	Dilución	Concentración teórica prevista	concentración medida		
Concentración (EU/mg)	Volumen (µL)	Concentración (EU/mL)	Volumen (µL)	Volumen (µL)				Serie 1	Serie 2	Serie 3
207,55	100	157,801	170	730	+5	1/1	434,96	INV	338,01	279,60
					+4	1/2	217,48	233,44	180,18	164,22
					+3	1/4	108,74	90,21	77,93	66,74
					+2	1/8	54,37	48,68	48,58	41,27
					+1	1/16	27,18	32,13	34,02	30,15

INV: Valor inválido

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

La concentración promedio del antígeno de la FHA de la vacuna sin diluir es la media geométrica de la precisión (= 207,55 UE/mg). Por lo tanto, la concentración teórica prevista del antígeno de la FHA de la muestra se calcula de la siguiente manera:

Concentración teórica prevista =

$$\frac{((\text{concentración de la muestra sin diluir (UE/mg)} \times \text{título de la proteína (mg/mL)}) \times \text{volumen de la muestra sin diluir (µL)}) + (\text{concentración de la adición (UE/mL)} \times \text{volumen de la adición (µL)})}{\text{volumen de la muestra sin diluir (µL)} + \text{volumen de la adición (µL)} + \text{volumen del diluyente (µL)}} \times 10 \times \text{dilución}$$

donde:

Título de la proteína = 0,80317 mg/mL

- Análisis estadístico

La linealidad en el rango seleccionado se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos presentados en la tabla 42.

La homogeneidad de las varianzas vinculadas se verifica mediante la prueba de Cochran. La dependencia entre la concentración teórica prevista del antígeno de la FHA y la concentración medida del antígeno de la FHA, 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 no significativa de la linealidad.

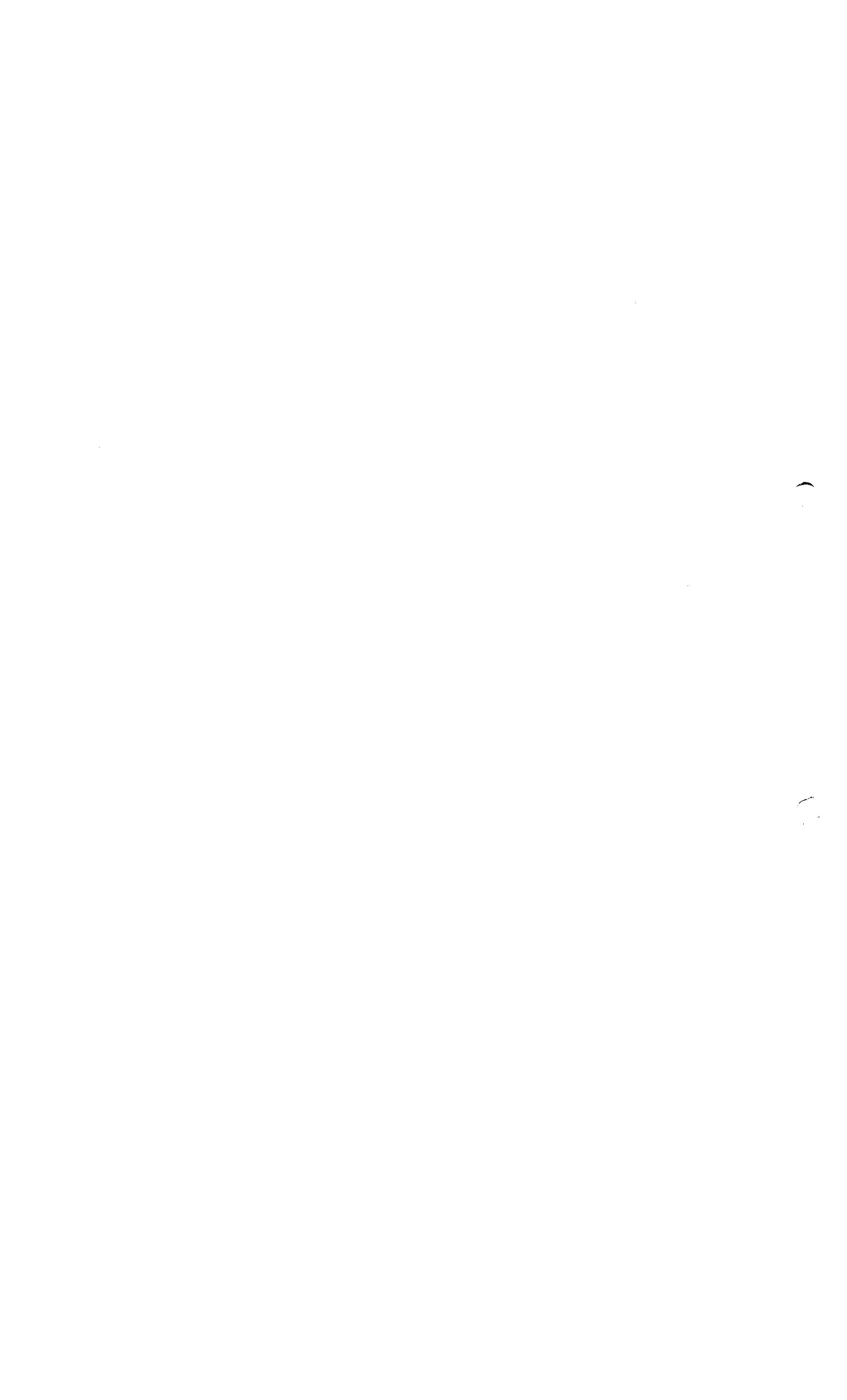
La prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas.

El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente pero no el ajuste correcto de la regresión lineal.

En el intervalo de concentración teórica de 54,37 UE/mL a 434,96 UE/mL, la prueba de Cochran muestra que las varianzas de las 3 series son homogéneas. El análisis de varianza permite concluir la significancia de la pendiente y el ajuste correcto de la regresión lineal.

ROXANA MONTEMILONE  
DIRECTORA TÉCNICA  
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ  
APODERADO  
SANOFI PASTEUR S.A.



Existe una dependencia lineal entre las concentraciones teóricas (log) y las concentraciones medidas (log).

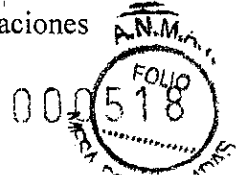
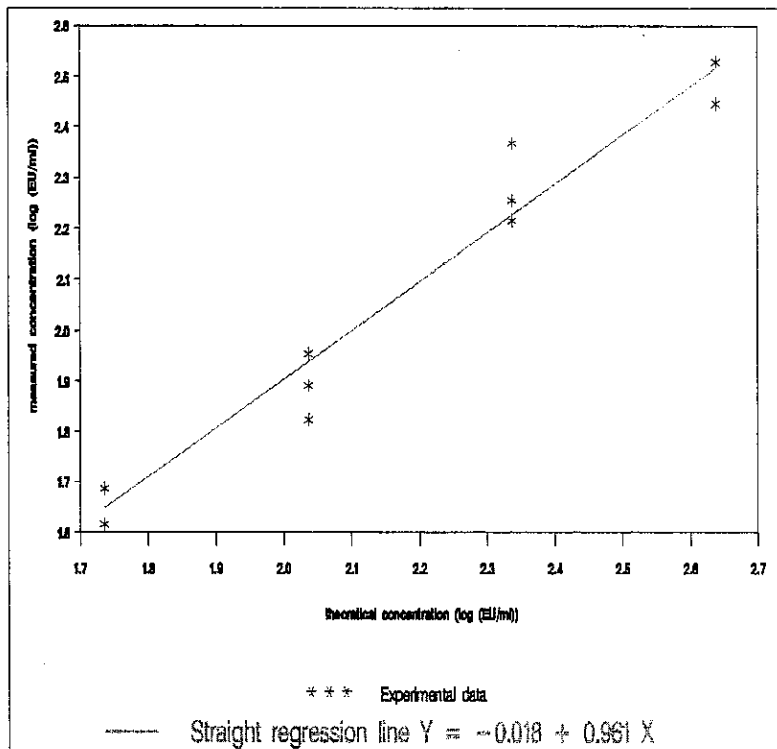


Tabla 43: Linealidad, ecuación de la recta de regresión

Ecuación de la recta de regresión	Coefficiente de determinación (R <sup>2</sup> )	Rango de linealidad en UE/mL
$Y = (-0,018 \pm 0,326) + (0,961 \pm 0,150) \cdot X$	0,9587	[27,31 - 535,89]
donde: X= concentración teórica (log[UE/mL]) Y = concentración medida (log[UE/ mL])		
$P_{\text{linealidad}}$	< 0,0001	
$P_{\text{LOF}}$	= 0,18	

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)



El método es lineal en el rango [ 27,31 - 535,89 ] UE/mL. Se cumplen todos los criterios de aceptación; por lo tanto, el método es lineal.

**Exactitud**

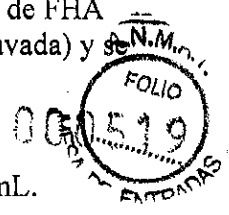
El diseño experimental fue el siguiente: 3 operadores llevaron a cabo 3 series separadas en días diferentes. Cada serie incluyó el ensayo de un rango de 5 concentraciones del antígeno de la FHA,

*[Signature]*  
 ROXANA MONTEMLONE  
 DIRECTORA TÉCNICA  
 SANOFI PASTEUR S.A.

*[Signature]*  
 CHRISTIAN DOMÍNGUEZ  
 APODERADO  
 SANOFI PASTEUR S.A.



en la vacuna contra la tos ferina, acelular, de dos componentes (FHA-PTxd), en la etapa de FHA purificada en solución. Una muestra se concentra sólidamente en FHA (muestra de adyuvada) y se diluye de acuerdo con el método actual.



- Resultados analíticos

El dato sometido a análisis es la concentración del antígeno de FHA, expresada en UE/mL. Los resultados se proporcionan en la tabla 42.

Debido a que el estudio de linealidad se realiza en el intervalo de concentración teórica de 54,37 UE/mL a 434,96 UE/mL, el estudio de exactitud se realiza en el mismo rango.

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

- Análisis estadístico

La exactitud se prueba mediante los siguientes pasos, aplicados a los datos presentados en la tabla 42.

El porcentaje de recuperación se calcula para cada nivel de concentración teórica prevista y para cada grupo (vea la tabla 44). La homogeneidad de las varianzas intraniveles se verifica mediante la prueba de Cochran. Cuando se adquiere la homogeneidad, la no significancia de las diferencias entre los niveles de concentración teórica se comprueba con un análisis de varianza. Cuando se comprueba la igualdad de las medias interniveles, el porcentaje de recuperación promedio global se calcula con los límites de confianza del 95 %.

El porcentaje de recuperación promedio se debe encontrar entre el 70 % y el 130 %.

**Tabla 44: Exactitud, porcentaje de recuperación promedio por concentración**

Nivel de concentración teórica (UE/mL)	Porcentaje de recuperación promedio
54,37	85 %
108,74	72 %
217,48	89 %
434,96	71 %

La prueba de Cochran muestra que las varianzas de los niveles de titulación teórica prevista son homogéneas.

El análisis de varianza permite concluir la igualdad de las medias interniveles.

El porcentaje de recuperación promedio global y sus límites de confianza del 95 % se presentan en la tabla 45.

**Tabla 45: Exactitud, porcentaje de recuperación promedio global y límites de confianza del 95 %**

Porcentaje de recuperación	Límites de confianza del 95 %
80 %	[ 71%- 88%]

