PORTARIA N9 175, DE 11 DE NOVEMBRO DE 1996

o secralirlo de Vigillncia Sanitiria do Ministério da Saúde, no uso de suas atribuições legais,

rnolve:

Art. 10 Aprovar as Nonnas Técnicas de Produção e Controle de Qualidade das Vacinas: Tríplice

Bacterlana, Toxóide TetAnico, Dupla Ad~lto. Dupla Infantil. na confonnldade do.anexo desta Portaria.

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

aprimoramento das referidas normas,

•Art. 3' Esta Portaria entrará emvigor na data de sua publicação.

ELISALUD L. A. CARLINI

ANEXO

NORMAS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DAANATOXINA

DIFTÉRICA

1.DEFINIÇOES

1.1.DENOMINAÇAo

Anatoxina Difttrica

1.2. DEFINIÇAo DESCRITI\(A

A Anatoxina Diftérica é uma Toxina Diftérica que destoxificada perde sua capacidade toxigênica,

porém mantém atividade imUl;ogênica. ."

1.3. PADROES INTERNACIONAIS DE REFER~NCIA

Os Padrões Internacionais são mantidos e distribuldos pelo Statens Seruminstitut of Copenhaguen

- Dinamarca,

1.3.1. O Padrão Internacional de Antitoxina Diftérica (estabelecido em .1934), conservado em ampolas q'ue

contêm soro equino hiperimune dessecado. É distribuldo aos Laborat6rios de Produção e Controle dissolvido em

SOlUÇa0Salina Glicerinada em frasco-ampola, com concentração de 10 Unidade Internacional (UI/ml). A UI é

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

conserva o Padrão Internacional.

1.3.2. A Quinta Preparação Internacional de Referência de Antitoxina Dift6rica (estabelecida em 1971) para

provas de floculação, é constitulda por soro equino hiperimune. dislrlbulda aos Laborat6rios de Produção e

Controle em ampolas que contêm 1800 equivalentes Lf (Limite de Floculaçto) de material liofilizado.

1.3.3. O Segundo Padrão Internacional do Tox6ide Diftérico Adsorvido (elllbelecido em 1978), é distribuldo aos

Laborat6rios de Produção e Controle na forma liofilizada, em ampolas contendo 132 UI.

1.3.4. O Primeiro Padrão Internacional de Referência para Anatoxlna Dlft6ric1 para provas de floculação

(estabelecido em 1988), é distribuldo aos laborat6rios de Produçlo e Controle, e contém 900 equivalentes

Lf'ampola.

1.4. TERMINOLOGIA

1.4.1. LOTE-SI;MENTE

Quantidade de ampolas contendo *Corynebacterium diphtheriae* Iionlizado, de compoliçlo uniforme, obtido a

partir de uma cepa liofilizada de procedência conhecida.

1.4.2.INÓCULO DE PRODUÇÃO

Quantidade de *Corynebacterium dlphlheriae* obtida a partir de uma ampola do Lole-Semenllllonlizldo.

1.4.3. CULTIVO DE PRODUÇÃO

Suspensao de *Corynebacterium diphtheriae* produzida em um único processo.

1.4.4. TOXINA DIFTÉRICA

Filtrado t6xico, obtido a partir do meio de cultura para preparação de Toxina, inoculado com 1n6cu1ode

Produção e coletado em um único processe .

1.4.5. TOXINA DIFTÉRICA CONCENTRADA

Toxina diftérica concentrada, por método f1slcoe obtida em um único processo.

1.4.6. ANATOXINA DIFTÉRICA A GRANEL

Filtrado at6xico, obtido de uma Toxina ou Toxina diftérica concentrada por destoxificaçllo com formaideldo.

à temperatura de 35'C.

1.4.7. ANATOXINA DIFTÉRICA PRODUTO ACABADO A GRANEL

Anatoxina Diftérica purificada e concentrada, homogênea, obtida de uma partida ou da mistura de partidal

cje Anatoxina Diftérica a Granel, terminadas e contidas em um único recipiente, aprovada e liberada, com **ai**

caracterlsticas de qualidade estabelecidas por estas Nonnas.

1.4.8. LOTE

Quantidade de Anatoxina Diftérica Produto Acabado a, Granel identificada e produzida de acordo com um

único protocolo de produção.

1.4.9. SUB-LOTE

Fração especifica e identificada de um Lote de Anatoxina Diftérica Produto Ácabado a Granel.

2. NORMÀS GERAIS DE PRODUçAo E CONTROLE

O trabalho na produção da Anatoxina Diftérica requer o cumprimento de Boas Práticas de Fabricação e

Normas de Biossegurança. .

O pessoal do laborat6rio deve ser alertado quanto aos riscos potênclals a que estão submetidos durante seu

trabalho rotineiro. Para minimizar esses riscos, o pessoal de laboratório deve:

o ser previamente imunizado contra difteria e ter controlada sua resposta imune por soroneutralização, pelo

menos uma vez ao ano, e apresentar um titulo mlnimo de 0,1 UI/ml da antitoxina diflérica circulante;

o receber treinamento sobre a correta utilizaçao e manejo dos equipamentos de produção e de contenção

primária e secundária, com que conta a Unidade Produtora.

As atividades de Produção e Controle devem seguir os Manuais de Procedimentos aprovados pela

Inslituiçao Produtora.

3. CONTROLE DAS OPERAÇOES DE PRODUÇÃO

A preparação da Anatoxina Diflérica baseia-se no sistema de Lote-Semente. O Lote-Semente empregado

em sua produção deve ter as mesmas caracterlsticas *da* cepa da qual procede o Lote-Semente liofilizado iniciaI.

N° 220 TERéA-FEIRA. 12 NOV 1996 DIÁRIO OFICIAL 23513

3.1. CONTROLE DA MATÉRIA-PRIMA

3.1.1. CEPAS DE PRODUÇÃO

As cepas de *Corynebacterium diphlheriae,* utilizadas na produção de anatoxina, devem ser liofilizadas e

mantidas à temperatura não maior que 4·C e suas caracterlsticas registradas em protocolos.

3.1.2. MEIOS DE CULTURA

3.1.2.1. MEIOS DE CULTURA PARA A PREPARAÇÃO DO LOTE-SEMENTE

Estes meios de cultura devem permitir o crescimento de *Corynebacterium diphtheriae* em 24 horas a 35°C.

3.1.2.2. MEIOS DE CULTURA PARA A PREPARAÇÃO 00 INÓCULO DE PRODUÇÃO

Este meio de cultura, deve ser capaz de permitir o crescimento do *Corynebacterium diphtheriae* em 24 horas

a 35°C.

3.1.2.3. MEIOS DE CULTURA PARA A PREPARAÇÃO DA TOXINA .

Os.componentes destes meios de cultura devem permitir o crescimento de *Comynebacterium diphtheriae* e

a.segurar a produção da Toxina Diftérica, com Ululo mfnimo de 40 Lf/ml. Não deve conter proteínaá de origem

anlmál e nem provocar. reações tóxicas e/ou alérgicas.

3.2. CONT.ROLE DO LOTE-SEMENTE

3.2.1. CONTROLE DA PUREZA (PM.2)

3.2.1.1. CONTROLE MICROSCÓPICO

Um esfregaço do Lote-5emente, corado pelo método de Gram, deve ser submetido a exame microscópico.

Devenl ser observado somente população uniforme de bacilos gram positivos.

3.2.1.2. PROVA DE AUS~NéJA DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES

UIIlI amostra do Lote-Semente é submetida à prova de Ausência de Microorganismos Contaminantes,

lnocuIIndo-Ie em meios de cultura recomendados. Após lncubação a 35·C, deve haver somente crescimento de

*CotyrItbIcIerium dip.'ltheriae.*

3.2.2. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE F,LOCULAÇÃO (PB.1)

UIIlIIl'noItra do Lote-Semente, inoculada e incubada em meio de produção de toxina, é submetida à prova

di tIllculIçIo de Ramon. Deve produzir concentração de Toxina semelhante à concentração indicada no lote

qlnII.

3.3. CONTROLE DO INOcuLO DE PRODUÇÃO

3.3.1. CONTROLE DA PUREZA (PM.2)

uma MlOIIrI do In6culo de Produçlo li submetido a prova indicada no Item 3.2.1.

3.4. CONTROLE DO CULTlVO DE PRODUÇÃO DE TOXINA

. 3.4.1. CON'T'ftOlE DE PUREZA (PM.2)

uma MlOIIrI do Cultivo 'lUbmtIld8 11I prova Indicada no Item 3.2.1.

3.4.2. DETERMINAÇÃO DO L1MITE.DE FLOCULAÇÃO (PB.1)

UIIlIIl'IlCIIIra do Cultivo da pnlduçIo de Ioldna após filtraçlo li submetida à prova de fíoculação de Ramon.

Deve ler no mInImo 40 LfmI •••• lUa uIlIlz~ como mat6rla prima

3.4.3. DETERMlNAçAO DE pH (PFQ.1)

Uma amclllra do Cultivo 61Ubm1tid1 \* dettrminaçlo de pH.

3.5. CONTROLE DA TOXINA DlrnRlCA

3.5.1.DETERMINAçAO DO LIMITE DE FLoCULAÇÃO (PB.1)

Uma amostra da T0llinI61Ubm1tid1\* prova indicada no Item 3.4.2.

3.5.2. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ,1)

Uma amostra da T0llinI61Ubm1tid1\* dIIermInaçIo de pH.

3.6. CONTROLE DA TOXINA DlrnRlCA CONCENTRADA

3.6.1. ETERMINAÇÃO DO LIMITE DE FLOCULAçAO (P8.1)

Uma amostra de Toxina concantrada 6 aubmatkIa \* prove indicada no Item 3.4.2.

3.6.2. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostra de Toxina concentrada 6 IIIbm1tlda \* deltrmlnaçlo de pH.

3.7. CONTROLE DA ANATOXINA DIF1'éRICA A GRANEL

'3;7.1. PROVA DE TOXiCIDADE ESPECiFICA (P8.2)

Uma amostra da Anatoxina a Granel 6 IUbmltldl\* prova de Toxicklade Especifica (PB.2.1).

3.7.1.1. PROVA INTRADÉRMICA

Não devem ocorrer reações denmonecrótlcIII no ~I de lnoculaçlo.

3.7.1.2. PROVA SUBCUTÃNEA

Pelo menos 80% dos animais inoculados devem aobrtviver durante '0 perfodo de observação, sem

apresentar qualquer sinal de intoxicação diftérica.

3.7.2. DETERMINAÇÃO DO tlMITE DE FLOCULAçAO (PB.1)

Uma amostra da Anatoxina a Granel é SUbmetida \* prova indicada no Item 3.4.2.

SEÇÃO

3.7.3. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostra da Anatoxina a Granel é submetida à determinação de pH.

3.8. CONTROLE DA ANATOXINA DIFTÉRICA PRODUTO ACABADO GRANEL

3.8.1. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE FLOCULAÇÃO (PB.1)

Uma amostra da Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel é submetida à prova indicada n.oitem 3.4.2.

3.8.2. DETERMINAÇÃO DA PUREZA ANTIG~NICA

Uma amostra da Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel é submetida ao método Micro-Kjeldahl para

determinação da quantidade de nitrogênio protéico (PFQ.6). A pureza antigênica é obtida da relação do valor em

Lf/ml (PB1) e a concentração em mg de nitrogênio protéico/ml. A Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Gra.nel,

devem ter, pelo menos, 1500 Lf por mg de nitrogênio protéico.

3.8.3. PROVA DE TOXICIDADE ESPECIFICA (PB.2)

Uma amostra da Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel deve ser submetida à prova de Toxicidade

especifica (P.B.2.2). Pelo menos 80% dos animais inoculados devem sobreviver durante o periodo de

observação, sem apresentar sinal de lntoxlcação diftérica.

3.8.4. PROVA DE ESTERILIDADE BACTERJANA E FÚNGICA (PM.1).

Uma amostra da Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel é submetida à prova de Esterilidade

Bacteriana e Fúngica. Não deve apresentar crescimento de bactérias ou fungos ao final da prova.

3.8.5. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

A Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel é submetida à deterrnlnação de pH, devendo ter um pH de

6,0 a 7,0.

3.8.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FORMALDEfDO RESIDUAL (PFQ.4)

Uma amostra da Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel é submetida à determinação de Formaldeldo

Residual, sendo o máximo permitido 200 ppm.

3.8.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TIMEROSAL (PFQ.2)

Uma amostra da Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel é submetida á.determlnação de Timerosal,

sendo o màXimo permitido 200 ppm, I

3.8.8. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SULFATO DE AMONIO (PFQ.8)

Uma amostra da Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel é submetida à determinação de Sulfato de

AmOnio, sendo o màximo permitido 200 ppm de sulfato. .

3.8.9. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLORETO DE SÓDIO (PFQ.7)

Uma amostra da Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel é submetida à determinação de Cloreto de

sódio, sendo o rnáximoperrnltlcc de 0,909 %

3.8.10. PROVA DE REVERSÃO DE TOXICIDADE (PB.4)

Uma amostra da Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel é dllulda e inoculada em ·cobaias. Os

animais não devem apresentar perda de peso. sintomas de intoxlcação diflérica local ou sistêmlca término da

prova.

3.8.11. PROVA DE ATIVIDADE IMUNOGI:NICA (PB.5)

Uma amostra da Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel é diluída em solução fisiológica esterilizada à

concentração de uma Dose Individual Humana (DIH) e adsorvlda.

3.8.11.1. MÉTODO AMERICANO (NIH)

Uma amostra da Anatoxina Diflérica Produto Acabado a Granel, adsorvida é inoculada em cobaias. A

atividade antilóxica do soro dos animais vacinados deve ter, no mínlrno.z UI/dose.

3.8.11.2. MÉTODO DESAFIO (OMS)

A Atividade Imunogênica da Anatoxlna Diftérica Produto Acabado a Granel adsorvida, é compro~ada. por

comparação com um Toxóide Diftérico de Referência. A atividade Imunogênica do produto não deve ser inferior a

30 UI/Dose Individuai Humana. I

J

j

j

J

4. ESTOCAGEM

A Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel deve ser acondicionada em frascos de vidro classe

farmacêutica e mantida à temperatura de 4·C a 8·C.

5. ROTULAGEM

O rótulo do frasco que contém a Anatoxina Diflérica Produto Acabado a Granel deve apresentar, no minimo,

as seguintes informações:

- nome do produtor

- nome do produto

- número do lote

- volume total

- concentração (Lf/ml)

- preservativo (nome e concentração)

- data da filtração esterilizante

6. REGISTROS

Os dados do processo de fabricação de cada Lote de AnatoxinaDiftérica Produto Acabado a Granel e os

resultados das provas de controle são registrados em Protocolo e arquivados.

7. ARQUIVO DE AMOSTRA

Deverà ser conservada na Seção Produtora uma amostra de cada Lote/ou Sub-lote do Produto Acabado a

Granel, à temperatura de 4·C a 8·C, devidamente identificados, até 36 meses a partir da data da última diluição

para Vacina Dupla uso Infantil (DT), Vacina Dupla uso Adulto (dT) ou Vacina Triplice (DTP).

8. UTILIZAÇÃO

A utilização dos Lotes ou Sub-Ioles da Anatoxma Diflérica Produto Acabado a Granel somente podem ser

autorizada após Iiberaçêo pelo Controle de Qualidade Interno.

23514 SEÇÃO 1

**Ir. .'.' '" •** -"W'-" • -- •• ,.,-.' •••••.•••.•••• --., •••••••. \_ • \_ •.•• .,. \_ •• '.,... ••• tIi/ •.•••••.••.•• '•.•. •• ~ •••• \* .,•.•.•.• .- .•.•..••.••.•. ,.,11 ••• fi •••.•••. "" .••.•••••.••••• " •.••• .., .•• \_ .•••••.•• " • ., •• ~ ~ •••••••.•...•.• \_\_ ""' •. .,. ••••. \_I

:. • f f \ :' ~ ,

**DIÁRIO OFICIAL** N° 220 TERCA-FEIRA, 12NOV 1996

NORMAS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE

DA VACINA PERTUSSIS

1. DEFINIÇOES

1.1. DENOMINAÇÃO

Vacina Pertussis

1.2. DEFINiÇÃO DESCRITIVA

A Vacina Pertussis é .uma suspensão homogênea de células inteiras mortas de uma ou mais cepas de

*BoTr!e/eflapertussis ,* em solução fisio!ógica.

. - 1.3. PADROES INTERNACIONAIS DE REFERI:NCIA E DE UNIDADE DE OPACIDADE

1.3.1. O Segundo Padrão Internacional de Referência da Vacina Pertussis (estabelecido em 1980) mantido no

Stalens Seruminstitut of Copenhaguen - Dinamarca, é distribuldo aos laboratórios de Produção e Controle em

ampolas que contém 46 UI/ampola.

1.3.2. A Quinta Preparação Internacional de Referência de Opacidade (estabelecida em 1975) mantida no

Nationallnstitute for Biological and Control of london - Inglaterra, é distribuída aos Laboratórios de Produção e

Controle. Consiste em uma barra de material plástico que simula as propriedades ópticas de uma suspensão

ba<;terianaeM 10 Unidades de Opacidade. Uma unidade de Opacidade corresponde a 10· *germeslml.*

1.4. TERMINOLOGIA

1.4.1. lOTE-SEMENTE

Quantidade de ampolas contendo *Borde/efla pertussis* liofilizada, de composição uniforme, obtido a partir de

uma cepa liofilizada de procedência conhecida.

1.4.2.INÓCUlO DE PRODUÇÃO

Suspensão de *Borde/efla pertussis,* de composição uniforme, obtida a partir de uma ampola do Lote-

Semente. ~

1.4.3. COLETA INDIVIDUAL

Suspensão de bactérias obtidas a partir de um Inóculo de Produção de *BOlde/efla pertussis,* que tenha sido

Inoculada em um meio de cultura para produção e coletada em um único processo.

1.4.4. COLETA INDIVIDUAllNATIVADA

Suspensão de bactérias mortas, obtidas a partir de uma Coleta Individual de *Borde/ella pertussis* e

submetida a processo flsico qulmico.

1.4.5. VACINA PERTUSSIS CONCENTRADA ACABADA A GRANEL

Concentrado homogêneo de *Borde/efla pertussis* mortas, contido em recipiente único, obtido de uma ou

vérias Coletas Individuais ·inativadas, processado de acordo com .um único Protocolo de Produção, aprovado e

liberado conforme os critérios estabelecidos por estas Normas.

1.4.6. lOTE

Quantidade da Vacina .como Produto Concentrado Acabado a Granel. identificado e prodlJzido de acordo

com um único protocolo de produção.

1.4.7. SUB-lOTE

Fração especifica e Identificad!l de um Lote de Vacina Pertussis Concentrada Acabada a Granel.

2. NORMAS GERAIS DE PRODUÇÃO E CONTROLE

O trabalho na produção da Vacina Pertussis requer o cumprimento de Boas Práticas de Fabricação e

Normas de Biossegurança.

O pessoal do laboratório deve ser alertado quanto aos riscos potênciais a que estão submetidos durante seu

trabalho rotineiro. Para minimizar esses riscos, o pessoal de laboratório deve: receber treinamento sobre a

correta ulilizaçAo'e manejo dos equipamentos de produção e de contenção primária e secundária, com que conta

a Unidade Produtora.

As atividades de Produção e Controle devem seguir os Manuais de Procedimentos aprovados pela

Ipstituição Produtora.

3. CONTROLE DAS OPERAÇOES DE PRODUÇÃO

A preparação da Vacina Pertussis baseia-se no sistema de lote Semente. O Lote Semente empregado em

sua produção deve ter as mesmas caracterlsticas da cepa da qual procede o Lote Semente liofilizado inicial. •••• 3.1. CONTROLE DA MATÉRIA PRIMA

3.1.1. CEPAS DE PRODUÇÃO

As cepas de *Borde/efla pertussis* utiliZadas para produção devem ser liofilizadas na fase I, contendo pelo

menos os aglutlnógenos 1, 2 e 3, mantidas à temperatura mlnima não maior que 4°C e suas caracterlsticas

devem ser registradas em protocolos.

3.1.2. MEIOS DE CULTURA

3.1.2.1. MEIOS DE CULTURA PARA PREPARAÇÃO DO lOTE-SEMENTE

Estes Meios de Cultura devem permitir o crescimento de *Borde/efla pertussis,* a manutenção dos

aglutin6genos, da atividade imunoqénlca e não devem aumentar a toxicidade especifica da cepa, em 24 horas a

35°C.

3.1.2.2. MEIOS DE CULTIJRA PARA PREPARAÇÃO DO INÓCULO DE PRODUÇÃO

Estes Meios de Cultura devem permitir o crescimento de *Borde/efla pertussis,* a manutenção dos

aglullnógenos, da atividade imunogênica e não devem aumentar a toxicidade especifica da cepa, em 18 horas a

35°C.

3.1.2.3. MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DA VACINA

Os componentes destes meios devem permitir o crescimento de *Borde/ella penussis.* a manutenção dos

aglulln6genos, da atividade imunogênica, não devem aumentar a toxicidade especifica da cepa, não deve conter

protelnas de origem animal e nem inducirr reações tóxicas *elou* alérgicas.

3.2. CONTROLE DO lOTE-SEMENTE

3.2.1. CONTROLE DA PUREZA (PM.2)

3.2.1.1. CONTROLE MICROSCÓPICO

Um esfregaço do Lote-Semente, corado pelo método de Gram, deve ser submetido a exame microsCÓpico.

Deverá ser observado somente população de cocobaéilo Gram negativo.

3.2.1.2. PROVA DEAUSI:NCIA DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES

• Uma amostra. do Lote-Semente é submetida à Prova de Ausência de Microorganismos Contaminantes

Inoculando em meios de cultura recomendados, após incubação a 350

• C, deve haver somente crescimento de

*Borde/ella pertussis.*

3.2.2. CONTROLE DE AGLUTINÓGENOS (PB.6)

. Uma amostra do Lote-Semente deve ser testada por aglutinação com antissoros mono-especlãcos, para a

veríflcação da presença dos aglutinógenos 1, 2 e 3. As cepas utilizadas na produção devem conter os

aglutin6genos especificados.

3.3. CONTROLE DO INÓCULO DE PRODUÇÃO

3.3.1. CONTROLE DA PUREZA (PM.2)

Uma amostra do Inóculo de Produção é submetida às provas indicadas no Item 3.2.1.

3.3.2. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostra do Inóculo de Produção é submetida à determinação de pH.

3.3.3. PROVA DE IDENTIDADE (PB.7)

Uma amostra do Inóculo de Produção é identificada por aglutinação com soro antipertussls especíãcc da

cepa do Lote-Semente. Deve apresentar aglutinação especifica. '':'

3.3.4. CONTROLE DE OPACIDADE (PM.4)

Uma amostra do Inóculo de Produção é submetida ao Controle de' Opacidade, por comparação à

Preparação de Referência de Opacidade.

3.4. CONTROLE DA COlETAINDIVIDUAL

3.4.1. CONTROLE DA PUREZA (PM.2)

Uma amostra da Coleta Individuai é submetida àprova indicada no Item 3.2.1.

3.4.2. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostra da Coleta Individuai é submetida à determinação do pH. O pH não deve ser superiora 8,3.

3.4.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FORMAlDEIDO RESIDUAL (PFQ.4)

Uma amostra da Coleta Individuai é submetida à determinação do teor de Formaldeldo Residual sendo' b

máximo permitido 200"ppm.

3.4.4. PROVA DE IDENTIDADE (PB.7)

Uma amostra da Coleta Individuai é submetida à prova Indicada no Item 3.3.3.

3.4.5. CONTROLE DA OPACIDADE (PM.4)

Uma amostra da Coleta Individuai é submetida à prova indicada no Item 3.3.4.

3.5. CONTROLE DA COLETA INDIVIDUAL INATIVADA

3.5.1. PROVA DEINATIVAÇÃO BACTERIANA (PM.3)

. Uma amostra da Coleta Individuai Inativada é semeada em meio de cultura recomendado para verificar la

ausência de crescimento de *Borde/alia partussis. .*

3.5.2. PROVA DE TOXICIDADE ESPECiFICA (PB.2)

Uma amostra da Coleta Individuallnativada é submetida à Prova de Toxicidade especifica (Ganho de PesÇl)

em camundongos albinos suiços susceptíveis. Os animais ao final da prova devem apresentar ganho de peso .

3.6. CONTROLE DA VACINA PERTUSSISCONCENTRADA ACABADO A GRANEL

3.6.1. PROVA DE ESTERILIDADE BACTERIANA E FÚNGICA (PM.1)

*I*

Uma amostra da Vacina Pertussis Produto Acabado a Granel é submetida à prova de Esterilidade

Bacteriana e Fúngica, Não deve apresentar crescimento de bactérias ou fUngOR.

3.6.2. PROVA DE TOXICIDADE ESPECIFICA (PB.2)

Uma amostra da Vacina Petlussis Produto Acabado a Granel é submetida à Prova Indicada no Item 3.5.2.

3.6.3. CONTROLE DA PUREZA (PM.2)

Uma amostra da Vacina Pertussls Produto Acabado a Granel é submetida à prova indicada no Item 3.2.1.1

3.6.4. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostra da Vacina Pertussls Produto Acabado a Granel é submetida ao determinação de pH. O pH

deve estar entre 6,7 a 7,3.

3.6.5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FORMALDEIDO RESIDUAL (PFQ.4)

Uma amostra da Vacina Pertussis Produto Acabado a Granel é submetida à prova indicada no Item 3.4.3.

3.6.6. PROVA DE IDENTIDADE (PB.7)

N° 220 TERÇA-FEIRA, 12 NOV 1996 DIÁRIO OFICIAL SEÇÃO 1 ~ 23515

Uma amostra da Vacina Pertussis Produto Acabado a Granel é submetida á Prova de Identidade indicada no

Item 3.3.3.

3.6.7. CONTROLE DA OPACIDADE (PM.4)

Uma amostra da Vacina Pertussis Produto Acabado a Granel é submetida á prova indicada no Item 3.3.4.

3.6.8. PROVA DE ATIVIDADE IMUNOG~NICA (PB.5)

Uma amostra da Vacina Pertussis Produto Acabado a Granel, dilulda em SOlUça0fisiológica á concentração

de uma Dose Individual Humana (011-1), é submetida a prova de Atividade Imunogênica em camundongos albinos

IUiçoS susceptlvels. A Atividade Imunogênica do produto não deve ser inferior a 4 UI/Dose Individual Humana.

4. ESTOCAGEM

A Vacina Pertussis Produto Acabado à Granel deve ser acondicionada em frascos de vidro classe

farmacêutica e mantida á temperatura de 4°C a 8°C.

5. ROTULAGEM

o r6tulo do frasco que contem a Vacina Pertussis Produto Acabado a Granel deve apresentar, no mIni mo,

ai seguintes informações:

• nomít do produtor

• nome do produto

• n~mero do lote

• volume tolll

• concentrlçlo (unidade opacimétrica por mililitro)

• dali do ~Itimo teste da atividade imunogênica

6. REGISTROS

OI dldol do processo de fabrícação de cada Lote da Vacina Pertussls Produto Acabado a Granel e os

ralultldol dai provas de controle devem ser registrados em Protocolos e arquivados.

7. ARQUIVO DE AMOST~

DeVI ser conservada na Unidade Produtora uma amostra de cada Lote/ou Sub-lote do Produto Acabado a

Grlnei \* temperatura di 4·C a 8°C devidamente identificada, até 36 meses a partir da data da ~Itima diluição

para a obtençlo da Vacina Trlplice (DTP).

a. UTILIZAÇÃO

A utillzaçlo doi Lotei da Vaclna Pertussis Produto Acabado a Granel somente poderá ser autorizada após a

. ~ pelo Controle ela Qualidade Intemo.

NORMAS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DAANATOXINA

TETÂNICA

1, Dl!FINlçOE8

1.1. OENOMINAÇÃO

AnMoldnI T,\*,1cII

U. Dl!FINIÇAo DESCRmvA

A AnMoldnI TIIAnlca • uma Toxina rltinlca que destoxificada perde sua capacidade toxigênlca, porém

manl6illlUllllvldldl1nQlog6n1cll.

1.3. PADROI!IINTERNACIONAlS DE REFER~NCIA

OI PIdrOeI InWNlclonaII 110 mantldol I dlttrlbuldol pelo SlItens Seruminstitut of Copen'haguen -

DInamMII.

1.3.1. O Itgundo Pldrlo Internacional d. Rllertncla di Anlltoxlna Tetanica (estabelecido em 1969), é

dlltrlbuldo I!lII.IborII6rIoI di Produçlo a Controlt em ampolas que cont6m soro equlno hiperimune liofilizado

com UOO UI/ampoII, \_\_ te a 1.000 Lflampoll.

1.3.2. O Itgundo PIdrIo Inllmaclonal do roxójde Tltanlco adsorvldo (esllbelecldo em 1981), é distribuldo aos

Laboral6rlol di ProdI.IOIOI Controle na formIIlloftllzada, Im ampolas contendo 340 UI.

'1.3.3. O PrlmIlnl PIdrIo InWrnIclonaI di Raler6ncla para Anatoxlna Tetânica para provas de l1oculaçao

(1I11b1l1cldo Im 1\_),' diIlrIbuldo IOIlaboretórlos di Produçlo e Controle, e contém 1.000 Lf/ampola.

1.4. TERMINOLOGIA

1.4.1. LOTE-SEMENTI!

Quantldadl di Impolal contendo *CIoItrldicJm* tellnlllQfillzado, de composição uniforme, obtido a partir de

uma cepa liofilizada di procedtncla conhtclcla.

1.4.2. INÓCULO DE PRODUÇÃO

Quantidade de *Clostrldium* lIlInI obtido a partir di uma ampola do Lote-Semente liofilizado.

1.4.3. CULTIVO DE PRODUÇÃO

Suspensão de *Clostrtrldlum* tellnl produzida Im um ~nlco processo.

1.4.4. TOXINA TETÂNICA

Filtrado tóxico, obtido a partir do melo de cultura para preparação de Toxina, InQCulado com Inoculo da

Produção e coletado em um ünlee prOClSIO.

1.4.5. TOXINA TETÂNICA CONCENTRADA

Toxina Tetânica concentrada, por método flslco e obtida em um (mico processo.

1.4.6. ANATOXINA TETÂNICA A GRANEL

Filtrado at6xlco, obtido de uma Toxina ou Toxina Tetlnlca Concentrada por deltoxiftcaçlo com formaldeldo

• temperatura de 35'C.

1.4.7.ANATOXINA TETÂNICA PRODUTO ACABADO A GRANEL

Anatoxina Tetànlca purificada e concentrada, homogênea, obtida de uma partida ou da mistura de mais

partidas de Anatoxina Tetânica a Granel, terminadas e contidas em um únlco recipiente, aprovada e liberada,

com caracterlsticas de qualidade estabelecidas por estas Normas.

1.4.8. LOTE

Quantidade de Anatoxina Tetánica Produto Acabado a Granel identificada e produzida de acordo com um

único protocolo de produção.

1.4.9. SUB·LOTE

Fração especifica e identificada de um Lote de Anatoxina Tetànlca Produto Acabado a Granel.

2. NORMAS GERAIS DE PRODUÇÃO ECONTROLE

O trabalho na produção da Anatoxina Tetanica requer o cumprimento de Boas Práticas de Fabricação e

Normas de Biossegurança.

O pessoal do laboratório deve ser alertado quanto aos riscos potênciais a que estão submetidos durante seu

trabalho rotineiro. Para minimizar esses riscos, o pessoal doJaborat6rio deve:

• Ser previamente imunizado contra tétano e ter controlada sua resposta imune por soro neutralização pelo

menos uma vez.ao ano, e apresentar umtilulq mlnimo de 0,01 Ullml de Antitoxina Tetânica circulante.

• Receber treinamento sobre a correia utilização e manejo dos equipamentos de produção e de contenção

primária e secundária, com que conta a Unidade Produtora. .

• Todas as operações de produção até o final da destoxãcação, deverão realizar-se em locais apropriados,

completamente Isolados e utilizando equipamentos exclusivos da Unidade.

As atividades de Produção e Controle devem seguir os Manuais de Procedimentos aprovados pela

Instituição Produtora.

3. CONTROLE DAS OPERAÇOÊS DE PRODUÇÃO

A preparação da Anatoxina Tetânica baseia-se no sistema de Lote-Semente. O Lote-Semente empregado

em sua produção deve ter as mesmas caracterlsticas da cepa da qual procede o Lote-Semente liofilizado iniciai.

3.1. CONTROLE DA MAT~RIA-PRIMA

3.1.1. CEPAS DE PRODUÇÃO

As cepas de *Clostrldlum tetanl.* utilizadas na produção de Anatoxina, devem ser liofilizadas e mantidas à

temperatura não maior que 4°C e suas caracterlsticas registradas em protocolos.

3.1.2. MEIOS DECULTURA

3.1.2.1. MEIOS DE CULTURA PARA PREPARAÇÃO DO LOTE-5EMENTE

Estes meios de cultura devem permitir o crescimento de *Clostrldlum tetanl* em 24 horas a 35°C.

3.1.2.2. MEIOS DE CULTURA PARA PREPARAÇÃO DO iNÓCULO DE PRODUçAo

Este meio de cultura deve ser capaz de permitir o crescimento de *Clostridlum tatanl*em 24 horas a.35'C.

3.1.2.3. MEIOS DE CULTURA PARA PREPARAÇÃO DA TOXINA

Os componentes destes meios de cultura devem permitir o crescimento de *Clostrldlum tetanl* e assegurar a

produção de Toxina Tetânica, com titulo mJnimo de 30 Lf/ml. Nãodeve conter protelnas de origem animai e nem

inducir reações tóxicas e/ou alérgicas.

3.2. CONTROLE DO LOTE-SEMENTE

3.2.1.·CONTROLE DA PUREZA (PM.2)

3.2.1.1. CONTROLE MICROSCÓPICO

Um esfregaço do Lote-Semente corado pelo método de Gram, deve ser submetido a exame microscópico.

Deverá ser observado somente população uniforme de bacilos Gram positivos.

3.2.1.2. PROVA DE AU5~NCIA DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES

~

Uma amostra do Lote-Semente é submetida á Prova de Ausência de Microorganismos Contaminantes,

inoculando-se em meios de culturas recomendados.Após lncubação em condiç6es de anaerobiose, deve haver

somente crescimento de *Clostrldlum tetanl.* Quando Incubado em condições de aeroblose, não deve haver

crescimento de bactérias ou fungos.

3.2.2. DETERMINAÇÃO DO liMITE DEFLOCULAÇÃO (PB.1)

Uma amostra do Lote-Semente, Inoculada e incubada em melo de produção de toxina, é submetida á prova

de floculação de Ramon. Deve produzir concentração de Toxina semelhante a concentração indicada no lote

originaI.

3.3. CONTROLE DO INÓCULODE PRODUÇÃO

3.3.1. CONTROLE DA PUREZA (PM.2)

Uma amostra do lnóculo de Produção é submetida á prova indicada no item 3.2.1.

3.4. CONTROLE DO CULTIVO DE PRODUÇÃO DE TOXINA

3.4.1. CONTROLE DE PUREZA (PM.2)

Uma amostra do cultivo é submetida á prova indicada no item 3.2.1.

3.4.2. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DEFLOCULAÇÃO (PB.1)

Uma amostra do Cultivo de produção da Toxina após filtração é submetida á prova indicada de floculaçao de

Ramon.Deveter no mlnimo 30 Lf/ml, parasua utilizaçao como materia prima

3.4.3. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostra do cultivo é submetida a determinação de pH.

3.5. CONTROLE DE TOXINA TETÃNICA

3.5.1. DETERMINAÇÃO DO liMITE DEFLOCULAÇÃO (P.B.1)

,

'S

23516 SEÇÃO **DIÁRIO OFICIAL** N° 220 TERÇA-FEIRA, 12NOV 1996

Uma amostra de Toxina é submetida á prova Indicada no Item 3.4.2.

3.5.2. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostra de Toxina é submetida á determinação de pH.

3.6. CONTROLE DE TOXINA TETÂNICA CONCENTRADA

3.6.1. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE FLOCULAçAO (P8.1)

Uma amostra de Toxina concentrada é submetida á prova indicada no Item 3.4.2.

3.6.2. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostra de Toxina concentrada é submeiida à determinação de pH.

3.7. CONTROLE DA ANATOXINA TETÂNICA A GRANEL

3.7.1 PROVA DE TOXICIDADE ESPECIFICA (PB.2)

Uma amostra da Anatoxina a Granel é submetida á prova de Toxicldade Especifica Pelo menos 80% dos

animais Inoculados devem sobreviver durante o perlodo de observação. sem apresentar sinal de~toxicação

tetânica,

3.7.2. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE FLOCULAÇÃO (PB.1)

Uma amostra da Anatoxina a Granel é submetida á prova indicada no Item 3.4,2,

3.7.3. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

Uma amostra da Anatoxina a Granel é submetida a determinação de pH.

3.8. CONTROLE DA ANATOXINA TETÂNICA PRODUTO ACABADO A GRANEL

3.8.1. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE FLOCULAÇÃO (PFQ.1)

Uma amostra da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel é submetida á prova indicada no item 3.4.2.

3.8.2. DETERMINAÇÃO DA PUREZA ANTIGeNICA

Uma amostra da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel é submetida ao Método de Micro-Kjeldhal

para. a determinação da quantidade de nitrogênio protéico (PFQ6). A Pureza Antigênlca é obtida da relação do

valor em Lf/ml (PB1) e a concentração em mg de nitrogênio protéico/ml. A Anatoxina Tetãnica Produto Acabado a

Granel deverá ter, pelo menos 1.000 Lf/mg de nitrogênio protéico.

3.8.3. PROVA DE TOXICIDADE ESPECiFICA (PB.2)

Uma amostra da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel deve ser submetida á prova. de Toxicidade

Especifica. Pelo menos 80% dos animais inoculados devem sobreviver durante o perlodo de observação, sem

apresentar sinal de intoxicação tetânica.

3.8.4. PROVA DE ESTERILIDADE BACTERIANA E FÚNGICA (PM.1)

Uma amostra da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel é submetida á prova de Esterilidade

Bacteriana e Fúngica. Não deve apresentar crescimento de bactérias ou fungos ao final da prova.

3.8.5. DETERMINAÇÃO DE pH (PFQ.1)

. Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel é submetida á determinação de pH, deve ter um pH de 6.0 a

7,0. .

3.8.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FORMALDEIDO RESIDUAL (PFQ.4)

Uma amostra da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel é submetida á determinação de

Formaldeldo Residual. sendo o maximo permitido 200 ppm,

3.8.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TIMEROSAL (PFQ.2)

Uma amostra da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel é submetida á determinação de Tlrnerosal,

sendo o máximo permitido 200 ppm.

3.8.8. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SULFATO DE AMONIO (PFQ.8)

Uma amostra da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel é submetida á Determinaçâo de Sulfato de

Amônio, sendo o máximo permitido 200 ppm de sulfato. •

3.8.9. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLORETO DE SÓDIO (PFQ.7)

Uma amostra da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel é submetida á Determinaçâo de Cloreto de

Sódio, sendo o máximo permitido 0.90g %.

3.8.10. PROVA DE REVERSÃO DE TOXICIDADE (PB.4)

Uma amostra de Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Gran~í é dlluída e- inoculada em cobaias. Os

animais não devem apresentar perda de peso, sintomas de intoxicaçâo tetânica ao término da prova.

3.8.11. PROVA DE ATIVIDADE IMUNOGeNICA (PB.5)

Uma amostra da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel é dilulda em solução fisiológica esterilizada

á concentração de uma Dose Individual Humana (DIHLe adsorvida.

3.8.11.1. MÉTODO AMERICÀNO (NIH)

Uma amostra da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel adsorvida é inoculada em cobaias. A

atividade antitóxica do soro dos animais vacinados deve ter, no mlnimo 2 UI/dose.

3.8.11.2. MeTODO DESAFIO (OMS)

A Atividade Imunogênica da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel adsorvida é comprovada por

comparação com um Toxóide Tetânico de Referência. A atividade Imunogênica do produto não deve ser inferior a

40 UI/Dose Individual Humana.

4. ESTOCAGEM

A Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel deve ser acondicionada em frascos de vidro classe

farmacêutica e mantida a uma temperatura de 4'C a 8'C.

5. ROTULAGEM

O rótulo do frasco que contém a Anatoxina Tetãnica Produto Acabado a Granel deve apresentar, n~ mlnimo,

as seguintes informações:

• nome do produtor

• nome do produto

• número de lote

• volume total

• concentração (Lf/ml)

- preservativo (nome do preservativo e concentração)

- data da filtração esterilizante

6. REGISTROS

Os dados do processo de fabricação de cada Lote da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel e os

resultados das provas de controle são registrados em Protocolos e arquivados,

7. ARQUIVO DE AMOSTRA

Deverá ser conservada, na seção Produtora; uma amostra de cada Lote/ou Sub-Iote do Produto Acabado a

Granel a uma temperatura de 4'C a 8'C, devidamente identificada, até 36 meses a partir dá data da última

diluição para Toxólde Tetânico adsorvldo (TI), Vacina Dupla uso Infantil (DT), Vacina Dupla uso Adulto (dT) ou

Vacina Trfplice (DTP).

8. UTILlZAÇAo

A utilização dos Lotes ou Sub-lotes da Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel somente poderá ser

autorizada após liberação pelo Controle da Qualidade Interno.

NORMAS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO TOXÓIDE

TETÂNICO (TI)

1.DEFINIÇOES

1.1. DENOMINAÇÂO

Toxóide Tetânico (Vacina Tetânica Adsorvida)

1.2. DEFINIÇAo DESCRITIVA

O Toxóide Tetãnico é uma Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel dilulda em Solução Salina

Tamponada e adsorvida pelo Hidróxido de AJumlnio ou Fosfato de AJumlnlo, contendo como preservatiVo

Timerosal.

1.3. PADROES INTERNACIONAIS DE REFEReNCIA

Os Padrões Intemacionais são mantidos e distribuldos pelo Statens Seruminslilut, Copenhaguen -

Dinamarca.

1.3.1. O Segundo Padrão Internacional de Referência da Antitoxina Tetãnlca (estabel.ecido em 1969), é

distribuldo aos Laboratórios de Produção e Controle em ampolas que contêm soro equino hiperimune liofilizado,

com 1.400 Ullampqla, equivalente a 1.000 Lf/ampola.

1.3.2. O Segundo Padrão Intemacional de Referência de Toxóide Tetânico Adsorvido (estabelecido em 1981),é

distribuldo aos Laboratórios de Produção e Controle na forma liofilizada, em ampolas contendo 340 UI.

1.4. TERMINOLOGIA

1.4.1. LOTE DE TÓXÓIDE TETÂNICO(TI) PRODUTO ACABADO A GRANEL

Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel dilulda e adsorvida, contida em um único recipiente e com as

caracterfsticas de qualidade dentro dos limites estabelecidos por estas Normas.

1.4.2. LOTE FINAL DO TOXÓIDE TETÂNICO (TT)

Quantidade de Toxóide Tetânico (TI) Produto Acabado a Granel, devidamente envasado em ampolas *0\1*

frascos-ampola, Identificado e produzido de acordo com um único Protocolo de produção.

1.4.3. SUB-LOfE

*f,."*

Fração especifica e identificada de um Lote final de Toxóide Tetânico (TT).

2. NORMAS GERAIS DE PRODUÇÃO E CONTROLE

O trabalho na produção do Tox610eTetânico (TT) requer o cumprimento de Boas Práticas de Fabricação.

As atividades de Produção e Controle devem seguir os Manuais de Procedimentos aprovados pela

Insliluição Produtora.

3. CONTROLE DAS OPERAÇOES DE PRODUÇÃO

3.1. CONTROLE DA MATÉRIA-PRIMA

3.1.1. LOTE DAANATOXINA TETÂNICA PRODUTO ACABADO A GRANEL

A Anatoxina Tetãnlca Produto Acabado a Granel a ser utilizada deve estar liberada pelo Controle de

Qualidade Interno.

3.1.2. HIDRÓXIDO DEALUMINIO OU FOSFATO DEALUMINIO

O Lote de gel de Hidróxido de Alumlnio ou Fosfato de Alumlnio a ser utilizádo, deve estar liberado pelo

Controle de Qualidade Interno.

3.1.3. TIMEROSAL

O Lote de Timerosal e o lote da solução de timerosal a serem utilizados devem estar liberados pelo Controle

de Qualidade Interno.

3.1.4. SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA

O Lote de Solução Salina Tamponada a ser utilizado deve estar liberado pelo Controle de Qualidade Intemo.

3.2. CONTROLE DO TOXÓIDE TETÂNICO (Tf) PRODUTO ACABADO A GRANEL

Nó 220 TERÇA-FEIRA., 12 NOV 1996 **DIÁRIO OFICIAL** SEçAo 1 23517

3.2.1. PROVA DE ESTERILIDADE BACTERIANA E FÚNGICA (PM.1) 7.1.TOXÓIDE TETÂNICO PRODUTO ACABADO A GRANEL

Uma amostra do Toxóide Tetânico (TI) Produto Acabado a Granel é submetida à prova de Esterilidade

Bacteriana e FOngica. Não deve apresentar crescimento de bactérias ou fungos ao final da prova.

3.2.2. PROVA DE INOCUIDADE (TOXICIDADE INESPECIFICA) (PB.3)

Uma amostra do Toxóide Tetanico (TT) Produto Acabado a Granel é submetida à prova de

Inocuidade,.utilizando-se camundongos albinos suiços e cobaias. Para que o produto seja considerado aprovado,

os animais devem sobreviver e apresentar ganho de peso ao final da prova.

3.2.3. PROVA DE ATIVIDADE IMUNOG~NICA (pB.5)

Uma amostra do Tóxóide Tetânico (TT) Produto Acabado a Granel é submetida à prova de Atividade

Imunogênica.

3.2.3.1. MéTODO AMERICANO (NIH)

Uma amostra do Toxóide Tetânico (TT) Produto Acabado a Granel, é Inoculada em cobaias. A atividade

antitóxica do soro dos animais vacinados deve ter, no mlnimo 2 UI/dose.

3.2.3.1. MÉTODO DESAFIO (OMS)

A atividade Imunogênica do Toxóide Tetanico (TI) Produto Acabado a Granel, é comprovada por

comparação com um Toxóide Tetânico de Referência. A atividade Imunogênica do produto não deve ser Inferior a

40 UI/Dose Individual Humana.

3.2.4. CONTROLE DE pH (PFQ))

Uma alll9stra do Toxóide Tetanico (TI) Produto Acabado a Granel é submetida ao controle de pH, deve ter

um pH de 6,0 a 7,0.

3.2.5•.CONTROLE DE TIMEROSAL (PFQ.2)

Uma amostra do Toxóide Tetanico (TI) Produto Acabado a Granel é submetida ao controle de TImerosal,

sendo o máximo permitido 200 ppm.

3.2.6. CONTROLE DE FORMALDEIDO RESIDUAL (PFQ.4)

t,Jmaamostra do ToxóideTetanico'(TI) ProdutoAcabado a Granel é submetida ao controle de Formaldeldo

-Residual, sendo o máximo permitido 200 ppm.

3.2.7. CONTROLE DE ALUMINIO (PFQ.5)

Uma amostra do Toxóide Tetanlco (TI) Produto Acabado a Granel é submetida ao controle de Alumlnlo,

sendo o máximo permitido 1,25 mg de AI3+/DoseIndividuai Humana.

3.3. CONTROLE DO LOTE FINAL DE TOXÓIDE TETÂNICO (TI)

3.3.1. PROVA Dl: ESTERILIDADE BACTERIANA E FÚNGICA (PM.1)

Uma amostra do Lote Final de Toxóide Tetanico (TI) é submetida à prova Indicada no item 3.2.1.

3.3.2. PROVA DE INOCUIDADE (TOXICIDADE INESPECIFICA) (PB.3)

Uma amostra do Lote Final de Toxólde Tetanico (TI) é submetida à prova indicada no item 3.2.2.

3.3j. PROVA DE ATIVID~DE IMUNOG~NICA (PB.5)

. Uma amostra do Lote Final de Toxólde Tetanico (TI) é submetida à prova indicada n9 Item 3.2.3.

3.3.4. CONTROLE DE pH (PFQ.1)

Uma amostra do Lote Final de Toxóide Tetanico (TI) é submetida à prova indicada no Item 3.2.4.

3.3.5. CONTROLE DE TIMEROSAL (PFQ.2)

Uma amostra do Lote Final de Toxóide Tetânico (TI) é submetida à prova indicada no Item 3.2.5.

3.3,6. CONTROLE DE FORMALDEIDO RESIDUAL (PFQ.4)

Uma amostra do Lote Final de Toxóide Tetânico (TI) é submetida à prova indicada no Item 3.2.6.

3.3.7. CONTROLE DE ALUMINIO (PFQ.5)

Uma amostra do Lote Final de Toxóide Tetânico (TI) é submetida à prova indicada no Item 3.2.7.

3.3.8. CONTROLE DO VOLUME MÉDIO POR AMPOLA OU FRASCO-AMPOLA (PFQ.3)

Uma amostra do Lote Final de Toxóide Tetânico (TI) é submetida a determinação do Volume Médio por

medida direta. O volume mlnimo de cada apresentação é dado de acordo com a tabela indiçada no procedimento

de controle

3.3.9. INSPEÇÃO VISUAL

Todo o Lote Final de Toxóide Tetanico (TI) deve ser inspecionado visualmente fiente a um fundo escuro e

claro. O produto é uma suspensão opalescente, ligeiramente acastanhada, que não deve apresentar grumos ou

partfculas estranhas.

4. ESTOCAGEM

O Lote Final do Toxóide Tetânico (TI) deve ser mantido à temperatura de 4°C a 8°C.

5. ROTULAGEM

Os rótulos do Lote Final do Toxóide Tetânico (H) devem estar de acordo com a Lei .6.360/76 Decreto

*79.094177.*

6. REGISTROS

Os dados do processo de produção de cada Lote Final ou Sub-Iote de Toxóide Tetânico (TI) li os resultados

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

7. ARQUIVO DE AMOSTRA

Deve ser conservada na unidade produtora uma amostra do Toxóide Tetanico Produto Acabado a Granel, â

temperatura de 4°C a 8°C, devidamente Identificado, até 36 meses a partir da Oltima prova de Atividade

Imunogênica.

7.2.LOTE FINAL DETOXÓIDE TETÂNICO (TI)

Deve ser conservada no Controle da Qualidade Interno, amostras do Lote Final ou Sub-Iotes de Toxóide

Tetânico (TI), à temperatura de 4°C a 8°C, devidamente identificada, durante no mlnimo 12 meses após a data

devencimento.

8. EXPEDIÇÂO

A expedição do Lote Final ou sub-tote de Toxóide Tetanlco (TT) somente pode ser autorizada após

liberação pelo Controle de Qualidade Interno e sua utilização após a aprovação pelo Controle de Qualidade

Nacjonal.

9. PRAZO DE VALIDADE

O Prazo de Validade é de 24 meses a partir da data de Inicio da Ollima prova de Atividade Imunogênica

realizada pelo Laboratório Produtor,

NORMASDE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALlDADEDA VACINA DUPLA

USO INFANTIL (Dn

1.DEFINIÇOES

1.1.DENOMINAÇÃO

Vacina Dupla - Uso Infantil (DT)

1.2.DEFINiÇÃO DESCRITIVA

A Vacina. Dupla - Uso Infantil (Dn é uma mistura de Anatoxina Diftérica· Produto Acabado a Gr;;nel e

Anato~ina Tetanica Produto Acabado a Granel, diluldas em Solução Salina Tarnpónada, adSorvidas pelo

Hidróxido de AJumlnioou Fosfato de Alumlnio, contendo como preservativo TImerosal.

1.3.PADROES INTERNACIONAIS DE REFERI:NCIA

Os Padrões Internacionais são mantidos e dislribuldos pelo Statens Serumlnstitut of Oopenhaguen •

Dinamarca.

1.3.1.TOXÓIDE DIFTÉRICO

1.3.1.1. O Padrão Internacional de Anliloxina Diftérica (estabelecido em 1934) conservado em ampolas que

contêm soro equino hiperimune dessecado. É dlstribuldo aos Laboratórios de Produção e Controle dissolvido em

Solução Salina Glicerinada em frasco-ampola, com uma concentração de 10 Ullml. A Unidade Internacional é

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

conserva o Padrão Internacional.

1.3.1.2. O Segundo Padrão Intemacional do Toxóide Diftérico Adsorvido (estabelecido em 1978), é dislribuldo

aos Laboratórios de Produção e Controle na forma liofilizada, em ampolas contendo 132 UI.

1.3.2.TOXÓIDE TETÂNICO

1.3.2.1. O Segundo Padrão Internacional de Referência da Antitoxina Tetânica (estàbelecldo em 1969), é

distribuldo aos Laboratórios de Produção e Controle, em ampolas que contêm soro equino hiperimune liofilizado

com 1.400 UI/ampola, equivalente at 000 Lf/ampola.

1.3.2.2. O Segundo Padrão Internacional do Toxóide Tetãnico Adsorvido (estabelecldo em 1981), é dislribuldo

aos Laboratórios de Produção e Controle na forma liofilizada, em ampolas contendo 340 UI. •

1.4.1.VACINA DUPLA - USO INFANTIL (DT) PRODUTO ACABADO A GRANEL

Mistura de Anatoxinas Diftérica e Tetânica Produto Acabado a Granel díluídas e adsorvidas, contidas em

um único recipiente e com as caracterfsticas de qualidade dentro dos limites estabelecidos por esta Norma. . l

1.4.2.LOTE FINAL DAVACINADUPLA· USO INFANTIL (DT)

Quantidade da Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) Produto Acabado a Granel, devidamente envasada em

ampolas ou frascos-ampola, Identificada e produzido de acordo com um únlco protocolo de produção,

1.4.3.SUB-LOTE

Fração especifica e Identificada de um Lote Final da Vacina Dupla - Uso Infantil (DT).

2. NORMAS GERAIS DEPRODUÇÃO E CONTROLE

O trabalho na produção da Vacina Dupla-Uso Infantil (DT) requer o cumprimento de Boas Práticas de

Fabricação. :

As atividades de Produção e Controle devem seguir os Manuais de Procedimentos aprovados pela

Instiluiçao Produtora.

3. CONTROLE DAS OPERAÇOES DE PRODUÇÂO

3.1. CONTROLE DA MATÉRIA-PRIMA

3.1.1. LOTE. DA ANATOXINA DIFTÉRICA PRODUTO ACABADO A GRANEL

A Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel, a ser utifizada deve estar liberada pelo Controle de

Qualidade Interno.

3.1.2. LOTE DA ANATOXINATETÂNICA PRODUTO ACABADO A GRANEL

A Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel, a ser utilizada deve estar liberada pelo Controle de

Qualidade Interno.

3.1.3. LOTE DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO OU FOSFATO DE ALUMINIO

O Lote de gel de Hidróxido de Alumlnio ou Fosfato de Alumlnio, a ser utifizada deve estar liberado pelo

Controle de Qualidade Interno.

**DIÁRIO OFICIAL** N° 220 TERÇA-FEIRA, 12 NOV 1996

3.1.4. TIMEROSAL

o Lote de Timerosal e o lote da solução de tirnersal, a serem utilizados devem estar liberado pelo Controle

de Qualidade Interno.

3.1.5. SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA

O Lote da Solução Salina Tamponada, a ser utilizada deve estar liberado pelo Controle de Qualidade

Interno.

3.2. CONTROLE DA VACINA DUPLA - USO INFANTIL (DT) PRODUTO ACABADO A GRANEL

3.2.1. PROVA DE ESTERILIDADE BACTERIANA E FÚNGICA (PM.1)

Uma amostra da Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) Produto Acabado a Granel é submetido 'a prova de

Esterilidade Bacteriana e Fúngica. Não deve apresentar crescimento de bactér.iasou fungos ao final da prova.

3.2.2. PROVA DE INOCUIDADE (TOXICIDADE INESPECIFICA) (PB.3)

Uma amostra da Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) Produto Acabado a Granel é submetida à prova de

Inoculdade. Utillzando·se cobaias e camundongos albinos suíços, Para que o produto seja considerado aprovado,

os animais devem sobreviver e apresentar ganho de peso ao final da prova.

3.2.3. PROVA DE ATIVIDADE IMUNOGJ:NICA (PB.5)

Uma amostra de Vacina Dupla • Uso Infantil (DT) Produto Acabado a Granel é submetida a prova de

Atividad~ Imunogênica.

3.2.3.1. MÉTODO AMERICANO (NIH)

3.2.3.1.1. COMPONENTES TETÂNICO E DIFTÉRICO

Uma amostra da Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) Produto Acabado a Granel é inoculada em cobaias. A

atividade do soro dos animais vacinados deve ter, no mlnimo 2 UI/dose para os componentes Tetânico e

Dillérico.

3.2,3.2. MÉTODOS DESAFIO (OMS)

3.2.3.2.1. COMPONENTE TETÂNICO

A atividade Imunogênica da Vacina Dupla- Uso Infantil (DT) Produto Acabado a Granel é comprovada por

comparação com um Toxóide Tetanico de Referência. A atividade Imunogênica do produto não deve ser inferior a

40 UI/Dose Individual Humana.

3.2.3.2.2. COMPONENTE DIFTÉRICO

A atividade Imunogênica da Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) Produto Acabado a Granel é comprovada por

comparação com um Toxóide Dillérico de Referência. A atividade Imuhogênica do produto não deve ser inferior a

30 UI/Dose Individual Humana.

3.2.4. CONTROLE DE pH(PFQ;1}'

A Vacina Dupla - Uso Infantil (DT), Produto Acabado a Granel é submetida ao controle de pH, deve ter pH *~Mam .*

3.2.5. CONTROLE DE TIMEROSAL (PFQ.2)

Uma amostra da Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) Produto Acabado a Granel é submetida ao controle de

Timerosal, sendo o máximo permitido 200 ppm.

3.2.6. CONTROLE DE FORMALDEfDO RESIDUAL (PFQ.4)

Uma amostra da Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) Produto Acabado a Granel é submetida ao controle de

Formaldeldo Residual, sendo o máximo permitido 200 ppm.

3.2.7. CONTROLE DE ALUMINIO (PFQ.5)

Uma amostra da Vacina Dupla » Uso Infantil (DT) Produto Acabado a Granel, é submetida ao controle de

Alumlnio, sendo o máximo permitido 1,25 mg de AI3+/Dose Individual Humana.

3.3. CONTROLE DO LOTE FINAL DE VACINA DUPLA - USO INFANTIL (DT)

3.3.1. PROVA DE ESTERILIDADE BACTERIANA E FÚNGICA (PM.1)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) é submetida à prova indicada no Item 3.2.1.

3.3.2. PROVA DE INOCUIDADE (Toxicidade Inespeclfica) (PB.3)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla- Uso Infantil'(DT) é submetida à prova indicada no item 3.2.2.

3.3.3. PROVA DE ATIVIDADE IMUNOGÉNICA (PB.5)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla - Uso Infaniil (DT) é submetida à prova indicada no item 3.2.3.

3.3.4. CONTROLE DE pH (PFQ.1)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) é submetida à prova indicada no item 3.2.4.

3.3.5. CONTROLE DE TIMEROSAL (PFQ.2)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) é submetida à prova indicada no item 3.2.5.

3.3.6. CONTROLE DE FORMALDEIDO RESIDUAL (PFQ.4)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) é submetida à prova indicada no item 3.2.6.

~.3.7. CONTROLE DE ALUMfNIO (PFQ.5)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) é submetida à prova indicada no item 3.2.7.

3.3.8. DETERMINAÇÃO DO VOLUME MÉDIO POR AMPOLA OU FRASCO·AMPOLA (PFQ.3)

Uma amostra do Lote Final da Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) é submetida a determinação do Volume

Médio por medida direta. O volume mlnimo de cada apresentação é dado de acordo com a tabela indicada no

procedimento de Controle de Qualidade.

3.3.9. INSPEÇÃO VISUAL

Todo o Lote Final de Vacina Dupla- Uso Infantil (DT), deve ser inspecionado visualmente, frente a um fundo

escuro e claro. O produto é uma suspensão opalescente, ligeiramente acastanhada que não deve apresentar

grumos ou partlculas estranhas.

4. ESTOCAGEM

O Lote Finàlde Vacina Dupla- Uso Infantil (DT) deve ser mantido à temperatura de 4'C a 8'C.

5. ROTULAGEM

Os rótulos do Lote Final de Vacina Dupla - Uso Infantil (DT), devem estar de acordo com a Lei 6.630/76

Decreto *79.094177.*

6. REGISTROS

Os dados dos processo de produçãode cada Lote Final ou Sub-lote de Vacina Dupla. Uso Infantil (DT) e os

resultados das provas de controle devem ser registrados em Protocolos e arquivados.

7. ARQUIVO DEAMOSTRA

7.1. VACINA DUPLA- USO INFANTIL(DT) PRODUTOACABADOAGRANEL

Deve ser conservado na unidade.produtora, uma amostra de Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) Produto

Acabado a Granel a temperatura de 4'C a 8'C devidamente identificada, por 36 meses a partir da data da última

prova de Atividade Imunogênica.

7.2. LOTE FINAL DAVACINA DUPLA- USO INFANTIL (DT)

Deve ser conservado no Controle de Qualidade Interno, amostras do Lote Final ou Sub·lotes de Vacina

Dupla - Uso Infantil (DT) à temperatura de 4'C a 8'C, devidamente identificada, durante no mlnlmo 12 meses

após a data de vencimento.

8. EXPEDIl;;ÃO

A expedição do Lote Final ou Sub-lote de Vacina Dupla - Uso Infantil (DT) somente pode ser autorizada após

liberação pelo Controle da Qualidade Interno e sua utilização apos aprovação pelo Controle da Qualidade

Nacional.

9. PRAZO DEVALIDADE

O Prazo de Validade é de 24 meses a partir do inIcio da última prova de Atividade Imunogênlca realizada

pelo Laboratório Produtor.

NORMAS DE PRODUÇÃOE CONTROLE DE QUALIDADE DA VACINA DUPLA

USO ADULTO (dI) .

1. DEFINIÇÓES

1.1. DENOMINAÇÂO

Vacina Dúpla - Uso Adulto (dT)

1.2. DEFINiÇÃO DESCRITIVA

A Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) é uma mistura de Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel e

Anatoxina Tetanica Produto Acabado a Granel, diluldas em Solução Salina Tamponada, adsorvidas pelo

Hidróxido de Aluminio ou Fosfato de Alumlnio contendo como preservativo Timerosal. A concentração final de

Anatoxina Diflérica não d:ve ser superior a 2 Lf/Dose Individual Humana.

1.3. PADRÓES INTERNACIONAIS DE REFERÉNCIA

Os Padrões Internacionais são mantidos e distribuldos pelo Statens Seruminstitut of Copenhaguen -

Dinamarca. .

1.3.1. TOXÓIDE DIFTÉRICO

1.3.1.1.' O Padrão Internacional de Antitoxina Dillérica (estabelecido em 1934) conservado em ampolas que

contêm soro eqOinohlperimune dessecado. É distribuldo aos Laboratórios de Produção e Controle dissolvido em

Solução Salina Glicerinada em frasco ampola, com uma concentração de 10 UI/ml. A Unidade Internacional é

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

conserva q Padrão Intemacional. '.

1.3.1.2. O Segundo Padrão Internacional de Toxóide Diftérico Adsorvido (estabelecido em 1978), é dislribufdo

aos Laboratórios de Produção e Controle na forma liofilizada, em ampolas contendo 132 UI.

1.3.2. TOXÓIDE TETÂNICO

1.3.2.1. O Segundo Padrão Internacional de Referência da Antitoxina Tetânica (estabelecldo em 1969), é

distribuldo aos Laboratórios de Produção e Controle, em ampolas que contêm soro eqOino hiperimune liofilizado

com 1400 UI/ampola,equivalente a 1000 Lf/ampola.

1.3.2.2. O Segundo Padrão Internacional do Toxóide Tetânico Adsorvido (estabelecido em 1981), é distribuldo

aos Laboratórios de Produção e Controle na forma liofilizada, em ampolas contendo 340 UI.

1.4. TERMINOLOGIA

1.4.1. VACINA DUPLA- USO ADULTO (dT) PRODUTO ACABADO A GRANEL

Mistura de Anatoxinas Diflérica e Tetânica Produto Acabado a Granel diluldas e adsorvidas, contidas em

um único recipiente e com caracterlsticas de qualidade dentro dos limites estabelecidos por estas Normas.

1.4.2. LOTE FINAL DEVACINA DUPLA- USOADULTO (dT)

Quantidade da Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) Produto Acabado a Granel, devidamente envasada em

ampolas ou frascos-ampola, identificada e produzida de acordo com um único protocolo de produção.

1.4.3. SUB·LOTE

Fração especifica e identificada de um Lote Final de Vacina Dupla - Uso Adulto (dT).

2. NORMAS GERAIS DE PRODUÇÃO E CONTROLE

O trabalho na produção da Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) requer o cumprimento de Boas Práticas de

N° 220 TERÇA-FEIRA, 12 NOV 1996 **DIÁRIO OFICIAL** SEÇÃO 1

Fabricação.

As atividades de Produção e Controle devem seguir os Manuais de Procedimentos aprovados pela

Instituição Produtora.

3. CONTROLE DAS OPERAÇOES DE PRODUÇÂO

3.1. CONTROLE DA MATÉRIA-PRIMA

3.1.1. LOTE ()A ANATOXINA DIFTÉRICA PRODUTOACABADO A GRANEL

A Anatoxina Diflérica Produto Acabado a Granel a ser utilizada deve estar liberada pelo Controle de

Qualidade Interno. \_

3.1.2. LOTE DA ANATOXINA TETÂNICA PRODUTOACABADO A GRANEL

A Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel a ser utilizada deve estar liberada pelo Controle de

Qualidade Interno.

3.1.3. HIDRÓXIDO DE ALUM(NIO OU FOSFÁTO DEALUMINIO

O Lote de gel de Hidr6xido de Alumlnlo ou Fosfato de Alumlnio a ser utilizado deve estar liberado pelo

Controle de Qualidade Interno.

3.1.4. T1MEROSAL

O Lote de Timerosal e o lote da solução de timerosal a serem utilizados devem estar liberados pelo Controle

de Qualidade Interno.

3.1.5. SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA

O Lote da Solução Salina Tamponada a ser utilizados deve estar liberado pelo Controle de dualidade

Interno.

3.2. CONTROLE DA VACINA DUPLA - USO ADULTO (dT) PRODUTO ACABADO A GRANEL

•3.2; 1. PROVA DE ESTERILIDADE BACTERIANA E FÚNGICA (PM.1)

Uma amostra da Vacina Dupla - Uso adulto (dT) Produto Acabado a Granel é submetida a prova de

Esterilidade Bacteriana e Fúngica. Não deve apresentarcrescimento de bactérias ou fungos ao final da prova.

3.2.2. PROVA DE INOCUIDADE (TOXICIDADE INESPECIFICA) (PB.3)

Uma amostra da Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) Produto Acabado a Granel é submetida à prova de

Inocuidade, utilizando-se cobaias e camundongos albinos suiços. Para que o produto seja consideradó aprovado,

os animais devem 'sobreviver e apresentar ganhode peso ao final da prova.

3.2.3. PROVA DE ATIVIDADE IMUNOGÉNICA (PB.5)

Uma amostra da Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) Produto Acabado a Granel é submetida à prova -de

Atividade ImunOQênlca.

3.2.3.1. MÉTODO AMERicANO (NIH)

Uma amostra da VaciQa Dupla - Uso Adulto (dT) Produto Acabado a Granel é submetida à prova de

Atividade Imunogênlca.

3.2.3.1.1. COMPONENTE TETÂNICO

- Uma amostra da Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) Produto Acabado a Granel, é inoculada em cobaias. A

atividade antit6xica do soro dos animais vacinados deve ter, no minlmo 2 UI/dose.

3.2.~.1.2. COMPONENTE DIFTÉRICO

Uma amostra da Vacina Dupla - Uso adulto Produto Acabado a Granel é inoculado em cobaias. A atividade

anlil6xica do soro dos animais vacinados deve ter, no minlmo 0,5 UI/dose.

3.2.3.2. MÉTODO DESAFIO (OMS)

3.2.3:2.1. COMPONENTE TETÂNICO

• A atividade Imunogênica da Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) Produto Acabado a Granel é comprovada por

comparação com um Tox6ide Tetânico de Referência.A atividade Imunogênica do produto não deve ser inferior a

40 UI/Dose Individuai Humana.

3.2.4. CONT~OLE DEpH (PFO.1)

Uma amostra da Vacina Dupla - Uso adulto (dT) Produto Acabado a Granel é submetida? determinação do

pH, devendo ter um pH de 6,0 a 7,0.

3.2.5. CONTROLE DE TIMEROSAL (PFO.2)

Uma amostra da Vacina Dupla - Uso adulto (dT) Produto Acabado a Granel é submetida ao controle de

Timerosal, sendo o máximo pemnitldo 200 ppm.

3.2.6. CONTROLE DE FORMALDEIDO RESIDUAL (PFQ.4)

Uma amostra da Vacina' Dupla - Uso adulto (dT) Produto Acabado a Granel é submetida ao controle de

Fomnaldeldo Residual, sendo o máximo pemnitido200 ppm.

3.2.7. CONTROLE DE ALUMINIO (PFO.5)

Uma amostra da Vacina Dupla - Uso adult03tdT) Produto Acabado a Granel é submetida ao controle de

Alumlnio, sendo o máximo pemnitido 1,25 mg de AI *IDose* Individual HUmana.

3.3. CONTROLE DO LOTE FINAL DE VACINA DUPLA- USO ADULTO (dT)

3.3.1. PROVA DE ESTERILIDADE BACTERIANA'E FÚNGICA (PM.1)

Uma amostra do Lote Final de Vacina üupla- Uso Adulto (dT) é submetida à prova indicada no Item 3.2.1.

3.3.2. PROVA DE INOCUIDADE (TOXICIDADE INESPECTFICA)(PB.3)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla- Uso Adulto (dT) é submetida à prova Indicada no rtem 3.2.2.

3.3.3. PROVA DE ATIVIDADE IMUNOGÉNICA (PB.5)

23519

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) é submetida à prova Indicada no Item 3.2.3.

3.3.4. CONTROLE DE pH (PFQ.1)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) é submetida à prova indicada no Item 3.2.4.

3.3.5. CONTROLE DE TIMEROSAL (PFQ.2)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) é submetida à prova indicada no Item 3.2.5.

3.3.6. CONTROLE DE FORMALDEfDO RESIDUAL (PFQ.4)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) é submetida à prova indicada no Item 3.2.6.

3.3.7. CONTROLE DE ALUMfNIO (PFQ.5)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) é submetida à prova indicada no Item 3.2.7.

3.3.a. CONTROLE DO VOLUME MÉDIO POR AMPOLA OU FRASCO-AMPOLA (PFO.3)

Uma amostra do Lote Final da Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) é submetida a detemninação do Volume

Médio por medida direta. O volume mlnimo de cada apresentação é dado de acordo com a tabela indicada no

procedimento de controle.

3.3.9. INSPEÇÃO VISUAL

Todo o Lote Final de Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) envasado, deve ser inspecionado visualmente, frente a

um fundo escuro e' claro. O produto é uma suspensão opalescente, ligeiramente acastanhada, que não deve

apresentar gnumos ou partlculas estranhas.

4. ESTOCAGEM

O Lote Final de Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) deve ser mantido à temperatura de 4°C a aoc.

5. ROTULAGEM

Os r6tulos do, Lote Final de Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) deverão estar de acordo com 'a Lei 6.360/76

Decreto 79.094/77.

6. REGISTROS

Os dados dos processos de produção de cada Lote Final ou Sub-lote de Vacina Dupla - Uso Adulto (dT) e

9s resultados das provas de controle devem ser registrados em Protocolos e arquivados.

7. AROUIVO DE AMOSTRA

7.1. VACINA DUPLA - USOADULTO (DT) PRODUTO ACABADO A GRANEL

Deve ser conservada na unidade produtora, uma amostra da Vacina Dupla· Uso adulto (dT) Produto

Acabado a Granel à temperatura de 4°C a aoc, devidamente identificada, por 36 meses a partir da última prova

de Atividade Imunogênica.

7.2. LOTE FINAL DA VACINA DUPLA - USO ADULTO (dT)

Deve ser conservada no Controle de Qualidade Interno, amostra do Lote Final ou Sub-Iote da Vacina Dupla -

Uso Adulto (dT) à temperatura de 4"C a a"C, durante no mlnimo 1~ meses após a data de vencimento.

a. EXPEDiÇÃO

A expedição do Lote Final ou Sub-Iote da Vacina Dupla - Uso Adulto(d'I) somente pode ser autorizada após

a liberação pelo Controle de Oualidade Interno e sua utilização ap6s aprovação pelo Controle de Qualidade

Nacional. *I .*

9. PRAZO'DE VALIDADE

O Prazo de Validade é de 24 meses a partir do inIcio da última prova de Atividade Imuhogênica realizada

pelo laborat6rio Produtor.

NORMAS DE PRODUÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DAVACINA

TRlpLlCE (DTP)

1. DEFINIÇOES

1.1.DENOMINAÇÃO

Vacina Trlplice (DTP)

1.2. DEFINiÇÃO DESCRITIVA

A Vacina Trfplice (DTP) é uma mistura de Anatoxina Diflérica Produto Acabado a Granel, Anatoxina Tetânica

Produto Acabado a Granel e Vacina Pertussis Produto Acabado a Granel, diluldas em Solução \_Salina

Tamponada e adsorvidas pelo Hidr6xido de AlumfniCl ou Fosfato de Alumlnlo, contendo como preservativo

Timerosal.

1.3. PADROES INTERNACIONAIS DE REFERÉNCIA

Os Padrões Internacionais são mantidos e distribuldos pelo Statens Senumlnslilut of Copenhaguen -

Dinamarca.

1.3.1.TOXÓIDE DIFTÉRlCO

1.3.1.1. O Padrão Internacional de Antitoxina Diflérica (estabelecido em 1934) conservado em ampolas que

contém soro equino hiperimune dessecado, É distribuldo aos Laborat6rios de Produção e Controle dissolvido em

Solução Sallna.Glicerlnadaern frasco ampola, com concentração de 10 UI/ml. A Unidade Internacional é definida

como a atividade correspondente a O,062a mg do material dessecado, contido nas ampolas onde se conserva o

Padrão Internacional.

1.3.1.2. O Segundo Padrão Internacional de Tox6ide Diftérico Adsorvido (estabelectdo em '1978), é distribuldo

aos Laborat6rios de Produção e Controle, na fomna liofilizada, em ampolas contendo 132 UI.

1.3.2.VACINA P.ERTUSSIS

1.3.2.1. O Segundo Padrão Internacional de Referência da Vacina Pertussis (estabelecido em 1980),\_é

---------------------~----~ ~--------------------------------------------- ...\_------**------**

•• -.-. ••••••••• \_. ~\_. \_\_ "" ,. •• ~ •.•••• 'W' \_ • IR ft \_ •• O; \_ ••.••• .., ••••• ~ •••• \_ •• \_ •••• \_

23520 SEÇÃO 1 **DIÁRIO OFICIAL** N° 220 TERÇA-FEIRA, 12 NÓV 1996

distribuldo aos Laborat6rios de Produção e Controle em ampolas contendo 25 mg de Vacina liofilizada. Cada

ampola contém 46 UI.

1.3.3. TOXÓIDETETÂNICO

1.3.3.1. O Segundo Padrao Intemacional de Referência da Anliloxina Tetânica (estabelecido em 1969) é

distribuldo aos Laborat6rios de Produção e Controle, em ampolas que contém soro equino hiperimune liofilizado

com 1.400 UI/ampola, equivalente a 1.000 Lf/ampola. •

1.3.3.2. O Segundo Padrão Intemacional do Tox6ide Tetânico Adsorvido (estabelecido em 1981) é dlstríbuído

aos Laborat6rios de Produção e Controle na fomna liofilizada, em ampolas contendo 340 UI.

1.4. TERMINOLOGIA

1.4.1. VACINA TRfPLltE (DTP) PRODUTO ACABADO A GRANEL

Mistura de Anatoxinas Diftérica e Tetânica Produtos Acabados a Granel e Vacina Pertussis Produto

Acabado a Granel, diluldas e adsorvidas, contidas em um único recipiente e com as caracterlsticas de qualidade

dentro dos limites estabelecidos por estas Normas.

1.4.2. LOTE FINAL DE VACINA TRlpLlCE (DTP)

Quantidade da Vacina Trlplice (DTP) Produto Acabado a Granel, devidamente envasada em ampolas ou

frascos-ampola, identificada e produzida de acordo com um único protocolo de fabricação.

1.4.3. SUB·LOTE

Fração especifica e identificada de um Lote Final de Vacina Trlplice (DTP).

2. NORMAS GERAIS DE PRODUÇÃO E CONTROLE

O trabalho na produção da Vacina Trlplice (DTP) requer o cumprimento de Boas Práticas de Fabricação.

As atividades de Produção e Controle devem seguir os Manuais de Procedimentos aprovados pela

Instituição Produtora.

3. CONTROLE DAS OPERAÇOES DE PRODUÇÃO

3.1. CONTROLE DAMATÉRIA·PRIMA

3.1.1. LOTE DA ANATOXINA DIFTÉRICA PRODUTO ACABADO A GRANEL

A Anátoxina Diftérica Produto Acabado a Granel a ser utilizado deve estar liberada pelo Controle de

qualidade Intemo.

3.1.2. LOTE DAVACINA PERTUSSIS PRODUTO ACABADO A GRANEL

A Vacina Pertussi! Produto Acabado a Granel a ser utilizado deve estar liberada pelo Controle de

Qualidade Intemo.

3.1.3. LOTE DAANATOXINA TETÂNICA PRODUTO ACABADO AGRANEL

. A Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Grane! a ser utilizado deve estar liberada pelo Controle de

Qualidade Interno.

3.1.4. HIDRÓXIDO DEALUMINIO OU FOSFATO DEALUMINIO

O Lote de gel de Hidr6xido de Alumlnio ou Fosfato de Alumlnio'a ser utilizado deve estar liberado pelo

Controle de Qualidade Intemo.

3.1.5. TIMEROSAL

O Lote de Timerosal e o lote da solução de timerosal a ser utilizado deve estar liberado pelOControle de

Qualidade Interno.

3.1.6. SOLUÇÃO SALINA TAMPO NADA

O Lote da SOlUça0 Salina Tamponada a ser utilizado deve estar liberado pelo controíe de Qualidade

Intemo.

3.2. CONTROLE DE VAÇINA TRfPLlCE (DTP) PRODUTO ACABADO"A GRANEL

3.2.1. PROVA DE ESTERILIDADE BACTERIANA E FÚNGICA (PM.1)

U!'"a amo~~ da Vacina Trlpllce (DTP) Produto Acabado a Granel é submetida á prova de Esterilidade

Bactenana e Funglca. Não deve apresentar crescimento de bactérias ou fungos.

3.2.2. PROVA DE INOCUIDADE (TOXICIDADE INESPECIFICA) (PB.3)

.. Uma amos~ da Vacina Trlplice (DTP) Produto Acabado a Granel é submetida á prova de inocuidade,

utihzando-se ~balas e camundongos albinos suiços. Para que o produto seja considerado inócuo, os animais

devem sobreVIVere apresentar ganho de.pese ao final dajirova,

3.2.3. PROVA DE ATIVIDADE IMUNOGÉNICA (PB;5) •

Uma amoslrl! da Vacina Tr.lplice (DTP) Produto Acabado a Granel é submetida á prova de atividade

imunogênica. .

3.2.3.1. COMPONENTE DIFTÉRICO

3.2.3.1.1. MÉTODO-AMERICANO (NIH)

. U!'"a amostra da Vacina Trlplice (DTP), Produto Acabado a Granel, é Inoculada em cobaias. A atividade

antltéxica do soro dos animais vacinados deve ter, no mlnimo 2 UI/dose.

3.2.3.1.2. MÉTODO DESAFIO (OMS)

A atividade imunogênica da Vacina Tríplice (DTP) Produto Acabado a Granel, é comprovada por

comparação com um Tox6ide.Diftérico de Referência. A atividade Imunogênica do produto não deve ser inferior a

30 UI/Dose Individual Humana-,

3.2.3.2. COMPONENTE PERTUSSIS

Uma. amOstra da Vacina Trlplice (DTP) Produto Acabada a Granel, é submetida a prova de -Atividade

lmunogêlllca em camundongos albinos suiços suceplivels, é comprovado por comparação com uma Vacina

Pertussls de Referência. A atividade Imunogênica do produto não deve ser inferior a 4 UI/Dose Individuai

Humana. . '

3.2.3.3. COMPONENTE TETÂNICA

3.2.3.3.1. MÉTODO AMERICANO (NIH)

. U!'"a amostra da Vacina Trlplice (DTP), Produto Acabado a Granel, é inoculada em cobaias. A ativIdade

antitóxlca do SO[O dos animais vacinados deve ter, no minlmo '2 UI/dose.

3.2.3.3.2. MÉTODO DESAFIO (OMS)

A Atividade. Imunogênica da Vacina Trlplice (DTP) Produto Acabado a Granel é comprovada por

comparação com um Tox6ide Tetânico de Referência. A atividade Imunogênica do produto não deve ser inferior a

60 UI/Dose Individual Humana.

3.2.4, CONTROLE DE pH (PFQ.1)

Uma amostra da Vacina Trlplice (DTP) Produto Acabado a Granel é submetida a determinação do pH. O pH

deve ser 6,0 a 7,0

3.2.5. CONTROLE DE TIMEROSAL (PFQ.2)

Uma amostra da Vacina Trlplice (DTP) Produto Acabado a Gran~1 é submetida ao controle de Tlrnerosal,

sendo o rnáxlrno pemnitido 200 ppm.

3.2.6. CONTROLE DE FORMALDEIDO RESIDUAL (PFQ.4)

Uma amostra da Vacina Trlplice (DTP) Produto Acabado a Granel é submetida ao controle de Fomnaldeldo

Residual,sendo o máximo pemnitido 200 ppm.

3.2.7. CONTROLE DE ALUMINIO (PFQ.5)

. Uma amostra da Vacina Trlplice (DTP) Produto Acabado a Granel é submetida ao controle de A1umlnlo,

sendo o máximo permitido 1,25 mg de M'/Dose Individual Humana.

3.3. CONTROLE DO LOTE FINAL DE VACINA TR(PLlCE (DTP)

3.3.1. PROVA DE ESTERILIDADE BACTERIANA E FÚNGICA (PM.1)

Uma amostra do Lote Final de Vaciná Trlplice (DTP) é submetida á prova indicada no Item 3.2.1.

3.3.2. PROVA DE INOCUIDADE (TOXICIDADE INESPECfFICA) (PB.3)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Trlplice (DTP) é submetida á prova indicada no Item 3.2.2.

3.3.3. PROVA DE ATIVIDADE IMUNOGI:NICA (PB.5)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Trlpllce (DTP) é submetida á prova indIcada no Item 3.2.::'.

3.3.4. CONTROLE DE pH (PFQ.1)

Uma amostra do Lote Final de Vacina Trlpllce (DTP) é submetida á prova indicada no Item 3.2.4.

3.3.5. CONTROLE DE TIMEROSAL (PFQ.2)

Uma amostra do Lote Final **de** Vacina Trlplice (DTP) é submetida à prova indicada no Item 3.2.5.

3.3.6. CONTROLE,oE FORMALDEloo RESIDUAL (PFQ.4)

Uma amostra do Lote Final de VacIna Trlplice (DTP) é submetida á prova indicada no Item 3.2.6.

3.3.7. CONTROLE DE ALUMINIO (PFQ.5)

Uma amostra do Lote Final **de** Vacina Trlplice (DTP) é submetida á prova indicada no Item 3.2.7.

3.3.8. CONTROLE DO VOLUME MÉDIO POR AMPOLA OU FRASCO AMPOLA (PFq.3)

Uma amostra do Lote Final da Vacina Trlplice (DTP) é submetida a detemninação do Volume Médio por

medida direta. O volume mlnimo de cada apresentação é dado **de** acordo com a tabela indicada .no procedimento

de controle.

3.3.9. INSPEÇÃO VISUAL **'~ ..S** *i ,$*

, Todo o Lote Final de Vacina Trfplice (DTP) deve ser InspecIonado visualmente, frente a um. fundo escvro e

claro. O produto é uma suspensão opalescente, ligeiramente acastanhada, que não deve apresentar gru~~ ou

partlculas estranhas.

"'.'1

4. ESTOCAGEM -u-

O Lote Final de Vacina Trlpllce (DTP) deve ser mantido á temperatura de 4°C a S'C. **.ili-**

';'. ~

5. ROTULAGEM

Os r6tulos do Lote Final de Vacina Trlplice (DTP) devem estar de acordo com a Lei *6360116* Decreto

*79094m.*

6. REGISTROS

,

Os dados dos processos de produção de cada Lote Final ou sub-lote de Vacina Trlplice (DTP) e os

resultados das provas de controle devem ser registrados em Protocolos e arquivados.

7. ARQUIVO DE AMOSTRA

7.1. VACINA TRfPlICE (DTP) PRODUTO ACABADO A GRANEL

Deve ser conservada na unidade produtora, uma amostra de Vacina Trlplice (DTP) Produto Acabado a

Granel á temperatura de 4°C a soC, devidamente identificàda, por 36 meses a partir da última prova da Atividade

Imunogênica.

7.2. LOTE FINAL DA VACINA TRlplICE (DTP)

Deve ser conservado no Controle de Qualidade Interno, amostra do Lote Final ou Sub-lote da Vacina Trlplice

(DTP) á temperatura de 4°C a soC, durante no mlnimo 12 meses ap6s a data de vencimento.

s, EXPEDiÇÃO

A expedlçao do Lote Final ou Sub-Iote da Vacina Trlplice (DTP) somente pode ser autorizada ap6s li

J'j'0' 220TERÇA~FElRA, 12NÓV 1996 . DIÁRIO OFICIAL 23521

Iiberaçao pelo Controle de Qualidade Interno e sua utilização ap6s aprovação pelo Controle de Qualidade

Nacional.

9. PRAZO DE VALIDADE

O Prazo de validade é de 24 meses a partir do inicio da última prova de Atividade Imunogênica realizada

pelo Laborat6rio Produtor.

PROCEDIMENTOS DE CONTROLE

1-PROVAS BIOLÓGICAS

1. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE FLOCULAÇÃO (LI) PARA TOXINA E ANA TOXINA (PB.1)

Esta prova tem por objetivo determinar, mediante a técnica de Ramon, a concentração em *Lf/ml* de uma

Toxina ou Anatoxina.

1.1. MATERIAL

- Amostra de Toxina ou Anatoxina

- Antitoxina Padronizada em Lf

- SOlUça0 fisiológica esterilizada

- Pipetas de 0,2 ml, 1,0 ml, 5,0 ml e 10,0 ml esterilizadas - pr6-plpetas

- Tubos de ensaio esterilizados

- Estante para tubos .

- Banho-maria a 45°C

- Cuba para descarte de material

- Agitador de tubos

- Pipetas automáticas.

1.2. PROCEDIMENTO

- Distribuir, em tubos de ensaio, volumes variáveis de Antitoxina Padronizada.

- Adicionar a cada tubo um volume constante de 1,0 ml de Toxina ou Anátoxina.

. - Completar com SOlUça0 fisiológica a um volume final constante.

- Homogeneizar e colocar em Banho-maria a 45°C.

- Observar os tubos constantemente.

- Registrar no protocolo o primeiro tubo que apresentar floculação (LI) e o tempo para esta reação se apresentar

(KI).

1.3. INTERPRETAÇÃO DA PROVA

O Lf/ml da Toxina ou Anatoxina será detenminado pelo primeiro tubo com mistura que f1ocular. O valor em

Lf/ml será dado pelo volume de Antitoxina Padronizada presente no tubo multiplicado por sua concentração em

equivalente *Lf/ml.*

2. TO?(ICIDAQE ESPECIFICA (PB.2)

Esta proVI consiste na verificaçao da ausência de Toxicidade Especifica.

2.1. ANATOXINA DIFTERICA

2.1.1. MATERIAL

• Amalnl testar

• Tubol de anulo esterilizados

• SoluçIo fIIlológlca •• teriliada

• S4irIngn de 1 mle 5 ml •• terllizadas

• AgulhM de 13 X 4,5 mm e 25 X 7,0 mrn esterilizadas

• CobIIII de 250 I 3!0g

• CIIIxa ptnI cobIIlII

• Cuba ptnI dttcarte de matarial

• AgIWdor de tubol

• Estente ptnI tubçlI

• Pipetas de 0,2 mI, 1 ml, lS mie 10 mI esterilizadas - pr6-pipetas

• Plptlal 1ut0m611cu

• Equlplmenlo de contençlo prlmirla

2.1.2. PROCEDIMENTO

2.1.2.1. ANATOXlNA D!FTERICA A GRANEL (PB.2.1)

Nio *diluir* a AnaI'OlCIna *quando* a ""&11II filo *estiver concentrada.*

Provi Inlrldtrmlcl

- Diluir I lmoatrI de Analoxlnl Dlft6ri<:111Granel I uma concentraça:> de 100 Lf/ml em SOlUça0fisiológica.

-Inocullr 0,2 ml da MIOItrI, por vlllntrad6nmk:a, em uma cobaia previamente depilada.

-Inocullr 0,2 ml de lOIuçIo fisiológica, por vlllntrld6nmlca, como controle negativo na mesma cobaia

- Observlr o Inlmal por um periodo de 48 horas.

Intarpretlçto da Prova

No local da lnocuilçlo, nIo deve ser observada reaçao dermonecr6ticas mais intensa que o controle

negativo.

Prova Subcutlinea

- Diluir a amostra de Anatoxina Dlllérica a Granel a uma concentração de 1ÓOLf/ml em SOlUça0 fisiológica.

-Inocular 5,0 ml, da amosn, por via subcutânea, em cada uma das 5 cobaias.

-Inocular 5,0 ml de soluça0 fisiológica, por via subcutânea, em cada uma das 2 cobaias, como controle

negativo.

- Observar os animais por um perfodo de 4 semanas.

ínterpretação da Prova

Para que a prova seja considerada satisfat6rla, os animais não devem apresentar, sintomatologia de

intoxicaçao dillérica e pelo menos 80% dos animais inoculados devem sobreviver.

2.1.2.2. ANATOXINA DIFTERICA PRODUTO ACABADO A GRANEL (PB.2.2)

- Diluir a amostra de AnatoxinaDillérica Produto Acabado a Granel a uma concentração de 500 Lf/ml em

solUça0 fisiológica.

- Inocular 1,0 ml da diluiçao, por via subcutânea, em cada uma das 5 cobaias.

- Inocular 1,0 ml. de SOlUça0 fisiológica, por via subcutânea, em cada uma das 2 cobaias, como controle

SEÇÃO 1

negativo.

- Observar os animais por um perlodo de 4 semanas.

lnterpretação da Prova

Para que a prova seja considerada satisfatória. os animais não devem apresentar. sintomatologia de

intoxicação diftérica e pelo menos 80% dos animais inoculados devem sobreviver.

2.2. ANATOXINA TETÂNICA

2.2.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Solução fisiol6gica esterilizada

- Seringas de 5 ml esterilizadas

• Agulhas de 25 X 7,0 mm esterilizadas

• Cobaias de 250 a 350g

- Caixa para cobaias

o Cuba para descarte de material

- Tubos de ensaloesterjlzados

• Agitador de tubos .

- Estante de tubos

- Pipetas de 0,2 ml, 1 ml, 5 ml e 10 ml esterilizadas • pr6-pipetas

- Pipetas automáticas

- Equipamento de contenção primária

2.2.2. PROCEDIMENTO

2.2.2.1. ANATOXINA TETÂNICA A GRANEL (PB.2.1)

*Não diluir* a *Anatoxina quando* a *mesma não estiver concentrede.*

- Diluir a amostra de Anatoxina Tetânica a Granel a uma concentração de 100 *Lf/ml* em Solução fislol6gica.

- Inocular 5,0 ml da dilulção, por via subcutânea, em cada uma das 5 cobaias.

- Inocular 5,0 ml de SOlUÇa0fisiol6gica, por via subcutânea, em cada um das 2 cobaias, como controle

negativo.

- Observar os animais por um perlodo de 4 semanas.

lnterpretação da Prova

Para que a prova seja considerada satisfatória, os animais não devem apresentar, sintomatologia de

intoxicaçao tetãnica e pelo menos 80% dos animais inoculados devem sobreviver.

2.2.2.2. ANATOXINA TETÂNICA PRODUTO ACABADO A GRANEL (PB.2.2)

- Diluir a amostra de Anatoxina Tetânica Produto Acabado a Granel a uma concentração de 500 Lf/ml em

Solução fisiol6gica.

- Inocular 1,0 ml da diluiçao, por via subcutânea, em cada uma das 5 cobaias. \_\_

- Inocular 1,0 ml de SOlUÇa0fisiol6gica; por via subcutânea, em cada uma das 2 cobaias, como controle

negativo.

- Observar os animais por um período de 4 semanas.

lnterpretação da Prova

Para que a prova seja considerada satisfatória, os animais não devem apresentar, sintomatologia de

íntoxicação tetânica e pelo menos 80% dos animais inoculados devem sobreviver.

2.3. VACINA PERTUSSIS (GANHO DE PESO)

2.3.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Padrão de opacidade

• Solução fisiológica esterilizada

o SOlUça0fisiológica contendo 100 ppm de timerosaf

- seringas de 1 ml esterilizadas

o Agulhas de 13 X 4,5 mm esterilizadas

o Camundongos albinos suiços susceptrveis de 14 a 16g, do mesmo sexo

o Caixa para camundongos

- Balança para pesagem de animais

- Cuba para descarte de material

- Tubos de ensaio esterilizados

- Agitador de tubos

- Estante para tubos

- Pipetas de 0,2 ml, 1 ml, 5 ml e 10 ml esterilizadas - pr6-pipetas

- Pipetas automáticas

- Equipamento de contenção primária

2.3.2. PROCEDIMENTO

- Diluir a amostra à uma concentração de 20 unidades opacimétricas por ml em SOlUça0 fisiológica, por

comparação visual frente ao padrão opacimétrico.

- Utilizar 2 grupos com pelo menos 10 camundongos albinos suiços cada.

- Registrar no protocolo o peso total dos camundongos albinos suíços de cada grupo.

-Inocular 0,5 ml da amostra dilurda., por via intraperitoneal, cada camundongo do primeiro grupo.

- Inocular 0,5 ml da Solução fisiol6gica com limerosal, por via intraperitoneal, cada camundongo do segundo

grupo, como controle negativo.

- Registrar em protocolo o peso total de cada grupo de camundongos albinos suiços, ás 72h.

- Registrar no protocolo o peso total de cada grupo de camundongos albinos suiços, no 7° dia.

2.3.3. INTERPRETAÇÂO DA PROVA

O produto é considerado satisfat6rio se:

• ao final das 72h, o peso total de cada grupo de camundongos albinos suiços não for menor que seu peso

inicial;

• ao final do 7° dia, a média de ganho de peso do grupo inoculado com a amostra não for menor que 60% da

média de ganho de peso do grupo controle negativo;

• não morrerem mais que 5% dos animais inoculados com a amostra.

3. INOCUIDADE (TOXICIDADE INESPECIFICA) (PB.3)

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

3.1. MATERIAL

**••.•..• llV .•.•• \_.\_ ••.•.••••• \_."'''' .•.**

\. **DIÁRIO OFICIAL**

7 )

23522 SEÇÃO N" 220 TERÇ~FEIRA, 12 NOV 1996

• Amostragem

• Produto acabado a granel· uma amostra

• Lote final- mistura de 15 ampolas ou 5 frascos-ampola

- Seringas de 1 ml, 3 ml e 5 ml esterilizadas

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

~ Camundongos albinos suiços de 17 a 22g

- Cobaias de 250 a 350g

• 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

3.2. PROCEDIMENTO

• Pesar os animais e identificá-los com corante

• Inocular 0,5 ml do produto, por via intraperitoneal, em cada um dos 5 camundongos albinos suiços

• Inocular 1,0 ml do produto, por via intraperitoneal, em cada uma das 2 cobaias

• Manter os animais em observação por um perlodo mlnimo de 7 dias.

- Pesar individualmente os animais ao término da prova e registrar os dados no protocolo.

3.3. INTERPRETAÇÃO DA PROVA

A prova será considerada satisfatória se:

• todos os animais sobreviverem ao perlodo mlnimo de 7 dias;

nenhum animal apresentar qualquer alteração no seu estado de saúde;

• o peso de cada animal for superior a seu peso iniciai.

4. REVERSÃO DA TOXICIDADE (PB:4)

4.1. ANATOXINA DIFTÉRICA PRODUTO ACABADO A GRANEL

Uma amostra de Anatoxina Diftérica Produto Acabado e Granel é submetida a prova de Reversão da

Toxicidade.

4.1.1. r,1ATERIAL

- Amostra a testar

- SOlUÇa0fisiológica esterilizada

- Erfenmeyers de 100 ml esterilizados .

- Provetas de 100 ml e 500 ml esterilizadas

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

- Seringas de 5 1)11 esterilizadas

- Agulhas de 25 X 7 mm esterilizadas

- Cobaias de 250 a 350g

- Caixa para cobaias

- Balança para pesagem de animais

- Cuba.para descarte de material

- Estante para tubos

- Estufa 37°C

• Cãmara fria 4°C a S~C

• Pipetas automáticas

- Equipamento de contenção primária

4.1.2. PROCEDIMENTO

- Diluir a Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel a 25 Lf/ml, em Solução fisiológica, para um volume

final de 200 ml.

• Distribuir allquotas de 100 ml em dois Erlenmeyers.

• Manter um *dos* Erlenmeyers à temperatura 4°C a soC, e outro a 370C por 6 semanas.

• Inocular 5 ml da díluição mantida a 4°C a soC, por via subcutánea, em cada urna das 5 cobaias.

-Jnocular 5 ml da diluição mantida a 37°C, por via subcutânea, em cada uma das 5 cobaias.

• Pesar os animais nos 1°,2°, 7° dias e semanalmente ate o 21° dia.

• Registrar em protocolo os pesos dos animais.

4.1.3. INTERPRETAÇÃO DA PROVA

O animais não devem apresentar sintomas de intoxicação diftérica e devem ganhar peso.

4..2. ANATOXINA TETÂNICA PRODUTO ACABADO A GRANEL

Uma·amostra de Anatoxina Tetanica Produto Acabado a Granel é submetida a prova de Reversão de

Toxicidade.

4..2.1.MATERIAL

• Amostra a testar

- Solução fisiológica esterilizada

• Erlenmeyers de 100 ml esterilizados

- Provetas de 100 ml e 500 ml esterilizadas

• Pipetas de 1 ml, 5 ml e 10 ml esterilizadas. pró-pipetas

• Seringas de 5 ml esterilizadas

- Agulhas de 25 X 7 mm esterilizadas

- Cobaias de 250 a 350g

- Caixa para cobaias

• Balança para pesagem de animais

- Cuba para descarte de material

• Estante para tubos

- Estufas 37°C

• cãrnara fria 4°C a SOC

• Pipetas automáticas

- Equipamento de contenção primária

4..2.2. PROCEDIMENTO

- Diluir a Anatoxina Diftérica Produto Acabado a Granel a 25 Lf/ml, em SOlUça0fisiológica, para um volume

final de 200 ml.

• Distribuir allquotas de 100 ml em dois Erlenmeyers ..

• Manter um dos Erlenmeyers à temperatura 4°C a S·C, e outro a 370C por 6 semanas.

• Inocular 5 ml de diluição mantida a 4·C a e·c, por via subcutânea, em cada uma das 5 cobaias.

• Inocular 5 ml da diluição mantida a 37°C, por via subcutânea, em cada uma das 5 cobaias.

• Pesar 05 animais nos 1·, 2·, 7· dias e semanalmente até o 21· dia.

• Registrar em protocolo os pesos dos animais.

4..2.3. INTERPRETAÇÃO DA PROVA

Os anírnais não devem apresentar sintomas de intoxicação tetânica e devem ganhar peso.

5. ATIVIDADE IMUNOGÉNICA (POTÉNCIA) (PB.5)

5.1. TOXÓIDE DIFTÉRICO

5.1.1. MÉTODO AMERICANO (NIH)

Esta prova tem por objetivo comprovar a Atividade Imunogênica do Toxóide Diftérico, mediante a

determinação do titulo antitóxico em UI/ml dos soros de cobaias previamente imunizadas.

5.1.1.1. IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

5.1.1.1.1. MATERIAL

• Amostragem

- Produto Acabado a Granel 01 amostra

• Lote Final mistura de 15 ampolas ou 05 frascos-ampola

- Tubos de ensaio esterilizados

• Estante para tubos

• Seringas de 1 ml e 5 ml esterilizadas

• Agulhas de 25 X 7 mm esterilizadas

• Balança para pesagem de animais

• Cobaias de 450 a 550g

- Caixa para cobaias

• Corante para identificaçao dos animais

• Cuba para descarte de material

• Equipamento de contenção primária

5.1.1.1.2. PROCEDIMENTO

• Pesar e identificar individualmente as cobaias

- Inocular 0,75 ml (metade da Dose Total Humana) de amostra, por via subcutânea, em cada um dos-06

cobaias

• Manter os animais imunizados por 04 semanas

5.1.1.2. SANGRIA

5.1.1.2.1. MATERIAL

• Cobaias imunizadas

• Pipetas de 1 ml, 2 ml e 5 ml esteríãzaoas- pr6-pipetas

• Pipetas Pasteur esterilizadas

• Tubos de ensaio esterilizados

• Estante para tubos

• Seringas de 10 ml esterilizad"as

• Agulhas de 40 X 1 mm esterilizadas

• Balança para pesagem de animais

- Estufa a 37°C

- Centrifuga cllnica

• Tubo de centrffuga

• Congelador a -20"C

- Cuba para descarte de material

- Pipetas automáticas

- Equipamento de contenção primária

5.1.1.2.2. PROCEDIMENTO

• Pesar individualmente as cobaias imunizadas.

• Selecionar exclusivamente as cobaias que apresentarem peso superior ao inicial.

- Coletar por punção cardfaca, 5 ml de sangue de cada animal e depositar o sangue nos tubos de centrlfuga.

-Incubar os tubos de centrffuga a 37°C por 60 minutos.

• Centrifugar a 1.000xg por 15 minutos.

• Extrair o soro utilizando pipeta Pasteur.

• Misturar volumes iguais dos soros de, no mlnimo 04 cobaias.

• Acondicionar a mistura de soro a ·20·C.

5.1.1.3. TITULAÇÃO DO SORO

5.1.1.3.1. MATERIAL

• Soro a testar

• Antitoxina Diftérica Padrão (UI/ml)

• Toxina Diftérica Padronizada (L+/10/50)

- SOlUça0salina esterilizada

- Pipetas de 1 ml, 2 ml e 5 ml esteríltaadas- pró-pipetas

• Tubos de ensaio esterilizados

• Estante para tubos

- Seringas de 1ml esterilizadas

• Agulhas de 25 X 7 mm esterilizadas

• Cobaias de 250 a 300g

• Caixa para cobaias

• Estufa a 37°C

• Cuba para descarte de material

• Agitador de tubos

• Pipetas automáticas

• Equipamento de contenção prirnária

"

5.1.1.3.2. PROCEDIMENTO

• Separar grupos de 4 cobaias por dllulção.

• Distribuir, *em* uma série de tubos, volumes variáveis de soro a testar.

• Acrescentar volumes constantes de Toxina Diftérica Padronizada de tal maneira que o volume a inocular

por animal contenha uma L+/10/50.

• Igualar os volumes de cada um dos tubo com solução salina.

- Homogeneizar e incubar a 370C por 45 minutos.

• Inocular um volume constante de cada diluição, por via subcutánea, em cada uma das 4 cobaias.

• Observar diariamente os animais por um perfodo de 96h.

• Registrar os dados em protocolo .

5.1.1.3.3. CONTROLE DE L+/10/50 DA TOXINA DIFTÉRICA PADRONIZADA

N° '220 'fER<;:A:.FEI:R:A;12NOV 1996' **DIÁRIO OFICIAL** SEÇÃO. 1. . \_ .

- Separar grupos de 4 cobaias por diluição.

\_ Distribuir, em uma série de tubos, volumes constante antitoxina padrão de tal maneira que o volume a

inocular por animal contenha 0,1 UI de soro a testar.

- Acrescentar volumes variáveis de Toxina Diflérica Padronizada.

- Igualar os volumes de todos os tubos com solução salina.

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

\_ Inocular um volume constante de cada diluição, por via subcutânea" em cada uma das 4 cobaias.

- Observar diariamente os animais por um perfodo de 96h.

- Registrar os dados em protocolo.

5.1.1.4. CÁLCULO DA DL50

o valor da DL50 da amostra a testar é determinada mediante um método de análise estatlstica que

compreenda a transformação dos dados obtidos em regressão linear. Para obter esta transformação é útil o

emprego de Probitos, Logit e TransformaçOes angulares.

5.1.1.5. CÁLCULO DA ATIVIDADE fMUNOG~NICA (POT~NCIA)

*A*

Atividade imunogênica (UI/ml) = - x C

*B*

onde:

A = DE50 Antitoxina Diflérica Padrão

B = DL50 do soro a testar

C = UI/mf da Antitoxina Diflérica de Referência

5.1.1.6.INTERPRETAÇAo DA PROVA

O mistura dos soros das cobaias imunizadas devem ter no mlnimo 2 UI/ml.

5.1.2. MáoDO DESAFIO (OMS)

Esta prova tem por objetivo comprovar a Atividade Imu'nOgênica do Toxóide Difléiíco, por comparação frente

a um Toxóide Diftérico de Referência.

5.1.2.1. IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

5.1.2.1.1. MATERIAL

- Amostragem

- Produto Acabado a Granel- 01 amostra

- Lote Final -. mistura de 15 ampolas ou 05 frascos-ampola

- lox6ldé Difléricode Referência

-Solução fisiológica esterilizada

- Pipetas de 1 ml,.2 ml, 5ml e 10mmesterilizadas - pró-pipetas

- Tubos de ensaio esterilizados

- Estante para tubos

- Seringas esterilizadas

--Agulhas de 25 X 7 mm esterilizadas

- Cobaias de 250 a 3009

- Caixa'para'cobalas

- Cuba para descarte de material

- Pipetas automáticas

.•Equipamento de-contenção primária

5.1.2.1.2. PROCEDIMENTO

- separar 8 grupos, de no mlnimo,16 cobaias cada.

- Separar1·grupo de 5 cobaias para controle da Dose Desafio.

• Fazer 4 diluiçOes do produto a testar e daVacina Padrão com fator de diluição 2 em solução fisiológica.

• Inocular, por via subcutanea, 1ml de cada diluição em cada cobaia.

• Manter os animais em observação por 28 dias.

5.1.2.2. DESAFIO

5.1.2.2.1. MATERIAL

- Cobaias Imunizadas

- Cobaias controle

• Toxina Diflérica Padronizada em DL50

-Solução salina tamponada, peptonada a 1%, esterilizada

• Pipetas de 1 ml e 5 ml esterilizadas· pró-pipetas

• Tubos de ensaio esterilizados

• Estante para tubos

• Seringas de 3 ml esterilizadas

• Agulhai de 25 X 7 mm esterilizadas

- Cuba para descarte de material

- Pipetas automáticas

.• Equipamento de contenção primária

5.1.2:22. PROCEDIMENTO

• D:luir a Toxina Diflérica Padronizada em solução salina tarnponada peptonada de modo a conter 100

DL50/ml

- Desafiar por via subcutânea, cada cobaia com 1,Oml da Toxina Diftérica Padronizada com 100 DL50/ml

- Observar os animais 2 vezes ao dia por um perlodo de 96h.

- Registrar emprotocclc a sintomatol6gia e morte dos animais.

5.1.2.2.3. CONTROLE DA DOSE DESAFIO

- Diluir a Toxina Diltérica Padronizada com 100 DL50/ml a 1:100 em Solução salina.

- Inocular 1,Oml da Toxina Diflérica Padronizada dilülda, por via subcutânea, em cada um das 05 cobaias.

5.1.2.3. cÁLéuLO DA DE50

o valor da .DE50 da amostra a testar é determinada mediante um método de análise estatlstica que.

compreenda a transformação dos dados obtidos em regressão linear. Para obter esta transformação é útil o

emprego de Probitos, Logit e Transformações angulares. . . *»*

5.1.2.4. C;t..LCULO DA ATIVIDADE IMUNOG~NICA (POT~NCIA)

Atividade imunogênica (UI/ml) = ~ xC

*B*

onde:

A" DE50 ,Toxóide Diflérico de Referência

B = DE50 do Produto a Testar

23523

C = UI/ml do Toxóide Diflérico de-Referência

5.1.2.5. VALIDADE DA PROVA

- Nem tocas as cobaias do controle devem morrer.

- A menor diluição do produto a testar deve proteger mais da metade dos animais.

- A maior diluição do produto a testar deve proteger menos da metade dos animais.

- As curvas da resposta ás doses do produto a testar e do Toxóide Diflérico de Referência não devem diíerir

significativamente quanto ao paralelismo e linearidade ( p => 0,05).

5.1.2.6. INTERPRETAÇÃO DA PROVA

O produto não deve conter menos de 30 UI/Dose Individuai Humana.

5.2. TOXÓIDE TETÂNICO

5.2.1. MÉTODO AMERICANO (NIH)

Esta prova tem por objetivo comprovar a Atividade Imunogênica do Toxólde Tetânico, mediante a

determinação do titulo antltóxíco em UI/ml dos soros de cobaias previamente imunizados.

5.2.1.1. IMUNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

5:2.1.1.1. MATERIAL

- Amostragem

- Produto Acabado a Granel- 01 amostra

• lote Flnal- mistura de 15 ampolas ou 05 frascos-ampola

• Tubos de ensaio esterilizados

• Estante para tubos

- Seringas de 1 ml e 5 ml esterilizadas

- Agulhas de 25 X 7mm esterilizadas

- Balança para pesagem de animais

- Cobaias de 450 a 550g

• Caixa para cobaias

• Corante para identificação dos animais

• Cuba para descarte de material

- Equipamento de contenção primária

5.1.1.1.2. PROCEDIMENTO

- Pesar e identificar individualmente as cobaias.

- Inocular 0,75ml (metade da Dose Total Humana) da amostra, por via subcutânea, em cada uma das 6

cobaias.

- Manter os animais imunizados por 06 semanas.

5.2.1.2. SANGRIA

5.2.1.2.1. MATERIAL

- Cobaias imunizadas

• Pipetas de 1 ml, 2 ml e 5 ml esterilizadas· pró-pipetas

• Pipetas Pasteur esterilizadas

- Tubos de ensaio esterilizados

- Estante para tubos

- Seringas de 10 ml esterilizadas

- Agulhas de 4 X 1 mm esterilizadas

- Balança para pesagem de animais

- Estufa a 37'C

• Centrlfuga clfnica

- Tubo de centrlfuga

• Congelador a -20'C

- Cuba para descarte de material

- Pipetas automáticas

- Equipamento de contenção primária

5.2.1.2.2. PROCEDIMENTO

- Pesar individualmente as cobaias imunizadas.

- Selecionar exclusivamente as cobaias que apresentarem peso superior ao inicial.

Coletar por punção cardlaca, 5,0 ml de sangue de cada animal e depositar o sangue nos tubos de

centrlfuga.

• Colocar os tubos de centrlfugaa 37°C por 60 minutos.

- Centrifugar a 1000xg por 15 minutos. ;'

• Extrair o soro utilizando pipeta Pasteur. •

• Misturar volumes iguais dos soros de no mini mo, 04 cobaias.

- Acondicionar o soro a -20'C.

5.2.1.3. TITULAÇÃO DO SORO

5.2.1.3.1. MATERIAL

- Soro a testar

- Antitoxina Tetanica de Referência

• Toxina Tetânica Padronizada em L+/10/50

• Solução salina tamponada peptonada 1%, esterilizada

• Pipetas de 1 ml, 2 ml e 5 ml esterilizadas - pr6-pipetas

- Tubos de ensaio esterilizados

• Estante para tubos

• Seringas de 1ml esterilizadas

- Agulhas de 13 X 4,5 mm esterilizadas

- Camundongos albinos suíços de 17 a 22g

; - Caixa para camundongos albinos suiços

- Estufa a 37'C

• Cuba para descarte de material

- Agitador de tubos

- Pipetas automáticas /"

- Equipamento de contenção primárja

/

5.2.1.3.2. PROCEDIMÊNTO */.t*

• Distribuir, emurna ~iie de tubos, voíurnesvarlávelsde soro a testar.

-Acrescentar volume constante de Toxina Telflnica Padronizada, de.tal maneira que o volume a inocular por

animal contenha uma L+/10/50.

-Igualar os volumes de todos os tubos com solução salina tamponada peptonada 1%.

**r.l:ru.-4 •••. ""CIol ••• JoIi •• ""'n;l ...•\_\_ . ,... •••..• ~\_\_ ••.-'"" •••.. ~ \_\_ ..•**~~\_.Ii. - ••••••.•~-\_.~ ~,.... •..•""""••• -. -"- " .•• **\_lICI •** .=.

• Homogeneizar e Incubar a 37·C por 45 minutos.

-Inocular, por via subcutânea, no mlnlmo dez camundongos albinos suiços com cada mistura.

- Observar diariamente os animais por um período de 96h.

- Registrar os dados em protocolo.

5.2.1.3.3. CONTROLE L+/10/50 DA TOXINATETANICA PADRONIZADA

- Distribuir, em uma série de tubos, volumes constantes de Antlloxina Tetanica de tal maneira que o volume

a inocular contenha 0,1UI.

- Acrescentar volume variavéis de Toxina Tetãnlca Padronizada.

-Igualar os ~olumes de todos os tubos com solução salina tamponada peptonada 1%.

• HomogeneIZar e incubar a 37°C por 45 minutos.

• Inocular, por via subcutãnea, no mlnimo dez camundongos albinos suiços com cada mistura.

- Observar diariamente os animais por um perfodo de 96h.

• Registrar os dados em protocolo.

5.2.1.4. CALCULO DA DL50

o valor da DL50 da amostra a testar é determinada mediante um método de análise estatrstica que

compreenda a transformação dos dados obtidos em regressão linear. Para obter esta transformação é útil o

emprego de Probitos, Logit e TransformaçOes angulares.

5.2.1.5. CALCULO DA ATIVIDADE iMUNOGI:NICA

Atividade imunogênlca (UI/ml) = ~ x C

*B ~*

onde:

A = DL50 Anliloxina tetanica de Referência

B •• DL50 do Soro a Testar

C = UI/ml da Anliloxina Tetanlca de Referência

5.2.1.6. INTERPRETAÇÃO DA PROVA

.- Os soros das cobaias imunizadas devem ter no mfnimo 2 UI/ml.

5.2.2. MI:TODO DESAFIO (OMS)

Em Camundongos albinos suiços

gsta prova tem por objetivo comprovar a Atividade Imunogênlca do Toxóide Tetanico por comparação frente

a um Tox6lde Telânico de Refer6ncia.

5.2.2.1.1. It.!UNIZAÇÃO DOS ANIMAIS

52.2.1.1. MATERIAL

• ArnoItragem

- Produto Acabado a Granel - uma amostra

- Lote Final- mistura de 15 ampolas ou 05 frascos-ampola

• Tox6ide Tetanlco de Refer6ncia

• Soluça0 ftslológica elt6ril

• Pipetas de 1 ml, 2 mI, 5 ml e 10 mI esterilizadas· pr6-plpetas

- Tubos de ensaio •• lerilizados

- Estante pera tubol

• seringas de 3 ml esterilizadas

• Agulhas de 13 X 4,5 mm esterilizadas

- camundongos atbIllOI sulçoa de 11 a 14g

- Caixa perII camundongos

• Cuba perII deIcaIte de material

- Agitador de tubos

• Pipetas lIUtolMtIcaI

• Equipamento de contençlo primária

5.2.2.1.2. PROCEDIMENTO

- $eparar 9 grupos de, no mlnimo, 20 camundongos albinos suiços cada.

- Fazer 4 diluiçOes do produto a testar comfator de diluição 2, em solução fisiol6gica.

• Fazer 4 diluições do Toxóide Tetãníco de Referência com fator de diluição 2, em solução fisiológica.

-Inocular 0,5ml de cada diluição, por via subcutânea, os camundongos albinos sulços

- Manter umgrupo de 12 animais sem Inocular, para controle da toxina de desafio.

• Manter os animais por 28 dias.

5.2.2.2. DESAFIO

*5.2.~.2.j.* MATERIAL

- Camundongos albinos sulços imunizados

- Camundongos albinos suiços para controle

- ToxinaTetanica Padronizada em DL50

- Solução salina tamponada peptonada 1%, esterilizados

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

- Tubos de ensaio esterilizados

- Estante para tubos

- Seringas de 3 ml esterilizadas

- Agulhas de 13 X 4,5 mm esterilizadas

- Cubá para descarte de material

- Pipetas automáticas

- Equipamento de contenção primária

5.2.2.2.2. PROCEDIMENTO

• Diluir a Toxina Tetânica Padronizada em solução salina tamponada peptonada 1%, de modo a conter 200

DL50/ml.

- Desafiar, por via subcutanea, cada camundongo imunizado. com O,5ml da Toxina Tetânica Padronizada

com 200 DL50/ml.

- Observar os animais 2 vezes ao dia por um perlodo de 96h.

• Registar os dados em protocolo.

5.2.2.2.3. CONTROLE DA DOSE DESAFIO

• Diluir a Toxina Tetânica Padronizada com 200 DL50/ml a 1:50, 1:100 e 1:200 com Solução salina

tamponada peptonada 1%.

• Inocular 0,5 mi de cada diluição, por via subcutânea, em cada grupo de 4 camundongos albinos suiços.

• Observar os animais 2 vezes ao dia por um perfodo de 96h.

• Registrar os dados em protocolo.

5.2.2.3. CALCULO DA DE50

o valor da DE50 da amostra a testar é determinada mediante um método de análise esta!lslica que

compreenda a transformação dos dados obtidos em regressâo linear. Para obter esta transformação é útil o

emprego de Probitos, Logil e TransformaçOes angulares.

5.2.2.4. cALCuLo DA ATIVIDADE IMUNOGI:NICA (pOTeNCIA)

*A*

Atividade imunogênica (UI/ml)oo - x C

*B*

onde:

A = DE60 Tox6ide Tetânico de Referência

B = DE50 do Produto a Testar

C = UI/ml do Toxóide Tetânico de Referência

5.2.2.5. VALIDADE DA PROVA

- Todos os camundongos albinos sulços de controle do desafio inoculados com a diluição 1:50 devem

morrer.

- Nenhum camundongo de Controle do Desafio inoculado com a diluição 1:200 deve morrer.

• A menor diluição do produto a testar deve proteger mais da metade dos animais.

• A maior diluição do produto a testar deve proteger menos da metade dos animais.

• As curvas de resposta às doses do produto testar e do Toxólde Tetanico de Referência não devem diferir

significativamente quanto ao paralelismo e linearidade (p s 0,05).

5.2.2.6. INTERPRETAÇÃO DA PROVA

O produto não deve conter menos de 40 UI/Dose Individual Humana em caso de Toxóide Tetânico e Vacina

Dupla (DT e dT)o Em caso de Vacina Trlpllce (DTP), não deve conter menos de 60 UI/Dose Individual Humana.

5.2.3. MI:TODO DESAFIO (OMS)

Em Cobaias

Esta prova tem por objetivo comprovar a Atividade Imunogênica do Toxóide Tetânico por comparação a um

Tox6ide Tetãnlco de Referência.

5.2.3.1. IMUNIZAÇÃO DOSANIMAIS

2.3.1.1. MATERIAL

- Amostragem

- Produto Acabado a Granel- 01 amostra

- Lote Final - mistura de 15 aQ'lPOlasou 05 frascos-ampola

• Tox6ide Tetânico de Referência

- Solução fisiológica est6ril

• Pipetas de 1 ml, 2 ml, 5 mfe 10 ml esterilizadas - pr6-pipetas

- Tubos de ensaio esterirlZados

- Estante para tubos

- Seringas de 3m1esterilizadas

- Agulhas de 25 X 7 mm esterilizadae

- Cobaias 250 a 350g

- Caixa para cobaias

- Cuba para descarte de material

- Agitador de tubos

- Pipetas automáticas

- Equipamento de contençao primária

5.2.3.1.2. PROCEDIMENTO

- Separar 8 grupos de, no mlnimo, 16 cobaias cada.

• Separar um grupo de 12 cobaias para controle da Dose Desafio.

• Fazer 4 diluiçOes do produto a testar com fator de diluição 2, em solução fisiológica.

- Fazer 4 diluições do Toxóide Tetânico de Referência com fator de diluição 2, em solução fisiológica.

-Inocular 1,0 ml de cada diluição, porvia subcutânea, em cada cobaia.

• Manter os animais por 26 dias.

5.2.3.2. DESAFIO

5.2.3.2.1. MATERIAL

-'Cobaias imunizadas

- Cobaias para controle

- Toxina Tetanica Padronizada (DL50)

- Solução salina tamponada peptonada 1%, esterlllzada

- Pipetas de 1 mI e 5 ml esterllzadas- pró-pipetas

- Estante para tubos

- Seringas de 3 ml esterilizadas

- Agulhas de 25 X 7 mm esterilizadas

- Cuba para descarte de material

- Tubos de ensaio esterilizados

- Agitador de tubos

- Pipetas automáticas

- Equipamento de contenção primària

5.2.3.2.2. PROCEDIMENTO

• Diluir a Toxina Tetânica Padronizada em solução salina tamponada peptonada 1% de modo a conter 100

DL60/ml.

• Desafiar por via subcutânea. cada cobaia imunizada com 1 ml da Toxina Tetânica Padronizada com 100

DL50/ml.

- Observar os animais 2 vezes ao dia por um perlodo de 96h.

- Registrar os dados em protocolo.

5.2.3.2.3. CONTROLE DO DESAFIO

• Diluir a Toxina Tetânica Padronizada com 100 DL50/ml a 1:50, 1:100 e 1:200 com Solução salina

tamponada peptonada 1%.

-Inocular, subcutaneamente, 04 cobaias com 1,Omlde cada diluição,

- Observar os animais 2 vezes ao dia por um perfodo de 96h.

- Registrar as mortes em protocolo .

5.2.3.3. CALCULO DA DE50

-.~""" ,-q2-2-0·-íf"'E~-·Ç"Â"':F"E"iRA:-;,.-1-,2c"NnôV", .==f9==9=6======-=-'::--=~·\_=-::\_::O:-~-""":D=~I=A='i:-::r=~=O=-F=1C=lA=·=·L==-=-:-===-=-==-=\_=:\_==-·=--==-===~=·\_=:=~==.. *~G.=~=-~--~=23~5"="í5*

o valor da DE50 da amostra a testar é determinada mediante um método de análise estatlstica que

compreenda a transformação dos dados obtidos em regressão linear. Para obter esta transformação é útil o

emprego de Probitos, Logit e transformações angulares.

5.2.3.4. CALCULO DA ATIVIDADE IMUNOG~NICA [POT~NCIAI

Atividade imunogênlca (Ullml) = !!x C

*B*

onde:

A = DE50 Tox6ide Tetânico de Referência

B = DE50 do Produto a Testar

C = Ulfml do Tox6ide Tetânico de Referência

5.2.3.5. VALI.oADE DA PROVA

o Todas as cobaias de Controle dó Desafio inoculados com a diluição 1:50 devem morrer.

o Nenhuma cobaia de Controle do Desafio inoculado com a diluição 1:200 deve morrer.

o A menor diluição do produto-a testar deve proteger mais da metade dos animais.

• A maior dilulçllo do produto a testar deve proteger menos da metade dos animais.

• As curvas de resposta às doses do produto a testar e do Tox6ide Tetânico de Referência não devem diferir

significativamente quanto ao paralelismo e linearidade (p S 0,05).

5.2.3.6. INTERPRETAÇÃO DA PROVA

o produto não deve conter menos de 40 UIfDose Individual Humana em caso de Tox6ide Tetânico e Vacina

Dupla (DT e df), Em caso de Vacina Tríplke (DPT), não deve conter menos de 60 UIfDose Individual Humana.

5.3. VACINA PERTUSSIS

A Atividade Imunogênica da Vacina Pertussis é determinada pela avaliação comparativa frente' a uma Vacina

Pertussls de Referência.

5.3.1. IMUNIZAÇÃO

5.3.1.1. MATERIAL

o Amostragem

o Vacina Pertussis Produto Acabado a Granel o ()1 amostra

• Vacina Trlplice Prodúto Acabado a Granel(DTP) - 01 amostra

o Lote Final (DTP) o mistura de 15 ampolas ou 5 frascos-ampola

o Vacina Pertussis de Referência

o Solução fisiológica tamponada pH 7,0 esterilizadas

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

o Tubos de ensaio esterilizados

o Estante para tubos

o seringas de 3 ml esterilizadr.s

o Agulhas de 13 X 4,5 mm esterilizadas

o Camundongos albinos suiços suscepllvels de 12 a 16g

o Caixa para camundongos

o Cuba para descarte de material

o Agitador de tubos

o Pipetas autorm!icas

o Equipamento de contençlo primária

5.3.1.2. PROCEDIMENTO

o Todos os camundongos albinos suiços devem estar sadios e serem preferencialmente. do mesmo sexo.

Quando de sexos difell!ntes, distribul·los em proporção igual por diluição. .

o ~parar 6 grupos de no mlnimo, 20 camundongos albinos suiços cada.

o Separar 4 grupos de no mlnimo, 10 camundongos albinos suíços cada para controle da Dose Desafio.

o A Vacina Pertussis Produto Acabado a Granel, deve ser dilulda em Solução fisiol6gica tamponada à

concentração de uma Dose Individual Humana.

- Fazer três diluições seriadas da amostra a ser testada e da Vaciná Pertussis.de Referência, com fator de

diluição 5, em solução fisiológica tamponada de modo que as diluiçOes assegurem uma proteção de 70 a 80%, 40

a 50% e 10 a 20%, respectivamente.

o Inocular, por via intraperitoneal, 0,5 ml das diluições da amostra e da Vacina Pertussis de Referência nos

grupos de camundongos albinos suíços,

o Manter os animais do grupo controle sem inocular.

o O Intervalo entre a vacinação e o desafio deve ser de 14 a 17 dias.

o Pelo menos 94% dos camundongos albinos suiços vacinados e dos grupos controle devem sobreviver

saudáveis ao final deste período. Caso contrário, a prova não será válida.

5.3..2. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE *Borde*.*fella pertussls* •

5.3.2.1. MATERIAL

o *Bordetella partussls* ATCC 18323 liofilizada

o 5· Padrão Internacional de Opacidade

o Diluente estarilizado (10gJ1de peptona de caserna e 6gl1de NaCI, pH 7,0 a 7,2)

o Placas de Petri e tubos com Agar Bordet·Gengou Sangue

o Pipetas Pasteur ésterilizadas

• Pipetas de 1 ml, 5 ml e 10 ml esterilizadas o pr6-pipetas

- Tubo de ensaio esterilizados

- Estante para tubos

o Estufa a 35°C

• Cuba para descarte de material

• Antissoro especifico

o Pipetas automáticas

o Equipamento de contenção primária

5.3.2.2. PROCEDIMENTO

o A cultura de *Bordetalla pertuss/s* deve ser iniciada quatro dias antes da data do desafio.

o Abrir e ressuspender com diluente uma ou mais ampolas de um lote de *Bordetella pertussls* ATCC 18323.

o Semear em tubos e placas com ágar Bordet - Gengou e incubar a 35°C por 48h. '

- Fazer um primeiro repique do crescimento obtido nos tubos em placas e tubos com Agar Bordet - Gengou

e Incubar a 35°C por 24h.

o Fazer um segundo repique do crescimento obtido nos tubos, em placas e tubos com Agar Bordet-Gengou

e Incubar a 35°C por 18h.

- Preparar uma suspensão de *Bordetella partuss;s* com o cultivo obtido nos tubos incubados a 35°C por 18

horas de modo a conter 10 UOplml por comparação com 5· Padrão Intemaclonal de Opacidade.

o O cultivo obtido nas placas, serve para observar as colOnias e identificá-Ias por

soroaglutlnação contra um antissoro especifico para a cepa.

o Em todas as etapas deve ser realizado o Controle da Pureza.

5.3.2.3. ESQUEMA DE PREPARAÇÃO DA DOSE DE DESAFIO

Número do tubo Suspensao bacteriana (ml) Diluente Diluição

,. "

*1/3*

*1/30*

*1/300*

113000(Dose de

Desafio)

*115*

*1/50*

11250

*111.250*

• O Intervalo entre a coleta do cultivo para preparar a suspensão e a inoculação do último camundongo da

prova, não deve ser superior a 2 hs e 30 minutos. Manter a Dose de Desafio a temperatura 4°C a 8'C.

• Desafiar os camundongos albinos suiços vacinados, via inlracerebral, com O,03ml da Dose de Desafio de

*Bordetella partuss;s.*

- Como controle da DL50 da Dose de Desafio de *Bordetalla pettussls,* inocular 3 grupos com 10

camundongos albinos suíços cada, via intracerebral, com 0,03ml das diluiçOes *1150, 11250* é *111.250.*

- Os animais devem ser observados diariamente por 14 dias.

o Os camundongos albinos sulços que morrerem a\é 72h ap6s ao desafio, devem ser excluídos da prova .•

o No 14° dia, os animais que apresentarem paralisia serão considerados mortos ..

- Registrar em protocolo a sintomatologla e morte dos animais. :

1;Ii"\_);llI'\_ULl;C.a:iW~ "' ~ "' ~-'~ ""\_JIC .••• \_\_ <lU\_loliAtflllt~\_ ••. 4 - - \_ •••••- \_\_ ••••\_ ••

1

2

3

4

1,Omlsuspensão com 10UOplml 2,0

0,5ml do tubo 1

O,5mldo tubo 2

2,Oml do tubo 3

4,5

4,5

18,0

Controle Dose de Desafio

5

67

8

5.3.3. DESAFIO

4,5

4,0

4,0

4,0

- Semear as três placas de Petri com Agar Bordet-Gengou, com O,1mVplaca da diluição *111250* e incubar a

35°C por 96h, para controle do numero de Unidades Formadoras de ColOnias.

- O somat6rio das colOnlas das três placas, deve ser dividido por 10, para, !le ter o número de colOnias

correspondente a 0,03ml.

O valor da DE50 da amostrá a testar é determinada mediante um método de ánálise estatistlca que

compreenda a transformação dos dados obtidos em regressão linear. Para obter esta transformação! é útil o

emprego de Probitos, Logit e TransformaçOes angulares. Para determinar a'DL50 se utiliza métodos análogos

de análise.

...' '.~~ -

...~.

*-:*

• A DE50 da vacina estiver compreendida entre à maior e a menor dose imunlzante.

• O Desvio Padrão da DE50 estiver entre 64% e 156%.

- A diluição *111.250* tiver no mlnimo 10 e no máximo 50 Unidades Formadoras de ColOnlas em O,03ml.

- A Dose de Desafio estiver entre 100 e 1000 DL50

• A DL50 contiver no máximo 300 Unidades Formadoras de ColOnias.

o As curvas de resposta ás doses do produto a testar e da Vacina Pertussls de Referência não diferirem

significativamente quanto ao paralelismo e linearidade (p :s: 0,05) ..

-A Vacina deve conter no mlnimo 4 UI no máximo 18 UIfDose Individual Humana.

- Se o valor encontrado for inferior a 4 UIfDose Individual Humana, poderá ser repetido o teste, e neste caso,

s6 será considerado que o produto cumpre os requisitos de potência, se a média geométrica de dois, três ou

quatro provas válidas for igualou superior a 4 UIfDose Individual Humana.

- Colocar 50 microlitros da amostra a testar em três (3) támínas de vidro.

o Colocar 50 microlitros dos Soros Mono-especlficos de aglutin6genos 1, 2 e 3, sobre as amostras em cada

uma das Lãrninas de vidro.

• Homogeneizar a mistura com movimentos circulares por 1 minuto.

- Deixar o material em repouso por 3 minutos.

- Observar a aglutinação da amostra nas 3 lãrnlnas por, no máximo, 5 minutos.

O,5mldo tubo 4

1,Omldo tubo 5

1,Omldo tubo 6

1,Omldo tubo 7

5.3.3.1. MATERIAL

o Camundongos albinos suiços imunizados

• Camundongos albinos suiços controle

o Dose de Desafio de *Bordatella pertuss;s* diluição 113000

- Placas de Petri com Agar Bordet·Gengou Sangue

- Seringas de 1,Omlesterilizadas

o Agulhas de 13 X 4,5mm esterilizadas

o Cuba para descarte de material

- Equipamento de contenção primária

5.3.3.2. PROCEDIMENTO

5.3.3.3. CONTROLE DA VIABILIDADE DA DOSE DESAFIO

5.3.4. CALCULO DA DE50

5.3.5. CALCULO DA ATIVIDADE IMUNOG~NICA (POT~NCIA)

Atividade imunogênica (Ulfml)= ix C

onde:

A = DE50 Vacina Pertussis de Referência

B = DE50 Vacina a Testar

C = Ulfml da Vacina Pertussis de Referência

5.3.6. VALIDADE DA PROVA

A prova é válida se:

5.3.7. ATIVIDADE DA VACINA

6 CONTROLE DE AGLUTINÓGENOS (PB.6)

6.1. MATERIAL

- Amostra a testar (cepa de *Bordetella pertussls)*

o Antissoros Mono-especlficos de aglutin6genos 1,2,3 de *Bordetella pertussls.*

o Lãrnnas de vidro para microscopia

o Cuba para descarte de material

o Pipeta Pasteur

6.2. PROCEDIMENTO

**. DIÁRIO OFICIAI:.** •••..• N°'220'TERÇA:-FEIR:A; 12 NOV-l'996

6..3. RESULTADO

- A cepa de *Bordetalla pariussis* deve apresentar aglutinaçao com os três (3) Soros Mono-especlficos.

7. PROVA DE IDENTIDADE (PB.7)

*Bordatafla partussis*

7.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Antissoro polivalente específico para cada cepa de *Bordatafla penussis*

- LAmlnas de vidro para microscopia

- Cuba para descarte de material

- Pipeta Pasteur

7.2. PROCEDIMENTO .

- Colocar 50 micnolilros da amostra a *testar* em Lamlna de vidro. \_

- Colocar 50 microlitros do Soro polivalente de *Bordalafla pettussís* sobre a amostra na Lâmina de vidro.

- Homogeneizar a mistura com movimentos circulares, por 1 minuto.

- Deixar o material em repouso por 3 minutos.

- Observar a aglutinaçtlo da amostra por, no máximo, 5 minutos.

7.3. RESULTADO

- A amostra deve apresentar aglutinaçao.

11-PROVAS MICROBIOL0GICAS

1. ESTERILIDADE BACTERIANA E FÚNGICA (PM.1)

Esta prova tem por objetivo detectar a presença de bactérias e fungos contaminantes nos produtos testados.

1.1. MEIOS DE CULTURA

Os Meios de Cultura utilizados são: Caldo T1oglicolatode Sódio e Caldo Caserna Soja, dlstríbuldos em tubos

d&ensaio.

1.1.1. CONTROLE DE E~STERILIDADE DOS MEIOS DE CULTURA

Os Meios de Cultura devem ser incubados de 30'C a 35'C por 48h. Selecionar os tubo que não apresentam

crescimento bacteriano armazená-los â 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 *C/ostridium sporoganas* ATCC 3584 (INCaSI00004)

- De uma cultura de *C/ostridium sporoganas* de 24 h em Caldo BHI (Brain Hearth Infusion) incubada a 30'C,

é feita uma suspensão em Caldo BHI calibrada espectrofotometricamente em 79% de transrnítáncla a um

comprimento de onda de 480nm.

- Da suspensão calibrada, fazer dilulçoes seriadas com fator 10, de 10" a 10'" em Caldo BHI.

- Semear 1,Ôml da diluiçao 1008 em tubos com 100 ml de Caldo T1oglicolato de Sódio.e incubar a 30-35'C

por 48h. •

- SemearO,1ml da diluiçao 1008 em placas de Pelri comágar BHI.

-Incubar em anaenobiose a temperatura de 30'C a 35'C por 48h.

~Após o per/ode de incubaçtlo, 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 TlOQlicolatode Sódio será considerado lértil para o referido microorganismo se após o perlodo de

incubação apresentar crescimento caracterrstico, confirmado por exame microscópico.

1.1.2.1.2. UTILIZAÇÃO DO *Micrococcus lutaus* ATCC 9341 (INCaS 00010)

- De uma cultura de *Micrococcus tuleus* de 24h em Caldo Nutriente, incubada a 30'C, é feita uma suspensão

em Caldo Nutriente, ajustada ao tubo N' 1 da Escala MacFarland (3x10'" cels/ml). .

- Diluir a suspensao ajustada em Caldo Nutriente, na proporção 1:2.

- Da suspensão anterior fazer diluiiOes seriadas, com fator 10, de 10.1 a 1008 em Caldo Nutriente.

- Semear 1,0 ml da dilulção 10 em tubos com 100 mlde Caldo T1oglicolato de Sódio e incubar a

temperatura de 30'C a 35'C por 48h.

- Semear 0,1 ml da diluiçao 1008 em placas de Petri com Agar Nutriente e incubar a 30'C -35'C por 48h.

- Após o período de incubação, 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 Tioglicolato de Sódio é considerado fértil para o referido microorganismo se, após o perlodo de

lneubação, apresentar crescimento caracterrstico confirmado por exame microscópico.

1.1.2.2. CALDO CASEINA SOJA

1.1.2.2.1. UTILIZAÇÃO. DE *Candida albicans* ATCC 10231 (INCaS 00006)

- De uma cultura de *Candida albicans* de 96h em Yeast Morfology Agar (YMA) incubada a temperatura de

20'C a 25'C coletar uma amostra com alça de 50 micra e inocular em tubo com 6,0 ml de Caldo Yeast Morfology.

- Homogeneizar a suspensão e incubar a temperatura de 20'C a 25'C por 24h.

- Fazer dilulçoes seriadas, com fator 10, de 10" a 10" em água destilada estéril. A partir da diluição 10"

diluir, na proporção 1:28 em água destilada estéril.

- Semear 1,0 ml da diluiçao 1:28 em tubos com 100 ml de Caldo Caserna Soja e incubar a temperatura de

20'C a 25'C por 7 dias.

- Semear 0,1 ml da dííulção final em placas com YMA e incubar a temperatura de 20'C a 25'C por 72h.

- Proceder â contagem de colOnias formadas após o perlodode incubação.

- O número de Unidades Formadoras de ColOnias por mililitro (UFC/ml) deve estar entre 50 e 100.

- O Caldo Caserna Soja é considerado fértil para o referido mIcroorganismo se, após o período de

incubação, apresentar crescimento caracterlstlco confirmado por exame microscópico.

1.2. SALA DE TESTES

A Prova de Esterilidade Bacteriana e Fúngica deve ser executada em Capela de Fluxo Laminar classe 100,

devidamente instalado em uma área blolimpa classe 10.000. O manejo requer o cumprimento estrito de Boas

Práticas de Laboratório e de Normas de Biossegurança.

1.3. AMOSTRAGEM

A amostragem utilizada na prova é de no mrnlmo *0,4..Jii,* 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. MATERIAL

• Amostras a testar

• Erlenmeyers esterilizados

- Pipetas de 5 ml e 10 ml esterilizadas

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

- Agulhas de 40 X 1,0 mm esterilizadas

• Tubos com 40 ml de Caldo T1oglicolato de Sódio

- Tubos com 40 ml de Caldo Caserna Soja

• Placas de Pelri com Agar Tripticaselna Soja

- Capela de Fluxo Laminar classe 100

- Pipetador automático

- Gaze esterilizada

• Estufas reguladas a 20'C ·25·C e 30'C -35'C

- Cuba para descarte de material !

- Equipamento de contenção primária

1.4.1.2. PROCEDIMENTO

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

- Deve ser usado equipamento completo de contenção primária.

- A prova deve ser executada dentro da Capela de Fluxo Laminar classe 100 que deverá ter sido acionado

15 minutos antes do inicio da prova.

.----- -Coletar e misturar as amostras em Erlentneyer.

- Homogeneizar e pipetar 5,Oml da amostra em cada um dos tubos de Caldo noglicolato de Sódio e Caldo

C~serna Soja, até esgotamento total da amostra.

- Fazer controle microbiológico dos procedimentos realizados dentro do gabinete de blossegurança, com

• placas de Agar Tripticaselna Soja.

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

Tioglicolalo de Sódio e Caldo Caserna Soja.

- Incubar os tubos de Caldo nogllcolato de Sódio. a temperatura de 30'C a 35'C e os tubos de Caldo

Caselna Soja a temperatura de 20'C a 25'C, durante 14 dias.

- Observar os tubos diariamente e registrar em protocolo.

1.4.2. FILTRAÇÃO POR MEMBRANA

1.4.2.1. MATERIAL

• Amostras

- Equipamento de filtração para prova de esterilidade em membrana

• Membrana pré-filtro

- Membrana filtrante 0,45 mlcra

- Tesouras esterilizadas

- Pinças esterilizadas

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

- Kitazato de 1000 ml esterilizado

- Tubos com 100 ml de Caldo TlOQllcolato.de Sódio

-Tubos com 100 ml de Caldo Caserna Soja

- Placas de Pelri com Ágar Tripticaselna Soja

• Capela de Fluxo Laminar classe 100

- Solução de água peptonada 1% esterilifizada

- Bomba de vácuo

- Estufas reguladas a 20'C ·25·C e 30'C -35'C

- Cuba para descarte de material

- Equipamento de contenção primaria

1.4.2.2. PROCEDIMENTO

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

- Deve ser usado equipamento completo de contençtlo primária.

- A prova deve ser executada dentro da Capela **de** Fluxo Laminar classe 100, que deverá ter sido acionado

15 minutos antes do inicio da prova. •

- Coletar e misturar as amostras com seringa e colocá-las no copo de fiitraçao.

- Filtrar a vácuo (70 mmHg), todo o volume da amostra.

- Após o término da filtraçao da amostra, lavar as membranas com um volume de SOlUça0 de água

peptonada 1%, igual ao volume da amostra.

- Dividir as membranas em duas partes iguais. .

- Colocar uma metade no tubo com Caldo Tiogllcolato de Sódio e a outra no tubo com Caldo Caserna Soja.

. ~- Fazer controle microbiológico dos procedimentos realizados dentro da Capela de Fluxo Laminar classe I ou

li, com placas de Agar Tripticaselna Soja. . . '

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

Tioglicolato de Sódio e-Caldo Caserna Soja.

- Incubar os tubos de Caldo T1oglicolato de Sódio atemperatura de 30 a 35°C e os tubos de Caldo Caserna

Soja a temperatura de 20 a 25'C durante 14 dias.

- Observar os tubos diariamente e registrar em protocolo.

INTERPRETAÇÃO DOSRESUL TADOS

Teste 1( 0,4..r,; , ) Test~ 2( *0,4..Jii )* Reteste(0,8vn) Resultado

satisfatório

+ satisfatório

+ + Insatisfatório

+ + Insatisfatório

1.5. ESPECIFICAÇÃO

As amostras em teste não devem apresentar crescimento bacteriano ou funglco.

2. PROVA DE PUREZA (PM.2)

2.1. CONTROLE MICROSCÓPICO (MÉTODO DE COLORAÇÃO DE GRAM)

**c** . --------------**-**--,-------.-.-.-- **~~\_~.\_ \_** .•-•- .•.-.-.-**,**.- .•.-.•.--**\_**-**\_**-- .•--.------- **\_\_**.**\_**..•.•••••••---- •••.•----- ..~•..~\_••.•••••~-~\_ •••••:-\_:-.\_•••••••••:"::~\_ •••••:-\_:-:.":\_•••:':.::\_==.::\_:":\_~\_::\_':\_:':\_::\_:\_::\_:\_~\_::\_:\_::\_':\_::\_:':.:\_::\_:-:\_:::\_:.\_~~': ••:-:\_=\_::•:•:.:'::\_:':\_::\_:\_:::'.-

*'-'--'--- , .....-.--, ~w •••••. \_ ~ . •. •.• - ~ ...-,.., .-,~ •• •*

;)N~~1(ff1:içÁ~~kHíM:ri:-,!óV 1996 **DIÁR'Íô OFiéiÂi** isÉç).6 **p** 1 "~3557

2.1.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Solução de Cristal Violeta

- Solução de Lugol

- Solução de Fucsina ou Safranina

- Alcool a 95°

- Lâmina de vidro para microscopia

- Bico de Bunsen

- Microscópio

- Cuba para descarte de material

2.1.2. PROCEDIMENTO

- Fazer esfregaço da amostra a testar sobre a lã mina de vidro.

- Fixar o esfregaço com calor.

- Corar 1 minuto com solução de Cristal Violeta.

'- Escorrer o corante e cobrir durante 1 minuto com, solução de Lugol.

- Descorar com álcool a 95° por aproximadamente 30 segundos.

-Lavar com água corrente.

- Corar 1 minuto com solução de Fucslna ou Safranina.

- Lavar com água corrente.

- Secar com calor.

- Observar em microscópio com objetiva de Imersão (100).

2.1.3. RESULTADO

As bactérias Gram Negativas se apresentam vermelhas (fucsina), ao passo que as Gram Positivas se

apresentam roxas.

2.2. PROVA DE AUS~NCIA DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES

2.2.1. COMPONENTE PERTUSSIS

2.2.2. MATERIAL

- Amostra a testar

-' Placas de Petri com Agar Bordet-Gengou Suplementado com 25% de sangue de carneiro

desfibrinado.

- Estufa a 35°C

- Gabinete de Biossegurança Classe 11B

- Microscópio

- Cuba para descarte de material

2.2.2.3. PROCEDIMENTO

Inocular 0,1 ml da amostra a testar em placas de Petrl com Agar'Bordet-Gengou Sangue.

Incubar à 35°C por 72 horas. ••.

Certificar as caracterfsticas morfológicas das colOnias.

Fazer esfregaço das colOnias, corar pelo método de Grame observar em microscópio.

2.2.2.4. RESULTADO

As caracterfsticas morfológicas das colOnias devem corresponder às descritas para *Bordetella pertussis.*

Somente devem aparecer no exame microscópico cocobacilos Gram Negativos.

2.3. COMPONENTE DIFTÉRICO

2.3.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Placas de Petri com meio de LeOêffler

- Estufa a 37° C

- Gabinete de Biossegurança Classe 11B

- Microscópio

- Cuba para descarte de material

2.3.2 . .PROCEDIMENTO

- Inocular 0,1 ml da' amostra a testar em cada placa de Petri com Meio de Leoêffler.

- Incubar a 37°C por 24 horas.

- Cel1ificar as caracterlsticas morfológicas das colOnias.

- Fazer esfregaço das colônias, corar pelo método de Gram e observar em microscópio.

2.3.3. RESULTADO

- As caracterlsticas morfológicas das colOnias devem corresponder às descritas para *Corynebacterium*

*diphtheriae. •*

- Somente deve aparecer no exame microscópico formas bacterianas Gram Positivas.

2.4. COMPONENTE TETÂNICO

2.4.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Placas de Petrl com Agar Sangue

- Estufa a 37°C

- Gabinete de Biossegurança Classe 11B

- Microscópio

- Jarra de Anaerobiose

- Cuba para descarte de material

2.4.2. PROCEDIMENTO

- Inocular 0,1 ml da amostra a testar em duas placa de Petri com Agar Sangue.

- Incubar uma placa em Jarra de Anaeroblose e outra placa em Aerobiose a 37°C por 24 horas.

- Certificar as caracterfslicas morfológicas das colõnías,

- Fazer esfregaços do material incubado, corar pelo inétodo de Gram e observar em mlcroscóplo.

2.4.3. RESULTADO

- Em Aerobiose:

- A amostra não deve apresentar crescimento bacteriano na placa de Petri com Agar Sangue.

- Em Anaeroblose:

- As caracterlsticas morfológicas das colOnias devem corresponder às descritas para *C/ostridium tetani.*

~'.

- Somente deve aparecer no exame microscópico formas bacterianas bacilos Gram Positivas.

3. PROVA DE INATIVAÇAo BACTERIANA *(Bordetella pertussis)* (PM.3)

3.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Pipetas de 1,0 ml esterilizadas

- Placas de Petri com Agar Bordet-Gengou Sangue

- Estufa a 35°C

- Gabinete de Blossegurança Classe 11

- Cuba para descarte de material

3.2. PROCEDIMENTO

- Inocular 0,1 ml da amostra a testar em placas de Petri com Agar Bordet·Gengou Sangue.

-Incubar à 35°C por 72 horas.

3.2.RESULTADO

- A amostra não deve apresentar crescimento Bordetella pertussis.

4. CONTROLE DE OPACIDADE (PM.4)

4.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Quinta Preparação de Referência de Opacidade

- Solução salina fisiológica esterilizada

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

- Tubos de ensaio de 16 X 160 mm

- Gabinete de Biossegurança Classe 11

- Cuba para descarte de material

4.2.-PROCEDIMENTO

- Colocar 1,Oml da amostra a testar em um tubo de ensaio de 16 X 160mm.

- Diluir a amostra com SOlUça0 salina fisiológica até uma opacidade semelhante ao padrão.

- Comparar a Opacidade visualmente contra a Quinta Preparação de Referência de Opacidade.

4.3. RESULTADO

A Unidade de Opacidade (Uop) é expressada pela formula

Uop/ml = *volumeflnal* x 10

*volume inicial*

11I-PROVAS FISICO-QUIMICAS

1. DETERMiNAÇÃO POTENCIOMÉTRICA DO pH (PFQ.1)

A Determinação Potenciométrica do pH, é feita pela medida da diferença de potêncial entre dois eletrodos

adequados, imerso na SOlUça0 em exame. Um deste eletrodo é sensfvel aos íons hidrogênio e o outro é o

eletrodo de referência, de potêncial constante.

1.1. MATERIAL

- Amostra a testar

-.SoluçOes tampão pH 4,0 , 7,0 e 9,0

- PotenciOmetro, eletrodos

- Béqueres de 25 ml

- Papel de filtro

- Frasco lavador com água bidestilada

1.2. PROCEDIMENTO

- Transferir para Béqueres de 25 ml cerca de 10 ml das soluções padrão pH 4,0, pH 7,0 e pH 9,0 e da

amostra a testar.

- Calibrar o aparelho, utilizando as soluções tampão.

- Lavar o eletrodo com água bidestilada e secar suavemente com papel de filtro após cada medição.

- Determinar o pH da amostra a testar. A amostra deve estar na mesma temperatura das soluções tampão

utilizadas na calibração

- Registrar os dados em protocolo.

2. DETERMINAÇÃO DE TIMEROSAL (PFQ.2)

Esta determinação tem põr objetivo a avaliação quantitativa de timerosal, em ppm.

2.1. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

A concentração de limerosal (mertiolate, tlmerosal, etil-mercuriliosalisilato) é determinada

espectrofotométricamente através da absorbãncla do produto resultante da reação do mercúrio nele contido com

a difenilcarbazona (dltizona), previamente purificada.

2.1.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Solução padrão de timerosal com 200 ppm

- Funis de separação de 50 ou 100 ml

- Balão volumétrico de 10 ml

- Pipeta graduada de 10 ml

- Erlenmeyer com rolha esmerilhada de 50 ml

- Cubetas de vidro ou de quartzo

- Funil de vidro

- Papel filtro

- EspectrofotOmetro ou colorlmetro

- Centrlfuga

- Tubos de centrffuga

• SOlUça0 de ditizona em tetracloreto de carbono a 0,05% (SOlUça0 estoque)

- SOlUça0 de hidróxido de amOnio 0,013 M e 0,075 M

- Solução de ácido acético 15%

**".à:or. \_'" ••• ~. \_,...~ .•• \_ .••• \*"' .••• \_ ••• ..,. '"** Ui'-~\_ •••••• \_ •.•• \_ ••• \_~ \_\_ .u::a.. •• -I\lL 'WO' •••••••••• \_.lIõI,\_-\_~- "' **IIol-S ~** 4\_ •••••••.• \_~ •• ~ ~ - 'U "" --

.,

-----------------------------------------------------~ -~- -- -

'~t::.ir- --·--·""::.;;""'0-----..-'~--- -...-----.- --.--.---.:"' ,,:,:'--:~--~:-:~..--.:-: --- **a •.••. \_.\_ ••••• ~\_ .•.••.•.•• ------...--- ---,. .•--.-- ••..•••.. - ••••.• ---- .•••. - •. ---**

. 23528 SEçXbí 1 B"IÃiÜb' OFÍCIAL r 'N:í%·TERÇA-~EíRA; 1:2N6V~1996

- Solução de ácido sulfúrico 0,25 M e 0,5 M

- Água bldestilada

- Tetracloreto de carbono p.a.

- Ditlzona

- Ácido nltrico (1:3)

o Papel de alumlnlo

Observação: toda vidraria utilizada deve ser lavada com HN03 (1:3) e enxáguada com água delonlzada.

2.1.2. PROCEDIMENTO

o Transferír allquotas de 2,5 , 5,0 e 7,5 ml de uma solução padrão de timerosal com 200 ppm para balões

volumétricos de 10 ml e completar o volume com água bldestilada.

o Transferir, de cada solução preparada' no Item anterior, allquotas de 0,5 ml para três funis de separação e,

a todos, acrescentar 4,5 ml de água bidestilada e 5,Omlde SOlUça0 de ácido sulfúrico 0,5 M.

o Preparar a solução estoque de ditizona em tetracloreto de carbono.

- Diluir a 1:50 asoluçêo-eetoque de ditizona.

- Adicionar 15 ml de SOlUça0extratora de dltizona a cada um dos funis de separação e agitar por 5 minutos.

Proteger da luz, recobrindo os funis com papel de alumlnio .•

- Recolher a fase orgânica, e lavá-Ia primeiramente com 10 ml de solução de hidróxido de amOnio0,013 M e

em seguida com 10 ml de solução de ácido acético 15%. Agitar ao final de cada lavagem.

- Filtrar a fase orgânica através de papel filtro, caso ocorra opalescência.

- Determinar a absorbãnclado. filtraria a 460 nm, Estas leituras correspondem às soluções de timerosal, de

concentração 50, 100 e 150 ppm.

- Tratar, de maneira similar, duas allquotas da amostra a testar. Se necessário, a separação das fases deve

ser feita por centrifugação.

- Fazer um ensaio em branco.

- Determinar.a concentraçao de timerosal das amostras por interpolação gráfica ou regressão linear.

2.1.2.1 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE DITIZONA

- Dissolver cerca de O,1g de ditlzonaem 150 ml de tetracloreto de carbono, com agitação, porum perlodo de

4 a 6 horas, protegendo da luz.

o Filtrar a solução em funil de separação de 500 ml e extrair, com porções de 50 ml de solução de hidróxido

de arnOnlaa 0,075 M a fase orgânica. Este procedimento deverá ser repetido até que a solução amoniacal deixe

a fase orgânica com coloraçao amarelo alaranjada.

- Juntar os extratos aquosos em funil de separação de 1000 ml e extrair a fase orgânica com 02 (duas)

porções de 2 ml de tetracloreto de carbono, desprezando-as.

o Adicionar 200 ml de tetracloreto de carbono a fase aquosa, e acidificar com 10 ml de ácido sulfúrico a 0;5

M.

o Recolher a fase orgânlca·e guardar em frasco âmbar contendo 10 ml de água deionizada e 1 ml de ácido

sulfurico a 0,5 M.

2.2. MÉTODO POLAROGRÁFICO

2.2.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Polar6grafo

o Eletr6lito suporte concentrado (KCI2M; HCI 0.2 M; Triton X 100 a 0,004%)

- Solução estoque de timerosal com 200 ppm

- Balão volumétrico de 10 ml e 20 ml

- Pipetas graduadas de 5 ml e 10 ml

- Água bidestilada

2.2.2. PROCEÓIMENTO

2.2.2.1. PREPARAÇÃO DO BRANCO E DOS PADRÕES DE TIMEROSAL

A preparRçao dos padrões de·timerosal deve realizar-se Imediatamente antes de seu uso.

- Preparação do branco

• Transferir 5 ml da SOlUça0de eletr6lito suporte conçentrada para balão volumétrico de 10 ml e completar o

volume com água bidestilada.

• Preparação do Padrão de Timerosal com 20 ppm

o Transferir 2 ml da solução estoque de timerosal, para balão volumétrico de 20 ml, adicionar 10 ml do

eletr6lito e completar o'volume com água bidestilada.

o Preparação do Padrão de Timerosaj com 40 ppm

o Transferir 4 ml da solução estoque de timerosal, para balão volumétrico de 20 ml, adicionar 10 ml do

eletr6lito e completar o volume com água bidestilada.

- Preparação ae Padrão Timerosal com 100 ppm

- Transferir 10 ml da solução estoque de timerosal, para balão volumétrico de 20 ml e completar o volume

com eletr6lito.

2.2.2.2. CURVA DE CALlBRAÇÃO

- Leitura do branco

- Transferir 5 ml do branco para a célula polarográfica.

o Efetuar a análise polarográfica por pulso diferencial. A análise é efetuada utilizando os seguintes

parámetros.

.~ Energia iniciai (Ei) ..........•................ -o,3V

Energia final (EI) -1,OV

Tempo de purgação 4 minutos

Tempo de gota .........•...........•......... 1 segundo

,velocidade de varredura ...............• 4 mV/seg.

- Leitura dos padrões

- Efetuar a análise polarográfica, por pulso diferencial, com os padrões de timerosal de 20, 40 e 100 ppm,

sob as mesmas condições do branco;

- Traçar a curva de callbração.

2.2.2.3. LEITURA DA AMOSTRA

" - Transferir 5 ml da amostra a testar para balão volumétrico de 10 ml e completar o volume com eletrOlito.

o Transferir 5 ml da diluição para a célula polarográfica.

- Efetuar ;;, análise polarográfica por pulso diferencial, utilizando os mesmos parámetros da curva de

calibração.

2.3. CÁLCULOS to

A concentração detírnerosal é dada pela f6rmula:

T(g%) = 2 x 10" xC

Onde:

C = concentração analisada fornecida pela curva de calibração (microgramaslml)

T = concentração de timerosal(g%)

Observação: O resultado deve ser expresso em ppm e registrado em protocolo.

2.3 MéTODO DE ABSORÇÃO ATOMICA

2.3.1 MATERIAL.

- Amostra a testar

- Espectrofot6metro de absorção atOmica

- Ácido nltrico concentrado p.a.

- SOlUça0de ácido nltrico a 1,5%

- SOlUça0padrão de titrisol a 1000'ppm

- SOlUça0de borohidreto de s6dio a 3%

- SOlUça0de permanganato de potassio a 5%

- Balão volumétrico de 50 e 1000 ml

- Pipetas graduadas de 5 e 10 ml

• Água bidestilada

2.3.2 PROCEDIMENTO

- Transferir, quantitalivamente, 1 ml da amostra a testar para um balão volumétrico de 50 ml, adicionar 0,5

ml de ácido nltrico concentrado e completar o volume, até o traço de refêrencia, comágua bldestilada.

- Preparar o branco substituindo a amostra a testar por água bldestilada e seguindoo procedimento descrito

acima.

- A partir de uma solução estoque de 1000 ppm de Hg, preparar um padrão Intermediário de 1 ppm de Hg e

deste retirar aI/quotas diferentes, de acordo com o intervalo de trabalho, transferindo-as para as células de

reação contendo solução de permanganato de potassio.

- Determinar a absorbancia a 253,6 nm em espectrofotOmetro de absorção atOmica com as seguintes

especificaçOes : Fonte de energia com lâmpada (6 mA) de catodo OCode mercúrio, fenda H07 e nitrogênio como

gás de arraste.

3. DETERMINAÇÃO DO VOLUME M~DIO POR AMPOLA OU FRASCO-AMPOLA (PFQ.3)

3.1 MéTODO

- Medida direta

3.2. MATERIAL

- Amostra a testar

o Proveta de 10 ml, 25 ml, 50 ml e 100 ml

- Seringas de 2 ml, 5 ml e 10 ml

- Agulhas 40 X 1,0 mm

3.3. PROCE[lIMENTOS

- Abrir, no mrnimo, 10 ampolas ou 5 frascos-ampola da amostra a testar e retirar Individualmente, com

seringa seca ti conteúdo de cada ampola ou frasco-ampola. .

~ Esgotar os conteúdo da seringa em uma preveta seca em que o volume final a ser medido ocupe no

mrnimo 40% da capacidade total da proveta.

- O volume médio 6 dado pelo volume determinado na proveta, dividido pelo númerode ampolas ou frascosampola

utilizados. . . .

- Registrar os dados em protocolo.

3.4. ESPECIFICAçOeS

• 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

(ml)

Excesso mlnlmo para

IIquldos móveis (ml)

0,5

1,0

2,0

5,0

10,0

20,0

50,0

0,10

0,10

0,15

0,30

0,50

0,60

2,00

4. DETERMINAÇÃO DE FORMALDEIDO RESIDUAL (PFQ.4)

Esta determinação tem por objetivo a determlnação quantitativa deformalderdo, em ppm.

4.1. MéTODO ESPECTROFOTOMIttRICO

4.1.1. MATERIAL'

- Amostra a testar

o Espectrofot6metro, cubetas de vidro ou quartzo

o Centrlfuga

- Tubo para centrlfuga

- Pipetas volumétricas de 1 ml, 3 ml e 4 ml

- Tubos de ensaio

- Banho-maria

• Solução de ácido tricloroacético 2.5%

- Solução estoque de formaldeldo com 100 *ug/ml,* titulàda

• Reagente de Hantzsch

• Acetilacetona p.a

- Acetato de am6nio p.a

• Ácido acético glacial p.a,

- Água bidestilada

4.1.2. PROCEDIMENTO

4.1.2.1. DESPROTEINIZAÇÃO

- Adicionar, lentamente e com agitação, a 1 ml da amostra, 3 ml de ácido tricloroacético 2.5%.

- Deixar em repouso por cinco minutos.

- Centrifugar por 10 minutos a aproximadamente 2.000xg.

- Transferir o sobrenadante para um tubo de ensaio.

4.1.2.2. PREPARAÇÃO DO BRANCO

- Colocar em um tubo de ensaio 1,0 ml de água bidestilada e adicionar 3 ml de ácidotricloroacético a 2.5%.

**-----------------------------------------------:** 1

j

lj

J

4.1.2.3. PREPARAÇÃO DOS PADRÓES DE FORMALDEIDO J

- Diluir a 10 ug/ml a SOlUça0estoque de formaldeldo.

\_Transferir 4 ml da diluição com 10 ug/ml de formaldeldo para um tubo de ensaio.

• Transferir 3 ml dadilulção com 10 ug/ml de formaldeldo para um tubo de ensaio e completar o volume para

4 ml com água bldestilada.

\_Transferir 2 ml da diluíção com 10 ug/ml de formaldeldo para um tubo de ensaio e completar o volume para

4 ml com água bldestilada.

\_Transferir 1 ml da dilulçao com 10 ug/ml de formaldeldo para um tubo de ensaio e completar o volume para

4 ml com água bidestilada.

4.1.2.4. TÉCNICA

• Adicionar 4 ml de reagente de Hantzsch em cada um dos tubos de ensaio.

\_ Colocar os tubos de ensaio em banho-maria a 58·C por cinco minutos.

o Deixá-los esfriar a temperatura ambiente.

4.1.2.5. LEITURA

o A amostra e o padrão devem ser lidos imediatamente após terem sido resfriados á temperatura ambiente

para evitar mudança na cotoraçêo.

- Ler os valores de absorbãncia a 412 nm.

\_A leitura dos padrões será utilizada para fazer a curva de calibração.

\_ Determinar a concentração de formaldeldo residual das amostras, por interpolação gráfica ou regressão

linear. .

- Registrar os dados em protocolo.

Observações:

• Reagente de Hantzsch

o Dissolver 150g de acetato de amOnio p.a., 3 ml de ácido acético p.a ,e 2 ml de acetilacetona em um frasco

de 1.000 rnl, contendo 500 ml de água destilada.

o Completar o volume para 1.000 ml.

- Guardar a SOlUça0em frasco árnbar,

• A concentração de formaldeldo residual deve ser expressa em ppm e os dados registrados em

protocolo.

5. DETERMINAÇÃO DE ALUMINIO (PFa.5)

Esta determínação tem por objetivo a avaliação quantitativa de Aiumlnlo (AI3

.) em *mg/ml.*

5.1. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

5.1.1. MATERIAL

• Amostra a testar

o EspectrofotOmelro

o Cubetas de viqro ou quartzo

o Pipetas graduadas de 1 ml, 2 ml e 15 ml

o Pipetador automático ,

\_ BalAo Kjeldahl

o Balllo volumétrico de 25 ml e 50 ml

o Acido .nltrico p.a.

o Manta de aquecimento

o SOlUça0 tampãc de acetato

o ,SolUça0 de ácido tioglic6lico 1%

- SOlUça0 reagente aluminon

- Banho-maria

- SolUça0 tampAo de carbonato

o Capela de segurança qulmica

o Agua bidestilada

- Gelatina p.a.

5.1.2. PROCEDIMENTO

o Colocar 1 ml da amostra a testar em balão de Kjeldahl e adicionar 2 ml de ácido nltrico p.a.

o Aquecer em manta de aquecimento até que a solução fique ilmpida.

o Transferir a solução para um balão volumétrico de 25 ml e completar o volume com tampão acetato.

o Pipetar 2 ml destà SOlUça0e transferir para balão volumétrico de 50 ml.

• Adicionar 2 ml da SOlUça0de ácido tioglicólico 1% recém-preparada.

• Aguardar 2 minutos. .

• Adicionar 15 ml da solução reagente de aluminon e aquecer em banho-maria (1QO·C)por 15 minutos.

• Esfriar.

• Adicionar 10 ml da solução tampão de carbonato e completar o volume com água bidestilada.

\_ Preparar uma solução branco contendo água bidestilada no lugar da amostra.

- Determinar a absorbãncia a 530 nm, do branco e da amostra.

\_ Determinar a concentração de A13•da amostra, por interpolação gráfica ou regressão linear.

- Registrar os dados em protocolo.

Observações:

• Preparo das soluções reagentes.

- Reagente de Aluminon

- SOlUça01

\_ Dissolver 250g de acetato de amOnio p.a. em 500 ml de água bldestilada.

\_ Adicionar 40 ml de ácido acético glacial, 0,5g de aluminon dissolvido em 50 ml de água bldestilada, 1,0 g

de ácido benzóico p.a. dissolvido em 150 ml de 2-propanol p.a. e 225 ml de 2-propanol p.a.

o Completar o volume a 1000 ml com água bidestilada.

-SOlUça0 2

o Dissolver 5,0 g de gelatina p.a. em 125 ml de água bídestilada quente e misturar com 250 ml de água

bidestilada fria.

- Filtrar e completar a500ml com água bidestilada.

·.Soluçao Final de Aluminon •

o Misturar com agitação as soluções 1 e 2. A mistura deve estar completamente ilmpida quando fria.

o Guardar em frasco de polletileno, protegidas da luz.

o Tamplo acetato •

o Dissolver 27.5 g de acetato de amOnio p.a. em 50 ml de água bidestilada e 0,5 ml de ácido clorldrico 25%.

o Completar a 100 ml com água bldestilada.

5.2. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE ABSORÇÃO ATÓMICA

5.2.1. MATERIAL

o Amostra a testar

- Pipetas volumétricas de 2 ml e 4 ml

- Balão de Kjeldahl

- Balão volumétrico de 25 ml

- Acido nllrico p.a .

o Manta de aquecimento

- EspectrofotOmetro de absorção atOmlca

- Capela de segurança qulmlca

- SOlUça0de nitrato de potássio a 100 *mg/ml*

- Agua bidestilada

/

/

5.2.2. PROCEDIMENTO

- Pipetar 2 ml da amostra a testar em balão de Kjeldàhl .

- Adicionar 4 ml de ácido nllrico p.a,

- Digerir a mistura até que a solução fique IImplda. •

\_ Transferir quantitativamente a mistura para baião volumétrico de 25 ml completando o volume com água

bidestilada. \_-----c-- \_

o Em paralelo, 'preparar uma curva de callbração-padrão de alumlniõ com as concentraçOes de 20 ppm, 40

ppm, 60 ppm e 80 ppm. *«;>*

• adicionar à amostra, a curva padrão e ao branco, uma-delermlnada "quantidade de supressor de íonlzação,

de modo a conter no final a concentração de 2000 ppm de potãssio.

\_ Preparar uma SOlUça0branco contendo água bidestilada no lu9ãr da amostra.

\_ Determinar em espectrofotOmetro de absorção atOmica, a concentração de Ar· da amostra, com as

seguintes condlçOes:

-ccmprimento de onda: *r* 309,3 nm

- abertura da fenda: 0,2 nm \

\_corrente da lâmpada para AI: 10 mA

\_chama: " óxido nitroso/acetrteno

Observação: A concentração de alumlnio (AI3·) dev~er expressa em *mg/ml* e regi~trar os dados em protocolo.

6. DETERMINAÇÃO DO NITROGÉNIO PROTEIC~ (PFa.6)

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

protéico em *mg/ml .*

6.1 MÉTODO DE MICRO-KJELDHAL

6.1.1 MATERIAL

o Amostra a testar

\_Manta de aquecimento para digestão, com sistema de neutralização para gases liberados

- Destilador

- Balança analítica

o Balão de Kjeldhal

• Bureta de 50 ml *(1/100)*

- Acido sulfúrico concentrado 37%

- Solução de hidróxido de sódio 20%

- SOlUça0de ácido bórico 5%

- SOlUça0de ácido clorfdrico O,1M padronizada

- SOlUça0indicadora mista (vermelho de metila e azul de metileno)

• SOlUça0de ácido trlcloroacético 33%

- Catalisador

• Pérolas de vidro

• Centrlfuga

- Plpetador automático

• Tubos de centrlfuga

- Pipetas graduadas 10 ml, 50 ml e 100 ml

- Agua bidestilada

6.1.2 PROCEDIMENTO

6.1.2.1 DIGESTÃO PARA DETERMINAÇÃO DO NITROGÉNIO TOTAL

\_ Pipetar a amostra em balão de Kjeldhal, 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 1,0 g de catalisador.

- Digerir, à temperatura de 300·C, por 30 minutos ou até que a amostra esteja IImpida e transparente,

6.1.2.2 DIGESTÃO PARA DETERMINAÇÃO DO NITROGÉNIO NÃOPROTÉICO

- Em tubo de centrlfuga, adicionar 2 rnl da amostra.

o Adicionar 8 ml de ácido trícloroacétlcc 33%.

- Centrifugar a 1500xg durante 10 minutos.

• Transferir 2,5 ml do sobrenadante, para balão de Micro-Kjeldhal.

- Adicionar 10 ml de ácido sulfúrico concentrado e 1,0 g de catalisador.

\_ Digerir, á temperatura de 300·C, por 30 minutos ou até a amostra esteja IImpida e transparente.

6.1.2.3 DESTILAÇÃO

• Levar os balões de Kjeldhal para o destilador, adicionar, gota a' gota, hidróxido de sódio 20%, até que a

solução fique ligeiramente azulada.

\_ Recolher cerca de 2:3 ml do destilado em um Erlenmeyer contendo 5 ml de solução de ácido bórico 5%, 25

ml de água destilada e 5 gotas de indicador misto.

6.1.2.4 TITULAÇÃO

\_Titular, com ácido clorldrico O,1M, até o ponto de viragem (coloração violeta indica o ponto final).

6.1.3 CÁLCULOS

Nitrogênio Total = *(yA -* VB) x 0,1M x Eqg N x FC x FD

onde:

VA = volume de HCI gasto na titulação da amostra

VB = volume de HCI gasto na titulação do branco

FC = fator de correção

FD = fator de diluição da preclptação em TCA (nilrogêneo não proteico)

NITROGt:NIO PROTÉICO = N total- N não Protéico

*r*

onde: N = t-jilrogênio

PROTEINAS(mg/ml) = Nitrogênio Protéico x 6,25

*- ..·c.::;:-- -----·~:--\_:\_;r----------· ----- -- \_--\_.-.-..----..*+- •. -.---- •••. --,. - •• -- -- ••••• -- ••• ""-\_ •• -\_ •.. - -- ••• - ~ ••••••.•• --- -- ••• - --\_ •• \_\_ •••• -. \_\_ .""-\_ •••••• .--- ,r). ) C, '\3 " , .... - "..,.,. ,.••.." 11 ~.--' ."·r r ": -,-- .ao I ~ f,o \_. '" '.

23530 SEÇÃO 1 DIÁRIO OFICIAL N° 220 TERÇA-FEIRA, 12 NOV 1996

6.2METODO

- Blureto

6.2.1 MATERIAL

- Amostra a testar

- EspectrofotOmetro

- Agitador de tubos

- Cubetas de vidro ou de quartzo

- Tubos de ensaio 16 X 160mm

- Pipetas volumétricas de 1 ml e 5 ml - pró-pipetas

- Pipeta graduada de 5 ml- pró- pipeta

- Reagente de Biureto

- Solução de cloreto de sódio a 0,85%

o Solução de cloreto de sódio a 0,85%. contendo albumina bovina (4 mg/ml)

6.2.2 PROCEDIMENTO .

o Transferir com o auxiliá de pipeta volumétrica, 1 ml da amostra a testar um tubo de ensaio.

o Adicionar com auxilio de pipeta graduada, 4 ml de solução de cloreto 'de sódio a 0,85%.

o Adicionar com auxilio de pipeta volumétrica, 5 ml de reagente de biureto.

o Homogenizar e deixar em ambiente escuro durante um perlodo de 30 minutos.

- Preparar um branco com 5 ml de solução de cloreto de sódio 0,85% mais 5 ml de reativo de Biureto.

- Em paralelo preparar uma curva de calibração padrão com as seguintes concentraçOes de albumina: 0,8

mg/ml; 1,6 mg/ml; 2,4 mglml e 3,2 mg/ml.

- Determinar a absorbãncla a 545 nm

7. DETERMINAÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO (PFQ.7)

Esta determinação tem por objetivo a avaliação quantitativa de cloreto de sódio em ppm.

7.1. METODO VOLUMETRICO

7.1.1. MATERIAL

o Amostra a testar

- Pipetas graduadas 1 ml e 10 ml

- Pipetador automático

-Erlenmeyer de 50 ml

- Solução de ácido nltríco 0,2 M

- Agua bldestilada

- Soluça0 indicadora

- Soluça0 de nitrato de mercúrio 110,005M titulada

- Bureta de 50 ml (1/100)

7.1.2. PROCEDIMENTO

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

• Adicionar 9 ml de água bidestilada.

o Adicionar, com agitação, 3 gotas da solução Indicadora.

o Adicionar algumas gotas de ácido nltrico 0,2 M, até que a solução fique amarela esverdeada.

- Preparar uma solução branco contendo água bldeslllada no lugar da amostra.

7.1.3. TITULAÇÃO

- Titular, com nitrato de mercúrio 110,005 M, até o ponto de viragem (coloração violeta indica o ponto final).

7.1.4. CALCULOS

A concentração de cloreto de sódio é dada pela fórmula:

NaCI (mg/ml) = *NA -* VBI FC'X O585

V

onde:

VA = volume de nitrato de mercúrio li, 0,005 M gasto na titulação da amostra

VB = volume de nitrato de mercúrio 11,0,005 M gasto na titulação do branco

FC = fator de correção

V = volume da amostra a testar (ml)

ObservaçOes:

Preparação das soíuções Reagentes

- Solução de Nitrato de mercúrio 11, O,005M titulada

\_Dissolver 1.623 9 de Nitrato de mercúrio 11em 150 ml de água bideslilada.

- Adicionar 14 ml de ácido n(trico2 M

\_Completar o volume para 1.000 ml em balão volumétrico éom água bidestilada.

- Titular.. -

- Solução de Ácido nltrico 0,2 M

o Trensferir 3,5 ml de ácido nltríco p.a. para um balão volumétrico de 250 ml.

- Completar o volume com água bideslilada.

- Solução Indicadora

\_ Em balão volumétrico de 25 ml, dissolver 12 mg de Difenilcarbazona (DFC) e 12,5 mg de azul de

bromofenol (ABF) em 15 ml de álcool etllico.

-Completar o volume com álcool etl.lico p.a,

o Guardar a solução emfrasco ámbar e à temperatura de 4'C a 8'C.

\_A concentração de cloreto deverá ser expressa em pprn e registrar os dados em protocolo.

8. DETERMINAÇÃO DE SULFATO D.EAMONIO (PFQ.8)

Esta determinação tem por objetivo a avaliação quantitativa de sulfato de amOnio, em ppm.

8.1. MÉTODO COLORIMETRICO

8.1.1. MATERIAL

- Amostra a testar

- Pipetador automático

\_ Pipetas volumétricas de 1 ml e 10 ml

- Balão volumétrico de '100 !TIl

\_Tubos de ensaio de 16X 160 mm (opticamente iguais)

\_Solução padrão estoque de Sulfato de Arnõnlo 0,6 g%

- Reagente de Nessler

- Agua bldestilada

8.1.2. PROCEDIMENTO

- Preparação da amostra a testar

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

- Completar o volume com água bideslilada.

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

- Preparação de PadrOes

- Transferir 1 ml da solução padrão estoque de sulfato de amOnio (O,6.g%) para balão volumétrico de 100 ml.

- Completar o volume com água bidestilada.

• Fazer diluiçOes da solução acima em proporçOes de 1:2, 1:3, 1:4.

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

8.1.3. TECNICA

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

- Comparar a cor entre a amostra e os padrões.

- A Intensidade da cor da amostra deve ser igual á da solução padrão.

BIBLIOGRAFIA

1. Requeriments for Diphtheria, Tetanus, Perlussis and Combined Vaccines. Technical Report series nO800

(1990)WHO.

2.-General Requeriments for the Sterility of Biological Substance, Technlcal Report Series nO530 (1973) WHO.

3. Biological Substances: Internacional Standards and References reagentes, Technical Report Series nO840

(1994)WHO.

4. Code of Federal Regulations, Title 21 (1995) Food and Orugs Adminlstration - USA

5. Good Manufacturing Practies for Biological Products, Technical Report Series nO822 (1992) WHO.

6.- Prácticas Adecuadas para la Fabricación de Productos Farmacéuticos, Serie de Informes Técnicos nO823

(1992) OMS.

7. Farmacopeia Brasileira 4° edição, parte I (1988)

\

.8. Pharmacopeia USP XXIII (1994)