PORTARIA N9 174, DE 11 DE NOVEMBRO DE 1996

O Secretirio de Viglltncia Sani"ria do Minilt6rio di saúde, 110uso de suas atribulç6es legais,

resolve: .

Art. l' Aprovar as Normas Técnicas de Produção e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos

Antit6xicos e Anti·rábico, na conformidade do anexo desta Portaria.

Art. 2' Estabelecer o prazo de 30 (trinta) dias para a apresentação de sugest6es, com vistas ao

aprimoramento das referidas normas.

Art. 3' Esta Portaria entrará em vigor na data de sua publicação.

ELISALDO L. A. CARLINI

ANEXO

NORMAS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DOS SOROS ANTIOFfDICOS

1.DEFINIÇOES

1.1. DENOMINAÇÃO

• Soro Antlbotrópico

• Soro Antlcrolálico

· Soro Anlllaquétlco

· Soro Antielapldico

· Soro Antlbotrópico-crotálico

• Soro Antlbotrópico-Iaquético

1.2. DEFINiÇÃO DESCRITIVA .

O Soro Antloffdico é uma SOlUça0de imunoglobulinas especificas purificadas, obtidas a partir de plasma de

equldeos hiperimunizados, contra o veneno da serpente a que se refere.

1.3. MATERIAIS DE REFERI:NCIA

1.3.1. VENENOS DE REFERI:NCIA NACIONAL

. O veneno de referência é uma mistura homogênea de venenos que representam a distribuição geográfica

da espécie e devem ser caracterizados pelas suas propriedades flsicas, qufmicas, bio!ógicas e farmac~I6glcas.

Os venenos de referência padronizados (DL50 em camundongos albinos SUlÇOS)para a reaãzação dos

provas referidos na presente Norma, bem como as instruções para a sua correta utilização, serão fomecidos pelo

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCaS).

Os venenos de referência para a prova de atividade (potência) dos anlivenenos especfficos são extraídos

das seguintes espécies:

· Veneno botrópico: Bothrops jararaca

· Veneno crotálico: Crotalus durissus terrificus

· Veneno elapldico: Micrurus frontalis

· Veneno faquético: Lachesis muta

1.4. TERMINOLOGIA

1.4.1. PLASMA INDIVIDUAL

Plasma obtido da sangria de um único animal.

1.4.2. PLASMA A GRANEL

Plasma obtido pela mistura de dois ou mais plasmas individuais.

1.4.3. SORO CONCENTRADO A GRANEL

Volume de soro obtido após digestao, purificação, concentração e dessallnização do plasma a granel. .

1.4.4. SORO PRODUTO ACABADO A GRANEL

Preparaçâo estéril de imunoglobulinas purificadas, diluída, contida em recipiente único, proveniente de um

ou mais Soros Concentrados a Granel, de cornposlção uniforme e com caracterlsticas de qualidade estabelecidas

por esta Norma.

1.4.5. lOTE FINAL DE SORO ANTIOFfDICO

Soro Produto Acabado a Granel envasado em ampolas ou frascos-ampola, em processo único, identificado

e produzido de acordo com um único protocolo de produção,

1.4.6. SUB·LOTE

Fração especifica e Identificada de um Lote Final de Soro Antiofldico.

2. NORMAS GERAIS DE PRODUÇÃO E CONTROLE

2.1. ASPECTOS GERAIS

2.1.1. A produção de soro antlofldico requer o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação e Normas de

Biossegurança.

2.1.2. As operações de lmunízação e sangria dos equldeos devem ser realizadas em local de fácil lavagem e

desinfBeçao.

2.1.3. Os equldeos devem ser sangrados mediante punção venosa. A zona de punção deve ser préviamente

lavada, tricotomizada e desinfetada. O sangue deve ser coletado asséptlcamente.

2,1.4. A separação do plasma deve ser realizada em local próprio, obedecendo normas de assepsia. O plasma

deve ser armazenado á temperatura de 4° C a 8° C.

2.1.5. Os processos de puriãcação, concentração, dessallnízação e filtração esterilizante, devem ser executados

em locais separados das áreas de manejo de animais.

2.1.6. Nos processos de puriílcação devem ser utilizadas misturas de plasmas de dois ou mais equldeos.

2.1:7. Os processos de Produção e Controle devem seguir os Manuais de' Procedimentos aprovados pela

Instltuiçao Produtora.

2.2. EQUIDEOS UTILIZADOS

2.2.1. Para a produção dos soros antiofldicos somente se utilizam equldeos saudáveis, após exame médico

veterinárió, e submetidos à quarentena antes de serem Ingressados no plantei produtor.

2.2.2. Animais que tenham recebido antibiótico s6 podem ser imunizados e sangrados após dez dias da última

adminlstraçao, com exceção daqueles que tenham recebido penicilina ou estreptomicina, os quais devem

aguardar quarentena de sessenta dias.

2.2.3. Antes do inicio de cada ciclo de lmunlzação, os animais devem ser submetidos à avaliação cllnica por um

perfodo mlnlmo de sete dias e devem s.er registradas todas as avaliações clinicas durante este e ou qualquer

outro perlodo subsequente.

2.2.4. Deve ser eliminado do processo de produção o plasma de qualquer equldeo que apresente sinal

persistente de enfermidade. Se a causa diagnosticada colocar em risco a saúde do restante dos equldeos

utilizados e existir alguma possibilidade de comprometimento da saúde humana, todos os plasmas ou produtos

deles derivados devem ser descartados e o plantei produtor deve ser suspenso e submetido à quarentena.

2.3. ANTIGENOS UTILIZADOS

2.3.1. As extrações e a manlpulação dos venenos devem obedecer as Boas Práticas de Fabricação e Normas de

Biossegurança.

2.3.2. A classlfícação taxionOmica das serpentes e a zona de captura devem ser registradas.

2.3.3. As serpentes que se destinam à produção de veneno devem ser submetjdas li quarentena.

2.3.4. As serpentes das quais são extraldos os venenos para a produção dos soros antlofldicos, devem ser

saudáveis e representarem a distri~uiçao geográfica das espécies.

2.3.5. Os venenos devem ser identificados, centrifugados, liofilizados, protegidos da luz e conservados li

temperatura de \_20°C. .

2.3.6. Para írnunlzaçãodos equideos, somente se utiliza soluções estéreis de venenos previamente dosados em nI\_\_

2.3.7. Quando se utiliza frações do veneno para imunizar, estas devem ser preparadas a partir de venenos

devidamente identificados e dosados.

2.3.8. Quando se ~':liza venenos destoxificados para a lmunízação dos equldeos, estes devem ter sua DL50

previamentlltdeterminada.

2.3.9. O anllgeno para o gênero Bothrops deve incluir: 50% de veneno de B. jararaca e 12,5% de cada um dos

venenos de B. moojeni, B. jararacussu, B. alternatus e B. neuwiedi.

2.3.10. O anllgeno para o gênero Crotalus deve ser Crotalus duríssus, crotamina positivo.

2:3:11. O anllgeno para o gênero Micnunus deve ser composto por partes de veneno de espécies Micnunus

frontalis e Micnunuscorallinus. .

2.3.12: O anllgeno para o gênero Lachesis deve ser de Lachesis muta.

3. CONTROLE DAS OPERAÇÓES DE PRODUÇÃO

3.1. CONTROLE DO PLASMA INDIVIDUAL

3.1.1. PROVA DE ATIVIDADE (PB.4)

Em cada Plasma Individual, determina-se a capacidade neutralizante do efeito letal do v.n.no dfi

referência correspondente, utilizando o métcdo de soroneutralizaçao em camundongos alblnoe IUIçoI ou

métodos *in vifro* validados.

3.2. CONTROLE DO PLASMA A GRANEL

3.2.1. PROVA DE ATIVIDADE (PB.4)

Uma amostra do Plasma a Granel é submetida li prova indicada no item 3.1.1.

3.2.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEINAS (PFQ.2)

Uma amostra de Plasma a Granel é submetida à determinação da concentração de protelnas pelo m6todo de

Biureto *elou* Micro-Kjeldahl.

3.2.3. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostra do Plasma a Granel é submetida li determínação do pH.

3.3.- CONTROLE DO SORO CONCENTRADO A GRANEL

3.3.1. PROVA DE ATIVIDADE (POTI:NCIA) (PB.4)

Em uma amostra do Soro Concentrado a Granel, determina-se a capacidade neutralizante do efeito 1.111do

veneno de referência correspondente, utilizando o método de soroneutrallzação em camundongos albino•• uiçol.

3.3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEINAS (PFQ.2)

Uma amostra do Soro Concentrado a Granel é submetida à determinação Indicadano item~.2.2.

3,3.3. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostra do Soro Concentrado a Granel é submetida à determlnação Indlc~dano item 3.2.3.

3.4. CONTROLE DO SORO PRODUTO ACABADO A GRANEL

3.4.1. PROVA DE ATIVIDADE (POTI:NCIA) (PB.4)

Uma emostra do Soro Produto Acabado a Granel é submetida à prova Indicada no Item 3.3.1.

3.4.1.1. TITULOS NEUTRALIZANTES MINIMOS

· Soro Antibotr6plco= 5,0 mgfml

· Soro Anticrotállco= 1,5 *mg/ml*

· Soro Antielapldico= 1,5 mgfml

· Soro Antibotr6pico-crotálico

Fração Botr6pica= 5,0 mgfml

Fração Crotálica= 1,5 mgfml

*· Soro* Antlbotróplco-laquétlco

Fraçao Botr6pica= 5,0 *mg/ml*

Frafao Laquética=· 3,0 *mg/ml*

3.4.2. PROVA DE PIROGI:NIO (PB.1)

Uma amostra do Soro Produto Acabado a Granel é submetida li Prova de Plrog6nlo. Os animais nlo

devem apresentar reação pirogênica.

3.4.3. PROVA DE ESTERILIDADE (PM.l)

Uma amostra de Soro Produto Acabado a Granel é submetida li prova de Esterilidade Bacteriana e

Fúngiça. Não deve apresentar crescimento de bactérias ou fungos.

3.4.4. DETERMINAÇÃO DE FENOL (PFQ.3)

Uma amostra do Soro Produto Acabado a Granel é submetida li determínação de Fenol, sendo o m6xlmo

permitido 0,35 g%.

3.4.5. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.l)

Uma amostra do Soro Produto Acabado a Granel é submetida li determinação do pH, devendo estar entre

6,0 e 7,0. .

3.4.6. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS TÓTAIS (PFQ.4)

Uma amostra do Soro Produto Acabado a' Granel é submetida li determinação de S6lidos Totais, sando o

máximo permitido 20%.

3.4.7. DETERMINAÇÃO DE SULFATO DE AMONIO (PFQ.5)

Uma amostra do Soro Produto Acabado a Granel é submetida à determlnação de Sulfato de AmOnlo,sendo

o máximo permitido 0,2 g% de sulfato.

3.4.8. DETERMINAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO (PFQ.6)

Uma amostra do *Soro* Produto Acabado a granel é submetida à deterrnlnação de Cloreto de Sódio,

devendo estar entre 0,70 e 0,90 g%.

3.4.9. DETERMINAÇf-O DE NITROGI:NIO E PROTEINAS (PFQ.2)

Uma amostra do Soro Produío Acabado a Granel é submetida à determínação de Nitrogênio Total e Não

Protéico pelo método de Micro-Kjeldhal.

. A concentração máxima permitida de Nitrogênio Não Protéico é 0,3 g%.

. A concentração máxima penmilida de proteína é 15 g%.

3.5. )NTROLE DO LOTF FINAL DE SORO ANTIOFIDICO

"lI; 1 pl'1n\là·.;: àTI\llnàrll= IPnT~"'r:làl IPR dI

utilizar como titulo do lote final, o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

O produto deve ter a potência neutralizante indicada no item 3.4.1.1.

3.5.2. PROVA DE PIROG~NIO (PB.1)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antiofldico é submetida a prova indicada no item 3.4.2.

3.5.3. PROVA DE ESTERILIDADE (PM.1)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antioffdico é submetida a prova indicada no item 3.4.3.

3.5.4. PROVA DE INOCUIDADE (TOXICIDADE INESPECIFICA) (PB.2)

Uma arrostra do Lote Final de Soro Antiofldico é submetida à prova de Inocuidade, utlllzando-se cobaias e

camundongos albinos sulços, Para que o produto seja considerado aprovado, os animais devem sobreviver e

apresentar ganho de peso ao final da prova.

3.5.5. PROVA DE IDENTIDADE (PB.5)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antlofidico é submetida ao método de Ouchterlony, com a finalidade de

se verificar a identidade do produto frente ao veneno de referência. Esta prova poderá não ser realizada caso seja

efetuada a prova de atividade (potência) no lote final de soro antiofidico.

3.5.6. CONTROLE DE FENOL (PFQ.3)

-Urna amostra do Lote Final de Soro Antiofldico é submetida à prova indicada no item 3.4.4. O produtor

poderá utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

r.

~/ 3.5.7. CONTROLE DO pH (PFQ.1)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antiofidico é submetida a prova indicada no item 3.4.5.

3.5.a. CONTROLE DE SÓLIDOS TOTAIS (PFQ.4)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antiofidico é submetida à prova indicada no item 3.4.6. O produtor poderá

utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

3.5.9. CONTROLE DE SULFATO DE AMONIO (PFQ.5)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antiofidlco é submetida a prova Indicada no item 3.4.7. O produtor

poderá utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

3.5.10. CONTROLE DE CLORETO DE SÓDIO (PFQ.6)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antioffdico é submetida a prova indicada .no item 3.4.a. O produtor

podera utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

3.5.11. CONTRO~E.DE NITROG~NIO E PROTEINAS (PFQ.2)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antiofldico é submetida a prova indicada no item 3.4.9. O produtor

poderá utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

• 3.5.12. CONTROLE DE VOLUME MÉDIO (PFQ.1)'

Uma amostra do Lote Final de Soro antiofidico é submetida à determinação do volume médio, por medida

direta. O volume médio de cada apresentação é dado de acordo com a tabela indicada no Procedimento de

Controle.

3.5.13. INSPEÇÃO VISUAL (PFQ.a)

Todo o lote Final de Soro Antiofldico deve ser inspecionado visualmente. frente a um fu~do escuro e claro.

O produto é uma SOlUça0 llmplda, incolor ou ligeiramente amarelada, que não deve apresentar gnumos ou

partículas.

4. ESTOCAGEM

O Lote Final de Soro Antioffdlco deve ser mantido à temperatura de 4°C a aOc.

5. ROTULAGEM

Os rótulos do Lote Final de Soro Antioffdico, 'deverão estar de acordo com a lei 6.360/76 Decreto

*79.094177.*

6. REGISTROS

Os dados dos processos de produção de cada lote Final !lU soe-lote de Soro Antioffdico e os resultados

das provas de controle devem ser registrados em protocolos e arquivados.

7. ARQUIVO DEAMOSTRA DO LOTE FINAL

7.1. SORO PRODUTO ACABADO A GRANEL

Deve ser conservada na Unidade Produtora, uma amostra do Soro Antlofldico Produto Acabado a Granel, à

temperatura de 4° C a aOC, devidamente identificada, até 12 meses após a data de vencimento.

7.2. LOTE FINAL DE SORO ANTIOFIDICO

Deve ser conservada no Controle de Qualidade Interno, amostra do Lote Final ou sua-tote de Soro

Antiofldico, à temperatura de 4° C a aOC, durante no mlnimo 12 meses após a data de vencimento.

8. EXPEDiÇÃO

A expedlção do Lote Final ou sub-lote de Soro Antiofldlco somente pode ser autorizada após überação pelo

Controle de Qualidade Interno e sua ulilizaçllo após a aprovação pelo Controle da Qualidade Nacional.

9. PRAZO DE VALIDADE

O Prazo de Validade do lote Final de Soro Antiofldico é de 38 meles, a partir da data da última

determlnação de potência realizada pelo produtor.

NORMAS DE PRODUÇÃO.E CONTROLE DE QUALIDADE DOS SOROS ANTITOXICOS

1. DEFINIÇOES

1.1. DENOMINAÇÃO

.SEÇÃO

· Soro Antitetânico

· Soro Antidiftérico

· Soro Antibotullnico

1.2. DEFINiÇÃO DESCRITIVA

O Soro Anlilóxico é uma solução de imunoglobulinas especificas purificadas, obtidas a partir de plasma de

equldeos hiperimunizados, contra a toxina bacteriana a que se refere.

1.3.PADROES INTERNACIONAIS DE REFER~NCIA

. Os Padrões Internacionais são mantidos e distribuldos pelo Statens Seruniinslilut of Copenhaguen •

Dmamarca.

1.3.1. O Segu~do Padrão Internacional de Referência da Antitoxina Tetânica (estabelecidó em 1969). é distribuldo

aos tacoratórlos de Produção e Controle em ampolas que contêm soro equino hiperimune liofilizado, com 1400

UI/ampola, equivalente a 1000 Lf/ampola (limite de Flocutação).

1.3.2. O Padrão Internacional da Antitoxina Diftérica (estabelecido em 1934), é conservado em ampolas que

contêm soro equino hiperimune dessecado. E dlslribuldo aos Laboratórios de Produçâo e Controle dissolvido em

Solução Salina Glicerinada em frasco-ampola. com concentração de 10 Unidade Internacional (UI/ml). A UI é

definida como a atividade correspondente a 0,0628 mg do material dessecado. contido nas ampolas onde se

conserva o Padrão Internacional.

1.3.3. O Padrão Internacional da Antitoxina Botullnica tipo A (estabelecido em 1963), é conservado em ampolas

que contêm soro equino hlperimune dessecado. É dlsfribuldo aos Laboratórios de Produção e Controle em

ampolas contendo 500 UI. A Unidade Internacional é definida como a atividade correspondente a 0,174 mg do

material dessecado. contido nas ampolas onde se conserva o Padrão Intemacional.

1.3.4. O Padrão Intemacional da Antitoxina B'otullnlca tipo B (estabelecido em 1963), é conservado em ampolas

que contêm soro equino hiperimune dessecado. É distribuldo aos Laboratórios de Produção e Controle em

ampolas contendo 500 UI. A Unidade Internacional é definida como a atividade correspondente a '0.174 mg do

material dessecado. contido nas ampolas onde se conserva o Padrão Internacional.

1.3.5. O Padrão Internacional da Antitoxina I;lotullnica tipo E (estabelecido em 1963), é conservado em ampolas

. que contêm soro equino 'hiperimune dessecado. É distriburdo aos Laboratórios de Produção e Controle em

ampolas contendo 1000 UI. A Unidade Internacional é definida como a atividade correspondente a 0,0691 mg do

material dessecado, contido nas ampolas onde se conserva o Padrão Internacional.

1.4. TERMINOLOGIA

1.4.1. PLASMA INDIVIDUAL

Plasma obtido da sangria de um único animal.

1.4.2. Pl,ASMA A GRANEL

Plasma obtido pela mistura de dois ou mais plasmas individuais.

1.4.3. SORO CONCENTRADO A GRANEL

Volume de soro obtido após digestão, puríílcação, concentração e dessalinização do plasma a granel.

1.4.4. SORO PRODUTO ACABADO A GRANEL

Preparação estéril de imunoglobulinas purificadas, dilulda, contida em recipiente único, proveniente de um

ou mais Soros Concentrados a Granel, de composição uniforme e com caracterlsticas de qualidade estabelecidas

por esta Norma.

1.4.5. LOTE FINAL DE SORO ANTITÓXICO

Quantidade de Soro Produto Acabado a Granel envasado em ampolas ou frascos-arnpcla, em processo

único. identificado e produzido de acordo com um único protocolo de produção.

1.4.6. SUB·LOTE

Fraçâo especifica e identificada de um Lote Final de Soro Antitóxico.

2. NORMAS GERAIS DEPRODUÇAo E CONTROLE

2.1. ASPECTOS GERAIS

2.1.1. A produção e controle soros antitóxicos requer o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação e Normas

de Biossegurança.

2.1.2. O pessoal do laboratório 'que manipula os anllgenos tetânico, diftérico e botullnico deve ser previamente

imunizado contra tétano, difteria e botulismo, e ter controlada sua resposta imune por soroneutralízação, pelo

menos uma vez ao ano, e apresentar um titulo mlnimo de acordo com as Normas de Produção e Controle de

cada um dos anllgenos. .

2.1.3. As operações de imunização e sangria dos equídeos devem ser realizadas em local de fácil lavagem e

desinfecção.

2.1.4. Os equldeos devem ser sangrados mediante punção venosa. A zona de punção deve Ser previamente

lavada, tricotomizada e desinfetada. O sangue deve ser coletado assepticamente.

2.1.5. A separação do plasma deve ser realizada em local próprio, obedecendo normas de assepsia. O plasma

deve ser armazenado à temperatura de 4° C a aOc.

2.1.6. Os processos de purificação, concentração, dessalinização e filtração esterilizante, devem ser executados

em locais separados das áreas de manejo ~e animais.

2.1.7. Nos processos de purificação devem ser utilizadas misturas de plasmas de dois ou mais equldeos.

2.1.a. Os processos de Produção e Controle devem seguir os Manuais de Procedimentos aprovados pela

Instituição Produtora.

2.2. EQUIDEOS UTiliZADOS

2.2.1. Para a produção dos soros antitóxicos somente se utilizam equldeos saudéveis, após exame médico

veterinério, e submetidos é quarentena antes de serem Ingressados ao plantei produtor .

2.2.2. Animais que tenham recebido antibiótico só podem ser Imunizados e sangrados após dez dias da última

administração, com exceção daqueles que tenham recebido penicilina ou estreptomicina, os quais devem

aguardar quarentena de sessenta dias. 2.2.3. Antes do i1ílcio de cada ciclo de imunização. os animais devem ser submetidos à avaliação cllnica por um

per/ode mlnimo de sete dias e devem ser registradas todas as avaliações clinicas durante este e ou qualquer

outro per/odo subsequente.

2.2.4. Deve ser eliminado do processo de produção o plasma de qualquer equideo que apresente sinal

persistente de enfermidade. Se a causa diagnosticada colocar em risco a saúde do restante dos equldeos

utilizados e existir alguma possibilidade de comprometimento da saúde humana. todos os plasmas ou produtos

deles derivados devem ser descartados e o plantei produtor deve-ser suspenso e submetido à quarentena.

2.3. ANTIGENOS UTILIZADOS

2.3.1. A obtenção e a manipulação das toxinas bacterianas devem obedecer as Boas Práticas de Fabricação e

Normas de Biossegurança.

2.3.2. As toxinas e toxóides utilizados para a imunização dos animais devem estar devidamente caracterizados

pelas Unidades Produtoras de Anl/genos e aprovadas pelo Controle da Qualidade da Instituição Produtora, de

acordo com as Nonnas estabelecidas.

3. CONTROLE DAS OPERAÇOES DE PRODUÇÃO

3.1. CONTROLE DO PLASMA INDIVIDUAL

~ 1 1 PRn\lA m: ATI\lInAnF IPR 7\

Em cada Plasma Individual, determina-se a capacidade neutralizante do efeito da toxina de referência

correspondente. utilizando o método de scroneutralzação em camundongos albinos sulços ou métodos *in vliro*

validados.

3.2. CONTROLE DO PLASMA A GRANEL

3.2.1. PROVA DEATIVIDADE (PB.7)

Uma amostra do Plasma a Granel é submetida á prova indicada no item 3.1.1.

3.2.2. DETERMINAÇÃOPA CONCENTRAÇÃO DE PROTEINAS (PFQ.2)

Uma amostra de Plasma a Granel é submetida á determinação da concentração de protelnas pelo método

de Biureto. *elou* Micro-Kjeldahl.

3.2.3. DETERMINAÇÃO DEpH. (PFQ.l)

Uma arrosíra do Plasma a Granel é submetida á determínação do pH.

3.3. CONTROLE DO SORO CONCENTRADO A GRANEL

3.3.1. PROVA DEATIVIDADE (POTI:NCIA) (PB.7)

Uma amostra do Soro Concentrado a Granel é submetida à determinação da capacidade neutralizante do

efeito da toxina ejereferência correspondente, utilizando o método de soroneutralização em camundongos albinos

suíços.

3.3.2. DETEBMINAÇAo DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEINAS (PFQ.2)

Uma amostra do Soro Concentrado a Granel é submetida à determinação indicada no item 3.2.2.

3.3.3. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.l)

Uma amostra do Soro Concentrado a Granel é submetida à determinação indicada no item 3.2.3.

3••••CONTROLE DO SORO PRODUTO ACABADO A GRANEL

3••••1. PROVA DE ATIVIDADE (POTI:NCIA) (PB.7)

Uma amostra do 5cro Produto Acabado a Granel é submetida à determinação Indicada no item 3.3.1.

3.•••1.1. POTl:NCIA MINIMA

3.••.1.1••1. Soro Antitetanico = 1000 Ullml

3.••.1.1.2. Soro Antidiftérico = 1000 Ullml

3.4. t,1.3. Soro Antibolullnico·

· Fração botulinica A = 250 Ullml

• Fraçao botulinica B = 250 Ullrnl

• Fraçao botulinica E = 250 Ullml

3.••.2. PROVA DE PIROG~NIO (PB.l)

Uma amostra do Soro Produto Acabado a Granel é submetida à Prova de Pirogênio. Os animais não

devem apresentar reação pirogênlca.

3.4.3. PROVA DE ESTERILIDADE (PM.l)

Uma amostra do Soro Produto Acabado a Granel é submetida à prova de Esterilidade Bacteriana e

~1~lnn~ **N5n "'.\lA QF\t\*CAnt::ar ,.r•• ,.iMAntn riA** h:v"h'ri~c: **1"\11fi Innnc:**

3•••.••.DETERMINAÇÃO DE FENÓl(PFQ.3) •

Uma amostra do Soro Produto Acabado a Granel é submetida à determinaçâo de Fenol, sendo o máximo

permitido 0,35 g%.

3.••.5. DETERMINAÇÁO DE pH (PFQ.l)

Uma amostra do Soro Produto Acabado a Granel é submetida <li determinação do pH, devendo estar.entre

6,0 e 7,0.

3.••.6. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS (.PFO.4)

Uma amostra do Soro Produto Acabado a Granel é submetida à determinação de Sólidos Totais, sendo o

miximo permitido 20 %.

3.••.7. DETERMINAÇÃO DE SULFATO DE AMONIO (PFQ.5) .

Uma amostra de Soro Produto Acabado a Granel é submetida á determinação de Sulfato de AmOnio, sendo

o máximo permitido 0,2 g% de sulfato.

3.••.8. DETERMINAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO (PFQ.6) Uma amostra de Soro Produto Acabado a granel é submetida à determinação de Cloreto de Sódio,

devendo estar entre 0.70 e 0,90 g%.

3.4.9. DETERMINAÇÃO DE NITROG~NIO E PROTEINAS (PFQ.2)

Uma amostra do Soro Produto Acabado a Granel é submetida à determinação de Nitrogênio Total e Não

Protéico pelo método de Micro-Kjeldhal.

A concentração máxima permitida de Nitrogênio Não protéico é 0,3 g%.

A concentração máxima permitida de Protelna é 15 g%.

3.5. CONTROLE DO lOTE FINAL DE SORO ANTITÓXICO

3.5.1. PROVA DE ATIVIDADE (POTI:NCIA) (PB.7)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antitóxico é submetida à prova indicada no item 3.3.1. O produtor

poderá utilizar como tltulo do lote FInal o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

O produto deve ler a Potência neutralizante indicada no item 3.4.1.1.

3.5.2. PROVA DE PIROG~NIO (PB.l)

Uma amostra do lote Final de Soro Antitóxico é submetida à prova indicada no item 3.4.2.

3.5.3. PROVA DE ESTERILIDADE (PM.l)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antitóxico é submetida à prova indicada no item 3.4.3.

3.5.4. PROVA DE INOCUIDADE (TOXICIDADE I~ESPECrFICA) (PB.2)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antitóxlco é submetida à Prova de Inocuidade, utilizando-se cobaios e

camundongos albinos sulços. Para que o produto seja considerado aprovado, os animais devem sobreviver e

apresentar ganho de peso ao final da prova. •

3.5.5. PROVA DE IDENTIDADE (PB.3)

Uma amostra do lote Final de Soro Antitóxico é submetido ao Método de Ouchterlony. com a finalidade

de se verificar a identidade do produto frente à toxina referência. Esta prova poderá não ser realizada caso seja

efetuada a prova de atividade (potência) no lote Final do Soro Antitóxico.

3.5.6. CONTROLE DE FENOl (PFQ.3)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antitóxico é submetida à prova indicada no item 3.4.4. O produtor

poderá utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel. .

~ ~ 7 r.ntJTR('l1 F nn nl-llPl=n 1\

Uma amostra do Lote Final de Soro Antit6xico é submetida à prova indicada no item 3.4.5.

3.5.a. CONTROLE DE SÓLIDOS TOTAIS (PFQ.4)

Uma amostra do lote Final de Soro Antitóxico é submetida à prova indicada no item 3.4.6. O produtor

poderá utilizar o resuítado-obtldo no Soro Produto Acabado a Granel.

3.5.9. CONTROLE DE SULFATO DE AMONIO (PFQ.5)

Uma amostra do lote Final de Soro Antitóxico é submetida à prova indicad.ano item 3.4.7. O produtor

poderá utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

3.5.10. CONTROLE DE CLORETO DE SóDIO (PFQ.6)

Uma amostra do lote Final de Soro Antitóxico é submetida à prova indicada no item 3.4.8. O produtor

poderá utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acàbado a Granel.

3.5.11. CONTROLE DE NITROG~NIO E PROTEINAS (PFQ.2)

Uma amostra do lote Final de Soro 'Antitóxico é submetida à prova irtdlcada no item 3.4.9. O produtor

poderá utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

3.5.12. CONTROLE DE VOLUME MÉDIO (PFQ.7)

Uma amostra do lote Final de Soro antitóxico é submetida à determinaçâo do volume médio, por medida

direta. O volume médio de cada apresentação é dado de acordo com a tabela indicada no procediment~ de

Controle.

3.5.13. INSPEÇÃO VISUAL (PFQ.S)

Todo o lote Final de Soro Antitóxico deve ser inspecionado visualmente, frente a um fundo oscuro e claro.

O produto é uma solução IImpida, incolor ou ligeiramente amarelada, que não deve apresentar grumos ou

partlculas.

4. ESTOCAGEM

O lote Final de So~Antitóxico deve ser.mantido à temperatura de4°C a aOc.

5. ROTULAGEM

Os rótulos do Lote·Final de Soro Anlil6xico, devem estar de acordo com a Lei 6.360/76 Decreto *79.094177.*

6. REGISTROS

. Os dados dos processos de produção de cada lote Final ou Sub-lote do Soro Antitóxico e os resultados

das provas de controle devem ser registrados em protocolos e arquivados.

7. ARQUIVO DE AMOSTRA

7.1. SORO PRODUTO ACABADO A GRANEL

Deve ser Conservada na Unidade Produtora, uma amostra do Soro Antitóxico Produto Acabado a Granel, à

temperatura de 4°C a soC, devidamente identificada, até 12 meses após a data de vencimento do lote final.

7.2. lOTE FINAL DO SORO ANTITÓXICO

Deve ser conservada no Controie de Qualidade lntemo, amostra do lote Final ou sub-lote de Soro

Antítóxlco, á temperatura de 4°C a SOC,duranteno mlnlmo 12 meses após a data de vencimento. A expedição do Lote Final ou Sub-lote de Soro Antitóxico somente pode ser autorizada após liberação pelo

Controle de Qualidade Intemo e sua utilizaçao após a aprovação pelo Controle de Qualidade Nacional

9.-PRAZO DE VALIDADE

o Prazo de Validade do Lote Finais de Soro Antitóxico é de 36 meses, a partir da data da última

determinaçao da potência realizada pelo produtor.

NORMAS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO S,?RO ANTI-RÁBICO

1. DEFINIÇOES

1.1. DENOMINAÇÃO

• Soro Anti-rábico

1.2. DEFINiÇÃO DESCRITIVA

O Soro Anti-Rábico é uma SOlUÇa0de Imunoglobulina especrtica purificada, obtida a partir de plasma de

equldeos hiperimunizados, contra o vlrus rábico.

1.3. MATERIAIS DE REFERêNCIA

1.3.1. VIRUS RÁBICO

As cepas de vlrus rábico, envasadas em ampolas e liofilizadas, são distribuidas pelo Laboratório de

Controle NaCionalde Qualidade em Saude (INCaS) aos Laboratórios de Fabricaçao e Controle.

1.3.2. SORO ANTI-RÁBICO DE REFERêNCIA NACIONAL

Preparado a partir de soro de equldeos hiperimunizados e padronizado em Unidades Internacionais (UI/ml)

frente ao Soro de Referência Internacional. É distribuldo pelo Laboratório de Controle Nacionalde Qualidade em

Saude (INCQS) aos Laboratórios de Fabrícação e Controle, sob fonma liofilizada, em ampolas ou frascos-ampola.

1.4. TERMINOLOGIA

1.4.1. LOTE DEVIRUS SEMENTE

Quantidade de ampolas ou frascos-empole contendo vlrus rábico liofilizado de cornposlção uniforme,

obtido apartir de uma cepa IiÔfilizada,de procedência conhecida.

1.4.2. VIRUS RÁBICO TRABALHO

1.4.3. Quantidad~ de vlrus ráblco obtido em um único processo de fabricação, a partir do vírus semente, com

composição unifonme,conservado em condiçOes adequadas.

PLASMA INDIVIDUAL

Plasma obtido da sangria de um único animal

1.4."- PLASMA A GRANEL

Plasma obtido pela mistura de dois ou mais plasmas individuais.

1.4.5. SORO CONCENTRADO A GRANEL

Volume de soro obfído.apcs digestao, purlfícação, concentração e dessallnízação do plasma a granel.

1.4.6. SORO PRODUTO ACABADO A GRANEL

Preparação estéril de Imunoglobulinas purificadas, dilulda, contida em recipiente único, proveniente de um

ou mais Soros Concentrados a Granel, de ccmposlção uniforme e com caracterlsticas de qualidade estabelecidas

por esta Nonma.

1.4:7. LOTE FINAL DE SORO ANTI-RÁBICO

Soro Produto Acabado a Granel envasado em ampolas ou frascos-ampola, em processei único, identificado

e produzido de acordo com um único protocolo de produção,

1,4.8. SUB·LOTE

Fração especifica e identificada de um Lote final de' Soro Anti-Rábico.

2. NORMAS GERAIS DEPRODUÇÃO E CONTROLE

2.1.ASPECTOS GERAIS

2.1.1. A produção de soro Anti-Rábico requer (, cumprimento das Boas Práticas de Fabricaçao e Normas de

Blossegurança.

2.1.2. O pessoal que manipula antlgeno (vlrus rábico) deve ser previamente Imunizado contra a raiva, e sua

resposta imune é controlada por soroneutrallzação em camundongos, pelo menos uma vez ao ano, devendo

apresentar um titulo mfnimo de 1:25 (DE5Q)ou 0,5 UI/ml.

2.1.3. As operações de lmuntzação e sangria dos equldeos devem ser realizadas em local de fácil lavagem e

deslntecçáo. 2.1.4. Os equldeos devem ser sangrados mediante punção venosa. A zona de punção deve ser previamente

lavada, tricotomizada e desinfetada. O sangue deve ser coletado assepticamente.

. . ~

2.1.5. A separaçAo do plasma deve ser realizada em local próprio, obedecendo normas de assepsia. O-Plasma .

deve ser Inmazenldo • temperatura de 4°C I SOC.

SEÇÃÓ 1 23495

2.2.2. Animais que tenham recebido antibiótico só podem ser imunizados e sangrados após dez dias da úlljma

administração, com exceção daqueles que tenham recebido penicilina ou estreptomicina, os quais devem

aguardar quarentena de sessenta dias.

2:2.3. Antes do inIcio de cada ciclo de imunização, os animais devem ser submetidos á avaliação cllnica por um

perlodo mlnimo de sete dias e devem ser registradas todas as avaliações clinicas durante este e ou qualquer

outro perlodo subsequente.

2.2.4. Deve ser eliminado do processo de produção o plasma de qualquer equldeo que apresente sinal

persistente de enfermidade. Se a causa diagnosticada colocar em risco a saúde do restante dos equldeos

utilizados e existir alguma possibilidade de comprometimento da saúde humana, todos os plasmas ou produtos

deles derivados devem ser descartados.e o plantei produtor deve ser suspensoe submetido à quarentena,

2.3.ANTIGENOS UTILIZADOS

2.3.1. A obtenção e a rnanlpulação do vlrus rábico devem obedecer as BoasPráticas de Fabricação e Normas de

Biossegurança. .

2.3.2. sao utilizados para a imunizaçao dos animais vírus inativado ou vlrus vivo. replicados 'in vltro" (cultivo em

células) *elou* 'in vivo" (tecido nervoso de animais de laboratório) . .

2.3.3. Tanto o anllgeno inatlvado. quanto o antlgeho vivo utilizados na imunizaçao dos animais devem ter sua

qualidade devioamente controlada através de provas executadas e aprovadas pelo Controle de Qualidade da

lnstitulção Produtora.

2.3.4. Os vlrus rábicos semente e trabalho utilizados na produção e controle devem ser identificados,

devidamente controlados e conservados à temperatura de no mlnimo -70· C,

2.3.5. Para imunizaçao dos equideos, somente se utilizám soluções estéreis de virus rábico, previamente dosado

em DLso.

3. CONTROLE DAS OPERAÇOES DE PRODUÇÃO

3.1.CONTROLE DO PLASMA INDIVIDUAL

3.1.1. PROVA DE ATIVIDADE (POTÉNCIA) (PB.10)

Em cada Plasma Individual, determina-se a capacidade neutralizante do efeito letal do vlrus rábico,

mediante o método de soroneutralízação, utilizando o Soro de Referência Nacional para avallação comparativa de

sua atividade. Altemativamente, pode ser utilizado outro método de efetividade comprovada pela lnstltulção

Produtora, validados e autorizados.

3.2. CONTROLE DO PLASMA A GRANEL

3.2.1. PROVA DE ATIVIDADE' (pOTêNCIA) (PB.10)

Uma amostra do Plasma a Granel é submetida à prova indicada no item3.1.1.

3.2.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEINAS (PFQ.2)

Uma amostra de Plasma a Granel é submetida á determinação da concentração de protelnas pelo método

de Micro-Kjeldahl e ou método de Biureto.

3,2.3. DETERMINAÇÃO DE pH. (PFQ.1) \'- Uma amostra do Plasma a Granel é submetida à determínação do pH.

3.3. CONTROLE DO SORO CONCENTRADO A GRANEL

3.3.1, PROVA DE ATIVIDADE (pOTêNCIA) (PB.10)

Em uma amostra do Soro Concentrado a Granel determina-se a capacidade neutralizante do efeito letal do

vlrus ráblco, mediante o método de soroneutralizaçâo, utilizando o Soro de Referência Nacional·para avaííaçào

comparativa de sua atividade em UI/ml.

3.3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEINAS (PFQ.2)

Uma amostra do Soro Concentrado a Granel'é submetida á determlnação da concentração de proteinas

pelo método. Micro-Kjeldahl e ou método de Biureto.

3.3.3. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostra do Soro Concentrado a Granel é~ubmetida à determlnação indicada no item3.2.3.

3.4. CONTROLE DO SORO PRODUTO AC."BADO A GRANEL

3.4.1. PROVA DE ATIVIDADE (POTr:NCIA) (PB.10)

Uma amostra de Soro Produto Acabado a Granel é submetida à prova Indicada no item 3.3.1. A atividade

do produto não deve ser inferl~~~O UI/ml.

3.4.2. PROVA DE PIROGr:NIO (PB.1)

Uma amostra do Soro Produto Acab;do I Granel' submetida à prova de pirogênio. Os animais não devem

apresentar reação pirogênlca.

3.4.3. PROVA DE ESTERILIDADE (PM:1)

Uma amostra do Soro Produto Acabado a Granet' submetida à proVI de Esterilidade bacterianae fúngica,

podendo ser utilizados os métodos por in:;:;ulaçlo direta ou filtraçlo em membl'llnas, nlo. devendo apresentar

crescimento de bactérias ou fungos 10 finll di provI.

- 3.4.4. DETERMINAçÃo DE FENOL (PFQ.3) 2.1.6. OI processos de p~rificaçlo, concentraçto, dellllinlzlçlo e llltrlçlo esterilizante. devem ser executados Uma amostra do Soro Produto Acabado I Granel' submetidl • d,termlnaçio de fenol, se!ldo o m6ximo

em locallseparadol dll àrell de mlneJo de Inimall, ~ "<, permitido de 0,35 g%. --...

2.1.7, NOI procellOl de purlncaçlo devem Itr utlllzldll mlllurll de plllmll de doll ou mlll equldeol.

2.1,S. OI procallOl di Produçlo e Controll dlvlm leguir OI Mlnulll di Procedimentos aprovldos pell

Inllitulçto P.~ulora.

2.2. EQUIDEOS UTILIZADOS

2.2.1. Plra I produçlo do IOro AnU·Ràblco lomentl 1i utllizlm equidlOl Itudàvell, lpóS eXime médIco

v.lIrlnàrlo, I lubmelldOl • qUlranllnl Inl •• di I.ram ingrallldol no plantei produtor 3.4.5. DETERMiNAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostre do Soro Produlo Acabado I Granel' submetidl • deltrmlnaçlo do pH, o qual deve estar

entre 6,0 e 7,0.

3.4.6. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS (PFQ.4)

Uma amostra do Soro Produto Acabado I Granel' submelidl. deltrmlnaçlo de Sólidos lotais, sendo o

màximo permitido de 20%.

3.4.7. DETERMINAÇÃO DE SULFATO DE AMONIO (PFQ.5) Uma amostra de Soro Produto Acabado a Granel é submetida à determinação de sulfato de amOnio, sendo

o máximo permitido 0,2 g% de sulfato.

3.4.8. DETERMINAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO (PFQ.6)

Uma amostra de Soro Produto Acabado a granel é submetida à determinação de cloreto de sódio, o qual

deve estar entre 0,70 e 0,90 g%.

3.4.9. DETERMINAÇÃO DE NITROGêNIO E PROTEINAS (PFQ.2)

Uma amostra do Soro Produto Acabado a Granel é submetida à determinação de Nitrogênio total e não

protéico pelo método de Micro-Kjeldhal.

A concentração máxima permitida de nitrogênio não protéico é 0,3 g%.

A concentração máxima permitida de protelna é 15 g%.

3.5. CONTROLE DO LOTE FINAL DE SORO ANTI·RÁBICO

3.5.1. PROVA DE ATIVIDADE (pOTêNCIA) (PB.10)

U.:na amostra do Lote Final de Soro Antl-Ráblco é submetida à prova indicada no item 3.3.1. O produtor

poderá utilizar como titulo do lote final, o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

3.5.2. PROVA DE PIROGêNIO (PB.1)

Uma amostra do Lote Final de Soro de Soro Antl-Rábico é submetida à prova indicada no item 3.4.2.

3.5.3. PROVA DE ESTERILIDADE (PM.1)

Uma amostra do Lote Final de Soro Anti·Rábico, estatisticamente representativa do lote, é submetida à

prova indicada no item 3.4.3.

3.5.4. PROVA DE INOCUIDADE (TOXICIDADE INESPECIFICA) (PB.2)

Uma amostra do Lote Final de Soro Anti·Rábico é submetida á prova de inocuidade, utilizando-se cobaios e

camundongos. Para que o produto seja considerado inócuo, os animais devem sobreviver e apresentar ganho de

peso ao final da prova.

3.5.5. CONTROLE DE FENOL (PFQ.3)

Uma amostra do Lote Final de Soro Anti·Rábico é submetida à prova indicada no item 3.4.4. O produtor

poderá utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

3.5.6. CONTROLE DO pH (PFQ.1)

Uma amostra do Lote Final de Soro Anti·Rábico é submetida à prova indicada no item 3.4.5.

3.5.7. CONTROLE DE SÓLIDOS TOTAIS (PFQ.4)

Uma amostra do Lote Final de Soro Anti·Rábico é submetida à prova indicada no item 3.46. O produtor

poderá utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

3.5.8. CONTROLE DE SULFATO DEAMONIO (PFQ.5)

Uma amostra do Lote Final de Soro Anti·Rábico é submetida à prova indicada no item 3.4.7. O produtor

poderá utilizar o resultado obtido nó Soro Produto Acabado a Granel.

3.5.9. CONTROLE DE CLORETO DE SÓDIO (PFQ.6)

Uma amostra do Lote Final de Soro Anti·Rábico é submetida à prova indicada no item 3.4.a. O produtor

poderá utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

3.5.10. CONTROLE DE NITROGt:NIO E PROTEfNAS (PFQ.2)

Uma amostra do Lote Final de Soro Anti·Rábico é submetida à prova Indicada no item 3.4.9. O produtor

poderá utilizar o resultado obtido no Soro Produto Acabado a Granel.

3.5.11. CONTROLE DE VOLUME MêDIO (PFQ.7)

Uma amostra do Lote Final de Soro Antl-Rábíco é submetida à determinação do volume médio, por medida

direta. O volume médio de cada apresentação é dada de acordo com a tabela Indicada no procedimento de

controle.

3.5.12.INSPEÇAoVISUAL (PFQ.8)

Todo o Lote Final de Soro Anti·Rábico deve ser inspecionado visualmente. O produto é uma solução

IImpida, incolor ou ligeiramente amarelada e não deve apresentar grumos ou parti cuias. .

3.5.13 PROVA DE IDENTIDADE (PB.4)

Uma amostra do Lote Final de Soro Anti·Rábico é submedida a Prova de Identidade em paralelo com a

Prova de Atividade indicada no item 3.3.1.

.4. ESTOCAGEM

O Lote Final de Soro Anti·Rábico deve ser mantido à temperatura de 4° C a aOc.

5. ROTULAGEM

Os rótulos do Lote Final de Soro Anti·Rábico, deverão estar de acordo com a Lei 6.360/76 Decreto

*79.094177.*

6. REGISTROS

Os dados dos processos de produção de cada Lote Final ou sub-lote do Soro ANTI·RÁBICO e os

resultados das provas de cçntrole devem ser registrados em protocolos e arquivados.

7. ARQUIVO DE AMOSTRAS

7.1. SORO PRODUTO ACABADO A GRANEL

Deve ser conservado na unidade produtora, 01 (uma) amostra do Soro Produto Acabado a Granel, 'a

temperatura de 4° C a aoc, devidamente identificada, até 12 mêse~lIJlÓ~ data de vencimento, do lote final.

7.2. LOTE FINAL

Amostras do Lote Final ou sue-tote de Soro ANTI-RÁBICO devem ser conservadas à temperatura de 4° C a aOC, no Controle de Qualidade Intemo durante, no mlnimo, 12 meses após a data de vencimento

a. EXPEDiÇÃO

A expedição do Lote Final ou Sub·lote de Soro ANTI·RÁBICO somente pode ser autorizada após liberação

pelo Controle da Qualidade Interno e aprovação pelo Controle da Qualidade Nacional.

9. PRAZO DE VALIDADE

O Prazo de Validade do Lote Final de Soro ANTI·RÁBICO é de 36 meses, a partir da data da última

determinação de potência realizada pelo produtor. .

PROCEDIMENTOS DE CONTROLE DE QUALIDADE

I- PROVAS BIOLÓGICAS

PROVAS GERAIS

1. PROVA DE PIROGt:NIO (PB.1)

O prova de pirogênio é um ensaio limite e baseia-se na estimativa da atividade pirogênica da amostra a

testar, ou seja, na elevação da temperatura de coelhos, quando inoculados por via Intravenosa com a referida

amostra.

1. MATERIAL

• Amostra a testar

• Coelhos adultos (peso mlnimo 1.500g)

• Seringa's apirogênlcas

• Agulhas apirogênlcas

• Erlenmeyers aplrogênicos

- Contedores para coelhos

• Banho-maria regulado a 37°C

• Forno para despirogenizar material

• Sistema de medição de temperatura, senslvel e aferido.

• Cuba para descarte de material

• Equipamento para contenção primário

A.1.2. PROCEDIMENTO

- Os animais serão avaliados até 4a horas antes do prova propriamente dito, simulandó as mesmas

condições do prova, excetoa injeção, tornando-se apenas a temperatura dos mesmos.

- Mantê·los em ambiente livre de ruldos a uma.temperatura de 20°C a 23°C

• Suspender a alimentação dos animais 12 horas antes do prova. A água pode ser fomeclda à vontade,

mas restrita durante o prova.

- Pesar os animais e cotoca-íos no contedor.

- Preparar as amostras 30 a 60 minutos antes de serem inoculadas.

• Determinar a temperatura controle de cada coelho, levando-se em conta a média de duas temperaturas

tomadás com intervalo de 30 minutos. Esta temperatura servirá de base para a determinação da elevação de

temperatura após a injeção do soro a ser testado.

- Usar somente animais que apresentem temperatura entre 38,9° C e 39,aoC.

-Injetar a amostra na veia marginal da orelha de cada um de 03 coelhos (1 mVkgde peso).

- Manter os animais em observação durante 3 horas, registrando as temperaturas a cada hora.

- Calcular a variação de temperatura de cada animal pela diferença entre a maior temperatura obtida após

a Injeção e a temperatura controle (inicial).

A.1.3. AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Para a amo~ra em prova ser considerada SATISFATÓRIA, deve cumprir as condições abaixo:

- Nenhum dos 3 animais deve apresentar aumento de temperatura igualou superior a 0,6° C.

• O somatório das variaçOesindividuais de temperaturas dos 3.animais não deve exceder a 1,4° C.

Se as condlçOes acima não forem satisfeitas, a prova deve ser repetída utilizando-se 5 coelhos.

Ap6so reprova, a amostra será considerada SATISFATÓRIA se:

• No máximo 3 dos 8 animais apresentarem variaçOes individuais de temperatura Igualou superior a 0,8° C.

• O somatório das variações de temperatura dos 8 coelhos não exceder a 3,7° C.

OBS.: Os animais utilizados no prova de pirogênio não devem ser reutilizados.

2. PROVA DE INOCUIDADE (TOXICIDÃDE INESPECIFICA) (PB.2)

Esta prova tem por objetivo comprovar a ausência de substâncias tóxicas.

2.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Seringas de 1 ml e 5 ml esterilizadas

- Agulhas de 13 x 4,5mm e 25 x 7mm esterilizadas

• Equipamento de contenção primária

• Camundongos albinos sulços de 17 a 22 g

• Cobaias de 250 a 350 9

• Caixa para camundongos

• Caixa para cobaias

• Corante para identificação dos animais

- Balança para pesagem de animais

• Cuba para descarte de material

- Tubo de ensaio esterilizado

- Estante para tubo de ensaio

• Equipamento de contenção primária

2.2. PROCEDIMENTO

- Pesar os animais e identificá·los com corante. --

\_ Inocular, Intraperitonealmente, 0,5 ml do produto em cada um dos 5 camundongOl Ilblnossulços.

• Inocular, intraperitonealmente, 1,0 ml do produto em cada uma das 2 coblils.

\_ Manter oe animais em observação por um perlodo mlnimo de 7 dias.

• Pesar individualmente os animais ao têrmino da prova e registrar os dados **em** protocolo.

2.3. INTERPRETAÇÃO DA PROVA A prova será considerada satisfatória se: Todos os animais sobreviverem ao perlodo mlnlmo de 7 dias.

- Nenhum animai apresentar qualquer alteração no seu estado de saúde.

- O peso de cada animal for superior a seu peso inicial.

PROVAS SOROS ANTIOFfDICOS

3.- DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL DE VENENO (DLi5Q)(PB.3)

A DLi5Qéa dose de veneno capaz de provocar a morte de 50% dos animais inoculados.

3;1. MATERIAL

- Veneno a ser titulado

-Tubos de ensaio esterilizados

o Solução fisiológica 0,85%, esterilizada

- Pipetas de 1,Omle 5,Oml esterilizadas e pr6-pipetas

- Agitador de tubos

- seringas de 1 miou 3 ml esterilizadas

o Agulhas 10 x 5 mm esterilizadas

- Caixas para camundongos

o Camundongos albinos sulços de 18 a 22g

o Cuba para descarte de material

• Corante para identificação dos animais

- Pipetas automáticas

- Equipamento para contençAo primária

3.2. PROCEDIMENTO

o Efetuar diluiçOes sucelllvas de veneno com solução fisiológica, utilizando um.fator de diluição constante,

nlo supener a 1,5, de maneira que o volume final seja Idêntico em todos os tubos.

o Igualar o volume com soluçA0 fisiológica.

- Homogeneizar a mistura.

- Inocular, por villnlrlperitoneal, um volume de 0,5 ml por camundongo de cada diluição em grupos de, no

mlnimo, 10 camundongos albinos sulços. A dislribulçAo dos animais nos grupos deve ser realizada por

procedimento 10 ICIIO, •• ndo os grupos·mantidos o mais uniforme posslvel.

- Obler'lar OI animais at6 048horas.

- Registrar os dados Im protocolo.

3.3. VALIDAçAO DO ENSAIO

A faixa da r,sposta (porcentagem de morte) deve estar compreendida entre 10 e 90%, formando a curva

de regrelllo que deve apresentar uma relação linear e ser estatisticamente validada.

Os limitei di confiança nlo devem ser amplos, Indicando melhor preclsão do ensaio quanto menores

forem os aeusllmU.s.

3.04.CALCULO DA DLIO

Calcular a Dlso por m6todo estatisticamente comprovado (probito, transformação angular, Logit ou

Spearrnan-Karber)

04.PROVA DE ATIVIDADE (POT~NCIA) (PB.oC)

A prova de atividade (potência) dos soros especlllcos (antlofldicos) baseia-se em uma reação de

soroneulrlllzlçAo *In v/tro,* cujo objetivo é a determlnaçào da dose neutralizante necessária (dose efetiva 50%)

para proteger os camundongos albinos sulços contra os efeitos letais de uma dose fixa de veneno

correspondente.

04.1.MATERIAL

- Amostra a testar

• Veneno especlllco de refeAlncla

-Tubos de ensaio esterilizados

- Pipetas de 1 mi a 5 ml esterilizadas e pró-pipetas

- seringas de 1 ml a 5 ml esterilizadas

o Agulhas 10 x 5 rnm esterilizadas

\_~nh **IrAn fi.lnlAnlMl n AI;o,c. oc.t6ril**

- Estufa. ou Banho-Maria a 37"C

- AgUador de tubos

- Caixas para camundongos

- Camundongos albinos suíços de 18 a 22g

- Cuba pllra descarte de material

- Corante para Identificação dos animais

o Pipeta automáti<'.a

o Equipamento para contenção primária

4.2. PROCEDiMENTO

4.2.1. DETERMINAÇÃO DA DEi5Q

o Efetuar diluiçOes sucessivas da amostra em prova com solução fisiológica utilizando um fator de diluição

constante, não superior a 1,5, de maneira que o volume final seja idêntico em todos os tubos.

- A cada tubo adicionar volume constante da solução de veneno referência, de modo que cada volume

inoculado por animal contenha 5 DLi5Q' • •

- Homogeneizar e incubar a mistura a 37" C, por 30 a 60 minutos.

o Inocular, por via intraperitoneill, um volume constante de 0,5 ml por camundongo de cada mistura, em

gijlpos de pelo menos 8 camundongos albinos suíços. •

- Observar os animais até 48 horas,

- Registrar os dados em protocolo.

04.2.2.VALIDAÇÃO DO ENSAIO

A faixa de resposta (porcen\agem de sobrevívêncle) deve estar compreendida entre 10 e 90%, formando a

curva de regressao que deve apresentar uma relação linear e ser estatisticamente validada.

Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor preclsão do ensaio quanto menores

forem os seus IimUes. . .

4.2.3. CALCULO DA DEso'

. Calcular a DEso por método estatisticamente comprovado (probito, transformação angular, Logit ou

Spearman-Karber).

4.2.4. CALCULO DA POTI:NCIA

Após a determinação, aplica-se a seguinte expressão para o cálculo da potência. Potência (mg/ml) =!! x C

*B*

onde:

A = Tv-1

Tv = número de Dlso utilizadas no prova por camundongo.

B = DE!oQdo soro

C = Dlso do veneno

Utiliza-se (Tv -1) porque ao final de cada dose por camundongo da mistura sorolveneno, há uma (1) Dlso de

veneno remanescente, não neutralizada pelo soro e esta é a responsável pelas mortes de 50% dos camundongos

albinos suiços. .

A ~uanlidade de veneno neutralizada pelo soro é 1 DLi5Qa menos do total contido em cada dose diluiçao por

animal,

Como a potência do soro é definida em termos do número de DLi5Qdo veneno que são neutralizados em vez do

número de Dlso em cada dose animal usa-se a expressão Tv-1. '

Titulo da potência é expresso em miligramas de veneno neutralizada por 1ml da amostra prova.

5.- PROVA DE IDENTIDADE */n vliro* (PB.5)

A prova de identidade fundamenta-se na reação antlgenél-anticorpo, no suporte de gel de ágar com

formação de linhas de precipitaçao.· '

5.1. MÉTODO

O método·utilizado é o de Ouchterfony.

5.2. MATERIAL

- Amostra a testar

o Veneno de Referência

- Lâmina para microscópio

-Agar noble

- SOlUÇa0fisiológica tamponada 0,85% esterilizada

- Capilar de vidro

• Geladeira

- Perfurador

• Pipetas estéreis

- Estufa a 37"C

o Cuba para descarte de material

- Equipamento para contenção primária

5.3. PROCEDiMENTO

• Preparar um gel de ágar a 1% em solução fisiológica tamponada. Espalhar o gel de ágar na lamina com a

finalidade de montar uma fina camada, levar é estufa a 37" C sem secar. Adicionar um volume de 4;0 mI de 6gar

na lãmlna e colocar na geladeira em câmara úmida por uma hora.

- Fazer oriflcios no gel, com auxilio de um perfurador, mantendo uma mesma distancia entre o orifIclo

central e os periféricos. -

- Preencher o oriflcio central com solução de veneno e os periféricos com a amostra a testar em diluições

variáveis. Preencher um dos oriflcios com soro normal de cavalo.

- Levar fi estufa a 37" C por 24 horas em càrnara úmida.

- Realizar a leitura em lâmpada para contraste.

5.4. RESULTADO

Observar a presença de linha de preclpltação, reação de Identidade entre os componentes analisados

identidade parcial ou não identidade. '

PROVAS SOROS ANTITÓXICOS

6.- DETERMINAÇÃO DA POTI:NCIA DAS TOXINAS BACTERIANAS (PB.6)

6.1. DETERMINAÇÃO DO LIMITE MÇ)RTE DA TOXINA TETÃNICA (L+/10)

A ~ose L+/10 é dada pela menor quantidade de toxina que, quando misturada a 0,1 UI de Anlitoxina de

ReferênCia e Inoculada em animais, provoca a morte de 100% destes em até 96 horas.

6.1.1. MATERIAL

- Toxina a ser titulada

- Anliloxina de Referência (UI/ml)

-Tubos de ensaio esterilizados

- Solução fisiológica 0.85% esterilizada

- SOlUça0fisiológica tampo nada peptonada 1% esterilizada

- Pi~etas de 1 ml,2 ml, 5 ml e 10,[111esterilizadas e pró pipetas

- Agitador de tubos

- Seringas 1 ml esterilizadas

- Agulhas 13 x 4,5 mm esterilizadas

- Caixas para camundongos

- Camundongos albinos suiços de 17 a 22g

- Cuba para descarte de material

~ Corante para identificação dos animais

- Pipetas automáticas

- Estufa a 37" C

- Equipamento de contenção primária

6.1.2. PROCEDIMENTO

- Diluir a Antitoxina de Referência com SOlUÇa0fisiológica a 1 UI/ml.

-Dllulr a toxina em SOlUça0fisiológica peptonada 1%, a uma concentração conhecida.

- Em uma série de tubos adicionar volumes variáveis de toxina dilufda.

o Adicionar um volume constante da Antitoxlna de Referência dilulda.

- Igualar o volume com SOlUça0fisiológica peplonada 1%.

- Homogeneizar e Incubar a 37° C por 45 minutos.

- Inocular cada camundongo, por via subcutânea, com volume que contenha 0,1 UI de Antitoxina de

Referência em grupos de, no mlnimo, 10 camundongos albinos suiços. A distribuiç40 dos animais nos grupos

deve ser realizada por procedimento ao acaso, 'sendo os grupos mantidos o mais uniforme possível,

- Observar os animais até 96 horas.

- Registrar os dados em protocolo.

6.1.3. INTERPRETAÇÃO DA PROVA

Limite Morte (L+/10) será a menor quantidade de toxina que, quando combinada com 0,1 UI de Antitoxina

de Referência, provoca a morte dos animais em 96 horas 6.2.-DETERMINAÇÃO DO LIMITE MORTE DA TOXINA DIFTÉRICA (L+)

A dose L+' é a menor quantidade de toxina que, quando misturada a 1UI de Antitoxina de Referência e

inoculada em animais, provoca a morte de 100% destes em 96 horas.

6.2.1. MATERIAL

- Toxina a ser titulada

- Antiloxina de Referência (UI/ml)

**\_TllhnC tio** ~nc:::ain **oc.torili'7:1nnc:**

- Solução fisiológica 0,85% esterilizada

- Solução fisiológica tamponada peptonada 1% esterilizada

- Pipetas de 1 101,2 rnl, 5 ml e 10101esterilizadas e pró-pipetas

- Agitador de tubos

- seringas de 3 ml esterilizadas

- Agulhas 25 x 7 mm esterilizadas

- Caixas para cobaias

- Cobaias de 230 a 250g

- Cuba para descarte de material

- Corante para Identificação dos animais

- Pipetas automáticas

- Estufa a 37" C

- Equipamento de contenção primária

6.2.2. PROCEDIMENTO

- Diluir a Antitoxina de Referência com solução fisiológica a 10 UI/m!.

- Diluir a toxina em solução fisiológica a uma concentração conhecida.

- Em uma série de tubos adicionar volumes variáveis de toxina dilulda.

- Adicionar um volume constante da Antitoxina de Referência dilulda.

-Igualar o volume com solução fisiológica peptonada 1%.

- Homogeneizar e Incubar a 37° C por 45 minutos. . . .

-Inocular cada cobaia, por via subcutânea, com um volume que contenha 1 UI de Antltoxína de ReferênCia

em gnupos de, no mlnimo, 4 cobaias. A distribuição dos animais deve ser realizada por procedimento ao acaso,

*sendo* osgnupos mantidos o mais uniforme posslvel.

- Observar os animais até 96 horas.

- Registrar os dados em protocolo.

6.2.3.1NTERPRETAÇÃO DA PROVA

O limite Morte (L+) será a menor quantidade *de* toxina que, quando combinada com 1 UI de Antitoxina de

Referência, provoca a morte dos animais em 96 horas.

6.3. DETERMINAÇÃO DO LIMITE MORTE DA TOXINA BOTULlNICA TIPO A (L+/10)

A dose L+/10 é data pela menor quantidade de toxina que, quando misturada a 0,1 UI de Antltoxinade

Referência e inoculada em animais, provoca a morte de 100% destes em 96 horas,

6.3.1. MATERIAL

- Toxina a ser titulada

- Antitoxina Botulinica Tipo A de Referência (UI/ml)

- Tubos de ensaios esterilizados

- Solução fisiológica tamponada pH 7,2 esterilizada

- Solução fisiológica tamponada pH 7,2 glicerinada 1%, esterilizada

- Pipetas de 1101,2ml, 5 ml e 10 101esterilizadas e pro-pipetas

- Agitador de tubos

- Seringas 1 ml esterilizadas

- Agulhas 13 x 4,5 mm esterilizadas

- Caixas para camundongos

- Camundongos albinos suiços de 18 a *22g*

- Cuba para descarte de material

- Corante para identificação dos animais

- Pipetas automáticas

- Estufa a 37" C

- Balança para pesagem de animais

- Equipamento de contençM primária

6.3.2. PROCEDIMENTO

**.• nilllh"::I Antittwin:ll Rntlll1nif'::a Tinn A nA RAfa.re.n,.i::l t"'nm c:nh 1t""5n ficinIAnil":a ::lin 1 111**

- Diluir a toxina em solução fisiológica tamponada glicerinada 1%, a uma concentração conhecida.

- Em uma série de tubos adicionar volumes variáveis de toxina dilulda.

- Adicionar um volume constante da Antitoxina de Referência dilufda.

-Igualar o volume com solução fisiológica tamponada glicerinada 1%.

- Homogeneizar e incubar a 37° C por 60 minutos.

- Inocular cada camundongo , por via subcutânea, com volume que contenha 0,1 UI de Antitoxlna de

Referência em gnupos de, no mlnimo, 10 camundongos albinos suiços. A distribuição dos animais deve ser

realizada por procedimento ao acaso, sendo os gnupos mantidos o mais uniforme possível.

- Observar os animais até 96 horas.

- Registrar os dados em protocolo.

6.3.3.1NTERPRETAÇÃO DA PROVA

O Limite Morte (L+/10) será a menor quantidade *de* toxina que, quando combinada com 0,1 UI de

Antitoxina de Referência, provoca a morte de 100% dos animais em 96 horas.

6.4. DETERMINAÇAo DO LIMITE MORTE DA TOXINA BOTULlNICA TIPO'B (L+/10)

A dose L+/10 é data pela menor quantidade de toxina que, quando misturada a 0,1 UI de Antitoxina de

Referência e inoculada em animais, provoca a morte de 100% destes em 96 horas.

6.4.1. MATERIAL

- Toxina a ser titulada

- Antitoxina Botul/nica Tipo B de Referência (UI/ml)

- Tubos de ensaios esterilizados

- Solução fisiológica tampoÍlada pH 7,2 esterilizada

- Solução fisiológica tamponada pH 7,2 glicerinada 1'lo, esterilizada

- Pipetas de 1 101,2 ml , 5 ml e 10 101esterilizadas e pro-pipetas

- Agitador de tubos

• Seringas 1 ml esterilizadas

- Agulhas 13 x 4,5 mm esterilizadas

- Caixas para camundongos

- Camundongos albinos suiços de 18 a *22g*

- Cuba para descarte de material

• Corante para identificação dos anlmals

- Pipetas automáticas

- Estufa a 37° C

- Equipamento de contenção primária

6.4.2. PROCEDIMENTO

- Diluir a Antitoxina Botul/nica Tipo B de Referência com solução fisiológica' tamponada a 0,1 UI.

• Diluir a toxina em solução fisiológica tamponada glicerinada 1'lo, a uma concentração conhecida.

·Em uma série de tubos adicionar volumes variáveis de toxina dilulda.

- Adicionar um volume constante da Antitoxina de Referência dilulda.

• Igualar o volume com solução fisiológica tamponada glicerinada 1%.

• Homogeneizar e incubar a 37° C por 60 minutos.

- Inocular cada camundongo , por via subcutânea, com volume que contenha 0.1 UI de Antitoxina de

Referência em grupos de, no mlnlmo, 10 camundongos albinos suiços. A distribuição dos animais deve ser

realizada por procedimento ao acaso, sendo os grupos mantidos o mais uniforme possível,

- Observar os animais até 96 horas.

- Registrar os dados em protocolo.

6.4.3.INTERPRETAÇAo DA PROVA

O Limite Morte (L+/10) será a menor quantidade de toxina que, quando combinada com 0,1 UI de

Antitoxina de Referência, provoca a morte de 100% dos animais em 96 horas.

6.5. DETERMINAÇÃO DO LIMITE MORTE DATOXINA BOTULlNICA TIPO E (L+/10)

A dose L+/10 é data pela menor quantidade de toxina que, quando misturada a 0,1 UI de-Antitoxina de

Referência e inoculada em animais, provoca a morte de 100% destes em 96 horas.

6.5.1. MATERIAL

- Toxina a ser titulada

- Antitoxina Botul/nica Tipo E de Referência (UI/ml)

- Tubos de ensaios esterilizados

- Solução fisiológica tampo *nada* esterilizada

• SOlUÇa0fisiológica tamponada glicerinada 1%,esterilizada

• Pipetas de 1 ml, 2 101,5 ml e 10 ml esterilizadas e pro-pipetas

• Agitador de tubos

- Seringas 1 101esterilizadas

- Agulhas 13 x 4,5 mIOesterilizadas

- Caixas para camundongos

- Camundongos albinos suíços de 18 a 22g

- Cuba para descarte de material

- Corante para Identificação dos animais

• Pipetas automáticas

- Estufa a 37° C

- Balança para pesagem de animais

- Equipamento de contenção primária

6.5.2. PROCEDIMENTO

- Diluir a Antitoxina Botul/nica Tipo E de Referência com solução fisiológica tamponada de modo que o

volume a ser inoculado por animal contenha 0,1 UI. .

- Diluir a toxina em solução fisiológica tamponada glicerinada 1%, a uma êoncentração conhecida,

- Em uma série de tubos adicionar volumes variaveis de Toxina dilurda.

- Adicionar um volume constante da Antitoxina de Referência dilulda.

- Igualar o volume com solução fisiológica tamponada glicerinada 1%.

- Homogeneizar e Incubar a 37° C por 60 minutos.

- Inocular cada camundongo , por via subcutânea, com volume que contenha 0,1 UI de Antitoxlna de

Referência em gnupos de, no mlnimo, 10 camundongos albinos suiços. A distribuição dos animais deve ser

realizada por procedimento ao acaso, sendo os gnupos mantidos o mais uniforme possível.

- Observar os animais até 96 horas.

- Registrar os dados em protocolo.

6.5.3.INTERPRETAÇAo DA PROVA

O Limite Morte (L+/10) será a menor quantidade de toxina que, quando combinada com 0;1 UI de

Antitoxina de Referência, provoca a morte de 100% dos animais em 96 horas.

7. PROVA DE ATIVIDADE (POTtNCIA) (P8.7)

A prova de atividade (potência) dos soros antitóxicos baseia-se em uma reação de soroneutrallzação,

cujo objetivo é a determinação da dose neutralizante necessária para proteger. os animais utilizados na prova

contra os efeitos letais de uma dose prova da toxina de refência correspondente.

7.1. SORO ANTITETÂNICO

7.1.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Toxina Tetânica de Referência

- Antitoxina Tetânica de Referência

- Tubos de 'ensaio esterilizados -

- Pipetas de 1 101a 5 ml esterilizadas e pró-pipetas

- Seringas de 1 ml esterilizadas

- Agulhas 13 x 4,5 mIOesterilizadas

\_ ~nh **1,..5" fic:inlnnil"':;a tamMnn::ui:t m:t.nfnn:u;=:a *1°t.***

- Solução fisiológica 0,85% esterilizada

- Estufa a 37°C

- Agitador de tubos

- Caixas para camundongos

\_Camundongos albinos suiços *de* 17 a 22g

- Cuba para descarte de material

• Corante para identificação dos animais

- Pipetas automáticas

- Equipamento de contenção primária

7.1.2. PROCEDIMENTO

\_ Diluir a Toxina Tetanica *de* Referência com solução fisiológica tamponada peptonada 1% a uma

concentração de 1L+.

\_Em uma série de tubos adicionar volumes variáveis da amostra a testar .

\_Adicionar 1 ml da Toxina tetânica de referência dilulda.

\_ Igualar o volume para 2,0 ml com solução fisiológica tamponada peptonada.

\_ Homogeneizar e incubar a mistura a 37°C por 45 minutos.

\_ Inocular, por via subcutânea, cada camundongo com um volume de 0,2 ml de cada mistura, em grupos de 10 camundongos albinos sulços,

- Observar os animais até 96 horas.

- Registrar os dados em protocolo.

- Nas mesmas condições descritas e paralelamente, realizar o prova com a Antitoxina Tetanica de

Referência, com o objetivo de se verificar a validade da prova e estabelecer correlação no cálculo do titulo.

7.1.3. CÁLCULO DA POT~NCIA

Determinar a Potência do soro em prova, considerando a menor dllulção que determine a morte dos

animais durante o perlodo de observação.

Potência (UI/ml) = ~ x C *· B*

onde:

A = O inverso da diluiçao do soro em prova

B = Volume de sono diluldo

C = Doses posslveis de injetar por mistura

7.2. SORO ANTI DI FTtRICO

'1

7.2.1. MATERIAL

- Amostl'l a te.tar

- Toxina DIMrlca de Refertnclá

- Antiloxina Dlft6rlca de Refertncla

- Tubos de ensaio •• tarliizadol

- Pipetaa de 1 mI • 5 mI ntarilizadas e pr6-pipetas

- seringu de 5 ml •• tarllizadas

- Agulhas 25 x 7 mm uterilizadas

- SoIuç1o IIslo16glca esterilizadss

• Estufa e 37'C

- Agitador d. tubos

• Caixas pal'l cobaias

- Cobllas de 230 • 250 g

• Cubl pal'l ducarte de material

o Corante para Identltlcaçlo dos animais

o Plpatas autorMtlcas

- Equipamento de contençAo prirn4lria

7.2.2.- PROCEDIMENTO

• Diluir a Toxina Dlll6rica de Referência com SOlUça0 fisiológica tamponada peptonada 1% a uma

concentraçlode 10L+.

o Em uma MrIe de tubos, adicionar volumes varlévels da amostra a testar.

o Adicionar 1 ml da Toxina DllIérlca de refertncla dlluida.

-Igualar li volume para 10,0 ml com SOlUça0fisiológica.

• Homogeneizar e incubar a mistura a 37"c por "5 minutos.

- Inocular cada cobaia, por via sUbculênea, com um volume de 2,0 ml de cada mistura, em grupos de 4

cobaias. .

- Observar os animais até 96 horas.

• Registrar os dados em protocolo.

• Nas mesmas condições descritas e paralelamentl!. realizar o prova com a Antitoxina Diflérica de

Refér6ncia, com o objetivo de se verificar a validade da prova e estabelecer corretação no cálculo do titulo.

1.2 •.3. CÁLCULO DA PO~NCIA

Determinar a Pot6ncla do soro em prova, considerando a menor dilulção que determine a morte dos

animais durante o periodode observaç<'lo.

Potência (U*.*I/ml) = ~*B* x C

onde: .

A = O inverso da diluiçao do soro em prova

B = Volume de sono dliuido

C = Doses posslveis de Injetar por mistura

7.3. SORO ANTIBOTULlNICO TIPO A

7.3.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Toxina Bo.lulinica Tipo A de Referência

- Antitoxina Toxina Botullnica TIpo A de Referência

- Tubos de ensaio esterilizados

- Pipetas de 1 ml , 2 ml , 5 ml e 10 ml esterilizadas

- Seringas de 1 ml esterilizadas .

- Agulhas 13 x 4,5 mm esterilizadas

-SOlUÇa0 fislolOgica tamponada glicerinada esterilizada

.- Estufa a 37·C

- Agitador de tubos

- Caixas para camundongos

- Camundongos albinos sulços de 18 a 22g

- Cuba para descarte de material

- Corante para Identificação dos animais

- Balança para pesagem de animais •

- Equipamento de contenção primária

7.3.2. PROCEDIMENTO

- Diluir a Toxina Botullnica de Referência com solução fisiológica tamponada glicerinada a uma

concentração de 1L+.

- Em uma série de tubos diluir e adicionar um volume constante de toxina Botullnica tipo A dilulda.

- Adicionar nos tubos volumes variáveis da amostra a testar,

- Igualar o volume para 5,0 ml com SOlUça0fislolOgica tamponada glicerinada.

- Homogeneizar e incubar a mistura a 37"C por 60 minutos.

-Inocular, por via subcutânea, cada camundongo com um volume de 0,5 ml de cada mistura, em grupos de

10 camundongos albinos suiços.

- Observar os animais até 96 horas.

- Registrar os dados em protocolo.

\_ Nas mesmas condições descritas e paralelamente, realizar o prova com a Antitoxina Botullnica Tipo A de

Referência, com o objetivo de se verificar a validade da prova e estabelecer correlação no cálculo do titulo.

7.3.3. CÁLCULO DA POT~NCIA Determinar a Potência do soro em prova, considerando a menor diluiçao que determine a morte dos

animais durante o perlodo de observação.

Potência (UI/ml) = ~ x C

*B*

onde:

A = O inverso da dllulção do soro em prova

B = Volume de soro diluldo

C = Doses possivels de injetar por mistura

7.4. SORO ANTIBOTULINICO TIPO B

7.4.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Toxina Botullnica TIpo B de Referência

- Antitoxina Toxina Botullnlca Tipo B de Referência

- Tubos de ensaio esterilizados .

- Pipetas de 1 ml , 2 ml , 5 ml e 10 ml esterilizadas

- Seringas de 1 ml esterilizadas

- Agulhas 13 x 4,5 mm esterilizadas

- SolUça0 fisiolOgica tamponada glicerinada esterilizada

- Estufa a 37"C

- Agitador de tubos

- Caixas para camundongos

• Camundongos albinos suiços de 18 a 229

- Cuba para descarte de material

- Corante para identificação dos animais

- Balança para pesagem de animais

- Equipamento de contenção primária

7.4.2. PROCEDIMENTO

- Diluir a Toxina Botullnica de Referência com solução fisiolOgica tamponada glicerinada a uma

concentração de 1L+.

- Em uma série de tubos diluir e adicionar um volume constante de toxina Botullnica tipo B diluida.

~Adicionar nos tubos volumes variáveis da amostra a testar.

- Igualar o volume para 5,0 ml com solução fisiológica tamponada glicerinada.

- Homogeneizar e Incubar a mistura a 37·C por 60 minutos.

- Inocular, por via subcutânea, cada camundongo com um volume de 0,5 ml de cada mistura, em grupos de

10 camundongos albinos suiços. .

- Observar os animais até 96 horas.

- Registrar os dados em protocolo. .

- Nas mesmas condições descritas e paralelamente, realizar o prova com a Anlitoxina Botullnica Tipo B de

Referência, com o objetivo de se verificar a validade da prova e estabelecer correlação' no cálculo do titulo.

7.4.3. CÁLCULO DA POT~NCIA

Determinar a Potência do soro em prova. considerando a menor diluição que determine a moi1e dos

animais durante o perlodo de observação,

Potência (UI/ml) = ~ x C

*B*

onde:

A = O inverso da diluição do soro em prova

B = Volume de soro diluldo

C = Doses posslvels de injetar por mistura

7.5. SORO ANTIBOTULlNICO TIPO E

7.5.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Toxina Botullnica TIpo E de Referência

- Antitoxina Toxina Botullnica Tipo E de Referência

- Tubos de ensaio esterilizados

- Pipetas de 1 ml , 2 ml , 5 ml e 10 ml esterilizadas e 'pró-pipetas

- Seringas de 1 ml esterilizadas

- Agulhas 13 x 4,5 mm esterilizadas

- Soluçljo fisiológica tamponada glicerinada esterilizada

- Estufa a 37°C

- Agitador de tubos

- Caixas para camundongos

- Camundongos albinos suiços de 16 a 18 g

- Cuba para descarte de material

- Corante para identificação dos animais

- Balança para pesagem de animais

- Equipamento de contenção primária

7.5.2. PROCEDIMENTO

- Diluir a Toxina Botullnlca de Referência com solução fisiolOgica tamponada glicerinada a uma

ccncentraçào de lL+.

- Em uma série de tubos diluir e adicionar um volume constante de toxina Botullnlca tipo E dllulda.

- Adicionar nos tubos volumes variáveis da amostra a testar.

• Igualar o volume para 5,0 ml com SOlUÇa0fisiológica tamponada glicerinada.

- Homogeneizar e incubar a mistura a 37°C por 60 minutos.

- Inocular, por via subcutânea, cada Catnüiíâórigo com um volume de 0,5 ml de cada mistura, em grupos de

10 camundongos albinos suíços.

- Observar os animais até 96 horas.

- Registrar os dados em protocolo.

- Nas mesmas condições descritas e paralelamente, realizar o prova com a Antitoxina Botullnica Tipo E de

Referência, com o objetivo de se verificar a validade da prova e estabelecer correlação no cálculo do titulo.

7.5.3. CÁLCULO DA POT~NCIA

Determinar a Potência do soro em prova, considerando a menor diluiçao que determine a morte dos

animais durante o período de observação.

Potência (UI/ml) = ~ x C

*B*

onde:

A = O inverso da dilulção do soro em prova

B = Volume de soro diluldo c = Doses posslvels de injetar por mistura X TItulo L+/10

8.· PROVA DE iDENTIDADE *In vltro* (PB.8

A prova de identidade fundamenta-se na reação antlgeno-anticorpo, no suporte de gel de ágar, com

formação de Iin~as de precipitação.

8.1. MÉTODO

O método utilizado é o de Ouchterlony.

8.2. MATERiAL

f

~

~I

II

I

- Amostra a testar

- Toxinas de Referência

- Lãmina pa~amicrosc6pio

-Agarnoblê

- Solução fisiol6glca tamponada 0,85% esterilizada

- Capilar de vidro

-Geladeira

- Perfurador

- Pipetas estéreis

- Estufa a 37"c

- Cuba para descarte de material

- Equipamento para contenção primária

8.3. PROCEDIMENTO

- Preparar um gel de ágar a 1% em solução fisiol6gica tamponada. l:spalhar o gel de ágar na lãmína com a

finalidade de montar uma fina camada, levar à estufa a 370 C sem secar. Adicionar um volume de 4,0 ml de ágar

na lãmina e colocar na geladeira' em câmara úmida por uma hora.

- Fazer 'oriflcios no gel, com auxilio' de um perfurador, mantendo uma mesma distancia entre o oriflcio

central e os periféricos.

,,\_, - Preencher o oriflcio central com solução de Toxina de Referencia Padrão, e os periféricos· com a amostra

a testar em diluiçOes variáveis. Preencher um dos oriflcios com soro normal de cavalo.

• Levar à estufa a 370 C por 24horas em càmara úmida.

-Realizar a leitura em íãrnpada para contraste.

8.4. RESULTADO

Observar a presença de linha de precipitação, reação de identidade' entre os componentes analisados,

identidade parcial ou não identidade.

-.

PROVAS SOROS ANTI-RÁBICO

9. DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL dE VIRUS RÁBiCO (DL5Q)(PB.9)

A DL5Qéa diluição de vlrus que mata 50% dos animais inoculados com 0,03 ml, por via intracerebral.

9.1. MATERIAL

- Vrrusa ser titulado

-Tubos de ensaio esterilizados

- Água destilada esterilizada

- Soro de origem animal esterilizado

• Pipetas de 1,Omle 10,Oml esterilizadas

• Agitador de tubos

- seringas de 1,0 miou 0,25 ml esterilizadas

- Agulhas descartáveis de 13 x 4,5 mm

• Caixas para camundongos

", Camundongos Albino Suiçode 11 a 14 g

.·Cubapara descarte de material'

- Corante para identificação dos animais

- Banho de água com gelo

• Equipamentó para contenção primária

*c,*

9.2. PROCEDIMENTO

- Efetuar diluiçOes sucessivas de vírus em água destilada contendo 2% de soro de origem animal,

utilizando um fator de diluição 10. O procedimento deve ser realizado em banho de água com gelo. .

- Homogeneizar a mistura. •

- Inocular, por via iritracerebral, em grupo não menor que 10 camundongos, cada diluiçáo. O volume do

inóculo é de 0,03 mil animal. A distribuição dos animais nos grupos deve ser realizada por procedimento ao

acaso, sendo os grupos mantidos o mais uniformemente posslvel.

• Observar os animais.durante 14 dias.

- Registrar os dados em protocolo.

,

9.3.-VALlDAÇÃO DA PROVA

Para que o ensaio seja considerado valido é necessário que:

- A percentagem de morte dos animais deve ser decrescente frente as diluiçOes crescentes.

-A diluiÇáo com maior concentração de vírus deve matar mais que 90% dos animais inoculados, e a

diluição de menor concentração viral deve matar menos que 10% dos animais, formando portanto, a curva de

regressáo que deve apresentar uma relação linear e ser estatisticamente validada. .

-Os limites de confiança não devem ser amplos, indicando melhor precisão do ensaio quanto menores

forem os seus limites.

9.4. CÁLCULO DA DL5Q

Calcular a DLsopor método estatisticamente comprovado (probit-Bllss, Logit ou Spearman-Karber).

10.-. PROVA DE ATIViDADE (POT~NCIA) (PB10)

A prova de atividade do soro ANTI-RÁBICO. baseia-se em uma reação de soro neutralização, cujo objetivo é

a determinação da dose neutralizante necessária (dose efetiva 50%) para proteger os camundongos contra os

efeitos letais de uma dose desafio de vírus rábico CVS (dose desafio). É utilizado um Soro de Referência

Nacional para avallaçAo comparativa da potência do soro em prova.

10.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Soro de Referência Nacional, de titulo conhecido (Ul/ml)

- Vrrus CVS trabalho de titulo conhecido, mantido no máximo a - 700 C

- Tubos de ensaio 13 x 100 mm esterilizados

- Pipetas de 1 ml, 5 ml e 10 ml esterilizadas - Seringas de 1 miou 0,25 ml esterilizadas

- Agulhas descartáveis de 13x 4,5 mm

-Diluente para virus, esterilizado:(Agua destilada contendo 2% de soro de origem animai)

- Banho-maria a 37°C

- Agitador de tubos

- Caixas para camundongos

- Camundongos' suiço-alblnos de 11 a 14g

- Cuba para descarte de material

• Pipetador automático

• Equipamento de contenção primária

10.2.- PROCEDIMENTO

10.2.1. DETERMINAÇÃO DA DOSE EFETIVA 50% (DE5Q)

Diluição de soro que protege 50% dos animais inoculados com 0,03 ml de vlrus trabalho desafio por via

intracerebral.

10.2.1.1. DILUIÇAo DOS SOROS EM PROVA E REFERÉNCIA

- Preparar um banho de *tgua* com gelo, no qual devem ser realizados todos os procedimentos.

- Em 2 séries de tubos, previamente identificados, efetuar diluiç08s seriadas dos soros em prova e de

referência, utilizando um fator de diluição não superior a 2, até que seja atingida a diluição na qual, supostamente,

não haja neutralização.

- Transferir para tubos igualmente identificados, 0,3 ml de cada uma das 4 últimas diluiçOes realizadas para

os soros em prova e de referência.

• Preparar uma diluição de vlrus trabalho desafio que contenha entre 150 e 300 DL5Qiniciais por 0,03 ml via

intracerebral em camundongos. O volume desta diluição deve ser suficiente para a distribuição de 0,3 ml em cada

um dos 8 tubos acima citados.

• Adicionar 0,3 ml da diluiÇáo de desafio em cada um dos 8 tubos contendo 0,3 ml das 4 últimas diluiçOes

seriadas realizadas para os soros prova ede referência.

- Homogeneizar as misturas, obtendo diluiçOes dobradas dos soros.

- Preparar 4 diluiçOes decJmais seriadas do vírus trabalho, a partir da diluição adicionada aos soros.

Adicionar a 0,3 ml de cada uma destas diluições seriadas, 0,3 ml diluente gelado para vírus,

- Homogeneizar, obtendo diluiçOes dobradas do vírus trabalho.

- Incubar as misturas "soro + vlrus" e "vlrus + diluente" em banho-maria a 370 C, por 90 minutos,

verificando-se a temperatura ao InIcio e término do período de incubação.

- Ap6s a incubação, retornar com os tubos para o.banho de água com gelo.

- inocular em cada camundongo, por via intracerebral, um volume de 0,03 ml de cada mistura em grupos

de pelo menos 10 camundongos.

- Observar os animais por 14 dias e registrar os dados em protocolo.

10.2.2. CÁLCULO DA DE5QDOS SOROS EM PROVA E DE REFERÉNCIA

Os valores obtidos para DE5Q dos soros em prova e de referência são calculados por método

estatisticamente comprovado (Prollit-Bliss, Logit ou Spearman-Karber).

10.2.3. CÁLCULO DA pOTêNCIA

Ap6s a determinação das DEIO dos soros em prova e de referência. aplica·.e I .eguinte .xpr."Jo plfll o

cálculo da potência:

Potência (UI/ml) =!! x C

*B*

onde:

A = O inverso da DE5Qdo soro em prova'

B = O Inverso da DE5Qdo soro de referência

C = Ul/ml do soro de referência

10.2.4. CÁLCULO DA DL5QDO V[RUS DESAFIO

O valor referente ao titulo do vfrus trabalho empregado no prova (DLIO ) é calculado por' método

estatisticamente comprovado (Probit-Bliss, Logit ou Spearman-Karber).

DL5Qreal de desafio =Antilogaritmo (diluição DL5Qcalculada - Diluição utilizada como desafio)

10.2.5. VALIDAÇÃO DO ENSAIO

Para que o ensaio seja considerado válido é necessario que:

- A menor diluição do soro proteja pelo menos 90% dos animais inocul~dos e a menor dilulçao proteja

menos que 10% dos animais, formando portanto, a curva de regressão que deve apresentar uma relação linear e

ser estatisticamente validada.

- Os limites de confiança não devem ser amplos, Indicando melhor precisão do ensaio quanto menores

forem os seus limites.

11.- PROVAS MICROBIOLÓGICAS

1. ESTERILIDADE BACTERIANA E FÚNGICA (PM.1)

Esta prova tem por objetivo detectar a presença de bac1érias e fungos contaminantes nos produtos

testados.

1.1. MEIOS DE CULTURA

Os Meios de Cultura utilizados' são: Caldo TIoglicolato de Sódio e Caldo Caselna Soja, distribuldos em

tubos de ensaio.

1.1.1. CONTROLE DE ESTERILIDADE DOS MErOS DE CULTURA

Os Melas de Cultura devem ser Incubados à temperaturl di 30a 350 C por 48 h. Selecionar os tubos que

não apresentam crescimento bacteriano e armezená-Ios à temperatura ambiente.

1.1.2. CONTROLE DA FERTILIDADE DOS MEIOS DE CULTURA

1.1.2.1. CALDO TiOGLlCOLATO DE SÓDIO

1.1.2.1.1. UTILIZAÇÃO DE *CLOSTRIDIUM SPOROGéNéSATCC* 3584 (INCQS00004)

- De uma cultura de *Closlridlum sporogenes* de 24 h em Caldo BHI (Braln H.arth Inru.lon), incubada a 300

C, é feita uma suspensão em Caldo BHI calibrada espectrofotometricamentt .m 7lil% d. tran.mlttnclt a um

comprimento de onda de 480nm. - Da suspensão calibrada, fazer diluições seriadas com fator 10, de 10" a 10~ em CaldG BHI.

- Semear 1,0 ml da diluiçao 10~ em tubos com 100 ml de Caldo Tioglicolato de Sódio e incubar á

temperatura de 30 a 35° C por 48 h.

o Semear O,1mlda diluiçao 10~ em placas de Petri com agar BHI.

o Incubar em anaerobiose a 30-35° C por 48 h.

- Após o perlodo de incubação, proceder a contagem de colOnias formadas.

- O número de Unidades Formadoras de ColOnlaspor mililitro (UFC/ml), deve estar entre 30 e 300.

- O Caldo Tioglicolato de Sódio será considerado fértil para o referido mIcrorganismo se, após o período de

íncubação, apresentar crescimento caracterfstico confirmado por exame microscópico.

1.1.2.1.2. UTILIZAÇÃO DO *M/CROCOCCUS LUTEUS* ATCC 9341 (INCQS 00010)

o De uma cultura de *Micrococcus* luteus de 24h em Caldo Nutriente, incubada a 30°C, é feita uma

suspensão em Caldo Nutriente, aju~tada ao tubo nQ 1da Escala MacFarland (3x10' cels/ml).

o Diluir a suspensão ajustada em Caldo Nutriente, na proporção 1:2.

- Da suspensão anterior fazer dilui~oes seriadas, com fator 10, de 10" a 10-6em Caldo Nutriente.

- Semear 1,0 ml da dllulçãc 10 em tubos com 100ml de Caldo Tioglicolato de Sódio e incubar á

temperatura de 30 a 35°C por 48 h. .

- Semear 0,1ml da diluiçao 1O~em placas de Petri com Agar Nutriente e incubar a 30.35° C por 48 h.

-Após o perlodo de lncubação, proceder a contagem de colOnias formadas.

- O número de Unidades Formadoras de ColOnias por mililitro (UFC/ml), deve estar entre 30 e 300.

- O Caldo Tioglícolato de Sódio é considerado fértil para o referido microrganismo se, após o perlodo de

incubaçao, apresentar crescimento caracterlstico confirmado por exame microscópico.

1.1.2.2. CALDO c~sEfNA SOJA

1.1.2.2.1. UTILIZAÇÃO DE *CANO/DA ALB/CANS* ATCC 10231 (INCQS 40006)

o De uma cultura de *Candida a/bicans* de 96 h em Veast Morfology Agar (VMA), incubada á temperatura de

20.25° C, coletar uma amostra com alça de 50 micra e inocular em tubo com 6,0 ml de Caldo Veast Morfology.

o Homogeneizar a suspensão e incubar à temperatura de 20 a 25° C por 24h.

o Fazer diluições seriadas, com fator 10, de 10.1 a 10" em água destilada estéril. A partir da dilulçao 10" ,

diluir I\a proporçao.1 :28 em água destilada estéril.

• o ?n" ,,,,0,s..e, mear 1,0 ml da dilulçao 1'28 em tubos com 100 ml de Caldo Caselna Soja e incubar á temperatura de nnr 7 *rll".*

- semear 0,1ml da dilulçao final em placas com VMA e incubar á temperatura de 20 a 25° C por 72 h.

- Proceder a contagem de colOnicas formadas após o períoeo de lncubação,

• O número de Unidades Formadoras de ColOniaspor mililitro (UFC/ml) deve estar entre 50 e 100.

• O Caldo Case/na Soja é considerado fértil para o referido microrganismo se, após o perfodo de

incubaçao, apresentar crescimento caracterlslico confirmado por exame microscópico.

1.2. SAlA DE PROVAS

A Prova de Esterilidade Bacteriana e Fúngica deve ser executada em Capela de Fluxo Laminar,

devidamente instalada em uma área biolimpa classe 10.000.

O manejo requer o cumprimento estrito de Boas'Práticas de Laboratório.

1.3. AMOSTRAGEM

A amostragem utirlZada na prova é de no mlninio *O,4,J; ,* onde n corresponde ao volume total do Produto

Acabado a Granel ou ao número total de ampolas ou frascos-ampola do Lote Final.

1.4. MÉTODOS

1.4.1. INOCULAÇÃO DIRETA

1.4.1.1. PH,TERIAL

o Amostra a testar

o Erlenmeyers esterilizados

- Pipetas de 5 ml e 10 ml esterilizadas

o seringas de 10 mI, 20 mI, 50 ml e 100 ml esterilizadas

o Agulhas de 40 x 1,0 mm esterilizadas

o Tubos com 40 ml de Caldo TIoglicolato de Sódio

- Tubos com 40 ml de Caldo Caselna Soja

- Placas de Petri com Agar Tripticaselna Soja

- Capela de Fluxo Laminar

- Pipetador automático

- Gaze esterilizada

- Estufas reguladas a 20-25° C e 30-35° C

- Cuba para descarte de material

o Equipamento de contenção primária -----

1.4.1.2. PROCEDIMENTO

• O material a ser utilizado na área biolimpa deve ter condições que assegurem a sua assepsia.

• Deve ser usado equipamento completo de contenção primária.

- A prova deve ser executada em Capela de Fluxo Laminar, que deverá ter sido acionada 15 minutos antes

do inrcio da prova.

- Coletar e misturar as amostras em Erlenmeyer.

- Homogeneizar e pipetar 5,0 ml da amostra em cada um dos tubos de Caldo Tioglicolato de Sódio e Caldo

Caserna Soja, até esgotamento total da amostra.

- Fazer controle microbiológico dos procedimentos realizados em Capela de Fluxo Laminar, com placas de

Agar Tripticaserna Soja.

- Para controle de esterilidade dos Meios de Cultura utilizados na prova, reservar um tubo de Caldo

Tioglicolato de Sódio e Caldo Caselna Soja.

-Incubar os tubos de Caldo Tioglicolato de Sódio à temperatura de 30 a 35°C e os tubos de Caldo Caselna

Soja á temperatura de 20 a 25° C, durante 14 dias.

• Observar os tubos diariamente.

1.4.2. FILTRAÇÃO POR MEMBRANA

1.4.2.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Equipamento esterilizado de filtração para prova de esterilidade em membrana

o Membrana filtrante de porosidade não maior do que 0,45 micra

- Tesouras esterilizadas

- Pinças esterilizadas

- Seringas de 10 ml, 20 ml, 50 ml e 100 ml esterilizadas

- Kitazato de 1000 ml esterilizado

• Tubos com 100 ml de Caldo Tioglicolato de Sódio

o Tubos *com* 100 ml de Caldo caseína Soja

o Placas de Petri com Agar Tripticaselna Soja

. .1 **i k** .'-CXX.C) **x ...**J**.**•.:t\_ x:c. : \_

o Capela de Fluxo Laminar

o SOlUça0de água peptonada 0,1% esterilizada

- Bomba de vácuo

o Estufas reguladas a 20-25° C e 30-35°C

o Cuba para descarte de material

• Equipamento de contenção primária esterilizado

1.4.2.2. PROCEDIMENTO

- O material a ser utilizado na área biolimpa, deve ter condições que assegurem sua assepsia.

o Deve ser usado equipamento completo de contenção primária.

o A prova deve ser executada em .capela de Fluxo Laminar, que devera ter sido acionada 15 minutos antes

do inIcio da prova. .

o Coletar e misturar as amostras com seringa e colocá-Ias no copo de filtração.

o Filtrar a vácuo (70 mm Hg) todo o volume da amostra.

o Após o término da filtração da amostra, lavar as membranas com um volume de SOlUça0de água

peptonada 0,1%, igual ao volume da amostra.

o Dividir a membrana em duas partes iguais.

- Colocar uma metade no tubo com Caldo Tioglicolato de Sódio e a outra no tubo com Caldo Case/na Soja.

o Fazer controle microbiológico dos procedimentos realizados dentro da Capela de Fruxo Laminar, com

placas de Agar Tripticaselna Soja.

- Para controle de esterilidade dos Meios de Cultura utilizados na prova, reservar um tubo de cada um dos

meios Caldo Tioglicolato de Sódio e Caldo Caserna Soja.

• Incubar os tubos de Caldo Tioglicolato de Sódio à temperatura de 30 a 35° C e os tubos de Caldo Caserna

Soja á temperatura de 20 a 25° C durante 14 dias.

o Observar os tubos diariamente.

• INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Prova 1 (0,4.r,; ) Prova 2 (O,4.r,; ) Reprova *(O,8,J; )* Resultado

- Satisfatório

+ - - Satisfatório

+ o + Insatisfatório

+ + Insatisfatório

1.5. ESPECIFICAÇÃO

A amostra em prova não deve apresentar crescimento bacteriano ou ffingico

PROVAS FISICO-QUIMICAS

1. DETERMINAÇÃO DO pH (PFQ.1)

A Determinaçao Potenciométrica do pH, é realizada pela medida da diferença de potencial entre dois

eletrodos, Imersos na SOlUça0em exame. Um destes eletrodos é senslvel aos lons hidrogênio e o 0utr0-6 o

eletrodo de referência, de potencial constante.

1.1. MÉTODO

Potenciométrico

1.2. MATERIAL

• Amostra a testar

- Soluções tampão pH 4,0; 7,0 e 9,0

- PotenclOmetro e eletrodos

-- B6queres de 25 ml

• Papel de fiilrlL

- Frasco lavador com água bldestilada -

1.3. PROCEDIMENTO

- Transferir para Béqueres de 25 rnl cerca de 10 ml das soluções' padrao pH 4,0 .e 7.0, e da amostra a

testar.

o Calibrar o aparelho, utilizando as soluções tampão,

o Lavar o eletrodo com água bidestilada e secar suavemente com papel filtro.

o Determinar o pH da amostra a testar.

- Registrar os dados em protocolo.

1.4. ESPECIFICAÇÃO

O pH da amostra deve estar compreendido entre 6,0 e 7,0.

2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGI:NIO E PROTEINAS (PFQ;2)

Esta determinação tem por objetivo a avaliação quantitativa de nitrogênio protéico e do nitrogênio não

protéico.

2.1. MÉTODO

Mlcro-Kjeldahl

2.2. MATERIAL

- Amostra a testar

- Manta de aquecimento para digestao, com sistema de neutralização para gases liberados

o Destilador

• Balança analltica

• Balão de microKjeldhal

o Bureta de 25ml (1/100)

- Ácido sulfúrico concentrado 37%

• Solução de hidróxido de sódio 20%

o Solução de ácido bórico 5%

- Solução de ácido clorldrico (HCI) 0,1M padronizada

- Solução indicadora mista (vermelho de metila e azul de metileno)

- Solução de ácido tricloroacético (TCA) 33%

- Catalisador

- Pérolas de vidro

- Centrlfuga

- Pipetador automático

• Tubos de centrlfuga

\_ • Agua bidestilada

2.3. PROCEDIMENTO

2.3.1. DIGESTÃO PARA DETERMINAÇÃO DO NITROGI:NIO TOTAL

• Pipetar a amostra em balão de microKjeldhal, de maneira que a concentração de protelnas esteja em

tomo de 5% (PN}.

- Preparar um branco com água bidestilada.

- Adicionar 10 ml de ácido sulfúrico concentrado e catalisador.

\_Digerir á temperatura de 300·C, até que a amostra esteja Ifmpida e transparente.

2.3.2. DIGESTÃO PARA DETERMINAÇAo DO NITROG~NIO NÃO PROTÉICO

• Em tubo de centrlfuga, adicionar 2 ml da amostra.

• Adicionar 8 ml de ácido tricloroacético 33%.

• Centrifugar a 1500 x g durante 10 minutos.

• Transferir 2,5 ml do sobrenadante, para balão de microKjeldhal.

• Adicionar 10 ml de ácido sulfúrico concentrado e catalisador.

• Digerir, á temperatura de 300· C, até que a amostra esteja Ifmpida e transparente.

2.4. DESTILAÇÃO • \_ Levar os balões de microKjeldhal para o destilador e adicionar, gota a gota, hidróxido de sódio 20%, até

que a SOlUÇa0fique ligeiramente azulada.

\_ Recolher cerca de 25 ml do destilado em um Erlenmeyer contendo 5 ml de SOlUÇa0de ácido bórico 5%,

25 ml de água destilada e 5 gotas de indicador misto.

2.5. TITULAçÃO

• Titular, com ácido clorfdrico 0,1M, até o ponto de viragem (coloração violeta indica o ponto final).

2.6. CÁLCULOS

Nitrogênio Prot~ico= B x 'Cx Fc x Fd

onde:

B= diferença entre o volume.de HCLgasto na tltulação e o volume de HCI gasto na titulação do·branco

C= 0,1 M x 14,007

Fc= fator de correção

Fd= fator de diluiçllo dapreclpltação com TCA Nitrogênio não protéico

NITROG~NIO PROTÉICO= N total- N não Protéico

;

onde:

N= Nitrogênio

PROTEINAS= Nitrogênio Protéico x 6,25

2.7. ESPECIFICAÇÃO

• A concentraçao máxima de Nitrogênio não protéico é de 0,3 g%.

• A concentração máxinia de protelnas é de 15 g%

3· DETERMINAÇÃO DE FENOL (PFO.3)

Esta determináção tem por.objetivo a quantlfícação de fenol.

3.1. MÉTODO

**J=c:nAt"'trnfntnm6trirn**

3.2. MATERIAL

• Amostra a testar

- EspectrofotOmetro VIS

• Cubeta de vidro

.' Pipeta vol.umétrica 5 ml, pró-pipeta

.Pipeta.graduada 5 ml, pró-pipeta

-B6quer25 ml

• Pró-plpeta

- PotenclOmetro. eletrodo

- Soluçllo tampllo pH 9,0

• Soluçllo de 4-aminoantipirina 0,1%

- SoIUçllo de ferricianeto de potássio 5%

3.3. PROCEDIMENTO

• Diluir a amostra prova-de tal forma que a concentração de fenol encontre-se na faixa de 5 a 30 ppm;

• Adicionar 5 ml da SOlUça0tampão borato pH 9,0;

• Adicionar 5 ml da SOlUça0de 4-amlnoantipirina 0,1%;

• Adicionar 5 ml da SOlUça0de ferriclaneto de potássio 5%;

- Determinara absorbáncia da solução resultante, após 10 minutos, a 546 nm.

- Faier um ensaio em branco;

- Fazer uma curva de calibraçllo e determinar o teor de fenol da amostra por interpolação ou regressllo

linear.

3.4. PREPARO DESOLUÇÓES E REAGENTES NA DETERMINAÇÃO DO FENOL

• SOlUça0tampão borato.pH 9,0

SOlUça0A - Dissolver6.18g de.áctdc bórico p.a, em solução de cloreto de potássio 0,1 M e levar a 1000 ml

com a mesma SOlUça0.

A solução de cloreto de potássio 0,1 M equivalente a 7,46 g de KCI em 1000 ml de água destilada.

SOlUça0B - Diluir 2,0 g de hidróxido de sódio p.a. em água destilada, completando o volume a 500 ml.

Preparo do tampão pH9,0 • Para 1000 ml da SOlUça0A, adicionar 420 ml da solução B. Verificar o pH no

potenciOmetro.

- SOlUça0de 4-aminoantipirina 0,1%

- Dissolver 0,1g de 4!atninoantipirina em tampão borato pH 9,0, completando o volume a 100 ml.

- SolUça0 de ferricianeto de potássio 5%

- Dissolver' 5g de ferricianeto.de potássio p.a. com um pouco de água destilada, completar o volume paratüü ml

com água destilada.

3.5. ESPECIFICAÇÃO

- O teor de fenol deve ser menor ou igual a 0,35 g%.

4 - DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS (PFO.4)

Esta determinação tem por objetivo a quantitlcação de sólidos totais.

4.1. MÉTODO

Termogravimétrico

4.2. MATERIAL

- Amostra a testar

- Pipetas graduadas de 1 ml e pró-pipeta

- Pesa filtro

- Balança analltica

- Dessecador

- Estufa a 105· C

- Placa de aquecimento

- Placa de Petri

- Capela de exaustão

4.A,3. PROCEDIMENTO

- Pesar em um pesa filtro, previamente tarado, 1g da amostra em duplicata.

- Colocar na capela de exaustão sobre uma placa de aquecimento, até a evaporação do Ifquido.

- Transferir o pesa filtro com amostra para a estufa a 105·C e deixar por uma hora.

- Transferir a amostra dessecada para um dessecador, deixar por 30 minutos e pesar.

- Repetir o processo de dessecação até peso constante.

- Proceder os cálculos

4.4. CALCULOS

% ~e sólidos totais = *BxlOO*

C

Onde:

B = diferença entre o pesa filtro dessecado e o pesa filtro vazio

C = peso da amostra

4.5. ESPECIFICAÇÃO

A concentração máxima de sólidos totais é de 20%.

5 - DETERMINAÇÃO DÉ SULFATO.DE AMONIO (PFO.5)

Esta determinaçao tem por objetivo a avaliação quantitativa de sulfato de amOnio.

5.1. MÉTODO

Colorimétrico

5.2. MATERIAL

- Amostra a testar'

- Pipetador automático

- Pipetas volumétricas de 1 ml e 10 ml, pró-pipetas

- Balão volumétrico de 100 ml

- Tubos de ensaio de 16 x 160 mm (opticamente iguais)

- Solução padrão estoque de Sulfato de AmOnio 0,6%

- Reagente de Nessler

• Agua bidestilada

5.A.3. PROCEDIMENTO

- Preparação da amostra a testar

- Transferir 1 ml da amostra a testar para balão volumétrico de 100 ml.

- Completar o volume com água bidestilada.

- Transferir uma allquota de 10 ml da SOlUça0para um tubo de ensaio.

- Preparação de Padrões

- Transferir 1 ml da SOlUÇa0padrão estoque de sulfato de amOnio balão volumétrico de 100 ml.

- Completar o volume com água bidestilada.

- Fazer diluiçOes da sotução.aclrna em proporções de 1:2, 1:3, 1:4.

- Transferir para tubos de ensaio, allquotas de 10 ml das diluições acima.

5.4. TÉCNICA

• Adicionar 1 ml do reagente de Nessler aos tubos com a amostra a testar e com os padrões.

- Comparar a cor entre a amostra e os padrões.

- A intensidade da cor da amostra deve ser igualou menor á da SOlUÇa0padrão diluld~1:A.3.

5.5. ESPECIFICAÇÃO

O limite máximo permitido de sulfato de amOnio é 0,2%.

6. DETERMINAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO (PFO.6)

Esta determlnãção tem por objetivo a avaãação quantitativ~ de' cloreto de sódio.

6.1. MÉTODO

Volumétrico .,.1'

6.2. MATERIAL

-Amostra a testar

- Pipetas graduadas 1,0 ml e 10,0 0)1' .

- Pipetador automático

• Erlenmeyer de 50,0 ml

• soíuçao de ácido nflrico 0,2 N

- Água bidestilada

- Solução indicadora

- Solução de nitrato de mercúrio 11,01N titulada

- Bureta de 50,0 ml *(1/100)*

6.A.3. PROCEDIMENTO

- Transferir 1,0 ml da amostra a testar para um Erlenmeyer de 50,0 ml.

- Adicionar 9,0 ml de água bidestilada.

- Adicionar, com agitação, 3 gotas da solução indicadora.

- Adicionar algumas gotas de ácido nrtrico 0,2 N, até que a solução fique amarela esverdeada.

- Preparar uma SOlUça0branco contendo água bideslilada no lugar da amostra.

6.4. 'TITULAÇÃO

- Titular, com nitrato de mercúrio 110,01N, até o ponto de viragem (coloração violeta indica o ponto final).

6.5. CÁLCULOS

A concentração de cloreto de sódio é *dada* pela fórmula:

NaCI (mg/ml) = *(VA - VB)FcxOS.85*

*V*

onde:

VA= volume de nitrato de mercúrio 110,01N gasto na titulãção da amostra

VB= volume de nitrato de mercúrio 110,01N gasto na titulaçao do branco

Fc= fator de correção

V = volume da amostra atestar (ml)

6.6. PREPARO DAS SOLUÇOES REAGENTES

- SOlUça0de Nitrato de mercúrio 110,01Ntitulada

- Dissolver 1.623 g de Nitrato de mercúrio 11em 150,0 ml de água bideslilada.

-Adicionar 14, Oml de ácido nrtrico 2 N.

• Completar o volume para 1.000,0 mr em balão volumétrico com água bidestilada.

- Titular

- Solução de Ácido nltrico 0,2N

- Transferir ?,5 ml-de ácido nrtrico p.a. para um balão volumétrico de 250,0 ml.

- Completar o volume com águabideslilada.

- SOlUça0Indicadora

- Em balão volumétrico de 25,Oml, dissolver 12,0 mg de Difenilcarbazona (DFC) e 12,5 mg de azul de

bromofenol (ABF) em 15,0 ml de álcool etllico.

- Completar o volume com álcool etllico p.a.

- Guardar a SOlUça0em frasco âmbar e á temperatura de 4° C a 8° C.

6.7. ESPECIFICAÇÃO

A concentração de Cloreto de Sódio permitida é de 0,70 a 0,90 g%.

7. DETERMINAÇÃO DE VOLUME MÉDIO POR AMPOLA OU. FRASCO- AMPOLA (PFQ.7)

Esta determlnação tem por objetivo quantificar o volume médio.

7.1. MÉTODO

Medida direta

7.2. MATERIAL

- Amostra a testar

• Proveta de 50 ml e 100 ml

• Seringas de 10 ml e 20 ml

- Agulhas 40 x 1,0 mm

7.A.3. PROCEDIMENTO

- Abrir, no mlnimo, 5 ampolas ou frasco-ampolas da amostra a testar e retirar, individualmente, com seringa

seca o conteúdo de cada ampola ou frasco-ampola.

- Esgotar o conteúdo da seringa em uma proveta seca em que o volume final a ser medido ocupe, no

mlnlmo, *40%* da capacidade total da proveta.

- O volume médio é dado pelo volume determinado na proveta, dividido pelo número de ampolas ou frascoampolas

utilizados.

7.4. ESPECIFICAÇÃO

Nenhuma ampola ou frasco-ampola deverá conter volume menor do que o declarado e o volume médio

deverá ter excesso mlnimo, conforme tabela abaixo.

volume declarado excessomlnimo para líquldos móveis (ml)

(ml)

0,5 0,10

1,0 0,10

2,0 0,15

5,0 0,30

10,0 0.50

20,0 0,60

50,0 ou mais 2,0%

8. DETERMINAÇÃO DE ASPECTO DE AMOSTRAS (PFQ.8)

Esta determinação tem por objetivo verificar o aspecto

8.1. MÉTODO

Visual

8.2. MATERIAL

- Amostra a testar

- Balões volumétricos de *100* ml

- Balão volumétrico de 25 ml

- Tubos de ensaio

- Pipetas volumétricas de 1ml e 2 ml, pró. pipetas

• Pipeta graduada de 10 ml, pró-pipeta

8.A.3. REAGENTES E SOLUÇOES

- Ácido clorfdrico *0,01* M

- Nitrato de prata 0,1 M

• Água destilada

- Solução I - SOlUça0opalescente:

SOlUça0de ácido clorldrico dilulda 1:100.

• Solução 11• solução levemente turva:

Solução de ácido clorldrico dilulda *2:100.*

- Solução 11I- Solução turva:

SOlUÇa0de ácido clorldrico diluldo 4:100.

8.4. PROCEDIMENTO

- Pipetar, com auxilio de pipeta volumétrica, 5 ml de cada SOlUça0(I, 11e 11I)em três tubos de ensaio de

igual diãmetro. •

- Adicionar em cada tubo 0,5 ml de SOlUça0 de nitrato de prata 0,1M e homogeneizar.

Essas soluções corresponderão a: levemente turva, opalescente e turva, respectivamente.

- Pipetar com auxilio de pipeta volumétrica, 5,5 ml da amostra de soro em um tubo de ensaio de mesmo

diâmetro .

• Comparar aos padrões obtidos observando-se no eixo vertical dos tubos contrav-uma supertlcie

escura,

8.5. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A amostra testada deverá ser IImpida ou levemente turva.

BIBLIOGRAFIA

1. Biological Substances: Intemational Standards and References Reagents, Technlcal Report Series 840 (1994)

Wl-fO.

2. General Requirements for the SteriJity of Biologícal Substances, Technical ~eport Series 530 (1973) Wl-f0.

A.3. Good Manufacturlng Practices for Blologlcal Products, Technical Report Series 822 (1992) Wl-f0.

4. Farmacopéia Brasileira **4"** edição, Parte I (1988).

5. Pharmacopea USP XXII (1993).

6. Requirements forthe Imnune Sera of Animal Origem, Technical Report Series 413 (1969) WHO.

7. Requirements for Snake Antivenins, Technical. Report Series 463 (1971) Wl-f0.

CERTIFICADO DE LIBERAÇÃO

Certificamos que o Lote , de SORO ANTI-BOTRÓPICO cujo número aparece. nos

rótulos de cada recipiente final, satisfaz todas as Normas Brasileiras vigentes, as Normas preconizada pela OMS

Série de lnformes Técntcos nO413-Anexo 2 -1969- e as Boas Práticas de Manufatura da OMS, estabeler.:idasna

Série de Informe Técnico, n° 823-Anexo 1- 1992.

Nome e Assinatura do Gerente Nome e Assinatura do Gerente

Produção Controle de Qualidade

Nome e Assinatúra do Farmacêutico Responsável CRF\_\_ ND \_

NOME E ASSINATURA DO DIRETOR

DA

INSTITUÇÃO

*Data-'\_I\_*

CERTIFICADO DE LIBERAÇÃO

Certificamos que o Lote , de SORO ANTI-CROTÁLlCO cujo núm~ro aparece nos

rótulos de cada. recipiente final, satisfaz todas as Normas Brasileiras vigentes, as Normas preconrzada pel.aOMS

Série de Informes Técnicos nO413-Anexo 2 -1969- e as Boas Práticas de Manufatura da OMS, estabelecidas na

Série de Informe Técnico. nO823-Anexo I -1992.