

contenga 4 dosis citopáticas mínimas (MCD), salvo en los pocillos con medio de cultivo y control celular. Las placas se incuban a 37 °C durante 1 a 3 horas. Tras la incubación, se agrega la suspensión de células Vero a todos los pocillos de la placa de análisis, excepto a los pocillos de control del medio de cultivo y de control celular. Los pocillos de control celular reciben la suspensión de células Vero sin diluir o varias diluciones de la misma. Los pocillos de control del medio de cultivo reciben el medio de cultivo solo. Se sella cada pocillo con aceite mineral y se incuban las placas a 37 °C durante 6 a 8 días. El criterio de valoración del análisis es la máxima dilución de suero que neutraliza la toxina indicada por el último pocillo de la serie de dilución que muestra un cambio de color del indicador de pH rojo de fenol al amarillo.

Para cada serie del análisis, la antitoxina detectable mínima (MDA) se define como la máxima dilución (concentración más baja) del estándar de referencia que muestra un cambio de color al amarillo, lo que indica protección contra la toxina de desafío. Las unidades asignadas a los resultados de las muestras de prueba por el estándar de referencia se expresan en unidades internacionales por mililitro (UI/mL). Se calculan multiplicando la MDA del estándar de referencia por la dilución de la muestra de prueba correspondiente al último pocillo amarillo de la placa de análisis.

5.1.1.4 Resumen de validación de la prueba

GCI validó la MIT-pH para toxina diftérica evaluando su precisión, selectividad, robustez y límite de detección (LOD). El análisis de los datos demostró un rendimiento óptimo de esta prueba para la cuantificación de los niveles de anticuerpos contra la difteria en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.1.2 Prueba de inhibición micrometabólica de la toxina diftérica con cristal violeta

La MIT-CV para toxina diftérica es similar a la MIT-pH para toxina diftérica (sección 5.1.1), pero con una lectura más fácil de la monocapa Vero al final del análisis. Se utiliza colorante cristal violeta en lugar del cambio de color de un indicador de pH.

5.1.2.1 Principio de la prueba

La MIT-CV para toxina diftérica mide el anticuerpo sérico funcional contra la toxina diftérica utilizando células Vero y la toxina sintetizada por *Corynebacterium diphtheriae*. Se mezclan diluciones seriadas de suero humano con toxina de desafío diftérico y se incuban con células Vero sensibles a la toxina. Los anticuerpos neutralizantes específicos de la toxina diftérica contenidos en las muestras de suero se unen a la toxina y la neutralizan. La toxina neutralizada no afecta la viabilidad celular; por lo tanto, las células cultivadas siguen siendo viables y forman una monocapa confluyente, que se tiñe de púrpura al añadir cristal violeta. En ausencia de anticuerpos neutralizantes, la toxina de desafío causa una pérdida de la viabilidad celular y las células se desprenden de la placa del análisis. La adición de cristal violeta a las células cultivadas expuestas y que murieron debido a la toxina produce la falta de tinción (ausencia de color).



5.1.2.2 Justificación/Fundamentación de la prueba

La MIT-CV para toxina diftérica se considera un análisis muy sensible y específico para determinar la respuesta protectora de anticuerpos a la toxina diftérica secretada por *Corynebacterium diphtheriae* durante la infección. Este procedimiento es reproducible, utiliza un volumen de suero pequeño y permite analizar numerosas muestras de suero al mismo tiempo. La MIT-CV para toxina diftérica, que utiliza células Vero, es un análisis de neutralización recomendado en las directrices del PAI de la OMS para determinar el nivel circulante de antitoxina diftérica en sueros humanos (3).

5.1.2.3 Resumen del procedimiento de prueba

MIT-CV para toxina diftérica realizada de conformidad con las SWI J003740 de sanofi pasteur (*Determinación de antitoxina diftérica en unidades internacionales: procedimiento de tinción con cristal violeta*).

Cada muestra de prueba y control se diluyó en diluciones dobles en serie a lo largo de las filas de la placa de microtitulación. En cada pocillo se dispensó toxina diftérica titulada para contener 4 dosis MCD, salvo en los pocillos con medio de cultivo y control celular. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 a 3 horas. Tras la incubación, se agregó una suspensión de células Vero a todos los pocillos de la placa de análisis, excepto a los pocillos de control del medio de cultivo y de control celular. Los pocillos de control celular recibieron la suspensión de células Vero sin diluir o varias diluciones de la misma. Los pocillos de control del medio de cultivo recibieron el medio de cultivo solo. Las placas se incubaron a 37 °C en una incubadora con CO₂ humidificada durante 6 a 8 días. El criterio de valoración del análisis fue la máxima dilución de suero que neutralizó la toxina indicada por el último pocillo de la serie de dilución que se tiñó de púrpura.

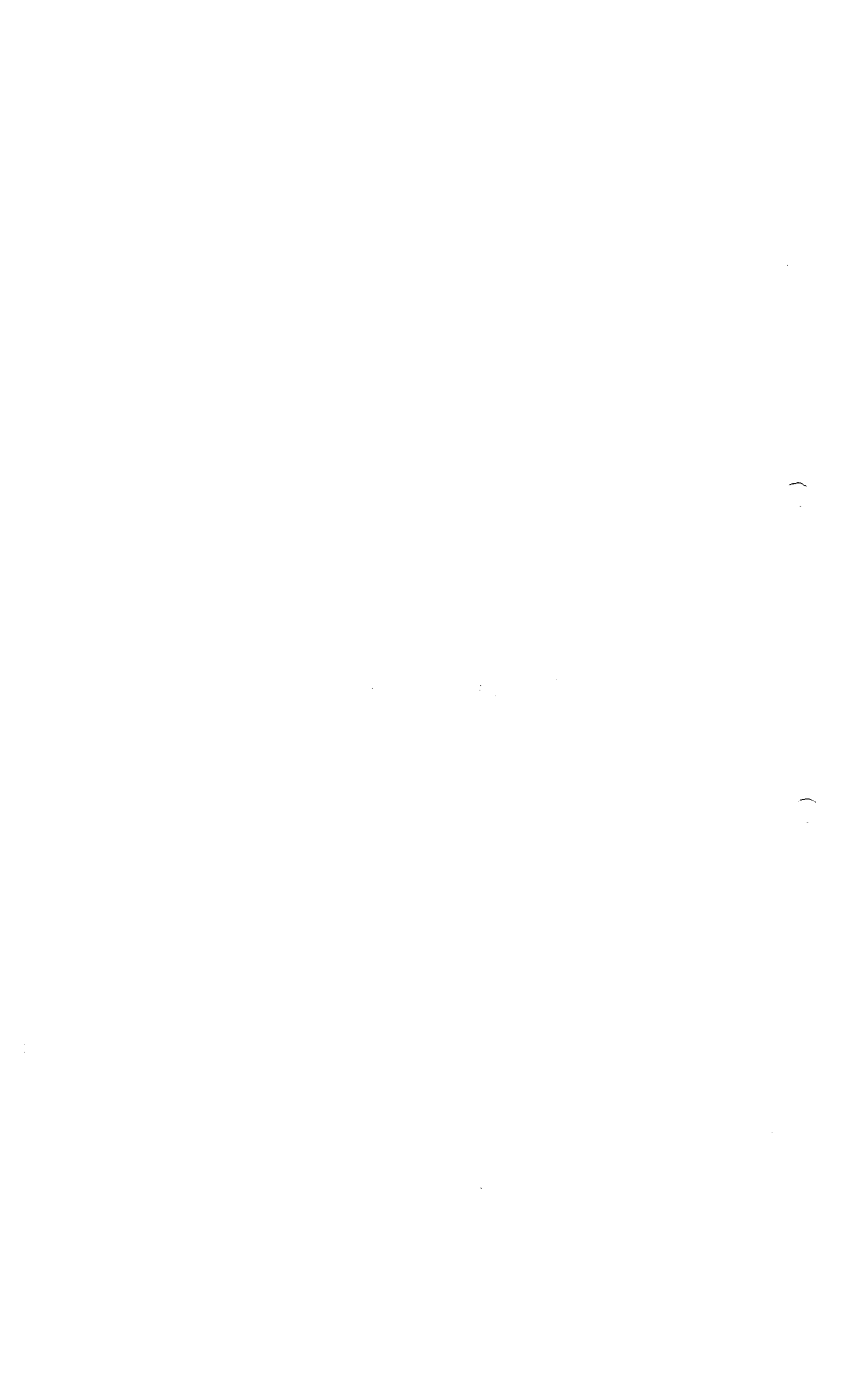
Para cada serie del análisis, la MDA se definió como la máxima dilución (concentración más baja) del estándar de referencia que se tiñe de púrpura, lo que indica protección contra la toxina de desafío. Las unidades asignadas a los resultados de las muestras de prueba por el estándar de referencia se expresan en unidades internacionales por mL (UI/mL). Se calcularon multiplicando la MDA del estándar de referencia por la dilución de la muestra de prueba correspondiente al último pocillo teñido de púrpura de la placa de análisis.

5.1.2.4 Resumen de validación de la prueba

La MIT-CV para toxina diftérica fue validada mediante la evaluación de su precisión intranalítica, precisión interanalítica, exactitud, diluibilidad, especificidad, límite inferior de cuantificación (LLOQ) y concordancia. El análisis de los datos demostró un rendimiento óptimo de esta prueba para la cuantificación de los niveles de anticuerpos contra la difteria en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.1.2.5 Resumen del análisis de concordancia

Se llevó a cabo un análisis de concordancia entre los análisis validados MIT-pH y MIT-CV para toxina diftérica realizados por GCI para evaluar la comparabilidad de los resultados generados por ambos métodos. La MIT-pH para toxina diftérica concordó con la MIT-CV para toxina diftérica lo que demuestra que ambos análisis generan resultados similares.





5.2 ELISA para IgG de tétanos

Se utilizó ELISA para inmunoglobulina G (IgG) de tétanos para evaluar los anticuerpos contra el toxoide tetánico en sueros humanos. Una descripción detallada del ELISA para IgG de tétanos, llevado a cabo por CGI, que se presenta más abajo, demuestra que el análisis es válido y aceptable para el uso previsto de cuantificar los niveles de anticuerpos antitetánicos en suero humano.

5.2.1 Principio de la prueba

El análisis ELISA para IgG de tétanos se utiliza para cuantificar la cantidad de anticuerpos contra el toxoide tetánico en suero humano. El antígeno tetánico purificado se adsorbe en los pocillos de una placa de microtitulación. Muestras de suero diluidas (muestras de prueba, estándar de referencia y control de calidad) se incuban en los pocillos. Los anticuerpos específicos de las muestras de suero se unen al antígeno inmovilizado. Los anticuerpos no unidos se lavan de los pocillos y se añaden inmunoglobulinas antihumanas conjugadas a enzimas. El conjugado de enzimas se une al complejo antígeno-anticuerpo. Se lava el conjugado excedente y se agrega un sustrato colorimétrico específico. La enzima unida cataliza una reacción hidrolítica, que inicia una coloración. Una vez que el estándar de referencia llega a una densidad óptica específica (DO), se detiene la reacción. La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de anticuerpo específico unido a los pocillos. Los resultados se leen en un espectrofotómetro (lector de placas de ELISA). Un estándar de referencia analizado en cada placa se utiliza para calcular la cantidad de anticuerpos específicos contra tétanos presentes en las unidades asignadas por el estándar de referencia (UI/mL).

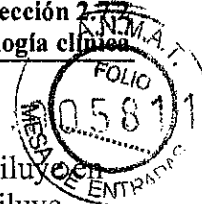
5.2.2 Justificación/Fundamentación de la prueba

Los anticuerpos que neutralizan la toxina tetánica secretada por *Clostridium tetani* se pueden medir utilizando métodos de análisis *in vivo* o *in vitro*. El ELISA para IgG de tétanos es un método relativamente sencillo, rápido y económico que requiere cantidades pequeñas de material para medir anticuerpos antitetánicos en sueros humanos. El ELISA para IgG de tétanos se creó como alternativa a la prueba de neutralización en ratones (MNT) para tétanos, y es un método apropiado para estimar la cantidad de anticuerpos antitetánicos en sueros humanos.

5.2.3 Resumen del procedimiento de prueba

ELISA para IgG de tétanos realizado de conformidad con la SWI J000051 de sanofi pasteur (*Método ELISA para la determinación de anticuerpos contra el tétanos en unidades internacionales*).

Se recubren placas de microtitulación de noventa y seis pocillos con solución de antígeno de cobertura añadiendo toxoide tetánico diluido a todos los pocillos de la placa de microtitulación. Las placas recubiertas se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS)/Tween después de la incubación. Se diluye una ampolla del estándar de la OMS que contiene inmunoglobulina antitetánica liofilizada para crear una concentración de trabajo que se diluye en serie a lo largo de las columnas de la placa de microtitulación y se utiliza para establecer la curva estándar. Cada control se diluye en serie en ocho diluciones dobles a lo largo de las columnas de la placa de microtitulación. Los controles se analizan aisladamente en cada placa. La dilución inicial para las



muestras de prueba se basa en el historial de inmunización. Cada muestra de prueba se diluye en diluciones dobles en serie a lo largo de las columnas de la placa de microtitulación. Se diluye el conjugado de anticuerpos hasta la dilución óptima de trabajo y se añade a cada pocillo. Tras la incubación, se añade a todos los pocillos solución de sustrato enzimático. Se controla por espectrofotometría la formación de color hasta que la DO del pocillo que contiene la máxima concentración del estándar de referencia alcanza un valor $> 1,5$. Las concentraciones se determinan por el método de cálculo de la línea de referencia utilizando un programa de reducción de datos.

5.2.4 Resumen de la validación de la prueba

El ELISA para IgG de tétanos se validó evaluando su precisión, diluibilidad, LOD y LLOQ. El análisis de los datos demostró un rendimiento óptimo de esta prueba para la cuantificación de los niveles de anticuerpos antitetánicos en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.3 ELISA para IgG de tos ferina

Los ELISA para IgG de tos ferina (anti-PT y anti-FHA) llevados a cabo por GCI se utilizaron para evaluar la respuesta inmunitaria a los anticuerpos antipertúsicos en sueros humanos. Una descripción detallada del ELISA para IgG de PT y del ELISA para IgG de FHA, que se presentan más abajo en la sección 5.3.3 y en la sección 5.3.4, respectivamente, demuestran que los ELISA son válidos y aceptables para el uso previsto de cuantificar los niveles de anticuerpos antipertúsicos en suero humano.

5.3.1 Principio de las pruebas

Los ELISA para IgG de tos ferina se utilizan para cuantificar la cantidad de anticuerpos antipertúsicos en suero humano. El antígeno pertúsico purificado (ya sea PT o FHA) se adsorbe en los pocillos de una placa de microtitulación. En estos pocillos se incubaron muestras de suero diluido. Los anticuerpos antipertúsicos específicos de las muestras de suero se unen al antígeno pertúsico inmovilizado para formar complejos antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos no unidos se lavaron de los pocillos y se agregó inmunoglobulina antihumana conjugada a enzimas. El conjugado de enzimas se une al complejo antígeno-anticuerpo. El exceso de conjugado se eliminó por lavado y se añadió un sustrato colorimétrico específico. La enzima unida catalizó una reacción hidrolítica, que produjo una coloración. Después de un tiempo específico, se detuvo la reacción. La intensidad del color generado es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos unidos a los pocillos. Los resultados se leyeron en un espectrofotómetro (lector de placas de ELISA). Se calculó la absorbancia neta restando el valor de la absorbancia media para los pocillos testigo recubiertos de antígeno de todos los valores de absorbancia para el resto de los pocillos. Un suero estándar de referencia empleado en cada placa se utilizó para calcular la cantidad de anticuerpo antipertúsico específico presente en las muestras de prueba mediante una comparación con la curva estándar de referencia. Las unidades asignadas a los resultados de las muestras de prueba por el suero del estándar de referencia se expresan en unidades ELISA por mL (UE/mL).



5.3.2 Justificación/Fundamentación de las pruebas

Los anticuerpos antipertúsicos que se unen a los antígenos producidos por *Bordetella pertussis* se pueden medir utilizando métodos de análisis *in vivo* o *in vitro*. Entre los métodos *in vitro*, los ELISA para IgG de tos ferina tienen buena sensibilidad y especificidad, y requieren cantidades pequeñas de suero para medir los anticuerpos antipertúsicos. Los ELISA para IgG de tos ferina fueron creados como alternativa a la prueba de aglutinación bacteriana y a la prueba de neutralización *in vitro* (4).

5.3.3 ELISA para IgG de toxina pertúsica

5.3.3.1 Resumen del procedimiento de prueba

ELISA para IgG de PT realizado de conformidad con la SWI J003765 de sanofi pasteur (*Titulación mediante ELISA de anticuerpos anti-PT en suero o plasma humano, método [francés]*).

Las placas de microtitulación se recubrieron con solución de recubrimiento de antígenos. Las placas recubiertas se lavaron con PBS que contenía Brij 35 al 0,33 % después de la incubación y se utilizaron el día del lavado. Se diluyó el estándar de referencia para crear una concentración de trabajo que se añadió a la placa de microtitulación por duplicado, se diluyó en serie a lo largo de las columnas de la placa y se utilizó para establecer la curva estándar. Se diluyeron en serie controles altos y medios de anticuerpo anti-PT a lo largo de las columnas de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Los controles se analizaron por duplicado en cada placa. Se añadió control negativo de anticuerpos anti-PT a cada placa de análisis en 4 pocillos. Las muestras clínicas se diluyeron en una serie de diluciones dobles y se transfirieron a la placa de análisis por duplicado. La dilución inicial se modificó en función del historial de inmunización. Las placas se incubaron a 28 °C durante 2 horas. El conjugado de anticuerpos se diluyó hasta la dilución óptima de trabajo y se añadió a todos los pocillos excepto a los pocillos testigo de conjugado. Se incubaron las placas a 28 °C durante 20-24 horas y, tras la incubación, se añadió solución de sustrato enzimático a todos los pocillos. Las placas se incubaron a temperatura ambiente antes de detener la reacción. La formación de color se midió mediante espectrofotometría. Se calcularon los títulos basándose en la comparación entre la pendiente de la curva de respuesta a la dosis y la regresión lineal de la referencia y la de cada muestra analizada en paralelo.

5.3.3.2 Resumen de la validación de la prueba

El ELISA para IgG de PT fue validado por Sanofi Pasteur, SA, Val de Reuil, Francia, mediante la evaluación de su precisión, exactitud, linealidad (diluibilidad) y LLOQ. El análisis de los datos demostró un rendimiento óptimo de esta prueba para la cuantificación de los niveles de anticuerpos anti-PT en suero humano. Posteriormente el análisis fue transferido entre laboratorios de Sanofi Pasteur, SA a GCI sanofi pasteur, EE. UU. Para verificar la validez del análisis transferido antes de la evaluación de las muestras clínicas, se evaluó la precisión y la exactitud, y los resultados de la transferencia mostraron que las características de rendimiento del ELISA para IgG de PT eran adecuadas para medir los niveles de anticuerpos anti-PT en muestras de suero humano de los estudios clínicos.



5.3.4 ELISA para IgG de hemaglutinina filamentosa

5.3.4.1 Resumen del procedimiento de prueba

ELISA para IgG de FHA realizado de conformidad con la SWI J003769 de sanofi pasteur (*Titulación mediante ELISA de anticuerpos antihemaglutinina filamentosa en suero o plasma humano, método [francés]*).

Las placas de microtitulación se recubrieron con solución de recubrimiento de antígenos. Las placas recubiertas se lavaron con PBS que contenía Brij 35 al 0,33 % después de la incubación y se utilizaron el día del lavado. Se diluyó el estándar de referencia para crear una concentración de trabajo que se añadió a la placa de microtitulación por duplicado, se diluyó en serie a lo largo de las columnas de la placa y se utilizó para establecer la curva estándar. Se diluyeron en serie controles altos y medios de anticuerpos anti-FHA a lo largo de las columnas de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Los controles se analizaron por duplicado en cada placa. Se añadió control negativo de anticuerpos anti-FHA a cada placa de análisis en 4 pocillos. Las muestras clínicas se diluyeron en una serie de diluciones dobles y se transfirieron a la placa de análisis por duplicado. La dilución inicial se modificó en función del historial de inmunización. Las placas se incubaron a 28 °C durante 2 horas. El conjugado de anticuerpos se diluyó hasta la dilución óptima de trabajo y se añadió a todos los pocillos excepto a los pocillos testigo de conjugado. Se incubaron las placas a 28 °C durante 20-24 horas y, tras la incubación, se añadió solución de sustrato enzimático a todos los pocillos. Las placas se incubaron a temperatura ambiente antes de detener la reacción. La formación de color se midió mediante espectrofotometría. Se calcularon los títulos siguiendo el método de bioanálisis de líneas paralelas basándose en la comparación entre la pendiente de la curva de respuesta a las dosis y la regresión lineal de la referencia y la de cada muestra analizada en paralelo.

5.3.4.2 Resumen de la validación de la prueba

El ELISA para IgG de FHA fue validado por Sanofi Pasteur, SA, Val de Reuil, Francia, mediante la evaluación de su precisión, exactitud, linealidad (diluibilidad) y LLOQ. El análisis de los datos demostró un rendimiento óptimo de esta prueba para la cuantificación de los niveles de anticuerpos anti-FHA en suero humano. Posteriormente el análisis fue transferido entre laboratorios de Sanofi Pasteur, SA a GCI sanofi pasteur, EE. UU. Para verificar la validez del análisis transferido antes de la evaluación de las muestras clínicas, se evaluó la precisión y la exactitud, y los resultados de la transferencia mostraron que las características de rendimiento del ELISA para IgG de FHA eran adecuadas para medir los niveles de anticuerpos anti-FHA en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.4 Análisis serológicos para poliovirus

Se utilizaron dos análisis para evaluar la respuesta de anticuerpos a los poliovirus tipo 1, 2 y 3: la MIT-WT para poliovirus realizada por GCI y la MIT-Sa para poliovirus realizada por Focus Diagnostics, Inc. Ambos análisis miden el nivel de anticuerpos neutralizantes contra a poliovirus.





La MIT-WT para poliovirus es similar a la MIT-Sa para poliovirus, pero utiliza células Vero (células renales de mono verde africano) como línea celular indicadora y poliovirus salvaje de las cepas 1, 2 y 3 (Mahoney, MEF-1 y Saukett, respectivamente) como virus de desafío, frente a las células HEp2 (Cincinnati) como línea celular indicadora y siembra viral para los tipos Sabin 1, 2 y 3 como virus de desafío. Un estudio de concordancia mostró que la MIT-WT para poliovirus realizada por GCI y la MIT-Sa para poliovirus realizada por Focus Diagnostics, Inc. no concordaban (sección 5.4.2.5).

Las descripciones detalladas de la MIT-WT para poliovirus realizada por GCI y la MIT-Sa para poliovirus realizada por Focus Diagnostics, Inc. que se presentan a continuación, en la sección 5.4.1 y en la sección 5.4.2, respectivamente, demuestran que estos análisis de poliovirus son individualmente válidos y aceptables para el uso previsto de cuantificar los niveles de anticuerpos antipoliovirus en sueros humanos.

5.4.1 Prueba de inhibición micrometabólica para poliovirus con virus de tipo salvaje/células Vero

5.4.1.1 Principio de la prueba

La MIT-WT para poliovirus es un análisis funcional *in vitro* que mide el nivel de anticuerpos neutralizantes contra poliovirus. Se mezclan diluciones en serie de suero con poliovirus de desafío y se incuban con células Vero cultivadas sensibles al poliovirus. Los anticuerpos neutralizantes específicos que contiene el suero se unen a los poliovirus de desafío y los neutralizan. Los poliovirus neutralizados no afectan la viabilidad celular y estas células continúan metabolizando y liberando CO₂, lo cual reduce el pH del medio de cultivo. La supervivencia celular se correlaciona con el cambio en el indicador de pH (rojo de fenol a amarillo a un pH ≤ 7,0) que contenía el medio. En ausencia de anticuerpos neutralizantes, el poliovirus de desafío reduce el metabolismo celular y la producción de CO₂. Por consiguiente, el pH no disminuye y no se detecta un cambio de color.

La MIT-WT para poliovirus mide la respuesta funcional de anticuerpos séricos contra el poliovirus utilizando células Vero como línea celular indicadora (células renales de mono verde africano) y poliovirus salvaje de las cepas 1, 2 y 3 (Mahoney, MEF-1 y Saukett, respectivamente) como virus de desafío.

5.4.1.2 Justificación/Fundamentación de la prueba

Los análisis de neutralización de poliovirus se consideran altamente sensibles y son recomendados por la OMS para medir la inmunidad contra poliovirus (5) (6). Este procedimiento es reproducible, utiliza un volumen pequeño de suero y permite el análisis de numerosas muestras de suero al mismo tiempo, y se considera el método más específico para determinar la respuesta protectora de anticuerpos contra las infecciones de poliovirus. La OMS recomienda utilizar células HEp2 para el análisis de neutralización; no obstante, Albrecht (7) determinó que las células Vero son equivalentes a las células HEp2 cuando se hacen análisis de anticuerpos de poliovirus utilizando cepas de virus de tipo salvaje.



5.4.1.3 Resumen del procedimiento de prueba

MIT-WT para poliovirus realizada de conformidad con la SWI J001656 de sanofi pasteur (*Determinación de anticuerpos contra poliovirus mediante pruebas de inhibición micrometabólica [MIT]*).

Se prepararon placas de microtitulación para analizar cada tipo de poliovirus con el fin de establecer un título de criterio de valoración y un título medio geométrico (GMT) dinámico para cada análisis. La placa de microtitulación también contenía el control celular y el control de medios. Se añadieron sueros de control y se diluyeron en medio de cultivo mediante once diluciones dobles en serie a lo largo de la placa de microtitulación. Cada muestra de prueba se diluyó en diluciones dobles en serie en medio de cultivo a lo largo de las filas de la placa de microtitulación. Las muestras que se esperaba que tuvieran la titulación más elevada se diluyeron en serie a lo largo de dos placas de microtitulación. Se dispensó poliovirus de desafío específico para el tipo en cada pocillo, salvo en los pocillos de medio de cultivo, de control celular y de control de muestra. Para cada tipo de poliovirus, se prepararon diluciones de poliovirus de desafío en tubos. Se añadieron 25 microlitros de medio de cultivo a los pocillos de una placa de microtitulación de virus de desafío. Se transfirieron 25 microlitros de cada dilución en serie de virus de desafío desde los tubos a los pocillos correspondientes de la placa de microtitulación de virus de desafío. Las placas de microtitulación se incubaron a 37 °C durante 3 horas.

Tras la incubación, se agregó la suspensión de células Vero a todos los pocillos de la placa, excepto a los pocillos del medio de cultivo y de control celular. Los pocillos de control celular recibieron la suspensión de células Vero sin diluir o varias diluciones de la misma. Los pocillos de control del medio de cultivo recibieron el medio de cultivo solo. Se selló cada pocillo de las placas de microtitulación con aceite mineral. La actividad viral se evidenciaba visualmente por el color rojo/rosado del indicador de pH del medio de cultivo celular ($\text{pH} \geq 7,4$). La neutralización específica del poliovirus de desafío por el suero de prueba o la ausencia de actividad viral se evidenciaba visualmente por el color amarillo o amarillo anaranjado ($\text{pH} \leq 7,0$). Para determinar la dilución (antes de agregar el virus) de suero que neutraliza el 50 % del virus de desafío se empleó el método Karber. El título de dilución sérica se expresó como la inversa de la dilución (título).

5.4.1.4 Resumen de la validación de la prueba

La MIT-WT para poliovirus se validó evaluando su precisión, exactitud, diluibilidad, especificidad, LLOQ, estabilidad a corto plazo y robustez. El análisis de los datos demostró un rendimiento óptimo de esta prueba para la cuantificación de los niveles de anticuerpos contra poliovirus en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.4.2 Prueba de inhibición micrometabólica para poliovirus con cepa Sabin/células HEp2

5.4.2.1 Principio de la prueba

La MIT-Sa para poliovirus es una prueba de anticuerpos *in vitro* que mide el nivel de anticuerpos neutralizantes contra poliovirus. Se mezclan diluciones en serie de suero con poliovirus de desafío y se incuban con células HEp2 cultivadas sensibles al poliovirus. Los anticuerpos neutralizantes



específicos que contiene el suero se unen a los poliovirus de desafío y los neutralizan. El poliovirus neutralizado no afecta la viabilidad celular, lo cual indica ausencia de efecto citopático (CPE), y estas células pueden visualizarse tras su tinción con cristal violeta. En ausencia de anticuerpos neutralizantes, lo cual indica crecimiento o toxicidad viral, las células no se pueden visualizar tras su tinción con cristal violeta.

La MIT-Sa para poliovirus midió la respuesta funcional de anticuerpos séricos contra poliovirus utilizando células HEp2 (Cincinnati) como línea celular indicadora y siembra viral para los tipos Sabin 1, 2 y 3 como virus de desafío.

5.4.2.2 Justificación/Fundamentación de la prueba

Los análisis de neutralización de poliovirus se consideran muy sensibles y son recomendados por la OMS para medir la inmunidad contra poliovirus (5) (6). Este procedimiento es reproducible, utiliza un volumen pequeño de suero y permite el análisis de numerosas muestras de suero al mismo tiempo, y se considera el método más específico para determinar la respuesta protectora de anticuerpos contra las infecciones por poliovirus.

5.4.2.3 Resumen del procedimiento de prueba

MIT-Sa para poliovirus realizada de conformidad con el POE TSOP.119.040 de Focus Diagnostics, Inc. (*Anticuerpo contra poliovirus, neutralización [Protocolo de la OMS]*).

Se prepararon placas de microtitulación de control de calidad para analizar cada tipo de poliovirus. Se analizó suero estándar interno en ocho repeticiones en cada serie de análisis. Se analizaron por triplicado sueros de control con titulación alta, media y baja en cada serie de análisis. Se añadieron suero estándar interno y sueros de control a la placa de microtitulación y se diluyeron en medio de cultivo en once diluciones dobles en serie a lo largo de la placa. Se incluyó como control negativo en cada serie de análisis una placa de control celular que contenía células sin inocular. Cada muestra de prueba se analizó por triplicado y se diluyó en diluciones dobles en serie en medio de cultivo a lo largo de las filas de la placa de microtitulación.

Se llevaron a cabo titulaciones retrógradas del virus de desafío para confirmar la actividad y la concentración de los serotipos virales. Se prepararon diluciones de poliovirus de desafío para cada tipo de poliovirus para que contuvieran 100 TCID₅₀/25 µL. Se realizó la titulación retrógrada analizando el virus de trabajo sin diluir y en diluciones de 1/10, 1/100 y 1/1000

Se dispuso poliovirus de desafío específico de tipo en los pocillos correspondientes de las placas de microtitulación. Las placas de prueba se colocaron en bolsas de plástico parcialmente selladas y se incubaron a 36 °C ± 1 °C en una incubadora con CO₂ durante 3 horas. Tras la incubación, se agregó la suspensión de células HEp2 a todos los pocillos de la placa, excepto a los pocillos del medio de cultivo y del control celular. Las placas de prueba se colocaron en bolsas de plástico parcialmente selladas y se incubaron a 36 °C ± 1 °C en una incubadora con CO₂ durante 5 días. Tras la incubación, las placas fueron retiradas y teñidas con cristal violeta. Sin fragmentar la monocapa celular, se aspiró por completo el líquido de los pocillos y se añadieron 100 µL de solución de cristal violeta a todos los pocillos de la placa de análisis. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 40 min. Tras la incubación, se lavaron las placas y se dejaron secar antes de su interpretación. El criterio de valoración (título) se determinó como la máxima dilución

de suero (último pocillo) capaz de neutralizar por completo el virus, según lo indica la ausencia de CPE o la presencia de células teñidas.

5.4.2.4 Resumen de la validación de la prueba

La MIT-Sa para poliovirus se validó evaluando su especificidad, linealidad, precisión, sensibilidad, exactitud y robustez. El análisis de los datos demostró un rendimiento óptimo de esta prueba para la cuantificación de los niveles de anticuerpos contra poliovirus en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.4.2.5 Resumen del análisis de concordancia

Se llevó a cabo un análisis de concordancia entre los análisis MIT-WT para poliovirus validados realizados por GCI y el análisis MIT-Sa para poliovirus realizado por Focus Diagnostics, Inc. para evaluar la comparabilidad de los resultados generados por ambos métodos. Los resultados del análisis de concordancia demuestran que los análisis MIT-WT para poliovirus y MIT-Sa para poliovirus no concuerdan. Los resultados generados con la MIT-Sa son, por término medio, más de una dilución doble más bajos que los resultados generados con el análisis MIT-WT.

5.5 Análisis serológicos para hepatitis B

Se utilizaron dos análisis para evaluar los anticuerpos contra el antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) en sueros humanos: los análisis anti-HBs AUSAB RIA y VITROS, llevados a cabo por GCI. Ambos se utilizan para la determinación cuantitativa *in vitro* de los anticuerpos totales contra HBsAg en muestras de suero humano.

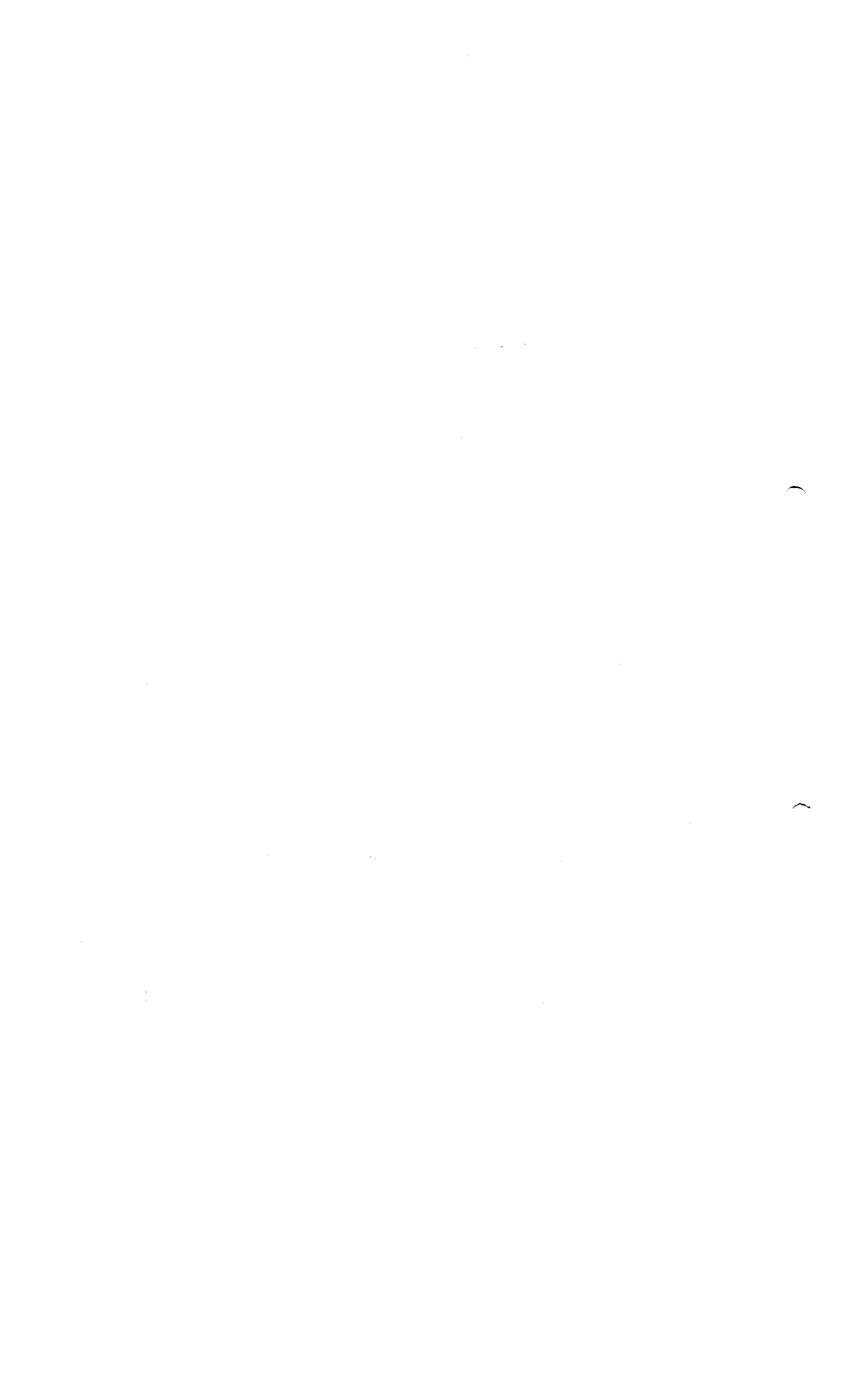
A partir de 2007 se utilizó el análisis anti-HBs VITROS para evaluar las respuestas de anticuerpos anti-HBsAg en los estudios de Hexaxim. Un estudio de concordancia mostró que los análisis anti-HBs AUSAB RIA y VITROS realizados por GCI concordaban (sección 5.5.2.5).

Las descripciones detalladas de los análisis anti-HBs AUSAB RIA y VITROS realizados por GCI que se presentan a continuación, en la sección 5.5.1 y en la sección 5.5.2, demuestran que estos análisis del antígeno de superficie de hepatitis B son válidos y aceptables para el uso previsto de cuantificar los niveles de anticuerpos anti-HBsAg en suero humano.

5.5.1 Radioinmunoanálisis AUSAB para la hepatitis B

5.5.1.1 Principio de la prueba

El AUSAB RIA se utiliza para cuantificar la cantidad de anticuerpos contra el HBsAg en suero humano. Este RIA de fase sólida utiliza un "principio del sándwich" en el cual microesferas de poliestireno recubiertas de HBsAg se incuban con muestras de prueba, estándares de referencia o controles de calidad. Los anticuerpos específicos presentes en las muestras se unen al HBsAg de fase sólida de la microesfera. Las microesferas se lavan y se añade antígeno radiomarcado [¹²⁵I]-HBsAg para que se fije al anticuerpo unido a la microesfera con el fin de crear un complejo radiactivo antígeno-anticuerpo-antígeno. Los niveles de anticuerpos presentes en las muestras de prueba se miden determinando la radiactividad en conteos por minuto (CPM) con un contador





gamma. Los valores de CPM son proporcionales al nivel de anticuerpos HBsAg presentes en la muestra y se convierten a mUI/mL utilizando la fórmula creada por Hollinger (8).

5.5.1.2 Justificación/Fundamentación de la prueba

El AUSAB RIA es un método licenciado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de EE. UU. que se utiliza en un kit disponible comercialmente (Abbott Laboratories). La utilidad del kit AUSAB RIA reside en su capacidad para determinar la eficiencia de las vacunas contra la hepatitis B además de demostrar la exposición previa al virus de la hepatitis B (9).

5.5.1.3 Resumen del procedimiento de prueba

AUSAB RIA realizado de conformidad con la SWI J001657 de sanofi pasteur (*Radioinmunoanálisis para la detección cuantitativa del anticuerpo contra el antígeno de superficie de hepatitis B en sueros humanos*).

El control positivo del kit de la prueba AUSAB se analizó en tres repeticiones; el control negativo se analizó en siete repeticiones utilizando las placas de análisis suministradas en el kit de prueba. Al principio y al final de cada análisis se analiza aisladamente un grupo de tres marcadores que consisten en control negativo, marcador bajo y marcador alto. En cada serie de pruebas se analizó aisladamente el estándar internacional de la OMS, diluido previamente a una concentración de trabajo de 50 mUI/mL, para determinar las tendencias de los controles. Se añadió suero fetal bovino (FBS) a 3 pocillos repetidos para actuar como testigo de la prueba.

Cada muestra de prueba se diluyó en FBS y se analizó aisladamente. Las diluciones se basaron en los resultados obtenidos en pruebas anteriores o en concentraciones históricas determinadas en estudios anteriores. Se colocó una sola microesfera recubierta de HBsAg en cada pocillo de la placa de análisis. Se incubaron las placas a temperatura ambiente durante 16 a 20 h. Tras la incubación, el líquido se aspiró de las placas y se lavó cada microesfera. Se puso ¹²⁵I-HBsAg en cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 4 h. Tras la incubación, el líquido se aspiró de las placas y se lavó cada microesfera. Las microesferas se transfirieron a los tubos de conteo y la radiactividad presente en cada muestra de prueba ocasionada por el ¹²⁵I-HBsAg ligado se midió con un contador gamma en CPM dentro de las 24 horas posteriores al lavado final. Se determinaron las titulaciones de las muestras en mUI/mL utilizando la fórmula de Hollinger (8).

5.5.1.4 Resumen de la validación de la prueba

El AUSAB RIA se validó evaluando su precisión, diluibilidad, LOD y LLOQ. El análisis de los datos demostró un rendimiento óptimo de esta prueba para la cuantificación de los niveles de anticuerpos anti-HBsAg en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

