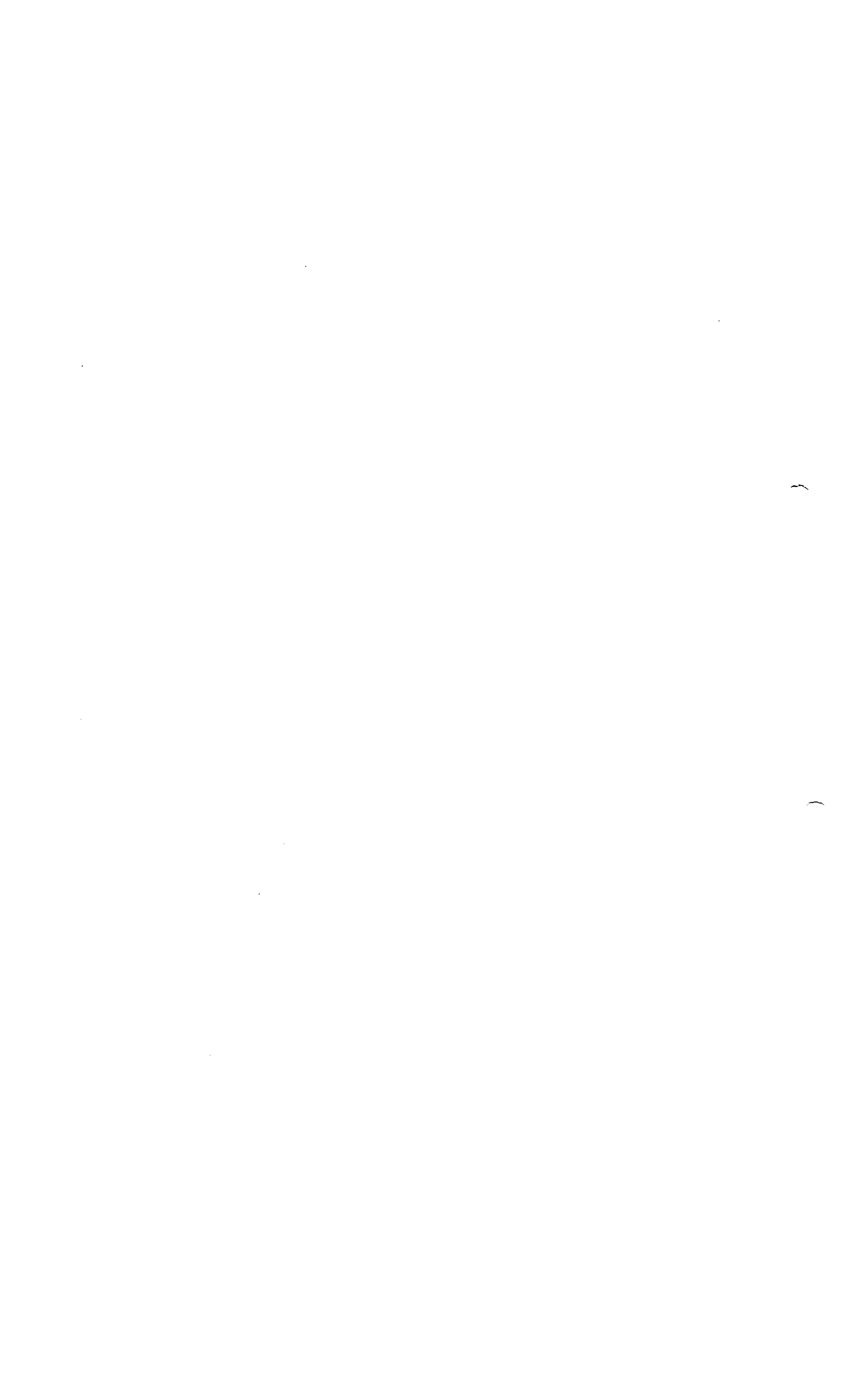


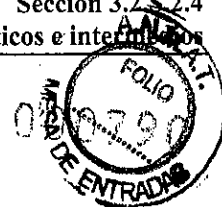
Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, introducción.

1 Especificaciones

Tabla 1: Especificaciones para el polisacárido (PRP) de *Haemophilus* tipo b

Pruebas	Requeridas por	Métodos	Criterios de aceptación
Prueba de identificación de <i>Haemophilus</i> tipo b	Ph. Eur. 1219, edición actual TRS 897	Ph. Eur. 2.7.1, edición actual Doble difusión según Ouchterlony (método inmunoquímico)	Positivo
Distribución del tamaño molecular: coeficiente de partición K_D	Ph. Eur. 1219, edición actual TRS 897	Ph. Eur. 2.2.30, edición actual y USP <621> cromatografía de exclusión por tamaño Cromatografía de exclusión por tamaño de alta presión con detección de UV e IR	$K_D \leq 0,31$
Contenido de ribosa	Ph. Eur. 1219, edición actual TRS 897	Ph. Eur. 2.5.31, edición actual Método colorimétrico Espectrofotometría UV visible	$\geq 35 \%$
Contenido de fósforo	Ph. Eur. 1219, edición actual TRS 897	Según la Ph. Eur. 2.5.18, edición actual Medición del contenido de fósforo según el método de Chen	7,5 - 9,4 %
Contenido proteico	Ph. Eur. 1219, edición actual TRS 897	Ph. Eur. 2.5.16, edición actual Método de Lowry/espectrofotometría	$\leq 1,0 \%$
Contenido de ácidos nucleicos	Ph. Eur. 1219, edición actual TRS 897	Ph. Eur. 2.5.17, edición actual Espectrofotometría UV	$\leq 1,0 \%$
Contenido de endotoxinas bacterianas	Ph. Eur. 1219, edición actual TRS 897	Ph. Eur. 2.6.14, edición actual Prueba cromogénica cinética	$< 10 \text{ UI}/\mu\text{g}$ de polisacárido
Prueba de pirógenos	/	Ph. Eur. 2.6.8, edición actual Inyección en conejos	Cumple con la Ph. Eur. (Δ temperatura $\leq +1,15 \text{ }^\circ\text{C}$ en el análisis de 3 conejos)





2 Procedimientos analíticos

Para los procedimientos analíticos descritos en la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), sólo se proporciona la referencia y se mencionan detalles específicos si corresponde.

Para los procedimientos analíticos no descritos en la Ph. Eur., en este capítulo se proporcionan los métodos.

2.1 Prueba de identificación de *Haemophilus* tipo b

Referencia

Esta prueba se realiza de acuerdo con los requisitos de la Ph. Eur. 2.7.1 "Immunochemical methods" (métodos inmunoquímicos).

Principio

Método de Ouchterlony (inmunoprecipitación mediante doble difusión pasiva en gel).

Equipos y reactivos

- **Equipo:** equipo estándar de laboratorio y equipo específico que se utilizará:
 - Geles prefabricados con pocillos precortados (listos para usar o para rehidratar)
 - Mesa de nivelación
 - Cámara húmeda
- **Reactivos:**
 - Tampón de tris-barbital pH 9,2 (cantidades relativas): Tris (7,20 g), barbital (1,84 g), barbital sódico (10,30 g), azida sódica (0,10 g) y agua purificada (hasta 1000 mL)
 - NaCl al 0,9 %.
 - Solución de tinción: Azul de Coomassie al 0,5% en solución de destinción
 - Solución de destinción (cantidades relativas): metanol (450 mL), ácido acético (100 mL), agua ultrafiltrada (hasta 1000 mL)
 - Antisuero para *Haemophilus*
- **Referencia:** vacuna interna liofilizada contra *Haemophilus* (20 µg después de reconstituir los frascos con 0,5 mL de agua purificada).

Procedimiento operativo

- Si se utiliza una película para rehidratar antes del uso:
 - Rehidrate la película verticalmente en 3 baños sucesivos de agua purificada, cada uno de 1 hora por lo menos, a temperatura ambiente.
 - Equilibre el gel en un tampón de tris barbital durante, por lo menos, 15 minutos.
 - Elimine el exceso de tampón de la superficie del gel y de los pocillos con papel de filtro delgado.



- Si se utiliza una película lista para usar:
 - Elimine el exceso de tampón de la superficie del gel y de los pocillos con papel de filtro delgado.
 - Coloque la película en una cámara húmeda sobre una mesa niveladora;
 - Deposite en los pocillos 10 μ L de diluciones adecuadas del producto sometido a prueba, el antígeno de referencia (20 μ g/mL) y las muestras de antisuero para *Haemophilus*.
 - Deje difundir a +37 °C;
 - Lave el gel con solución de NaCl y agua purificada, y séquelo.
 - Tiña el gel con solución de tinción.
 - Destiña el gel con solución de destinción hasta obtener un fondo completamente transparente.

Lectura, cálculo, resultados

Se observa una fusión completa con cada anticuerpo y su antígeno específico.

Criterios de validez

Se observan líneas de inmunoprecipitación con la referencia, con el producto y con el anticuerpo específico.



2.2 Distribución del tamaño molecular mediante HP-SEC

Referencia

Ph. Eur., método general 2.2.30 "Size exclusion chromatography" (cromatografía de exclusión por tamaño).

USP <621> Size exclusion chromatography (cromatografía de exclusión por tamaño).

Principio

Se realiza el análisis con un sistema de HPLC con una columna de tamiz molecular. Se eluye la muestra inyectada a través de un gel poroso bajo presión. Las moléculas (por ejemplo, ADN) de mayor tamaño que los poros más grandes del gel no pueden penetrar el gel y permanecen en la fase de circulación móvil. Estas moléculas son las primeras en abandonar la columna. Las moléculas más pequeñas se difunden en los poros del gel más o menos rápidamente, según su tamaño y forma, y abandonan la columna en orden descendente de peso molecular.

Las moléculas separadas se detectan posteriormente mediante un refractómetro diferencial o un espectrofotómetro UV. El tiempo de retención es inversamente proporcional a su peso molecular. El resultado se expresa como un coeficiente de partición (K_D).

Equipos y reactivos

- **Equipo:** equipo estándar de laboratorio y equipo específico que se utilizará:
 - Sistema computarizado de HPLC con detectores UV de longitud de onda múltiple y de índice de refracción.
 - Dos columnas conectadas en serie TOSOHAAS TSKgel G6000PWx1 7,5 x 300 mm o equivalente
 - Filtros de 0,22 μm y 0,45 μm .
- **Reactivos:** dodecil sulfato de sodio (SDS), hidrogenofosfato disódico dihidrato, azida sódica y agua purificada ultrafiltrada y dextrano con un peso molecular de 670 000 (control interno).
- **Referencia:** ADN altamente polimerizado de timo de ternero.

Soluciones

- **Fase móvil:** SDS al 0,1 % en agua, filtrada a través de un filtro de 0,22 μm
- **Fase de enjuague de la bomba y de la columna:** Azida sódica al 0,05 % en agua, filtrada a través de un filtro de 0,22 μm .
- **Solución SDS al 1 % p/p en agua:** filtrada a través de un filtro de 0,22 μm .
- **Solución de referencia V_0 (ADN a razón de 2 mg/mL):** prepare una solución de ADN a razón de 2 mg/mL en un tampón de fosfato. Agite durante varias horas a +5 °C para disolver el ADN. La solución debe ser incolora, transparente y ligeramente viscosa. Transfiera una alícuota al vial de HPLC. La solución se almacena a ≤ -20 °C.



- **Solución de ADN (200 µg/mL):** prepare una solución de ADN en SDS al 0,1 %. En un vial para HPLC, agregue solución de ADN de referencia a razón de 2 mg/mL (20 µL), SDS al 1 % (20 µL) y afore hasta 200 µL con agua.
- **Solución de referencia Vd (dextrano a razón de 2 mg/mL):** prepare una solución de dextrano a razón de 2 mg/mL en agua. Agite durante varias horas a temperatura ambiente. La solución debe ser incolora, transparente y ligeramente viscosa. Filtre a través de un filtro de 0,45 µm. Transfiera una alícuota al vial de HPLC. La solución se almacena a ≤ -20 °C.
- **Solución de referencia Vt (tampón de fosfato 0,05 M):** prepare una solución de tampón de fosfato 0,05 M, con hidrógenofosfato disódico dihidrato en agua. Filtre a través de un filtro de 0,45 µm.
- **Muestra (Ve):** prepare una solución de PRP de prueba a razón de 1 mg/mL en agua, teniendo en cuenta el contenido de humedad residual del PRP. Agite a temperatura ambiente durante 1 hora. En un vial para HPLC, agregue solución de PRP a razón de 1 mg/mL (75 µL), SDS al 1 % (30 µL) y afore hasta 300 µL con agua.

Procedimiento operativo

- **Condiciones cromatográficas:**

Tabla 2: Condiciones cromatográficas

Bomba	Inyector	Calentador de columnas	Detección
Velocidad de flujo: 0,5 mL/min. Elución isocrática al 100 % de SDS de la fase móvil al 0,1%	Volumen de inyección: 100 µL Temperatura del muestreador: +20 °C ± 3 °C	Temperatura: +30°C	Refractómetro (IR) con control de temperatura (+30 °C) Detección de UV λ (para ADN) = 260 nm

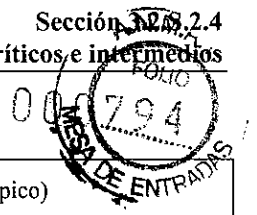
- **Análisis:**

Después de equilibrar el sistema con fase móvil y de purgar el detector de índice de refracción, se pueden inyectar las siguientes soluciones:

Tabla 3: Preparación de las muestras

Solución	Volumen inyectado	Detección	Duración	Resultado obtenido
Vt de referencia: Tampón de fosfato 0,05 M	100 µL	IR	110 min.	Vt
Vo de referencia: ADN (200 µg/mL)	100 µL	UV a 260 nm	110 min.	Vo
Control interno: Dextrano (2 mg/mL)	100 µL	IR	110 min.	Vd (comienzo)





Muestras	100 µL	IR	110 min.	Ve (pico)
Control interno: Dextrano (2 mg/mL)	100 µL	IR	110 min.	Vd (final)

Al final de una corrida, se debe enjuagar el sistema y las columnas con una solución de enjuague.

Lectura, cálculo, resultados

Se integran los cromatógrafos. Ajuste, si es necesario, las líneas base hasta alcanzar el nivel inferior de los picos.

Para las muestras, calcular los coeficientes K_D a partir de los tiempos de retención del pico (asimilados con volúmenes de elución de los diferentes compuestos) con la fórmula:

$$K_D = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)}$$

Donde:

- V_o = tiempo de retención del pico de ADN
- V_t = tiempo de retención del pico de fosfato 0,05 M
- V_e = tiempo de retención del pico de PRP sometido a prueba (o de dextrano).

Criterios de validez

- Los cromatogramas no muestran picos parásitos que puedan entorpecer la correcta integración de los picos de interés.
- El K_D del dextrano debe encontrarse dentro de los límites especificados en el gráfico de control.

Cromatogramas típicos

El cromatograma típico del V_o de la solución de referencia, del V_t de la solución de referencia, del V_d del control interno y de la solución de PRP sometido a prueba se presenta en la figura 1, la figura 2, en la figura 3 y en la figura 4.

Figura 1: Cromatograma típico del V_o

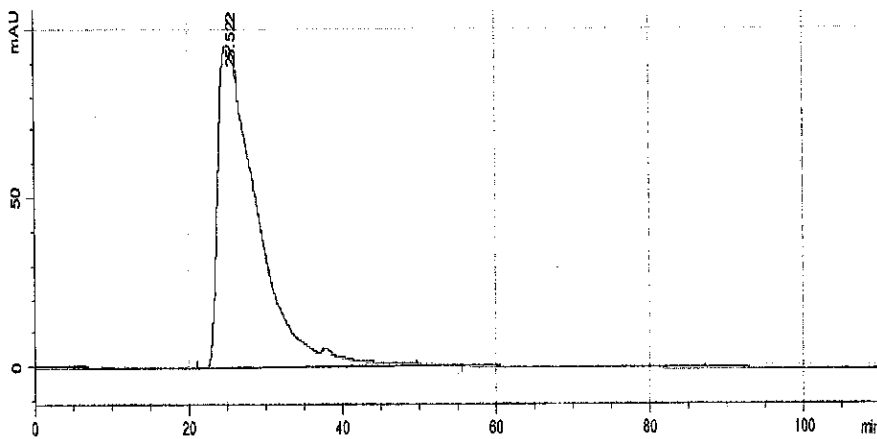




Figura 2: Cromatograma típico del Vd

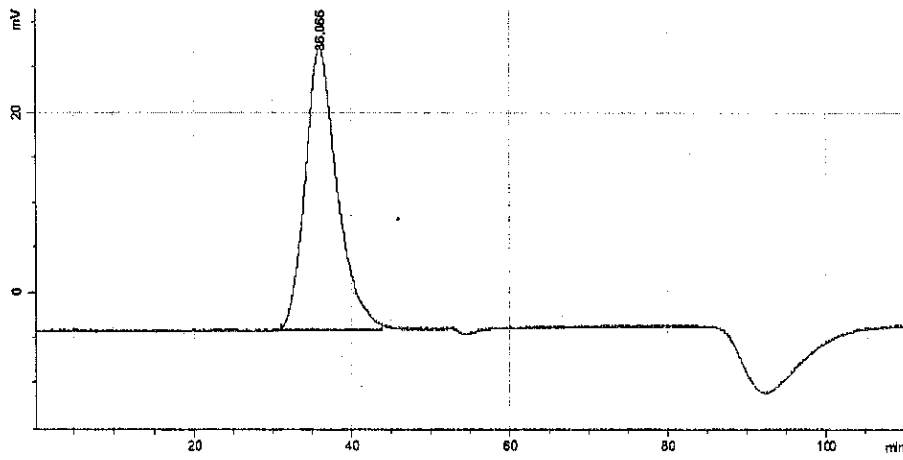
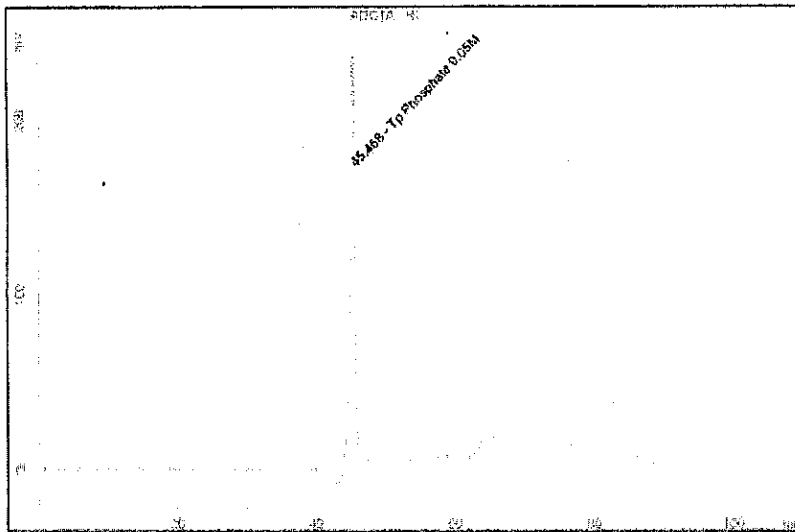


Figura 3: Cromatograma típico del Vt



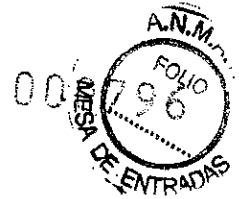
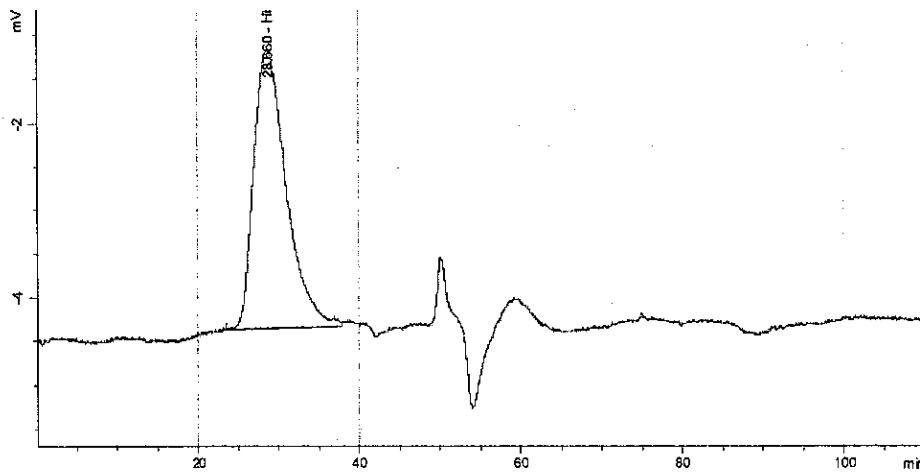


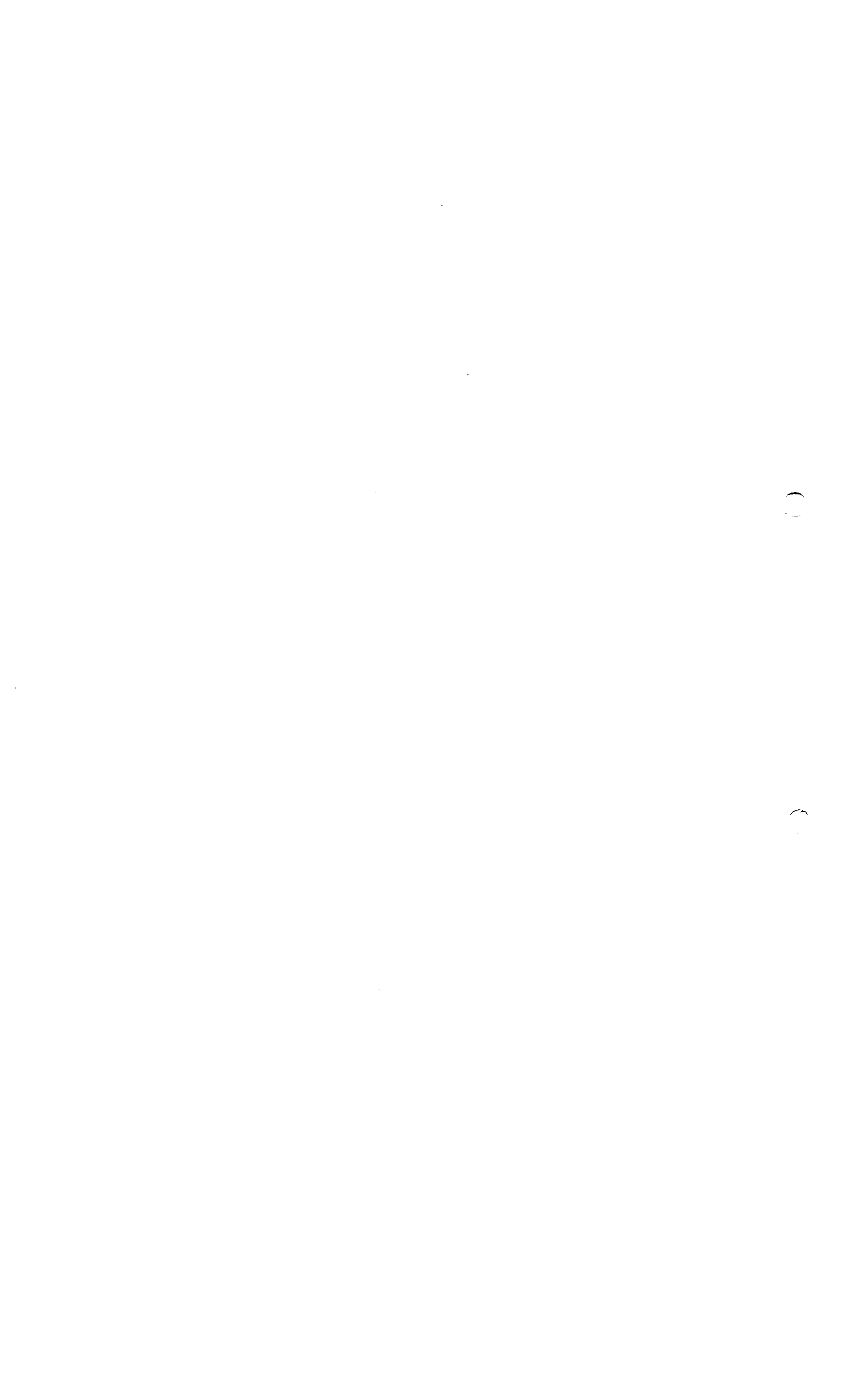
Figura 4: Cromatograma típico del PRP sometido a prueba

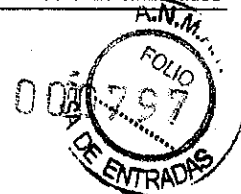


2.3 Contenido de ribosa

Esta prueba se realiza de acuerdo con los requisitos de la Ph. Eur. 2.5.31 "Ribose in polysaccharide vaccines" (ribosa en las vacunas de polisacáridos).

Utilice una alícuota de PRP disuelto en agua purificada (con la duración y las condiciones de agitación adecuadas para obtener una solución transparente) y diluido para que el contenido de ribosa de los volúmenes de las muestras se encuentre dentro del rango de las soluciones estándar (generalmente, para la muestra de prueba, se utiliza una solución de PRP a razón de 100 µg/mL).





2.4 Contenido de fósforo

Referencias

Chen P.S., Microdetermination of Phosphorus, Anal. Chem., 1956, 28, 1756-1758.

Según la Ph. Eur. 2.5.18 "Phosphorus in Polysaccharide vaccines" (fósforo en las vacunas de polisacáridos) para la fase de mineralización a fin de evitar una reacción de Maillard y para el rango de calibración.

Principio (método de Chen, después de la mineralización)

Se mineraliza el fósforo en fosfato en presencia de ácido caliente. El fosfato y el molibdato de amonio forman un complejo fosfomolibdico que, cuando se reduce, desarrolla un color azul. Este color puede medirse por espectrofotometría a 825 nm.

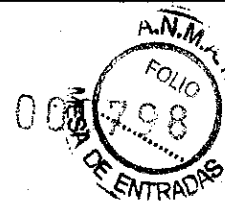
Equipos y reactivos

- **Equipo:** equipo estándar de laboratorio y espectrofotómetro UV visible.
- **Reactivos:** ácido sulfúrico concentrado, ácido sulfúrico 6 N en agua purificada, ácido perclórico al 70 %, ácido ascórbico al 10 % p/v, HCl 1 N, molibdato de amonio al 2,5 % p/v en agua para inyectables, solución estándar de fósforo del Instituto Nacional de Normas y Tecnologías (National Institute of Standard and Technologies, NIST) a razón de 10 mg/mL (para la solución de control).
- **Referencia:** dihidrogenofosfato de potasio (secado previamente a +100 °C).

Soluciones

- **Reactivo de mineralización:** ácido sulfúrico concentrado/ácido perclórico al 70 % (1 volumen/1 volumen)
- **Reactivo de coloración:** agua purificada/H₂SO₄ 6N/molibdato de amonio al 2,5 % p/v/ácido ascórbico al 10 % p/v (2 volúmenes/1 volumen/1 volumen/1 volumen). Agregue estos cuatro reactivos en el orden mencionado. Esta solución se debe preparar de forma extemporánea y debe ser amarilla.
- **Soluciones estándar de referencia:** utilice dihidrogenofosfato de potasio previamente secado a +100 °C, agua purificada y una alícuota de ácido sulfúrico concentrado para disolución para preparar una solución madre de referencia a 80 mg/L de fósforo. Diluya esta solución en agua purificada para preparar un estándar de referencia de trabajo de 2 mg/L de fósforo.
- **Solución de control interno de fósforo a razón de 50 µg/mL en HCl al 0,05 %:** utilice una solución NIST a razón de 10 mg/mL, HCl y agua purificada.
- **Control de mineralización:** utilice un reactivo de mineralización.
- **Solución muestra de prueba:** disuelva una alícuota de PRP en agua purificada para obtener una solución transparente. Diluya esta solución y utilice la alícuota apropiada para que el contenido de fósforo esté dentro del rango de las soluciones estándar (por lo general, para la muestra de prueba se utiliza el equivalente a 100 µg de PRP).





Procedimiento operativo

• **Mineralización:**

Prepare 4 muestras de prueba, 4 controles internos y 2 controles de mineralización

Tabla 4: Preparación de las muestras de mineralización

		Control de mineralización	Control interno	Pruebas
Solución que se evaluará	mL	-	-	$x \leq 1$
Solución de control interno de fósforo a razón de 50 µg/mL	mL	-	0,1	-
Si la muestra de prueba es mayor o igual a 0,5 mL, evapore los tubos en un horno a +100 °C. Coloque:				
Reactivo para mineralización:	mL	0,1	0,1	0,1
Agite con vórtice durante 5 segundos. Inserte los tubos en el baño seco Programe el calentamiento a +250 °C y mantenga a esa temperatura durante 20 minutos. La mineralización finaliza cuando el mineralizado se torna incoloro y transparente (sin embargo, puede presentar un color amarillo pálido que desaparece a temperatura ambiente). Deje que los tubos lleguen a la temperatura ambiente.				

• **Análisis por colorimetría:**

Tabla 5: Preparación de la muestra para el análisis por colorimetría*

	Testigo	Soluciones estándar				Control de mineralización	Control interno	Pruebas
		1	2	3	4			
Solución estándar de referencia de trabajo a razón de 2 mg/L	-	0,5	1	2	4	Tubos mineralizados		
Agua purificada	mL 4	3,5	2	1	-	3,9	3,9	3,9
Reactivo de coloración	mL 4	4	4	4	4	4	4	4
Tapón con película de parafina Agite. Deje los tubos en un baño de agua a 37 °C durante 2 horas.								
Microgramos de fósforo sometido a prueba en la muestra de prueba	0	1	2	4	8	-	a*	a

* Microgramos de fósforo en el control interno





Lectura, cálculo, resultados

Mida la absorbancia de cada tubo a 825 nm en comparación con el testigo, en un trayecto de 1 cm.

Establezca la regresión lineal de la curva de calibración $Y = aX + b$ y deduzca el coeficiente de correlación, donde $y = DO$, $x =$ concentración de fósforo, $a =$ pendiente y $b =$ ordenada al origen.

Mediante la ecuación lineal, deduzca la cantidad de fósforo ($\mu\text{g/mL}$) a partir de la DO de la muestra de prueba.

La concentración de fósforo de cada muestra sometida a prueba se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\mu\text{g/mL de fósforo} = \frac{OD - Blm - b}{a} \times D$$

Donde:

Blm = Testigo de mineralización

D = Factor de dilución

TS = Volumen de la muestra de prueba (mL)

Criterios de validez

El coeficiente de correlación de la curva de calibración debe ser, por lo menos, igual a 0,9990.

El valor obtenido para el control interno (la media de 4 determinaciones dependientes) debe estar dentro de los límites determinados por el gráfico de control.

La desviación relativa entre los 4 valores de DO debe ser menor o igual que 10 %.

La desviación relativa entre las concentraciones de fósforo calculadas para cada análisis (mismo análisis o diferente) debe ser menor o igual que 10 %.

2.5 Contenido proteico

Referencias

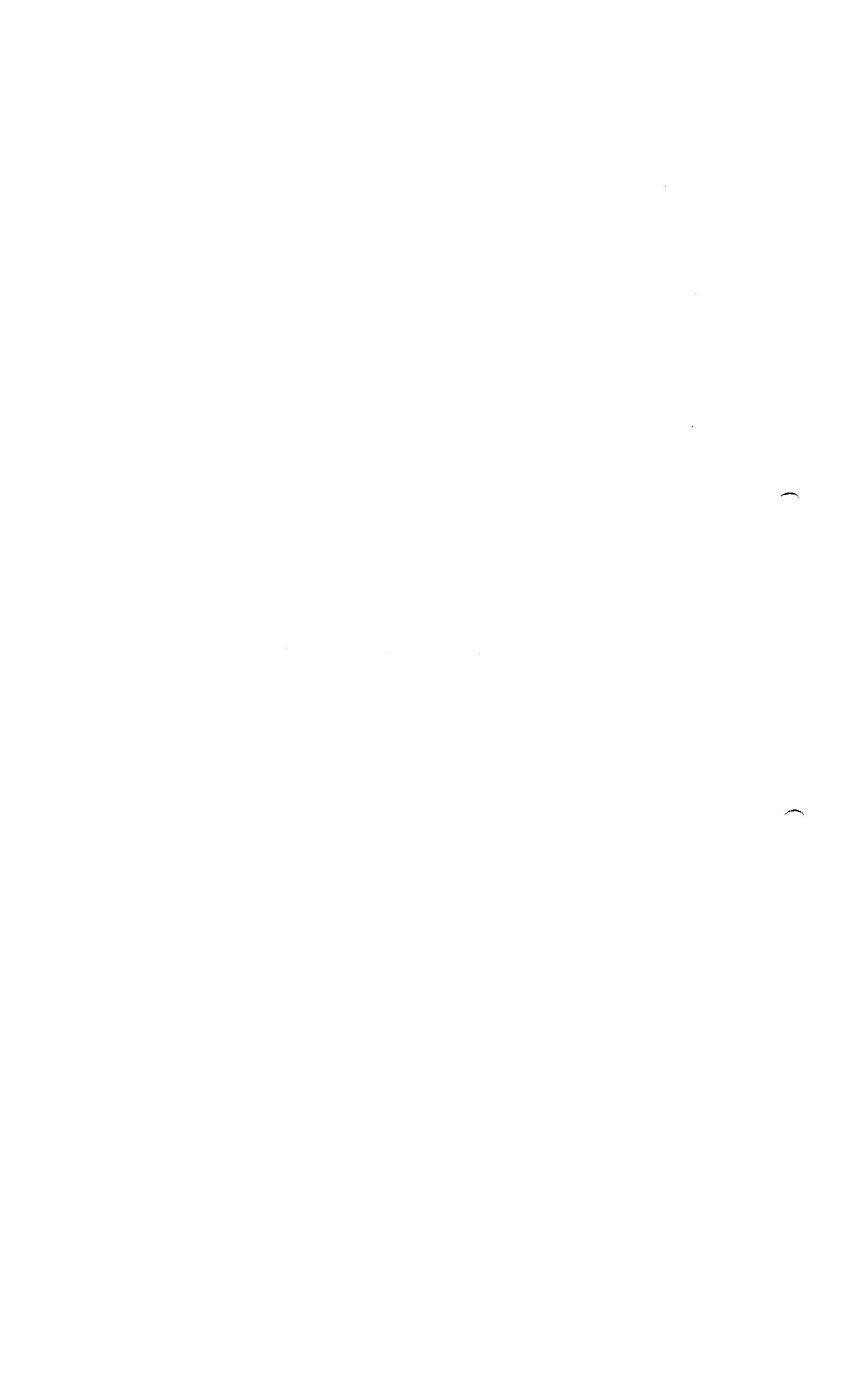
Esta prueba se basa en la Ph. Eur. 2.5.16 "Protein in polysaccharide vaccines" (proteína en las vacunas de polisacáridos).

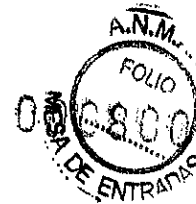
Lowry O.M., Rosebrough N.J., Randall R., Protein measurement with the Folin Phenol reagent, J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275.

Principio

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

Dado que muchos componentes no proteicos pueden afectar la intensidad del color, la precipitación de las proteínas de antemano mejora la especificidad de la prueba.





Equipo

Equipo estándar de laboratorio y espectrofotómetro UV visible.

Reactivos

Las cantidades son indicativas y se pueden multiplicar o dividir por un factor determinado, de ser necesario.

- NaOH 0,1 N
- Carbonato de sodio al 2 % p/v (reactivo A):
Carbonato de sodio anhidro.....40 g
Agua purificada 400 mL
NaOH.....8 g
Agua purificada hasta 2000 mL
Almacene a temperatura ambiente
- Sulfato de cobre al 1 % p/v en agua purificada (conserva a temperatura ambiente).
- Tartrato de sodio al 2 % p/v en agua purificada (conserva a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)
- Reactivo B: Sulfato de cobre al 1 % + tartrato de sodio al 2 % que se mezclarán extemporáneamente en volúmenes iguales.
- Reactivo C (solución alcalina de cobre): 50 volúmenes del reactivo A para 1 volumen del reactivo B. Mezcle. Prepare inmediatamente antes de usar.
- Ácido tricloroacético al 40 % (p/v) en agua purificada. Almacene a temperatura ambiente
- Reactivo de Folin Ciocalteu: el reactivo puro se conserva a $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Se diluirá extemporáneamente a razón de 1/2 en agua purificada.
- Solución estándar de referencia (proveedor 1) a razón de 1 g/L en NaOH 0,1 N Almacene a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.
- Solución estándar de referencia de trabajo de albúmina para el rango de calibración. Prepare inmediatamente antes de usar.

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

Solución estándar de referencia de albúmina a razón de 1 g/L 1 mL
NaOH 0,1 N hasta 20 mL

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

Solución estándar de referencia de albúmina a razón de 1 g/L 1 mL
NaOH 0,1 N hasta 5 mL

- Solución de control interno de albúmina (proveedor 2): Prepare una solución de 80 mg/L en agua purificada de la solución de albúmina al 96 %. Almacene a $\leq -20^{\circ}\text{C}$.





Procedimiento operativo

- Preparación de soluciones

Rango de calibración

Tabla 6: Preparación del rango de calibración

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

Solución de control interno

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

Muestras

Si es necesario, diluya la muestra en agua purificada para obtener de 5 a 50 µg en la muestra de prueba.

De ser necesario, agregue 0,15 mL de reactivo de precipitación a la muestra de prueba aforada a 1 mL con agua purificada. Conserve 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugue y elimine el sobrenadante. Limpie la superficie interna de los tubos. Vuelva a disolver el microgránulo en 0,4 mL de NaOH 0,1 N.

Realice 4 pruebas en paralelo.

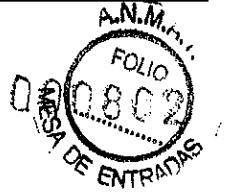
Lectura, cálculo, resultados

Verifique la ausencia de opalescencia en cada tubo. Si es necesario, centrifugue. Mida la DO de cada tubo por fotometría a 760 nm con respecto al control.

Grafique la curva de calibración.

Con base en la DO de prueba, utilice la ecuación de la línea de calibración para deducir la concentración de proteína de la muestra (µg/TS).





La concentración del análisis en $\mu\text{g/mL}$ se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de proteínas en } \mu\text{g/mL} = \frac{C \times D}{\text{TS}}$$

Donde:

C: concentración del análisis ($\mu\text{g/TS}$)

D: dilución

TS: Muestra de prueba (mL).

Determine la concentración media en $\mu\text{g/mL}$ y la desviación calculada en las concentraciones.

Criterios de aceptación

La prueba se considera válida si:

- El valor de cada prueba de muestra y el control interno (promedio de dos determinaciones) debe estar dentro de los límites establecidos por el gráfico de control.
- La desviación relativa entre los análisis dependientes de cada prueba de muestra debe ser menor o igual que 15%.

2.6 Contenido de ácidos nucleicos

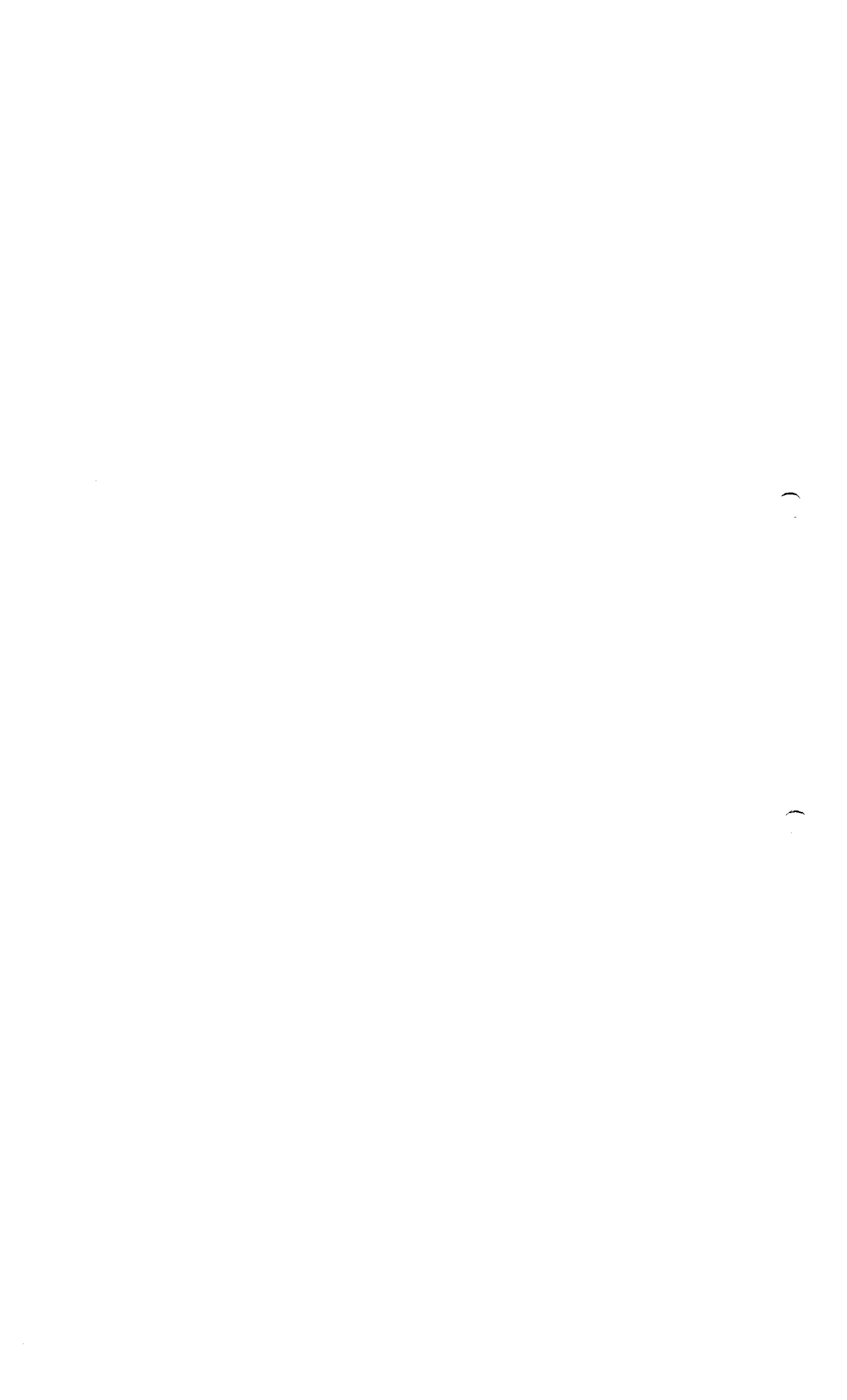
Esta prueba se realiza de acuerdo con los requisitos de la Ph. Eur. 2.5.17 "Nucleic acids in polysaccharide vaccines" (ácidos nucleicos en las vacunas de polisacáridos).

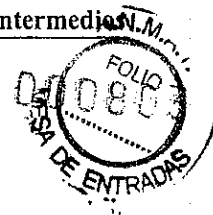
2.7 Contenido de endotoxinas bacterianas

Esta prueba se realiza de acuerdo con los requisitos de la Ph. Eur. 2.6.14 "Bacterial endotoxins" (endotoxinas bacterianas), prueba LAL y método cromogénico cinético.

2.8 Prueba de pirógenos

Esta prueba se realiza de acuerdo con los requisitos de la Ph. Eur. 2.6.8 "Pyrogens" (pirógenos), inyección a conejos.





3 Validación de los procedimientos analíticos

Se proporcionan los resultados de validación de pruebas utilizadas para liberar los intermedios, para las pruebas que no se describen en la Ph. Eur.

Se realizó la validación conforme a "Validation analytical procedures: text and methodology" (procedimientos analíticos de validación: texto y metodología) de la ICH Q2 (R1).

3.1 Identificación de *Haemophilus* tipo b

El método para la identificación de *Haemophilus* tipo b en PRP por el método de Ouchterlony se proporciona en el capítulo 2.1. Como prueba de identificación, se verificó la especificidad. La validación se realizó con el producto terminado Act-Hib® que contiene polisacárido PRP.

Se realizó la identificación con un lote de vacunas Act-Hib® y antisuero para *Haemophilus influenzae*. Se verificó la especificidad con antisuero para *Haemophilus influenzae* frente a otras valencias, incluso el toxoide tetánico, que representa posibles antígenos de interferencia. Se seleccionó la valencia del tétanos, ya que la proteína tetánica se utiliza para la conjugación con el polisacárido de *Haemophilus* tipo b. La lista de valencias evaluadas para determinar la especificidad se proporciona en la tabla 7.

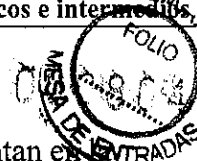
Tabla 7: Prueba de identificación de *Haemophilus*: Validación, material evaluado

Antígeno/valencia	Material
PRP-T	Vacuna Act-Hib®
Difteria	Referencia del toxoide diftérico
Tétanos	Referencia del toxoide tetánico
Tifoidea	Referencia de polisacárido de superficie Vi de <i>S. typhi</i>
Difteria, tétanos y tos ferina (vacuna acelular)	Vacuna DTAcP
HepBsAg	Referencia de la hepatitis B
IPV	Vacuna IPV
Polisacáridos meningocócicos A y C	Vacuna Meningo A + C
Serotipos de polisacáridos neumocócicos: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F	Vacuna Pneumo 23

ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.

CHRISTIAN DOMINGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.





Los resultados obtenidos con respecto a la verificación de la especificidad se presentan en la tabla 8.

Tabla 8: Resultados de validación obtenidos con respecto a la especificidad del antisuero para *Haemophilus influenzae*

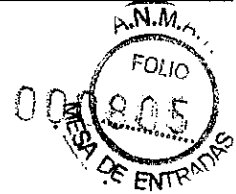
Antígeno	Resultado obtenido
Vacuna Act-Hib®	Positivo
Referencia de la difteria	Negativo
Referencia del tétanos	Negativo
Referencia de la fiebre tifoidea	Negativo
Vacuna DTAcP	Negativo
Referencia de la hepatitis B	Negativo
Vacuna IPV	Negativo
Referencia de Pneumo 23	Negativo
Vacuna Meningo A + C	Negativo

Se identificó positivamente el polisacárido de *Haemophilus* en la vacuna Act-Hib® en presencia del polisacárido contra *Haemophilus* sin reacción cruzada con las otras valencias evaluadas (incluida la valencia del tétanos).

Los resultados obtenidos demuestran que se identifica específicamente el polisacárido de *Haemophilus* con el método de Ouchterlony utilizando un antisuero contra *Haemophilus* sin reacción cruzada con las otras valencias evaluadas.

El método de Ouchterlony es válido para identificar el polisacárido de *Haemophilus*.





3.2 Distribución del tamaño molecular mediante HP-SEC

La distribución del tamaño molecular (coeficiente de partición K_D) mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alta presión en el PRP se describe en el capítulo 2.2. Dado que la prueba corresponde a una medición física, el parámetro estudiado fue la precisión (repetibilidad y precisión intermedia). Se presenta un resumen de la validación en la tabla 9.

Tabla 9: Distribución del tamaño molecular mediante HP-SEC en PRP: Validación, resumen

Características	Criterios de aceptación	Resultados
Precisión	Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia: $\leq \pm 0,04$	Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia son respectivamente iguales a: - Coeficiente de variación: 2,1 % y 4,6 % - Intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia para 1 medición que se realiza de la manera habitual: $\pm 0,025$

3.2.1 Precisión

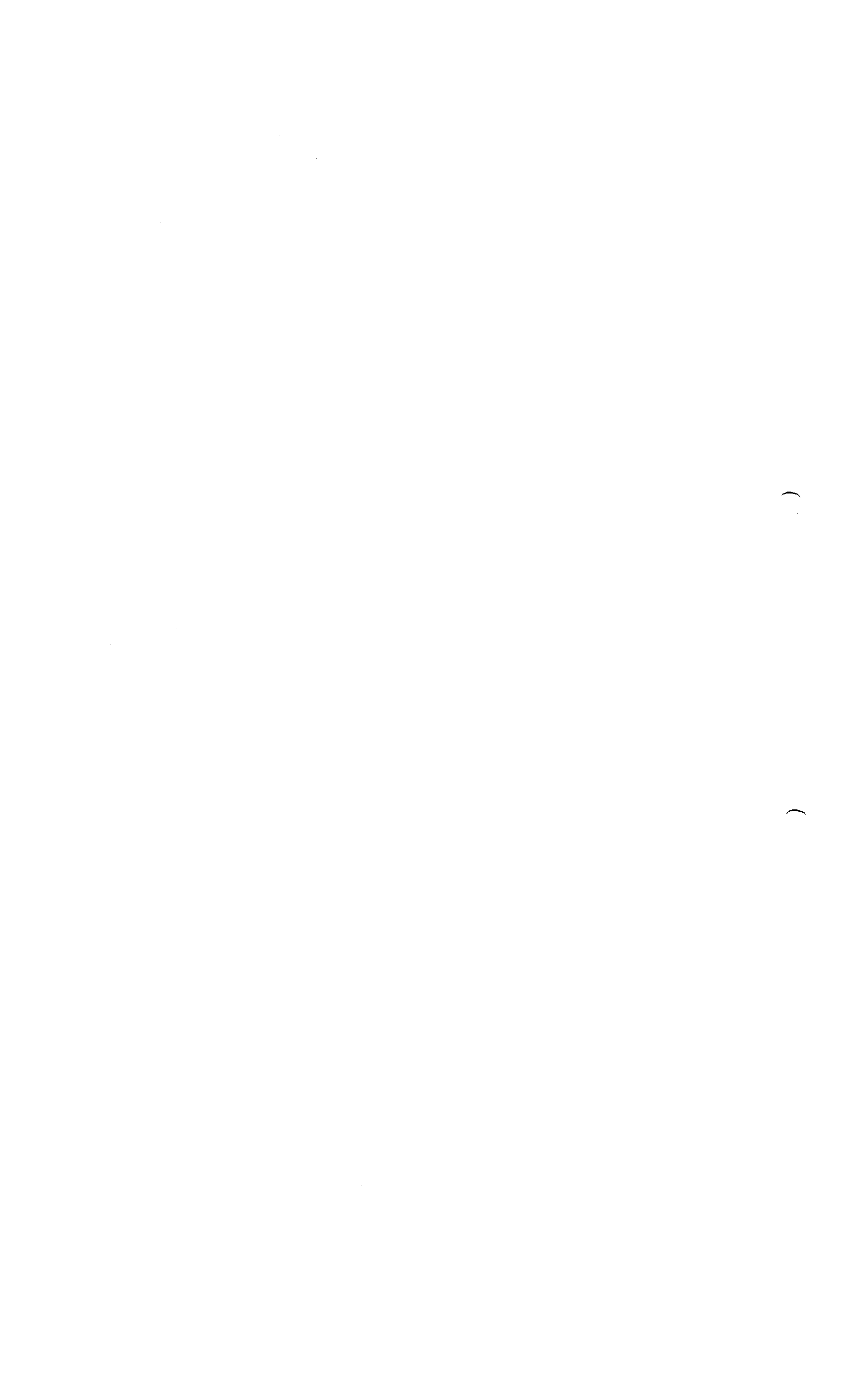
Se sometieron a prueba tres grupos, bajo condiciones de precisión intermedia: se realizaron las pruebas de forma independiente con el mismo método, en una muestra primaria homogénea, a cargo de 3 operadores, en 3 días diferentes, con 3 sistemas diferentes de cromatografías y 3 columnas diferentes.

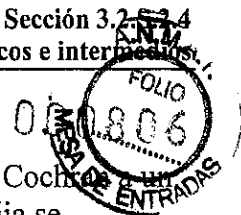
Dentro de cada grupo, se llevaron a cabo 6 pruebas bajo condiciones que garantizaban la repetibilidad: los análisis se llevaron a cabo de forma independiente utilizando el mismo método, en una muestra primaria homogénea, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y los realizó el mismo operador en un solo día.

Se separan las moléculas mediante HP-SEC y se detectan mediante el índice de refracción. Se determinó el K_D del PRP para cada prueba. Los resultados se presentan en la tabla 10.

Tabla 10: Distribución del tamaño molecular mediante HP-SEC en el PRP (K_D): Validación, precisión

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
0,239	0,261	0,261
0,249	0,259	0,269
0,248	0,256	0,276
0,245	0,247	0,270
0,246	0,255	0,262
0,244	0,249	0,260





Se verifica la homogeneidad de las varianzas intragrupal mediante una prueba de Cochran a un nivel de significancia del 5 %. Los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia se calcularon utilizando el cálculo de varianzas (varianza de repetibilidad en los grupos completos, varianza intergrupala y varianza de precisión intermedia). Se determinó el intervalo de confianza del 95 % de la precisión intermedia con la prueba de la t a un nivel de significancia del 5 % con varianzas de repetibilidad e intergrupales.

Las características de la repetibilidad y de la precisión intermedia, y el intervalo de confianza del 95 % para 1 medición son las siguientes:

Tabla 11: Características de repetibilidad y precisión intermedia

Características	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Intervalo de confianza del 95 %
Características de repetibilidad	0,0053	2,06%	/
Características de precisión intermedia	0,0116	4,56%	±0,025

El intervalo de confianza de la precisión intermedia es inferior a 0,04.

3.2.2 Conclusión

Se validó la especificidad del método. Los coeficientes de variación de la repetibilidad y de la precisión intermedia son, aproximadamente, de 2,06 % y 4,56 %, respectivamente, y el intervalo de confianza de la precisión intermedia es de ±0,025 para 1 corrida.

El método para determinar la distribución del tamaño molecular (K_D del polisacárido) en PRP mediante HP-SEC y detección del índice de refracción es válido.

