



5.5.2 Análisis de quimioluminiscencia del antígeno de superficie de hepatitis B

5.5.2.1 Principio de la prueba

Para la determinación cuantitativa *in vitro* de los anticuerpos totales contra HBsAg en suero humano se utiliza el análisis VITROS anti-HBs, aprobado por la FDA y disponible comercialmente, mediante el sistema de inmunodiagnóstico VITROS® ECi/ECiQ.

El sistema de inmunodiagnóstico VITROS ECi/ECiQ realiza análisis inmunodiagnósticos en muestras de suero humano con tecnología de detección de quimioluminiscencia. Todas las reacciones se realizan dentro de los pocillos recubiertos con HBsAg. El sistema de inmunodiagnóstico VITROS ECi/ECiQ utiliza la formación de un sándwich de antígeno con mediación de anticuerpos para detectar la presencia de inmunoglobulina anti-HBsAg total en suero humano. Este resultado implica la reacción del anti-HBsAg de la muestra con HBsAg (subtipos ad y ay) derivado de plasma recubierto en los pocillos. Luego, un conjugado de HBsAg (subtipos ad y ay) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) forma complejos con los antígenos anti-HBsAg unidos, para formar un sándwich de antígeno. Los materiales no ligados se eliminan mediante lavado. Se añade a los pocillos un reactivo que contiene sustratos luminógenos (un derivado de luminol y una sal perácida) y un agente de transferencia de electrones. La HRP del conjugado ligado cataliza la oxidación del derivado de luminol, produciendo luz. El agente de transferencia de electrones incrementa el nivel y la duración de la luz producida. El sistema inmunodiagnóstico VITROS ECi/ECiQ lee las señales lumínicas. La cantidad de conjugado de HRP ligado es directamente proporcional a la concentración de anticuerpos anti-HBsAg presentes en la muestra.

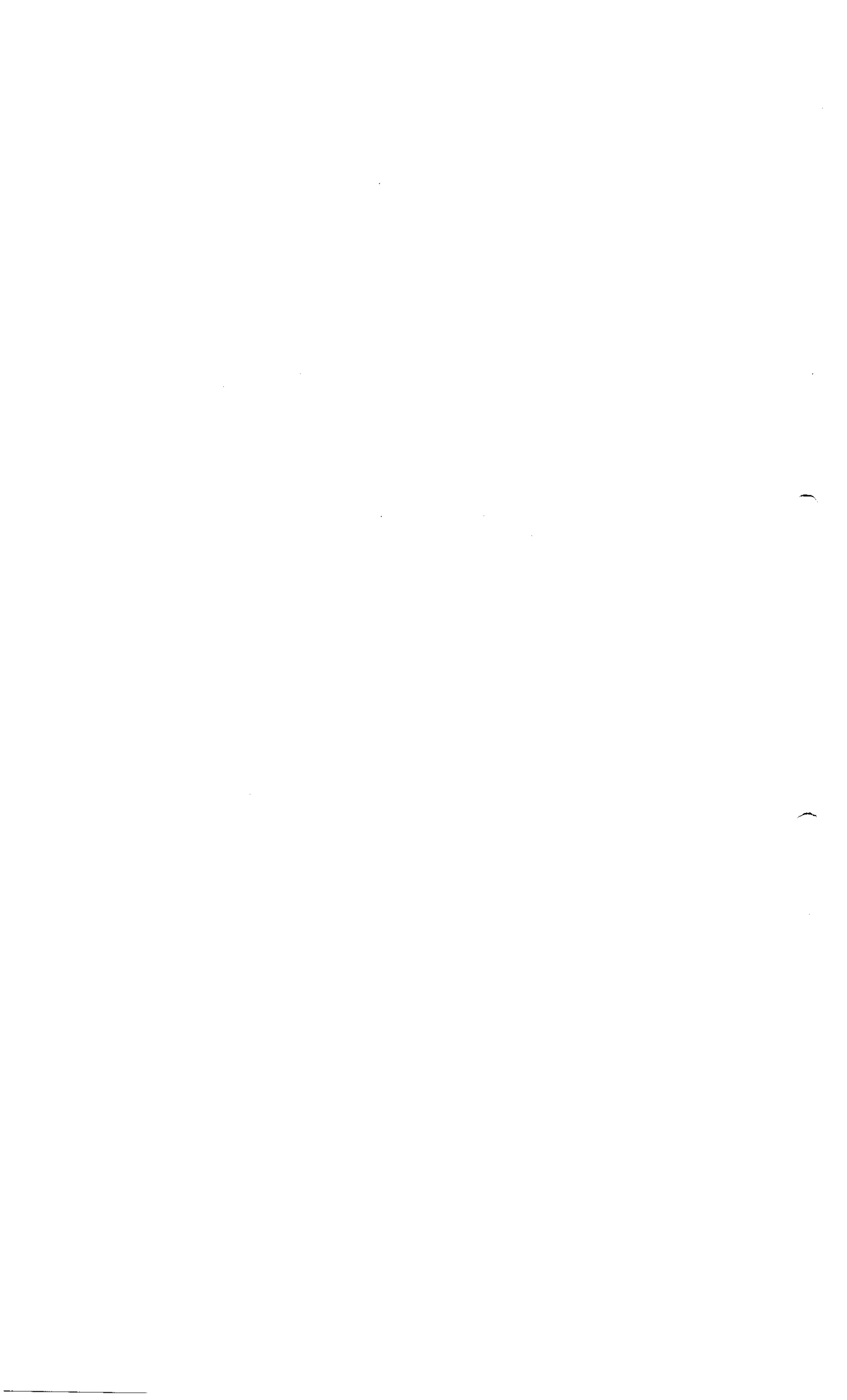
5.5.2.2 Justificación/Fundamentación de la prueba

El análisis VITROS anti-HBs de Ortho Clinical Diagnostics es un método con licencia de la FDA de EE. UU. para la determinación cuantitativa de los anticuerpos totales anti-HBsAg en suero humano utilizando el sistema de inmunodiagnóstico VITROS ECi/ECiQ. La aprobación inicial previa a la comercialización (n.º P000014) para el paquete de reactivos y calibradores anti-HBsAg de VITROS Immunodiagnostic Products se recibió de la FDA el 29 de septiembre de 2000 (10). El complemento a la presentación original que describe el enfoque cuantitativo para medir los anticuerpos anti-HBsAg, n.º P000014 S009, fue aprobado por la FDA en septiembre de 2004 (11).

5.5.2.3 Resumen del procedimiento de prueba

Análisis VITROS anti-HBs realizado de conformidad con la SWI J004212 de sanofi pasteur (*Análisis Ortho VITROS ECi para la detección de anticuerpos contra el antígeno de superficie de hepatitis B*).

El análisis cuantitativo VITROS anti-HBs se lleva a cabo utilizando el sistema de inmunodiagnóstico VITROS ECi/ECiQ. El fabricante (Ortho-Clinical Diagnostics) suministra todos los reactivos necesarios para realizar el análisis. Los paquetes de reactivos cuantitativos anti-HBsAg se cargan en el sistema de inmunodiagnóstico VITROS ECi/ECiQ y la calibración se lleva a cabo utilizando calibradores de análisis trazables al 1^{er} estándar internacional anti-HBsAg de la OMS. Tras la orden del operador, las muestras se cargan automáticamente en el sistema y se





lleva a cabo el análisis en un medio cerrado en el cual el ordenador del sistema controla la estabilidad de los parámetros operativos (temperatura, humedad, tiempo).

El sistema de inmunodiagnóstico VITROS ECi/ECiQ consta de las siguientes áreas principales: la unidad operativa, el centro de control del sistema (ordenador del sistema), el centro de salida y la unidad de alimentación. La unidad operativa consta de cuatro centros: centro de administración de reactivos, centro de suministro, centro de muestreo y centro de procesamiento. La unidad operativa se utiliza para cargar y descargar muestras, reactivos y suministros, y para llevar a cabo el procesamiento de muestras y análisis. El centro de administración de reactivos se utiliza para cargar y descargar paquetes de reactivos. Dentro del centro de suministro se almacena el reactivo universal de lavado y se transporta al subsistema de medición de reactivos y al subsistema de lavado de pocillos; se recogen los desechos líquidos y sólidos de las muestras y de los reactivos. Antes de que se pueda iniciar el procesamiento de muestras de suero, se programa la ubicación de las muestras en las bandejas de muestra utilizando el centro de control del sistema.

Las muestras se transfieren a microcopas, que se colocan en tubos de 16 mm dispuestos en bandejas universales de muestras de 6 tubos con código de barras. La toma de muestras y el procesamiento tienen lugar en el sistema de inmunodiagnóstico VITROS ECi/ECiQ. Cuando se inicia el procesamiento de muestras, el centro de muestreo carga las muestras desde las bandejas universales de muestras. El lector de códigos de barra escanea el código de la bandeja universal de muestras. La sonda de medición de muestra toma una punta desechable, aspira y dispensa el líquido de muestra en el pocillo de análisis liberado del paquete de reactivos y después desecha la punta usada.

En el centro de procesamiento los pocillos de análisis se procesan individualmente. El contenido del pocillo se mezcla y se incuba bajo condiciones controladas. El pocillo se lava con reactivo universal de lavado y se añade reactivo de señalización al pocillo. El luminómetro lleva a cabo lecturas de la reacción de quimioluminiscencia mejorada del pocillo. El sistema de inmunodiagnóstico VITROS ECi/ECiQ comunica los resultados del análisis de la muestra en formato impreso a través del centro de salida.

5.5.2.4 Resumen de la validación de la prueba

El análisis VITROS anti-HBs se validó evaluando su especificidad, exactitud, precisión, diluibilidad, estabilidad de la muestra y LOQ. El análisis de los datos demostró un rendimiento óptimo de esta prueba para la cuantificación de los anticuerpos contra el HBsAg en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.5.2.5 Resumen del análisis de concordancia

Se llevó a cabo un análisis de concordancia entre los análisis validados AUSAB RIA y VITROS anti-HBs realizados por GCI para evaluar la comparabilidad de los resultados generados por ambos métodos. El análisis VITROS anti-HBs concordó con el AUSAB RIA lo que demuestra que ambos análisis generan resultados similares.





5.6 Análisis serológicos de polisacáridos capsulares de *Haemophilus influenzae* tipo b

Se utilizaron dos análisis para evaluar la respuesta inmunitaria a los anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib: el PRP RIA realizado por GCI y el PRP ELISA realizado por HPA, Porton Down.

Para los estudios A3L16 y A3L10, se utilizó HPA, Porton Down, para el análisis de los anticuerpos anti-Hib. Un estudio de concordancia mostró que el PRP RIA realizado por GCI y el PRP ELISA realizado por HPA concordaban (sección 5.6.2.6).

Las descripciones detalladas del PRP RIA realizado por GCI y del PRP ELISA realizado por HPA que se presentan en la sección 5.6.1.4 y en la sección 5.6.2.5, respectivamente, demuestran que el RIA y el ELISA son válidos y aceptables para el uso previsto de cuantificar los anticuerpos anti-PRP en sueros humanos.

5.6.1 Radioinmunoanálisis para fosfato de polirribosil ribitol de *Haemophilus influenzae* tipo b

5.6.1.1 Principio de la prueba

Se determinaron los niveles séricos de anticuerpos anti-Hib mediante un RIA, en el cual se incuban muestras de suero con PRP radiomarcado. Los anticuerpos específicos se unen al antígeno marcado con polisacárido capsular tritiado (^3H -PRP) y forman complejos antígeno-anticuerpo. Estos complejos se precipitan con sulfato de amonio y se recolectan por centrifugación. La radiactividad medida en el microgránulo precipitado, en CPM, es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-PRP presentes en la muestra de suero. La concentración de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib de la muestra de suero se determina a partir de la curva de respuesta de concentración generada por los resultados de la titulación de las diluciones del estándar de referencia analizadas en la prueba.

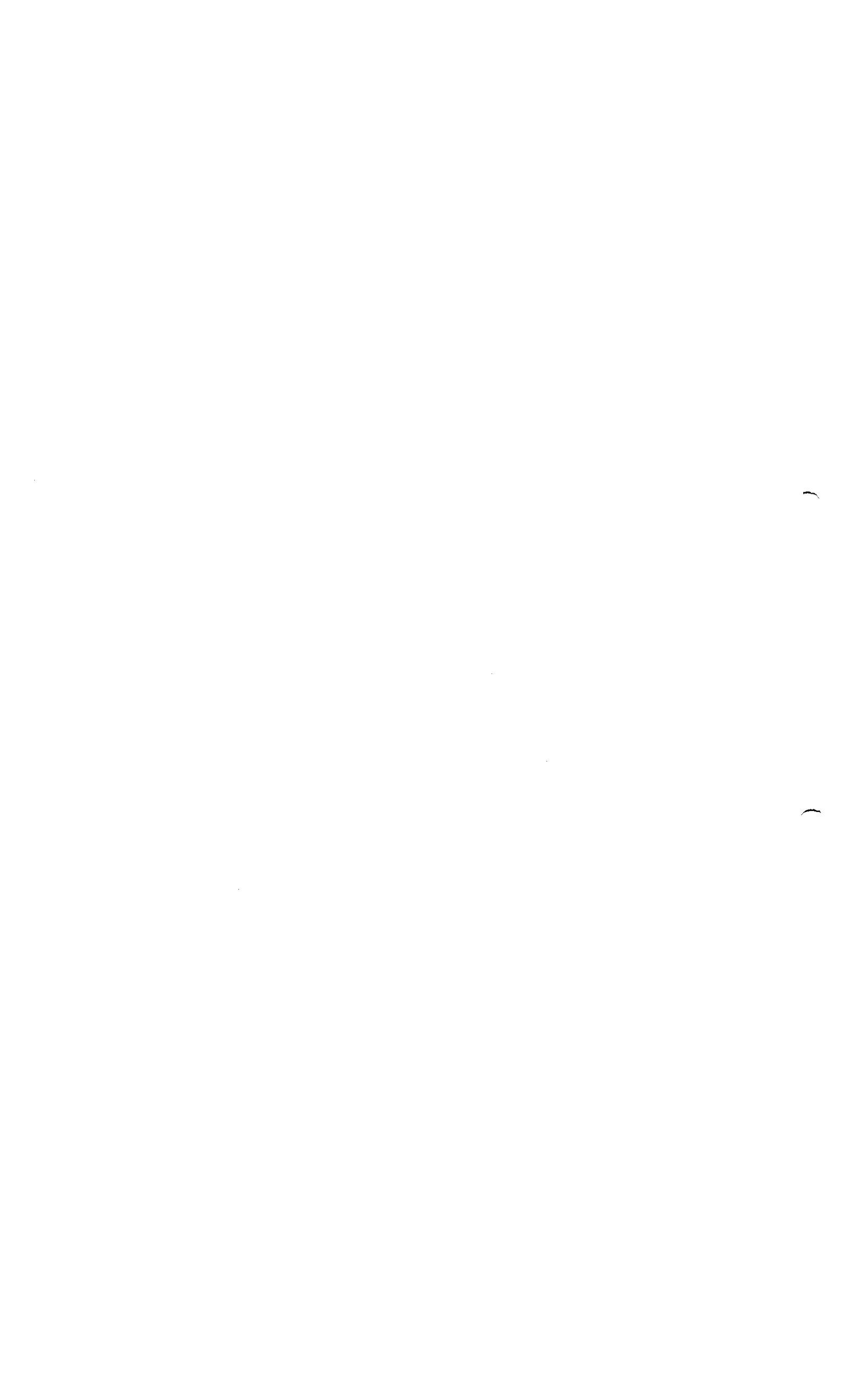
5.6.1.2 Justificación/Fundamentación de la prueba

Las determinaciones serológicas de los anticuerpos contra el polisacárido capsular de Hib se realizaron usando un RIA tipo Farr, según lo describe Anderson (12). El RIA es más sensible que el análisis de anticuerpos bactericidas para detectar anticuerpos anti-PRP y se pueden obtener resultados para muestras que en caso contrario no presentarían respuesta inmunológica en el análisis bactericida. El RIA es también específico para las respuestas de anticuerpos anti-PRP, mientras que el análisis de anticuerpos bactericidas mide también los anticuerpos contra otros antígenos de *Haemophilus influenzae* tipo b (13).

Por último, el Comité de Expertos sobre Estandarización Biológica de la OMS ha demostrado que el PRP RIA es un buen correlato de la efectividad clínica de las vacunas contra Hib (14).

5.6.1.3 Resumen del procedimiento de prueba

PRP RIA realizado de conformidad con la SWI J001663 de sanofi pasteur (RIA para la cuantificación de anticuerpos anti-PRP).



Cada referencia, control y muestra de prueba se diluyó en FBS y se analizó por duplicado. Se añadió doble marcación a todos los tubos que contenían estándar de referencia, controles de calidad y muestras de prueba. Los tubos del análisis se incubaron toda la noche a 4 °C. Se precipitó el complejo radiactivo de cada tubo con sulfato de amonio saturado frío, se incubó durante 1 hora y se centrifugó a 11.000 rpm a 4 °C durante 5 min. Se aspiró el sobrenadante; el microgránulo se disolvió en agua y se volvió a suspender en líquido de centelleo. La señal radiactiva se midió en un contador de centelleo. El porcentaje de fijación se calculó normalizando el ³H CPM con el marcador de volumen de ³⁶Cl y calculando los valores a partir de la curva estándar de referencia. El título de los anticuerpos anti-PRP se estimó sobre la base de la cantidad de ³H-PRP detectado en el precipitado, en comparación con un antisuero de referencia calibrado. La concentración de la muestra se determinó mediante comparación con una regresión lineal de la curva estándar de referencia.

5.6.1.4 Resumen de la validación de la prueba

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

5.6.2 ELISA para conjugado de polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b con albúmina de suero humano

5.6.2.1 Principio de la prueba

El método ELISA para HbOHA se utiliza para medir los niveles de IgG en suero humano reactivos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. El antígeno de HbOHA se adsorbe en los pocillos de una placa de microtitulación. En los pocillos se incuban muestras de suero diluidas (muestras de prueba, estándar de referencia y control de calidad). 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 anticuerpos de cabra contra la IgG humana conjugados a fosfatasa alcalina. El conjugado se une al complejo antígeno-anticuerpo. El exceso de conjugado se elimina por lavado y se añade un sustrato cromógeno. La enzima unida cataliza una reacción hidrolítica, que inicia una coloración. La reacción se detiene después de al menos 60 minutos o de que el suero de referencia llegue a una DO específica. Los resultados se leen en un espectrofotómetro (lector de placas de ELISA). Los resultados se registran en µg/mL.

5.6.2.2 Justificación/Fundamentación de la prueba

El ELISA para HbOHA es un método eficiente para la investigación sistemática de la serología de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. El ELISA para HbOHA es un método relativamente sencillo, rápido y económico, que elimina el uso de isótopos radiactivos y requiere cantidades pequeñas de material para medir anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b en sueros humanos.





5.6.2.3 Antecedentes para la prueba

El ELISA para HbOHA realizado según el procedimiento operativo estándar SOP EV/056/03 (*Enzimoimmunoanálisis de adsorción para HbOHA*) fue validado antes de su utilización para analizar muestras clínicas (sección 5.6.2.5). Los estudios de validación mostraron que el ELISA para HbOHA es adecuado para el uso previsto de medir los niveles de IgG en suero humano reactivos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b.

5.6.2.4 Resumen del procedimiento de prueba

Se recubrieron placas de microtitulación con solución de antígeno de cobertura añadiendo HbOHA diluido a todos los pocillos de la placa de microtitulación. Las placas recubiertas se lavaron con tampón de lavado después de su incubación. Se diluyó el estándar de referencia, lote 1983 del Centro de Evaluación e Investigación Biológica (CBER), para crear una concentración de trabajo que se diluye en serie a lo largo de la columna de la placa. El estándar de referencia se analizó por duplicado en cada placa. Se utilizaron los controles internos adecuados. Cada muestra de prueba se diluyó en siete diluciones dobles en serie en medio de cultivo a lo largo de las filas de la placa. Las muestras diluidas se transfirieron de la placa de dilución a la placa recubierta con antígenos. Las placas se cubrieron e incubaron a temperatura ambiente durante 60 a 90 minutos. El conjugado de anticuerpos se diluyó a la dilución de trabajo óptima y se agregó a cada pocillo. Tras la incubación, se añadió a todos los pocillos solución de sustrato cromógeno. Las placas se cubrieron e incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se controló por espectrofotometría la formación de color hasta que la DO del pocillo que contenía la concentración de 1/800 del estándar de referencia alcanzó un valor de 2 a 2,4. La concentración se determinó a partir de un ajuste logístico de 4 parámetros de la curva estándar de referencia.

5.6.2.5 Resumen de la validación de la prueba

HPA validó el ELISA para HbOHA evaluando su exactitud, repetibilidad, precisión intermedia, especificidad, linealidad, rango, LOD y LLOQ. El análisis de los datos demostró un rendimiento óptimo de esta prueba para la cuantificación de los anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.6.2.6 Resumen del análisis de concordancia

Se llevó a cabo un análisis de concordancia entre los análisis validados PRP RIA, realizado por GCI, y ELISA para HbOHA, realizado por HPA, para evaluar la comparabilidad de los resultados generados por ambos métodos. El PRP RIA concordó con el ELISA para HbOHA lo que demuestra que ambos análisis generan resultados similares.

5.7 Kit ELISA Enzygnost de Dade Behring para IgG anti-MMRV

Los kits ELISA Enzygnost® de Dade Behring son kits de diagnóstico comerciales que se utilizan para cuantificar la cantidad de anticuerpos contra sarampión, parotiditis, rubéola y varicela zóster en suero humano. Estos ELISA se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante para cada prueba, con la adición de controles de calidad internos y valores de corte revisados para





los valores positivos anti-IgG basados en debates con el CBER sobre la sensibilidad del análisis. Por debajo de estos valores de corte revisados (300 mUI/mL, 500 U/mL y 300 mUI/mL para sarampión, parotiditis y varicela, respectivamente), la seropositividad se confirma o comunica basándose en métodos funcionales (sección 5.8).

5.7.1 Principio de la prueba

Los kits se suministran con placas de 96 pocillos que contienen 6 tiras de poliestireno recubiertas compuestas por 8 pares de pocillos en cada tira. Los pocillos del lado izquierdo de cada par llevan adsorbido antígeno viral derivado de células de mamífero cultivadas infectadas (positivos para el antígeno) y los pocillos del lado derecho de cada par llevan adsorbidos componentes celulares de las mismas células de mamífero cultivadas, pero sin infectar (negativos para el antígeno). Ciertos anticuerpos específicos del estándar de referencia, de los controles de calidad y de las muestras de prueba se unen al antígeno inmovilizado. Los anticuerpos no unidos se lavan de los pocillos y se añaden anticuerpos contra las inmunoglobulinas humanas conjugados a enzimas. El conjugado de enzimas se une al complejo antígeno-anticuerpo. Se lava el conjugado excedente y se agrega un sustrato colorimétrico específico. Las enzimas ligadas catalizan una reacción hidrolítica que provoca que se revele el color. Después de un tiempo específico, 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). Para cada muestra de prueba, muestra de referencia o muestra de control, se calcula la diferencia de absorbancia (ΔOD) entre los pocillos positivos y negativos al antígeno para cada dilución. Para cada antígeno específico de los kits de análisis se determinan las concentraciones de anticuerpos específicos de antígenos.

5.7.2 Justificación/Fundamentación de la prueba

Los anticuerpos contra las vacunas MMRV se pueden medir por medio de análisis inmunoquímicos o funcionales. Los métodos de ELISA para IgG se crearon como alternativa a los análisis de neutralización reductora de placas (PRNT) para sarampión y parotiditis, al análisis de inhibición de la hemaglutinación (HAI) para la rubéola y al análisis de anticuerpo fluorescente para antígeno de membrana (FAMA) para el VZV. El ELISA es un método adecuado para la evaluación sistemática de anticuerpos contra MMRV en muestras clínicas porque es un método sencillo, rápido y económico que requiere cantidades pequeñas de material.

5.7.3 ELISA Enzygnost para IgG contra sarampión

5.7.3.1 Resumen del procedimiento de prueba

Las tiras de análisis estaban recubiertas y constaban de pocillos positivos para el antígeno (Ag+) recubiertos de antígeno viral derivado de células renales de mono infectadas por el virus del sarampión y pocillos negativos para el antígeno (Ag-) recubiertos de antígeno derivado de componentes celulares de las mismas células renales de mono, pero no infectadas. El estándar de referencia se analizó por duplicado al principio y al final de cada placa de análisis, en los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis. Se utilizó el estándar de referencia para calcular la titulación de anticuerpos contra el virus del sarampión en las muestras de suero. Cada control se analizó





aisladamente en los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis. Se añadió tampón de muestras aisladamente a los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis para actuar como testigo de la prueba. Cada muestra de prueba se analizó aisladamente en los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis. Las placas se cubrieron e incubaron a 37 °C durante 60 minutos. El conjugado de anticuerpos se diluyó a la dilución de trabajo óptima y se agregó a cada pocillo. Las placas se cubrieron e incubaron a 37 °C durante 60 minutos. Tras la incubación, se agregó solución de sustrato enzimático a todos los pocillos. Las placas se cubrieron e incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min. Tras la incubación, se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 0,5 N y se leyeron las placas por espectrofotometría a 450 nm con una corrección de 650 nm. Para cada muestra de prueba, muestra de referencia o muestra de control, se calculó la diferencia de absorbancia (ΔOD) entre los pocillos positivos y negativos al antígeno para cada dilución.

5.7.3.2 Resumen de la validación de la prueba

El procedimiento de ELISA para IgG de sarampión se validó evaluando su precisión, exactitud, especificidad, linealidad, robustez y LLOQ. El análisis de los datos demostró que el ELISA para IgG de sarampión era adecuado para el uso previsto de medir los anticuerpos contra el sarampión en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.7.4 ELISA Enzygnost para IgG contra parotiditis

5.7.4.1 Resumen del procedimiento de prueba

Las tiras de análisis estaban recubiertas y constaban de pocillos positivos para el antígeno (Ag+) recubiertos de antígeno viral derivado de células renales de mono infectadas por el virus de la parotiditis y pocillos negativos para el antígeno (Ag-) recubiertos de antígeno derivado de componentes celulares de las mismas células renales de mono, pero no infectadas. El estándar de referencia se analizó por duplicado al principio y al final de cada placa de análisis, en los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis. Se utilizó el estándar de referencia para calcular la titulación de anticuerpos contra el virus de la parotiditis en las muestras de suero. Cada control se analizó aisladamente en los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis. Se añadió tampón de muestras aisladamente a los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis para actuar como testigo de la prueba. Cada muestra de prueba se analizó aisladamente en los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis. Las placas se cubrieron e incubaron a 37 °C durante 60 minutos. El conjugado de anticuerpos se diluyó a la dilución de trabajo óptima y se agregó a cada pocillo. Las placas se cubrieron e incubaron a 37 °C durante 60 minutos. Tras la incubación, se agregó solución de sustrato enzimático a todos los pocillos. Las placas se cubrieron e incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min. Tras la incubación, se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 0,5 N y se leyeron las placas por espectrofotometría a 450 nm con una corrección de 650 nm. Para cada muestra de prueba, muestra de referencia o muestra de control, se calculó la diferencia de absorbancia (ΔOD) entre los pocillos positivos y negativos al antígeno para cada dilución.

5.7.4.2 Resumen de la validación de la prueba

El procedimiento de ELISA para IgG de parotiditis se validó evaluando su precisión, exactitud, especificidad, linealidad, robustez y LLOQ. El análisis de los datos demostró que el ELISA para





IgG de parotiditis era adecuado para el uso previsto de medir los anticuerpos contra la parotiditis en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.7.5 ELISA Enzygnost para IgG contra rubéola

5.7.5.1 Resumen del procedimiento de prueba

Las tiras de análisis estaban recubiertas y constaban de pocillos positivos para el antígeno (Ag+) recubiertos de antígeno viral derivado de células renales de mono infectadas por el virus de la rubéola y pocillos negativos para el antígeno (Ag-) recubiertos de antígeno derivado de componentes celulares de las mismas células renales de mono, pero no infectadas. El estándar de referencia se analizó por duplicado al principio y al final de cada placa de análisis, en los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis. Se utilizó el estándar de referencia para calcular la titulación de anticuerpos contra el virus de la rubéola en las muestras de suero. Cada control se analizó aisladamente en los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis. Se añadió tampón de muestras aisladamente a los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis para actuar como testigo de la prueba. Cada muestra de prueba se analizó aisladamente en los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis. Las placas se cubrieron e incubaron a 37 °C durante 60 minutos. El conjugado de anticuerpos se diluyó a la dilución de trabajo óptima y se agregó a cada pocillo. Las placas se cubrieron e incubaron a 37 °C durante 60 minutos. Tras la incubación, se agregó solución de sustrato enzimático a todos los pocillos. Las placas se cubrieron e incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min. Tras la incubación, se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 0,5 N y se leyeron las placas por espectrofotometría a 450 nm con una corrección de 650 nm. Para cada muestra de prueba, muestra de referencia o muestra de control, se calculó la diferencia de absorbancia (ΔOD) entre los pocillos positivos y negativos al antígeno para cada dilución.

5.7.5.2 Resumen de la validación de la prueba

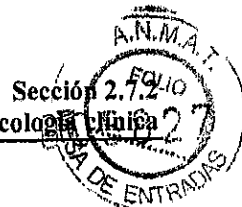
El procedimiento de ELISA para IgG de rubéola se validó evaluando su precisión, exactitud, especificidad, linealidad, robustez y LLOQ. El análisis de los datos demostró que el ELISA para IgG de rubéola era adecuado para el uso previsto de medir los anticuerpos contra la rubéola en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.7.6 ELISA Enzygnost para IgG contra varicela

5.7.6.1 Resumen del procedimiento de prueba

Las tiras de análisis estaban recubiertas y constaban de pocillos positivos para el antígeno (Ag+) recubiertos de antígeno viral derivado de células renales de mono infectadas por el virus VZV y pocillos negativos para el antígeno (Ag-) recubiertos de antígeno derivado de componentes celulares de las mismas células renales de mono, pero no infectadas. El estándar de referencia se analizó por duplicado al principio y al final de cada placa de análisis, en los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis. Se utilizó el estándar de referencia para calcular la titulación de anticuerpos contra el virus VZV en las muestras de suero. Cada control se analizó aisladamente en los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis. Se añadió tampón de muestras aisladamente a los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis para actuar como testigo de la prueba. Cada muestra de prueba se analizó





aisladamente en los pocillos Ag+ y Ag- de la tira de análisis. Las placas se cubrieron e incubaron a 37 °C durante 60 minutos. El conjugado de anticuerpos se diluyó a la dilución de trabajo óptima y se agregó a cada pocillo. Las placas se cubrieron e incubaron a 37 °C durante 60 minutos. Tras la incubación, se agregó solución de sustrato enzimático a todos los pocillos. Las placas se cubrieron e incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min. Tras la incubación, se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 0,5 N y se leyeron las placas por espectrofotometría a 450 nm con una corrección de 650 nm. Para cada muestra de prueba, muestra de referencia o muestra de control, se calculó la diferencia de absorbancia (ΔOD) entre los pocillos positivos y negativos al antígeno para cada dilución.

5.7.6.2 Resumen de la validación de la prueba

El procedimiento de ELISA para IgG de VZV se validó evaluando su precisión, exactitud, especificidad, linealidad, robustez y LLOQ. El análisis de los datos demostró que el ELISA para IgG de VZV era adecuado para el uso previsto de medir los anticuerpos anti-VZV en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.8 Análisis serológicos funcionales para MMV

5.8.1 PRNT antisarampión

5.8.1.1 Principio de la prueba

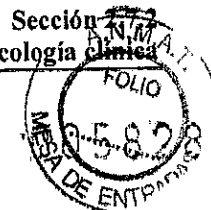
La PRNT contra el sarampión es un análisis funcional *in vitro* que mide el nivel de anticuerpos neutralizantes contra el virus del sarampión. Se mezclan diluciones seriadas de suero de desafío con virus del sarampión y se incuban con células Vero cultivadas sensibles al virus. Los anticuerpos neutralizantes específicos que contiene el suero se unen a los virus de desafío y los neutralizan. En presencia de anticuerpos neutralizantes, la infectividad del virus de desafío se reduce, como lo determina la reducción del CPE viral en cultivo de células Vero. Esta disminución se pone de manifiesto por la reducción de placas en el análisis.

Para determinar el título de anticuerpos neutralizantes contra el sarampión, se cuentan las placas después de teñir la monocapa celular y se determina una neutralización reductora de placas con titulación del 50 % (PRNT₅₀). La PRNT₅₀ se define como la inversa de la dilución del suero de prueba para la cual la infectividad del virus expresada como unidad formadora de placas (UFP) se reduce en un 50 %. Los títulos (PRNT₅₀) se expresan después en mUI/mL tras su calibración respecto al suero humano estándar internacional de la OMS (2° estándar internacional o 3^{er} estándar internacional), que se analizan en la misma serie.

5.8.1.2 Justificación/Fundamentación de la prueba

La PRNT contra el sarampión es el método de referencia utilizado para medir los anticuerpos neutralizantes contra el sarampión. El método permite una evaluación *in vitro* de la función neutralizante de los anticuerpos séricos que se considera que participan en la protección contra la enfermedad.





5.8.1.3 Resumen del procedimiento de prueba

Se dispensó suspensión de células Vero en cada pocillo de unas placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos; las placas se incubaron durante 3 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ humidificada. Se añadió el estándar internacional de la OMS por duplicado a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se diluyó en diluciones dobles en serie a lo largo de la serie de dilución correspondiente. Se añadió cada muestra de control y de prueba aisladamente a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se diluyó en diluciones dobles en serie a lo largo de la serie de dilución correspondiente. En cada serie analítica se incluyeron también pocillos de control celular y de control de virus de desafío del sarampión. El virus de desafío del sarampión se preparó utilizando la dilución de trabajo determinada previamente y se dispensó en cada pocillo, salvo en los pocillos de control celular. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 horas con 45 minutos.

Tras aspirar el medio de cultivo celular de las placas de 24 pocillos que contenían monocapas de células Vero, se distribuyó cada dilución de la mezcla "suero-virus" en la placa de 24 pocillos por duplicado. Las placas se incubaron durante 2 horas con 45 minutos a 37 °C. Tras la incubación, se aspiró el inóculo de "suero-virus" de cada pocillo de las placas de 24 pocillos y se añadió medio de cobertura a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 5 días. Tras la incubación, las placas se lavaron con tampón de fosfato. Las células se fijaron y se tiñeron con solución de cristal violeta. Las placas se enjuagaron con agua del grifo y se dejaron secar antes de contar manualmente la placa de cada pocillo. El criterio de valoración del análisis se define como la inversa de la dilución del suero de prueba en el que la infectividad viral se reduce en un 50 %, que se calcula por el método de Kärber modificado. Los títulos de anticuerpos neutralizantes contra parotiditis se expresan como mUI/mL usando el estándar internacional antiparotiditis de la OMS como referencia.

5.8.1.4 Resumen de la validación de la prueba

La PRNT contra el sarampión se validó evaluando su precisión, exactitud, diluibilidad, especificidad, LLOQ, estabilidad y robustez/solidez. El análisis de los datos demostró que la PRNT contra el sarampión era adecuada para el uso previsto de medir los anticuerpos neutralizantes contra el virus del sarampión en muestras de suero humano de los estudios clínicos.

5.8.2 PRNT antiparotiditis

5.8.2.1 Principio

La PRNT contra la parotiditis es un análisis funcional *in vitro* que mide el nivel de anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus de la parotiditis. Se mezclan diluciones seriadas de suero de desafío con virus de la parotiditis y se incuban con células Vero cultivadas, sensibles al virus. Los anticuerpos neutralizantes específicos que contiene el suero se unen a los virus de desafío y los neutralizan. En presencia de anticuerpos neutralizantes, la infectividad del virus de desafío se reduce, como lo determina la reducción de un CPE viral en cultivo de células Vero. Esta disminución se pone de manifiesto por la reducción de placas en el análisis.

Para determinar el título de anticuerpos neutralizantes contra la parotiditis, se cuentan las placas después de teñir la monocapa celular y se determina un título de PRNT₅₀. La PRNT₅₀ se define



Tabla 2.6: Estudio A3L16: inmunogenicidad de Pentaxim tras una vacunación de refuerzo, conjunto de análisis PP

Antígeno	Criterios	Vacunación de refuerzo: Pentaxim									
		Vacuna asignada en la serie primaria					General*				
		Hexaxim		Pentaxim + Engerix B			N		% 0 media		IC del 95 %
Difteria	≥ 0,1 UI/mL	N	% 0 media	IC del 95 %	N	% 0 media	IC del 95 %	N	% 0 media	IC del 95 %	
	≥ 1,0 UI/mL	225	96,0	(92,5; 98,2)	221	96,8	(93,6; 98,7)	446	96,4	(94,2; 97,9)	
Tétanos	GMT	225	72,9	(66,6; 78,6)	221	77,4	(71,3; 82,7)	446	75,1	(70,8; 79,1)	
	≥ 0,1 UI/mL	225	1,92	(1,58; 2,32)	221	2,11	(1,74; 2,56)	446	2,01	(1,75; 2,30)	
PT	≥ 1,0 UI/mL	222	100	(98,4; 100)	219	100	(98,3; 100)	441	100	(99,2; 100)	
	GMT	222	98,6	(96,1; 99,7)	219	95,0	(91,2; 97,5)	441	96,8	(94,7; 98,3)	
Respuesta de refuerzo	≥ 4 veces de aumento	222	4,81	(4,37; 5,31)	219	4,54	(4,07; 5,08)	441	4,68	(4,35; 5,04)	
	GMT	211	95,7	(92,1; 98,0)	208	95,7	(91,9; 98,0)	419	95,7	(93,3; 97,4)	
FHA	Respuesta de refuerzo	211	99,5	(97,4; 100)	208	99,0	(96,6; 99,9)	419	99,3	(97,9; 99,9)	
	GMT	226	226	(205; 249)	220	325	(292; 362)	446	271	(251; 291)	
Poliovirus 1	Respuesta de refuerzo	225	88,0	(83,0; 91,9)	215	94,0	(89,9; 96,7)	440	90,9	(87,8; 93,4)	
	GMT	225	96,9	(93,7; 98,7)	215	99,5	(97,4; 100)	440	98,2	(96,4; 99,2)	
Poliovirus 2	Respuesta de refuerzo	227	335	(305; 368)	221	333	(305; 363)	448	334	(313; 356)	
	GMT	211	100	(98,3; 100)	209	100	(98,3; 100)	420	100	(99,1; 100)	
Poliovirus 3	Respuesta de refuerzo	211	7243	(6218; 8436)	209	9996	(8521; 11725)	420	8502	(7609; 9500)	
	GMT	211	7243	(6218; 8436)	209	9996	(8521; 11725)	420	8502	(7609; 9500)	

ROXANA MONTEMLONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
ABDERRADO
SANOFI PASTEUR S.A.

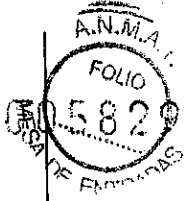


Tabla 2.6: Estudio A3L16: inmunogenicidad de Pentaxim tras una vacunación de refuerzo, conjunto de análisis PP

(cont.)

Antígeno	Criterios	Vacunación de refuerzo: Pentaxim									
		Vacuna asignada en la serie primaria					General*				
		Hexaxim		Pentaxim + Engerix B			% 0		% 0		
N	% 0 media	(IC del 95 %)	N	% 0 media	(IC del 95 %)	N	% 0 media	(IC del 95 %)	N	% 0 media	(IC del 95 %)
Poliovirus 2	≥ 8 (1/dil)	208	100	(98,2; 100)	210	100	(98,3; 100)	418	100	(99,1; 100)	
	GMT	208	8512	(7281; 9952)	210	11229	(9574; 13170)	418	9783	(8747; 10942)	
Poliovirus 3	≥ 8 (1/dil)	205	100	(98,2; 100)	205	100	(98,2; 100)	410	100	(99,1; 100)	
	GMT	205	10975	(9066; 13286)	205	14482	(12067; 17380)	410	12607	(11046; 14389)	
Hep B	≥ 10 mUI/mL	225	85,8	(80,5; 90,1)	218	98,6	(96,0; 99,7)	443	92,1	(89,2; 94,4)	
	GMT	225	83,9	(66,5; 106)	218	183	(156; 214)	443	123	(106; 142)	
PP	≥ 1,0 µg/mL	223	98,7	(96,1; 99,7)	216	99,5	(97,4; 100)	439	99,1	(97,7; 99,8)	
	GMT	223	27,4	(23,0; 32,7)	216	41,4	(35,0; 48,8)	439	33,6	(29,7; 37,9)	

5.3.5.3 Informe del análisis integrado de inmunogenicidad, tabla 83.

El número de sujetos analizados según el conjunto de análisis ITT.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

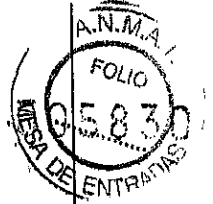
El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.

El porcentaje y los IC del 95 % se calculan según el número de sujetos con datos disponibles para el criterio de valoración relevante.



CD
CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



La inmunogenicidad se analizó usando el conjunto de análisis ITT.

- **Respuestas de anticuerpos contra difteria y tétanos**

Para la difteria, los porcentajes de sujetos al nivel de $\geq 0,1$ UI/mL fueron elevados ($\geq 96,0$ %) para ambos grupos. Al nivel de $\geq 1,0$ UI/mL fueron del 72,9 % en el grupo primovacunado con Hexaxim y del 77,4 % en el grupo primovacunado con el control. Para el tétanos, todos los sujetos (100 %) alcanzaron el nivel de $\geq 0,1$ UI/mL. Los porcentajes de sujetos que alcanzaron el nivel de $\geq 1,0$ UI/mL también fueron elevados ($\geq 95,0\%$) en ambos grupos. Los GMT fueron similares en ambos grupos para D y T.

- **Respuestas de anticuerpos anti-PT y anti-FHA**

Para PT, los índices de seroconversión y los índices de respuesta de refuerzo fueron similares en ambos grupos. Los GMT fueron más bajos en el grupo primovacunado con Hexaxim que en el grupo primovacunado con Pentaxim + Engerix B.

Para FHA, los índices de seroconversión tendían a ser más elevados en el grupo primovacunado con Pentaxim + Engerix B que en el grupo primovacunado con Hexaxim. Las respuestas de refuerzo y los GMT fueron similares en ambos grupos.

- **Respuestas de anticuerpos antipoliovirus**

Para todos los poliovirus, el 100 % de los sujetos de ambos grupos alcanzó títulos ≥ 8 (1/dil). Para los poliovirus, los GMT fueron más elevados en el grupo primovacunado con Pentaxim + Engerix B que en el grupo primovacunado con Hexaxim. Para los poliovirus 2 y 3 los GMT fueron similares en ambos grupos.

- **Respuestas de anticuerpos anti-Hep B**

Los porcentajes de sujetos al nivel de $\geq 0,1$ UI/mL y los GMT fueron más elevados en el grupo primovacunado con Pentaxim + Engerix B que en el grupo primovacunado con Hexaxim.

- **Respuestas de anticuerpos anti-PRP**

Los porcentajes de sujetos que alcanzaron el nivel de $\geq 1,0$ UI/mL fueron similares en ambos grupos. Los GMT fueron más elevados en el grupo primovacunado con Pentaxim + Engerix B que en el grupo primovacunado con Hexaxim. No obstante, ambos grupos alcanzaron índices de protección similares y elevados, reduciendo así al mínimo la importancia clínica de la diferencia numérica observada en los GMT.

Principales conclusiones:

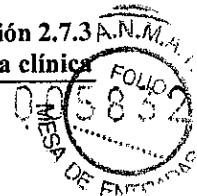
En este estudio se demostró que:

- Basándose en la inmunogenicidad, Pentaxim indujo una respuesta satisfactoria para todos los antígenos cuando se administró en dosis de refuerzo a los 18 meses, independientemente de que los sujetos hubieran sido primovacunados con Hexaxim o con Pentaxim.

Este estudio respalda el uso de Pentaxim en la inmunización de refuerzo de niños pequeños a los 18 meses previamente primovacunados con Hexaxim.

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





2.3 Estudios de fase III

2.3.1 A3L04 (serie primaria)

Título: estudio a gran escala de la seguridad de Hexaxim en comparación con Tritanrix-HepB/Hib + OPV administrado a los 2, 4 y 6 meses a 2133 lactantes de América Latina (México y Perú). Los únicos datos de inmunogenicidad recogidos en este estudio fueron la respuesta de anticuerpos al antígeno Hep B en un subconjunto de 306 sujetos mexicanos^a, entre ellos las respuestas inmunitarias anti-Hep B entre 3 lotes de Hexaxim.

Objetivo de inmunogenicidad: describir la respuestas de anticuerpos al antígeno Hep B de sólo 3 lotes de la vacuna Hexaxim y en el grupo de control.

Diseño del estudio: estudio multicéntrico controlado, de 4 ramas, con observador ciego, aleatorizado y de grupos paralelos.

Resumen del análisis estadístico: análisis descriptivo de la respuesta inmunitaria a Hep B en un subconjunto de 306 sujetos mexicanos (204 en el grupo de Hexaxim y 102 en el grupo de control) que recibieron vacunas Hexaxim o Tritanrix-HepB/Hib.

Resultados

En la Tabla 2.7 se presenta la demografía para el subconjunto incluido en el conjunto de análisis ITT de este estudio.

^a El calendario nacional de vacunación no incluye la vacuna contra Hep B al nacer.

ROXANA MONTMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





como la inversa de la máxima dilución del suero de prueba para la cual la infectividad del virus, expresada como UFP, se reduce en $\geq 50\%$.

5.8.2.2 Justificación/Fundamentación de la prueba

La PRNT contra la parotiditis es el método de referencia utilizado para medir los anticuerpos neutralizantes contra la parotiditis. El método permite una evaluación *in vitro* de la función neutralizante de los anticuerpos séricos que se consideran involucrados en la protección contra la enfermedad.

5.8.2.3 Resumen del procedimiento de prueba

Se dispuso suspensión de células Vero en cada pocillo de unas placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos, y se incubaron las placas durante 3 días a 37 °C en una incubadora con CO₂ humidificada. Se añadió cada muestra de control aisladamente a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se diluyó en diluciones dobles en serie a lo largo de la serie de dilución correspondiente. En cada serie analítica se incluyeron también pocillos de control celular, de control de virus de desafío de la parotiditis (N) y de media dosis de control de virus de desafío de la parotiditis (N/2). Se añadió cada muestra de prueba aisladamente a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se diluyó en diluciones dobles en serie a lo largo de la serie de dilución correspondiente. La dosis de desafío del virus de la parotiditis se preparó utilizando la dilución de trabajo determinada previamente. La media dosis de virus de desafío de la parotiditis (N/2) se preparó a partir de la dilución de trabajo del virus de desafío de la parotiditis (N). Se dispuso suspensión viral (N) en cada pocillo, salvo en los pocillos de control celular. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Se dispensaron anticuerpos de conejo contra la IgG humana en todos los pocillos de la placa de análisis y se incubaron durante 15 min en un agitador de placas.

Tras aspirar el medio de cultivo celular de las placas de 24 pocillos que contenían monocapas de células Vero (después de 3 días de incubación posterior a la siembra), se distribuyó cada dilución de la mezcla "suero-virus" en la placa de 24 pocillos por duplicado. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Tras la incubación, se aspiró el inóculo de "suero-virus" de cada pocillo de las placas de 24 pocillos y se añadió medio de cobertura a cada pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C durante 7 días. Tras la incubación, las placas se lavaron con tampón de fosfato. Las células se fijaron y se tiñeron con solución de cristal violeta. Las placas se enjuagaron con agua del grifo y se dejaron secar antes de contar manualmente las placas de cada pocillo. El criterio de valoración del análisis es una PRNT₅₀, que se define como la inversa de la máxima dilución del suero de prueba para la cual la infectividad del virus, expresada como UFP, se reduce en un 50 % o más.

5.8.2.4 Resumen de la validación de la prueba

La PRNT contra la parotiditis se validó evaluando su precisión, exactitud, diluibilidad, especificidad, LLOQ, estabilidad y robustez. El análisis de los datos demostró que la PRNT contra la parotiditis era adecuada para el uso previsto de cuantificar los niveles de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la parotiditis en muestras de suero humano de los estudios clínicos.





5.8.3 Análisis FAMA para el virus de varicela zóster

5.8.3.1 Principio de la prueba

Los niveles séricos de anticuerpos contra el virus de varicela zóster (VZV) se determinan con un análisis FAMA en el cual se detectan los anticuerpos séricos reactivos con los antígenos de membrana del VZV por inmunofluorescencia indirecta. Los anticuerpos séricos reactivos con los antígenos de membrana del VZV se unen a la superficie de fibroblastos de pulmón embrionario humano (HELFL) sin fijar infectados con VZV. Tras la adición de anticuerpos de cabra contra IgG humana conjugados con fluoresceína, que interactúan específicamente con los anticuerpos unidos, la presencia de anticuerpos reactivos contra el VZV se determina por microscopía de fluorescencia. Los títulos del análisis se registran como la inversa de la máxima dilución de sueros en la que se observa fluorescencia.

5.8.3.2 Justificación/Fundamentación de la prueba

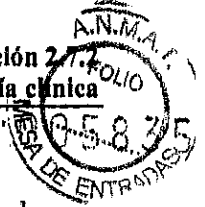
El análisis FAMA para el VZV es el método de referencia para determinar anticuerpos contra el virus de varicela zóster de relevancia biológica (15) y para determinar la inmunidad a la varicela (16).

5.8.3.3 Resumen del procedimiento de prueba

Se cultivaron células HELFL hasta su confluencia antes de infectarlas con células HELFL infectadas por la cepa Ellen del VZV. Cuando se observó un CPE del 90 %, se recogieron las células y se utilizaron en el análisis FAMA. Se añadieron muestras de prueba y controles aisladamente a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se diluyeron en seis diluciones dobles en serie a lo largo de la placa. Las células HELFL infectadas por el VZV se suspendieron de nuevo en PBS hasta una concentración conocida y se dispensaron en todos los pocillos de la placa de análisis. Se incubaron las placas durante 30 min. a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Tras la incubación, las placas se centrifugaron a 1000 x g a 4 °C durante 10 min. Se aspiró el sobrenadante y se lavaron las placas, que se centrifugaron después por segunda vez. Tras la eliminación del sobrenadante, se añadió conjugado de anticuerpos a cada pocillo, diluido a una dilución de trabajo óptima. Se incubaron las placas durante 30 min. a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Tras la incubación, se desechó el sobrenadante y se lavaron las placas con PBS. Se volvieron a suspender las células en una solución de glicerol al 90 % y se examinaron por microscopía de fluorescencia en busca de fluorescencia de membrana de las células infectadas. La fluorescencia de membrana indica un resultado positivo y la falta de fluorescencia de membrana indica un resultado negativo. Los resultados se registran como la inversa de la dilución más alta (concentración más baja) que produce fluorescencia de membrana.

5.8.3.4 Resumen de la idoneidad de la prueba

El análisis FAMA para el VZV llevado a cabo en el laboratorio Gershon en la Universidad de Columbia fue creado por los Drs. Anne Gershon y Philip Brunell, en 1974 (16). Como importante líder de opinión en el campo de la varicela, el laboratorio de la Dra. Gershon ha utilizado el análisis FAMA en numerosas investigaciones clínicas y sus datos se aceptan ampliamente; FAMA



es el análisis de anticuerpos utilizado de forma preferente para la evaluación de la inmunidad adquirida después de la enfermedad y tras la vacunación contra la varicela (17).

6 Anexo

Ninguno.





7 Lista de referencias

- 1 Tregnaghi MW, Voelker R, Santos-Lima E, Zambrano B. Immunogenicity and safety of a novel yeast *Hansenula polymorpha*-derived recombinant Hepatitis B candidate vaccine in healthy adolescents and adults aged 10-45 years. *Vaccine*. 2010 30;28(20):3595-601.
- 2 EMEA Guideline on Clinical Evaluation of New Vaccines. EMEA/CHMP/VWP/164653/2005 dated 18 October 2006.
- 3 Scheifele DW, Ochnio JJ. The immunological basis for immunization series; Module 2 : Diphtheria. Update 2009. World Health Organization, Geneva; 2009.
- 4 Wirsing von Konig CH. The immunological basis for immunization series; Module 4: Pertussis. World Health Organization, Geneva; 2009.
- 5 Robertson S. The immunological basis for immunization series. Module 6: Poliomyelitis. World Health Organization; 1993. No. WHO/EPI/GEN/93.16
- 6 WHO Expanded Programme on Immunization. Manual of laboratory methods: Titration of human sera for neutralizing antibodies to poliovirus. Geneva, 1997; p.65-71. WHO/VSQ/97.04
- 7 Albrecht P, Enterline JC, Boone EJ, Klutch MJ. Poliovirus and polio antibody assay in HEp-2 and Vero cell cultures. *J Biol Stand*. 1983;11:91-7.
- 8 Hollinger FB, Adam E, Heiberg D, Melnick JL. Response to hepatitis B vaccine in a young adult population. In: Szmuness W, Alter HJ, Maynard JE, editors. *Viral Hepatitis 1981 International Symposium*. Philadelphia, PA: Franklin Institute Press. 1982;451-66.
- 9 Gunter EW, Lewis BG, Koncickowski SM. 1996. Laboratory Procedures used for the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), 1988-1994. HHS, PHS, CDC.
- 10 U.S. Food and Drug Administration. PMA - Premarket Approval P000014 [received 2000 Sep 29]. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMA/pma.cfm?ID=4887>.
- 11 U.S. Food and Drug Administration. PMA - Premarket Approval P000014 Supplement 009 [received 2004 Sep 27]. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfPMA/PMA.cfm?ID=4994>
- 12 Anderson P. Intrinsic tritium labeling of the capsular polysaccharide antigen of haemophilus influenzae type B. *J Immunol* 1978;120(3):866-70.
- 13 Norden CW, Michaels RH, Melish M. Serologic responses of children with meningitis due to Haemophilus influenzae type b. *J Infect Dis*. 1976;134(5):495-9.
- 14 WHO Expert Committee on Biological Standardization. Forty-Ninth Report. WHO Technical Report Series 897. Geneva: World Health Organization, 2000.
- 15 Krah DL. Assays for antibodies to varicella-zoster virus. *Infect Dis Clin North Am*. 1996;10(3):507-527.

