

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO

Publicado em: 05/08/2024 | Edição: 149 | Seção: 1 | Página: 205

Órgão: Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/4ª Diretoria/Gerência de Laboratórios de Saúde Pública

CONSULTA PÚBLICA Nº 1.270, DE 2 DE AGOSTO DE 2024

A GERENTE DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA DA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, no exercício da competência que lhe foi delegada por meio do Despacho 77, de 10 de agosto de 2022, aliado ao art. 187, III, do Regimento Interno aprovado pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 585, de 10 de dezembro de 2021, resolve submeter à consulta pública, para comentários e sugestões do público em geral, proposta de ato normativo, em Anexo.

Art. 1º Fica estabelecido o prazo de 45 (quarenta e cinco) dias para envio de comentários e sugestões à proposta de renumeração dos Ensaio biológicos (5.5.2), ao texto farmacopeico 5.5.2.1 Testes para avaliação de pirogênios, ao novo método 5.5.2.1.1 teste de ativação de monócitos; à exclusão do método 5.5.2.3 Toxicidade e à revisão da monografia antimoniato de meglumina solução injetável, conforme Anexo.

Parágrafo único. O prazo de que trata este artigo terá início 7 (sete) dias após a data de publicação desta Consulta Pública no Diário Oficial da União.

Art. 2º A proposta de ato normativo estará disponível na íntegra no portal da Anvisa na internet e as sugestões deverão ser enviadas eletronicamente por meio do preenchimento de formulário eletrônico específico, disponível no endereço: <http://pesquisa.anvisa.gov.br/index.php/972788?lang=pt-BR>.

§1º Com exceção dos dados pessoais informados pelos participantes, todas as contribuições recebidas são consideradas públicas e de livre acesso aos interessados, conforme previsto na Lei nº 12.527, de 18 de novembro de 2011 e estarão disponíveis após o encerramento da consulta pública, em sua página específica, no campo "Documentos Relacionados".

§2º Ao término do preenchimento e envio do formulário eletrônico será disponibilizado número de identificação do participante (ID) que poderá ser utilizado pelo usuário para localizar a sua própria contribuição, sendo dispensado o envio postal ou protocolo presencial de documentos em meio físico junto à Agência.

§3º Em caso de limitação de acesso do cidadão a recursos informatizados será permitido o envio e recebimento de sugestões por escrito, em meio físico, durante o prazo de consulta, para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Coordenação da Farmacopeia - Cofar, SIA trecho 5, Área Especial 57, Brasília-DF, CEP 71.205-050.

§4º Excepcionalmente, contribuições internacionais poderão ser encaminhadas em meio físico, para o seguinte endereço: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Assessoria de Assuntos Internacionais - AINTE, SIA trecho 5, Área Especial 57, Brasília-DF, CEP 71.205-050.

Art. 3º Findo o prazo estipulado no art. 1º, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária promoverá a análise das contribuições e, ao final, publicará o resultado da consulta pública no portal da Agência.

Parágrafo único. A Agência poderá, conforme necessidade e razões de conveniência e oportunidade, articular-se com órgãos e entidades envolvidos com o assunto, bem como aqueles que tenham manifestado interesse na matéria, para subsidiar posteriores discussões técnicas e a deliberação final da Diretoria Colegiada.

GRAZIELA COSTA ARAÚJO

Este conteúdo não substitui o publicado na versão certificada.



ANEXO
PROPOSTA EM CONSULTA PÚBLICA

Processo nº: 25351.930989/2022-42

Assunto: Proposta de renumeração dos Ensaio biológicos (5.2.2), inclusão do texto farmacopeico 5.5.2.1 Testes para avaliação de pirogênios; inclusão do novo método geral 5.5.2.1.1 teste de ativação de monócitos; exclusão do método geral 5.5.2.3 Toxicidade e revisão da monografia antimoniato de meglumina solução injetável.

Agenda Regulatória 2024-2025: Tema nº 5.5 Atualização periódica dos compêndios da Farmacopeia Brasileira (FB)

Área responsável: Coordenação da Farmacopeia – Cofar

Diretor Relator: Rômison Rodrigues Mota

1 - 5.5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS - 5.5.2.1 TESTES PARA AVALIAÇÃO DE PIROGÊNIOS

5.5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

5.5.2.1 TESTES PARA AVALIAÇÃO DE PIROGÊNIOS

Deve ser realizado, para todo produto de administração parenteral, um teste para a determinação de pirogênios. Os pirogênios são contaminantes capazes de ativar a liberação de citocinas na circulação sanguínea, que atuam como mediadores endógenos, capazes de induzir a febre em humanos. Este capítulo descreve possibilidades de ensaios para detecção e/ou quantificação de pirogênios na amostra:

- O teste de ativação de monócitos - MAT (5.5.2.1.1) que tem a capacidade de detectar os pirogênios totais, isto é, os pirogênios do tipo endotoxina bacteriana e os pirogênios do tipo não-endotoxina (NEPs).
- O teste de pirogênios em coelhos (5.5.2.1.2) que tem capacidade de detectar e quantificar os pirogênios totais.
- O teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.1.3), que tem a capacidade de detectar ou quantificar somente pirogênios do tipo endotoxinas bacterianas. O teste de endotoxinas bacterianas pode substituir os testes de pirogênios totais, quando acompanhado de uma análise de risco produto-específica para evidenciar o baixo risco de presença NEPs na amostra e a correlação de resultados obtidos por meio do método de endotoxinas bacterianas e um dos métodos de pirogênios totais.

Sempre que possível, após uma validação produto-específica, o MAT deve substituir o teste de pirogênios em coelhos, visando a redução de uso de animais. O teste de pirogênios em coelhos apenas deve ser empregado quando o seu uso, comprovadamente, promover uma mitigação do risco de contaminação por pirogênios totais ou quando a interferência da amostra no MAT inviabiliza a sua aplicação.

Podem ser empregados métodos alternativos de detecção de pirogênios, aprovados em outros compêndios oficiais reconhecidos pela legislação vigente da Anvisa, que versa sobre a admissibilidade de compêndios estrangeiros.

2 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS - INTRODUÇÃO

5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS

INTRODUÇÃO

O teste de ativação de monócitos (MAT) é o teste preferencial para a determinação de pirogênios do tipo endotoxina bacteriana e pirogênios do tipo não-endotoxina (NEPs) em produtos de administração parenteral. Recomenda-se a sua utilização, em detrimento do teste de pirogênios em coelhos visando à redução de uso de animais.

A adequabilidade produto-específica do método deve ser demonstrada. O MAT tem a capacidade de detectar os mediadores endógenos liberados por monócitos humanos ou linhagens celulares monocíticas humanas quando estimulados por endotoxinas bacterianas ou por NEPs. As citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 beta (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6), atuam como mediadores endógenos, capazes de induzir febre em humanos.

Este capítulo descreve duas possibilidades de métodos para a execução do MAT:

- Método I – Teste semi-quantitativo;
- Método II – Teste por comparação com lote controle.

É possível empregar método alternativo aos métodos I e II de MAT, no entanto, nesse caso deve ser realizada uma validação completa e deve ser demonstrado que o método é equivalente aos métodos I ou II oficiais.

3 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – DEFINIÇÕES - *Concentração limite de contaminantes*

DEFINIÇÕES

Concentração limite de contaminantes

A concentração limite de contaminantes (CLC) é a maior concentração de pirogênios permitida em um produto. Uma vez que o MAT é capaz de identificar pirogênios contaminantes, tanto do tipo endotoxina quanto NEPs, a concentração de contaminantes, detectados pela inferência a uma curva padrão de endotoxina (método I), deve ser expressa como equivalente de endotoxina (EE). O critério de aceitação para uma decisão de aprovação/reprovação é a CLC expressa em EE por miligrama ou mililitro ou por unidades da atividade biológica do produto a ser examinado pelo método I.

A CLC é calculada pela seguinte expressão:

$$CLC = \frac{K}{M}$$

em que:

K = dose limite humana de endotoxina por quilo de peso corpóreo;

M = máxima dose do produto por kg de peso em um período de uma hora.

Tabela 1 - Valores de K por via de administração

<i>Via de administração</i>	<i>Valor de K</i>
Intravenosa, intramuscular e subcutânea	5,0 EE por kg de massa corporal
Intravenosa para radiofármacos	2,5 EE por kg de massa corporal
Intratecal	0,2 EE por kg de massa corporal
Formulações parenterais administradas por metro quadrado da superfície corporal	100 EE/m ²

Quando uma concentração limite de endotoxina (CLE) tiver sido especificada para um produto, a CLC é igual à CLE, salvo indicação em contrário. Neste caso, a concentração da solução teste é expressa em:

- mg/mL se o limite de endotoxina for especificado por massa (UE/mg);
- unidades/mL se o limite de endotoxina for especificado por unidade de atividade biológica (UE/Unidade);
- mL/mL se o limite de endotoxina for especificado por volume (UE/mL).

4 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – DEFINIÇÕES - *Sensibilidade do teste*

Sensibilidade do teste

A sensibilidade do teste (λ) é a menor concentração de endotoxina que o teste é capaz de detectar. Para determinar λ , faz-se necessário calcular o valor de corte na unidade de leitura do método aplicado. Para um ensaio imunoenzimático (ELISA), por exemplo, a unidade de leitura seria densidade óptica. O valor de corte é expresso como a média obtida a partir de 4 replicatas do branco somada a 3 desvios padrões, conforme expressão abaixo:

$$\text{Valor de corte} = \bar{X} + 3s$$

em que:

\bar{X} = média das 4 replicatas para as respostas ao branco;

s = desvio padrão das 4 replicatas das respostas ao branco.

λ corresponde à menor concentração de endotoxina na curva padrão cuja leitura exceda o valor de corte. Como λ é um ponto da curva padrão, deve ser estabelecido em cada teste para confirmar o cálculo da máxima diluição válida (MDV), conforme descrito em *Máxima Diluição Válida*. Para efeitos do teste, λ é expresso como equivalentes de endotoxina por mililitro (EE/mL).

O branco corresponde aos monócitos humanos ou linhagens celulares monocíticas humanas adicionados de diluente do teste utilizado na diluição da amostra, sem padrão de endotoxina.

5 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – DEFINIÇÕES - *Máxima Diluição Válida*

Máxima Diluição Válida

A MDV é a máxima diluição permitida de uma amostra na qual o limite de contaminantes pode ser determinado. O cálculo da MDV é baseado no padrão de referência de endotoxina, por meio de uma das seguintes fórmulas:

(1) Quando a CLC do produto for expressa em volume (EE/mL)

$$MDV = \frac{CLC}{\lambda}$$

em que:

CLC = concentração limite de contaminante

λ = sensibilidade do teste.

(2) Quando a CLC do produto for expressa em peso (EE/mg) ou unidade do produto (EE/unidade):

$$MDV = \frac{CLC \times C}{\lambda}$$

em que:

CLC = concentração limite de contaminante;

C = Concentração da amostra;

λ = sensibilidade do teste.

6 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – PROCEDIMENTO GERAL

PROCEDIMENTO GERAL

A amostra é incubada com uma fonte de monócitos humanos ou linhagens celulares monocíticas humanas. As fontes podem ser de (1) sangue total humano, (2) uma fração desse sangue humano contendo monócitos, como, por exemplo, células mononucleares de sangue humano periférico (PBMC), ou (3) linhagens celulares monocíticas humanas.

O sangue humano e PBMC devem ser processados dentro de um prazo validado que garanta reatividade adequada das células em relação aos pirogênios.

O sangue total humano, coletado na presença de anticoagulante apropriado, é geralmente diluído com meio de cultura ou solução salina, por exemplo, para uma concentração final de 2 a 50% (v/v).

PBMC ou linhagens celulares monocíticas humanas, diluídas em meio de cultura suplementado com (1) próprio plasma do doador ou (2) soro AB humano ou (3) soro fetal bovino, são normalmente usados em uma densidade celular final de $0,1-1,0 \times 10^6$ células/mL. A cultura celular é realizada a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$, em uma atmosfera apropriada para o meio de cultura, por exemplo, 5% de CO_2 em ar umidificado. A duração da cultura deve ser suficiente para permitir o acúmulo do mediador endógeno escolhido para leitura por detector adequado.

As leituras obtidas com a amostra são comparadas à curva padrão de endotoxina (Método I) ou a um lote controle do produto (Método II).

7 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – APARATOS

APARATOS

Despirogenizar todas as vidrarias e aparatos termoestáveis em estufa de despirogenização usando um processo validado. Temperatura e tempo comumente utilizados são de 30 minutos, a 250 °C. Todos os materiais de plástico, como microplacas e ponteiras para pipetadores automáticos, não devem interferir com o teste, devendo ser estéreis e apirogênicos.

8 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – FONTES DE CÉLULAS E QUALIFICAÇÃO - *Fontes de células* - Sangue total

FONTES DE CÉLULAS E QUALIFICAÇÃO

Fontes de células

Sangue total

O sangue total é obtido de doadores qualificados conforme descrito em *Qualificação de doadores de sangue*. Para o teste, o sangue total pode ser obtido de um único doador ou de mais doadores (*pool*) e deve ser qualificado de acordo com descrito em *Qualificação de células frescas* ou em *Qualificação de células criopreservadas*. Para a qualificação de células criopreservadas, uma alíquota de sangue fresco (individual ou *pool*) deve ser reservada.

Pools de sangue total devem consistir em doações de sangue de, no mínimo, 4 doadores individuais, mas preferencialmente 8 ou mais doadores, com um volume de sangue aproximadamente igual de cada doador. No caso de usar *pool* de sangue total, o agrupamento pode ser realizado antes do congelamento ou, alternativamente, o sangue total individual de cada doador pode ser congelado separadamente e, no momento do teste, logo após o descongelamento, o agrupamento pode ser realizado.

Para a execução dos testes de rotina, vide critérios de aceitação descritos em Critério de aprovação/reprovação da amostra.

9 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – FONTES DE CÉLULAS E QUALIFICAÇÃO - *Fontes de células* - Células mononucleares do sangue periférico

Células mononucleares do sangue periférico

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) são isoladas de sangue total e são obtidas de doadores qualificados conforme descrito em *Qualificação de doadores de sangue*. Para o teste, as PBMC podem ser obtidas de um único doador ou de mais doadores (*pool*) e devem ser qualificadas de acordo com descrito em *Qualificação de células frescas* ou em *Qualificação de células criopreservadas*. Para a qualificação de células criopreservadas, uma alíquota de PBMC frescas (individual ou *pool*) deve ser reservada.

Pools de PBMC devem consistir em doações de, no mínimo, 4 doadores individuais, com número de células aproximadamente igual de cada doador. No caso de usar *pool* de PBMC, o agrupamento

pode ser realizado antes do congelamento ou, alternativamente, as PBMC individuais de cada doador podem ser congeladas separadamente e, no momento do teste, logo após o descongelamento, o agrupamento pode ser realizado.

Para a execução dos testes de rotina, vide critérios de aceitação descritos em Crítério de aprovação/reprovação da amostra.

10 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – FONTES DE CÉLULAS E QUALIFICAÇÃO - *Fontes de células - Linhagens celulares monocíticas humanas contínuas*

Linhagens celulares monocíticas humanas contínuas

A manipulação de linhagens celulares monocíticas humanas contínuas deve atender aos critérios de boas práticas de laboratório para cultivo celular. Incluindo minimamente:

- Estabelecimento de um banco de células caracterizado por testes de esterilidade e identidade, morfologia, tempo de duplicação e funcionalidade;
- Manipulação das linhagens em ambiente asséptico;
- Estudo de estabilidade para determinação do número máximo de passagens em que a célula mantém suas características iniciais.

Para o teste de funcionalidade, deve-se garantir que a linhagem usada expressa os *Pattern Recognition Receptors* (PRR) necessários para detecção de pirogênio. Os PRR comumente avaliados para o MAT são os *Toll Like Receptors* (TLRs). A funcionalidade destes receptores é verificada por meio da incubação dessas linhagens com ligantes específicos, conforme descrito em *Adequabilidade para a curva padrão de endotoxina, Teste de fatores interferentes - método I: semi-quantitativo* e/ou em *Teste de capacidade de detecção de contaminantes não endotoxina*. No estudo de estabilidade, recomenda-se também o monitoramento da reposta obtida no sistema de detecção.

11 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – FONTES DE CÉLULAS E QUALIFICAÇÃO – *Qualificação de doadores de sangue*

Qualificação de doadores de sangue

Os doadores de sangue devem satisfazer critérios de qualificação, e outros requisitos em vigor que se relacionem com consentimento, saúde e segurança e considerações éticas, devendo os responsáveis pela utilização do referido método cumprirem todos os requisitos estabelecidos pela autoridade regulatória responsável pelo tema.

Os doadores de sangue devem se autodeclarar saudáveis, não estar sofrendo de nenhuma infecção bacteriana ou viral e estar livre dos sintomas de infecções por um período de pelo menos 1 semana antes da doação de sangue. Além disso, não devem ter tomado medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais nas 48 horas anteriores à doação de sangue e anti-inflamatórios esteroidais durante os 7 dias anteriores à doação de sangue.

Indivíduos que usaram imunossuppressores ou outras drogas conhecidas por influenciar na produção do mediador endógeno da leitura escolhida não devem ser aceitos como doadores de sangue. Doações de sangue devem ser testadas para marcadores de infecção de acordo com os requisitos nacionais para medicina transfusional.

12 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – FONTES DE CÉLULAS E QUALIFICAÇÃO – *Qualificação de células frescas*

Qualificação de células frescas

Células frescas destinadas para uso em MAT, por exemplo, sangue total humano, frações de sangue, como PBMC, são qualificadas simultaneamente com o procedimento geral.

Para a qualificação de células frescas, proceda da seguinte forma: em até 4 horas após a coleta de sangue, ou um período maior quando validado, gerar curvas de dose-resposta usando padrão de endotoxina com pelo menos 4 concentrações geometricamente diluídas.

As curvas dose-resposta devem atender aos critérios para a curva padrão de endotoxina descrito em *Adequabilidade para a curva padrão de endotoxina*. Se as células frescas forem usadas para a detecção de NEPs, estas devem ser qualificadas conforme descrito em *Teste de capacidade de detecção de contaminantes não endotoxina*.

Para o *pool* de células frescas, o efeito médio deve ser considerado, por exemplo, comparando a reatividade do *pool* com os resultados de cada doador individual.

13 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – FONTES DE CÉLULAS E QUALIFICAÇÃO – *Qualificação de células criopreservadas*

Qualificação de células criopreservadas

A fonte de células destinadas para uso em MAT, por exemplo, sangue total humano, frações de sangue, como PBMC ou linhagens celulares monocíticas humanas, podem ser criopreservadas. *Pool* de células criopreservadas pode ser obtido antes do congelamento ou por agrupamento de doações únicas criopreservadas, realizado imediatamente após o descongelamento.

A qualificação de células criopreservadas é realizada imediatamente após descongelar (e agrupar, se necessário). Curvas dose-resposta para células criopreservadas devem cumprir os critérios para a curva padrão de endotoxina descritos em *Adequabilidade para a curva padrão de endotoxina*. Se as células criopreservadas forem usadas para a detecção de NEPs, essas devem ser qualificadas conforme descrito em *Teste de capacidade de detecção de contaminantes não endotoxina*.

14 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS

TESTES PREPARATÓRIOS

Antes da implementação do MAT, faz-se necessário fornecer evidências objetivas de que se cumpriu os seguintes testes preparatórios:

- Adequabilidade da curva padrão de endotoxina conforme o descrito em *Adequabilidade para a curva padrão de endotoxina*;
- Ausência de interferência da amostra com o teste, conforme descrito em *Teste de fatores interferentes - método I: semi-quantitativo* e em *Determinação da diluição ótima da amostra e do lote controle - método II: teste de comparação de lote*;

- Ausência de interferência da amostra no sistema de detecção, conforme descrito em *Interferência no sistema de detecção*;
- Capacidade de detecção de contaminantes do tipo endotoxinas e NEPs, conforme descrito em *Teste de capacidade de detecção de contaminantes não endotoxina*.

15 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS - *Adequabilidade para a curva padrão de endotoxina*

Adequabilidade para a curva padrão de endotoxina

Independentemente da fonte celular, monócitos humanos ou linhagens celulares monocíticas humanas possuem uma expressão basal de mediadores endógenos. Portanto, durante o desenvolvimento do teste, esse deve ser otimizado para que a leitura do branco seja a menor possível. Além disso, a faixa de concentração da curva padrão deve ser selecionada de forma a gerar uma relação dose-reposta apropriada, que pode obedecer a um modelo de regressão linear ou não linear, como, por exemplo, os modelos logísticos de 4 ou 5 parâmetros (4PL e 5PL, respectivamente). Para a construção da curva padrão de endotoxina deve-se utilizar uma solução estoque de endotoxina preparada a partir de um padrão de referência compendial ou de um padrão de referência calibrado e rastreável em relação ao anterior.

Este teste demonstra a capacidade da endotoxina em ativar o receptor TLR4 das células monocíticas. A quantidade de pontos da curva padrão de endotoxina depende do modelo de regressão utilizado:

- Regressão linear - mínimo de 4 (quatro) concentrações;
- Regressão não linear - mínimo de 5 (cinco) concentrações para modelo 4PL e 6 (seis) concentrações para modelo 5PL.

Cada concentração da curva padrão deve ser testada em, no mínimo, 4 replicatas.

Independentemente do modelo de regressão a ser utilizado, a curva padrão deve apresentar um bom ajuste do modelo, o que deve ser demonstrado por meio de representações gráficas e de testes estatísticos. O ajuste pode ser otimizado por meio da transformação de dados.

16 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS - *Adequabilidade para a curva padrão de endotoxina - Critérios de aceitação para a curva padrão de endotoxina*

Critérios de aceitação para a curva padrão de endotoxina

- Para regressão linear, o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero e o coeficiente de determinação (r^2) não deve ser inferior a 0,975.
- Para regressão não linear, com exceção da assíntota inferior, os demais coeficientes devem ser significativamente diferentes de zero e o coeficiente de determinação (r^2) não deve ser inferior a 0,975. Adicionalmente, deve-se realizar uma análise de falta de ajuste, como por exemplo, o uso dos graus de liberdade e das somas dos quadrados dos erros para cálculo da falta de ajuste pela estatística F.
- Deve-se observar uma variância homocedástica.
- Para os testes de hipótese, utilizar um nível de significância de 0,05.

17 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS - *Teste de fatores interferentes - método I: semi-quantitativo*

Teste de fatores interferentes - método I: semi-quantitativo

O teste para fatores interferentes é necessário para demonstrar que a amostra a ser testada não interfere com o teste.

18 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS - *Teste de fatores interferentes - método I: semi-quantitativo* - Procedimento

Procedimento

Utilizando um diluente apropriado, diluir a amostra em séries geométricas, sem extrapolar a MDV. O teste é conduzido com 4 replicatas da amostra em diluições, nas condições com e sem adição de padrão de endotoxina, em uma concentração conhecida e justificada. Normalmente, esta concentração é igual ou próxima do ponto médio estimado da curva padrão de endotoxina. Usar a curva padrão de endotoxina para calcular a concentração de EE de cada solução preparada a partir da amostra.

Sempre que possível, os testes de interferência são realizados em pelo menos 3 lotes diferentes da preparação a ser examinada. Se apenas 1 lote estiver disponível, a validação deve ser realizada nesse lote em 3 testes independentes. Parâmetros de precisão para reprodutibilidade, por exemplo $\pm 50\%$ devem ser cumpridos.

19 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS - *Teste de fatores interferentes - método I: semi-quantitativo* - Cálculo da recuperação

Cálculo da recuperação

Calcular a recuperação média da endotoxina adicionada pela subtração da média de EE encontrada na amostra (se houver) com a encontrada na amostra adicionada de endotoxina. Posteriormente, dividir o valor encontrado pela concentração de endotoxina adicionada e multiplicar o resultado final por 100, para obter a recuperação em porcentagem.

20 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS - *Teste de fatores interferentes - método I: semi-quantitativo* - Critério de aceitação do teste para fatores interferentes

Critério de aceitação do teste para fatores interferentes

- A amostra é considerada livre de interferentes se a recuperação da endotoxina adicionada for de 50 a 200%.

Nota: se o interferente não puder ser eliminado pela diluição da amostra dentro do limite da MDV, recomenda-se o uso do Método II ao invés do Método I.

Determinação da diluição ótima da amostra e do lote controle - método II: teste de comparação de lote

Para o método II, as diluições a serem aplicadas no lote controle e na amostra dependem do tipo de análise a ser utilizada na comparação entre os dois. Essa análise deve ser justificada para cada tipo de produto e deve contemplar critérios de aceitação do teste.

Respostas a NEPs podem ser eliminadas por diluição muito mais rapidamente do que respostas a endotoxinas. Os produtos farmacêuticos que contêm NEPs apresentam frequentemente curvas dose-resposta acentuadas em comparação com curvas dose-resposta de endotoxinas bacterianas. As preparações que contêm ou podem conter NEPs devem ser testadas em uma faixa de diluições que inclua a diluição mínima, a ser determinada de acordo com o procedimento descrito abaixo.

21 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS - *Teste de fatores interferentes - método I: semi-quantitativo* - Procedimento

Procedimento

Devem ser testadas, no mínimo, 3 (três) diluições. Primeiro, deve-se encontrar qual a menor diluição da amostra que é capaz de estimular a máxima liberação de mediadores endógenos pelos monócitos humanos ou linhagens celulares monocíticas humanas na maioria dos doadores. Esta será uma das diluições escolhidas. Em seguida, selecionar uma diluição imediatamente acima e abaixo da diluição escolhida primariamente. Se a amostra não diluída (pura) for a condição capaz de estimular a máxima liberação de mediadores endógenos, então, deve-se selecionar a amostra não diluída e as duas diluições subsequentes, como por exemplo, as diluições $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ em um caso de diluição seriada na base 2.

Como a concentração que estimula a máxima liberação de mediador endógeno pode ser dependente do doador de células e do lote da amostra, a adequabilidade produto-específica deve ser realizada com pelo menos 3 testes independentes, cada um utilizando um doador diferente ou 1 *pool*. Caso a amostra apresente conteúdo de pirogênio inerente ao produto, recomenda-se executar uma análise de linhas paralelas entre as curvas dose-resposta da amostra e do lote controle para a avaliação estatística dos dados obtidos, sendo necessário testar pelo menos 3 pontos (concentrações). A abordagem estatística dos dados deve ser justificada.

22 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS - *Interferência no sistema de detecção*

Interferência no sistema de detecção

A diluição ótima da amostra, que foi previamente definida (em *Teste de fatores interferentes - método I: semi-quantitativo* e em *Determinação da diluição ótima da amostra e do lote controle - método II: teste de comparação de lote*), deve ser testada quanto à interferência no sistema de detecção (por exemplo, ELISA).

23 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS - *Interferência no sistema de detecção* - Procedimento

Procedimento

Deve-se preparar uma diluição em série do padrão do mediador endógeno de escolha (exemplo: IL-6, IL-1 β e TNF α), na presença e na ausência da amostra a ser examinada, em sua diluição ótima, conforme descrito em *Teste de fatores interferentes - método I: semi-quantitativo* ou *Determinação da diluição ótima da amostra e do lote controle - método II: teste de comparação de lote*.

24 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS - *Interferência no sistema de detecção* - Critério de aceitação do teste para interferência no sistema de detecção

Critério de aceitação do teste para interferência no sistema de detecção

- A concordância entre as leituras do padrão nas condições de preparo com e sem amostra, deverá estar no intervalo +/- 20%.

25 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS - *Teste de capacidade de detecção de contaminantes não endotoxina*

Teste de capacidade de detecção de contaminantes não endotoxina

Além de detectar endotoxinas bacterianas, o teste também deve provar ser capaz de detectar NEPs. A adequabilidade produto-específica do método deve ser demonstrada.

Para realização deste teste, deve-se demonstrar que a fonte de células de escolha (monócitos humanos ou linhagens celulares monocíticas humanas) responde ao estímulo de, pelo menos, menos dois (2) NEPs, ou seja, ligantes não endotoxina de receptores PRR, como os receptores TLR. Exemplos de NEPs e seus respectivos receptores: ácido lipoteicoico (LTA) para o receptor TLR2, lipoproteína bacteriana sintética para receptores TLR2-TLR1, lipoproteína bacteriana sintética para receptores TLR2-TLR6, flagelina para o receptor TLR5, peptideoglicano para o receptor TLR1 ou extrato bruto de célula bacteriana inteira. O teste deve ser realizado por meio de soluções de cada NEP em uma faixa de concentração adequada para a construção de uma curva dose-resposta.

Caso a resposta tenha sido satisfatória para a detecção de dois (2) NEPs, ao menos um (1) dos NEPs deve ser empregado para verificar se há interferentes na amostra. Isso é demonstrado por meio da adição de ao menos um NEP à amostra e cálculo de sua recuperação.

Quando disponível, lotes históricos que, sabidamente estão contaminados com NEP que causaram resposta positiva no teste de pirogênio em coelho ou efeito adverso em humanos, devem ser incluídos.

26 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – TESTES PREPARATÓRIOS - *Teste de capacidade de detecção de contaminantes não endotoxina* - Critérios de aceitação do teste de capacidade de detecção de contaminantes não endotoxina

Critérios de aceitação do teste de capacidade de detecção de contaminantes não endotoxina

- Além do ligante a receptores TLR4 (endotoxina), dois (2) outros ligantes, que ativam diferentes receptores TLR, devem ser detectados;
- A escolha dos NEPs utilizados deve refletir o(s) contaminante(s) mais provável(eis) de serem encontrado(s) na amostra a ser examinada;

- A recuperação de pelo menos um (1) NEP deve ficar entre 50 e 200%;
- Quando houver sinergismo entre o NEP e a amostra, a recuperação média deve ser maior que 50%, não havendo limite superior;
- Quando utilizados lotes sabidamente contaminados com NEP, esses devem ser reprovados pelo MAT.

27 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – MÉTODOS - *Método I: teste semi-quantitativo*

MÉTODOS

Método I: teste semi-quantitativo

No método I, o resultado da amostra em EE é calculado pela inferência de sua leitura a partir de uma curva dose-resposta do padrão de endotoxina. Para a amostra ser aprovada, deve possuir uma concentração de EE de até o valor de CLC.

28 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – MÉTODOS - *Método I: teste semi-quantitativo - Procedimento*

Procedimento

Utilizando o método validado anteriormente, preparar as amostras a serem examinadas conforme a **Tabela 2**.

Tabela 2 – Preparo de amostras para o Método I

<i>Solução</i>	<i>Fator de diluição</i>	<i>Adição de endotoxina</i>	<i>Número de replicatas</i>
A	<i>f</i>	-	4
B	<i>f1</i>	-	4
C	<i>f2</i>	-	4
AE	<i>f</i>	Igual ou próximo à concentração do meio da curva padrão de endotoxina	4
BE	<i>f1</i>	Igual ou próximo à concentração do meio da curva padrão de endotoxina	4
CE	<i>f2</i>	Igual ou próximo à concentração do meio da curva padrão de endotoxina	4
Controle Negativo (CN)	-	-	4

Curva padrão	-	Mínimo de 4 concentrações para modelo de regressão linear e mínimo de 5 pontos para modelo não-linear.	4 para cada concentração
--------------	---	--	--------------------------

SOLUÇÃO A = Amostra diluída pelo fator de diluição f , corresponde à menor diluição na qual a recuperação de endotoxina resulta em valores dentro do intervalo de 50-200%, de maneira consistente, conforme determinado em *Teste de fatores interferentes - método I: semi-quantitativo*.

SOLUÇÃO B = Amostra diluída pelo fator de diluição $f1$, sem exceder a MDV. Exemplo: 0,5 x MDV (duas vezes menos diluído que a MDV).

SOLUÇÃO C = Amostra diluída pelo fator de diluição $f2$, sem exceder a MDV. Exemplo: 1 x MDV.

SOLUÇÃO AE = Solução A adicionada de uma concentração de endotoxina equivalente ou próximo ao ponto médio da curva padrão de endotoxina.

SOLUÇÃO BE = Solução B adicionada de uma concentração de endotoxina equivalente ou próximo ao ponto médio da curva padrão de endotoxina.

SOLUÇÃO CE = Solução C adicionada de uma concentração de endotoxina equivalente ou próximo ao ponto médio da curva padrão de endotoxina.

SOLUÇÃO CN = Trata-se do controle negativo e equivale ao diluente do teste, utilizado na diluição da amostra, sem adição de padrão de endotoxina. Equivale ao branco da determinação da sensibilidade do teste, conforme definido em *Sensibilidade do teste*.

CURVA PADRÃO = Solução padrão de endotoxina em diluente, nas concentrações e número de pontos conforme definido em *Adequabilidade para a curva padrão de endotoxina*.

29 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – MÉTODOS - *Método I: teste semi-quantitativo - Cálculo e interpretação*

Cálculo e interpretação

Todos os dados a serem incluídos na análise devem referir-se a células para as quais os critérios para a curva padrão de endotoxina são satisfeitos, conforme definido em *Adequabilidade para a curva padrão de endotoxina*). Para cada fonte de célula diferente, doação individual, *pool* ou linhagem celular, usar a curva padrão de endotoxina para calcular a concentração de EE em cada uma das replicatas das soluções A, B e C e das soluções AE, BE e CE.

A recuperação do EE é calculada por meio da divisão do EE encontrado nas soluções AE, BE ou CE (após subtração do equivalente de endotoxina em A, B ou C) pela concentração de endotoxina adicionada às amostras, conforme fórmula abaixo:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{[EE \text{ em AE, BE ou CE (EE/mL)} - EE \text{ em A, B ou C (EE/mL)}] \times 100}{\text{Concentração de Endotoxina Adicionada (UE/mL)}}$$

O teste só é válido quando, pelo menos, uma das soluções AE, BE e CE apresentarem uma recuperação da endotoxina adicionada entre 50 e 200%.

30 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – MÉTODOS - *Método I: teste semi-quantitativo - Critério de aprovação/reprovação da amostra*

Critério de aprovação/reprovação da amostra

A amostra é considerada aprovada se as concentrações médias de EE das replicatas das soluções A, B e C, após correção para diluição e concentração, forem todas inferiores ou iguais à CLC. Por outro lado, a amostra é considerada reprovada se a concentração média de qualquer uma das soluções exceder à CLC.

Quando o teste for realizado com células de doadores individuais, a amostra deve cumprir com os critérios do teste em 4 diferentes doadores. Se a amostra for aprovada em apenas 3 dos 4 doadores testados, deve-se repetir o teste com células de 4 novos doadores, diferentes dos doadores previamente utilizados. A amostra a ser examinada deverá, então, cumprir com os critérios do teste em 7 dos 8 doadores testados.

Por sua vez, quando o teste for realizado com um *pool* ou com uma linhagem celular monocítica humana, a amostra a ser examinada deverá cumprir com os critérios do teste para 1 *pool* ou 1 passagem qualificada de células, respectivamente.

Nota: Em casos de contaminação pirogênica e reprovação de lote, pode-se realizar os testes do Método I utilizando outras diluições de amostra, com o intuito de quantificar o nível de contaminação de forma mais exata.

31 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – MÉTODOS - *Método II: teste de comparação de lote controle*

Método II: teste de comparação de lote controle

O método II compreende a comparação de uma amostra a ser examinada com um lote controle. Este método é indicado nos casos em que as interferências da amostra não possam ser suprimidas após a sua diluição dentro da MDV, ou em casos em que a amostra possa conter NEPs. O tipo de análise adotado para realizar a comparação de um lote amostra com um lote controle deve ser justificado para cada tipo de produto.

Caracteriza-se como lote controle aquele que se mostrou seguro e eficaz por meio de estudo clínico ou um lote representativo desse, previamente aprovado em todos os testes de liberação.

32 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – MÉTODOS - *Método II: teste de comparação de lote controle - Procedimento*

Procedimento

Utilizando o método validado anteriormente, preparar as amostras a serem examinadas conforme a **Tabela 3**.

Tabela 3 – Preparo das amostras para o Método II

<i>Solução</i>	<i>Descrição</i>	<i>Fator de diluição</i>	<i>Número de replicatas</i>
----------------	------------------	--------------------------	-----------------------------

A	Lote controle	$f1$	4
B	Lote controle	$f2$	4
C	Lote controle	$f3$	4
D	Amostra	$f1$	4
E	Amostra	$f2$	4
F	Amostra	$f3$	4
Controle Positivo (CP)	Padrão de endotoxina	-	4
Controle Negativo (CN)	Diluyente do teste	-	4

SOLUÇÃO A, B e C = Soluções do lote controle diluídas pelos fatores de diluição $f1$, $f2$ e $f3$, conforme determinado no item *Determinação da diluição ótima da amostra e do lote controle - método II: teste de comparação de lote*.

SOLUÇÃO D, E e F = Soluções da amostra, diluídas pelos fatores de diluição $f1$, $f2$ e $f3$, conforme determinado no item *Determinação da diluição ótima da amostra e do lote controle - método II: teste de comparação de lote*.

SOLUÇÃO CP = Solução do diluyente utilizado na diluição do lote controle e da amostra, adicionado de padrão de endotoxina em uma concentração que remete a uma resposta positiva clara. Esta solução funciona como um controle para demonstrar a viabilidade das células.

SOLUÇÃO CN = Solução do diluyente do teste, utilizado na diluição do lote controle e da amostra, sem adição de padrão de endotoxina. Equivale ao branco da determinação da sensibilidade do teste, conforme definido em *Sensibilidade do teste*.

Na etapa de detecção deve-se incluir uma curva de calibração preparada com o diluyente do teste e pelo menos 4 concentrações geometricamente diluídas do padrão do mediador endógeno a ser detectado (exemplo: IL-6), no mesmo diluyente do teste, em duplicata.

33 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – MÉTODOS - *Método II: teste de comparação de lote controle - Cálculo e interpretação*

Cálculo e interpretação

Na análise do Método II, tanto o CP, como pelo menos uma das soluções A, B e C devem obter uma leitura superior ao CN.

Para o método II, utiliza-se uma curva padrão do mediador endógeno de escolha (por exemplo: IL-6) que é aplicada em duplicata diretamente no sistema de detecção (por exemplo: ELISA). A curva deve contemplar, no mínimo, 4 concentrações (pontos) diluídas geometricamente e ser previamente validada. Adicionalmente, deve-se incluir um branco em duplicata, que consiste em diluyente do padrão do mediador endógeno.

Utilizar a curva de calibração do padrão do mediador endógeno para calcular a resposta das soluções A - F. Somar as respostas médias das soluções A, B e C e somar as respostas médias das soluções D, E e F. Dividir a soma das respostas médias das soluções D, E e F pela soma das respostas médias das soluções A, B e C, conforme a equação abaixo:

$$\text{Resultado relativo da amostra} = \frac{\sum(\bar{X}_A, \bar{X}_B, \bar{X}_C)}{\sum(\bar{X}_D, \bar{X}_E, \bar{X}_F)}$$

A amostra é aprovada se o valor resultante cumprir com o critério de aceitação definido, que não exceda a um valor justificado.

Nota: Quando a amostra estiver contaminada com o mediador endógeno, este fato deve ser resolvido por meio da modificação e validação do método escolhido.

34 - 5.5.2.1.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS – MÉTODOS - *Método II: teste de comparação de lote controle - Critério de aprovação/reprovação da amostra*

Critério de aprovação/reprovação da amostra

Quando o teste for realizado com células de doadores individuais, a amostra deve cumprir com os critérios do teste em 4 diferentes doadores. Se a amostra for aprovada em apenas 3 dos 4 doadores testados, deve-se repetir o teste com células de 4 novos doadores, diferentes dos doadores previamente utilizados. A amostra a ser examinada deve, então, cumprir com os critérios do teste em 7 dos 8 doadores testados.

Por sua vez, quando o teste for realizado com um *pool* ou com uma linhagem celular monocítica humana, a amostra a ser examinada deve cumprir com os critérios do teste para 1 *pool* ou 1 passagem qualificada de células, respectivamente.

Nota: Em casos de contaminação pirogênica e reprovação de lote, pode-se realizar os Métodos I e II utilizando outras diluições de amostra, com o intuito de quantificar o nível de contaminação de forma mais exata.

35 - 5.5.2.1.2 TESTE DE PIROGÊNIOS EM COELHOS

5.5.2.1.2 TESTE DE PIROGÊNIOS EM COELHOS

(...)

36 - 5.5.2.1.3 TESTE DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

5.5.2.1.3 TESTE DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

(...)

37 - 5.5.2.3 TOXICIDADE

5.5.2.3 TOXICIDADE

O teste de toxicidade possibilita detectar reatividade biológica inesperada e não aceitável de fármacos e medicamentos. Esse teste *in vivo* é sugerido para a avaliação da segurança de produtos biológicos e derivados de biotecnologia.

TESTE GERAL

Seleção dos animais

Usar camundongos sadios, de ambos os sexos, de linhagem conhecidos, não utilizados previamente em testes biológicos. Mantê-los sob dieta uniforme, água à vontade e em temperatura ambiente constante de $(21 \pm 3)^\circ\text{C}$. No dia do teste, selecionar camundongos com peso entre 17 g e 22 g.

Preparo da amostra

A amostra deve ser preparada conforme especificado na respectiva monografia e administrada imediatamente.

Procedimento

Usar seringas, agulhas e vidraria estéreis. Administrar, em cinco camundongos, volume da preparação amostra indicada na monografia, por uma das vias descritas a seguir.

Intravenosa — Injetar a dose na veia caudal, mantendo-se a velocidade constante de 0,1 mL por segundo ou a indicada na monografia.

Intraperitoneal — Injetar a dose na cavidade peritoneal.

Subcutânea — Injetar a dose na região cervical ou abdominal.

Oral — Administrar a dose por meio de sonda ou outro dispositivo adequado.

Interpretação

Manter os animais em observação durante 48 horas após a administração ou pelo tempo indicado na monografia. A amostra cumpre o teste se todos os animais sobrevivem e não mais que um apresenta sintomas anormais no intervalo de tempo estabelecido. Se um ou dois animais morrerem, ou mais de um apresentar sintomas anormais ou de toxicidade inesperada, repetir o teste utilizando outros cinco ou quinze camundongos, com peso entre 19 g e 21 g. A amostra cumpre os requisitos do teste se o número de camundongos mortos não excede 10% do total de animais testados, incluindo o teste original, e nenhum animal do segundo grupo apresenta sintomas indicativos de toxicidade anormal.

TESTE PARA PRODUTOS BIOLÓGICOS, SOROS E VACINAS

Seleção dos animais

Usar, pelo menos, cinco camundongos com peso entre 17 g e 22 g e, pelo menos, dois cobaios sadios com peso entre 250 g e 350 g.

Procedimento

Pesar os animais e registrar em formulário próprio antes de injetar a amostra. A menos que especificado de outra forma na monografia, injetar intraperitonealmente em cada animal o equivalente

a uma dose humana da preparação, sem ultrapassar 1,0 mL para camundongos e 5,0 mL para cobaias. A dose humana é definida no rótulo da preparação sob teste ou na bula que a acompanha.

Interpretação

~~Por um período de, no mínimo, sete dias, observar os animais quanto a sinais de enfermidade, perda de peso, anormalidades ou morte. Se, durante o período de observação, todos os animais sobrevivem, não manifestam respostas que não são específicas ou esperadas para o produto e não sofrem redução de peso, a preparação cumpre o teste. Do contrário, o teste deve ser repetido para as espécies nas quais os requisitos não foram cumpridos. A preparação cumpre o teste se todos os animais do segundo grupo preenchem os critérios especificados para o teste inicial.~~

~~Se, após o segundo teste, a preparação não cumprir os requisitos, mas não forem observadas mortes em porcentagem igual ou superior a 50% do número total de animais testados, um segundo reteste pode ser realizado, nas espécies nas quais se observou o não cumprimento dos requisitos. Utilizar o dobro de animais do teste inicial. Se os animais preenchem os critérios especificados para o teste inicial, a preparação cumpre o teste.~~

38 - ANTIMONIATO DE MEGLUMINA SOLUÇÃO INJETÁVEL - TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA - Toxicidade (5.5.2.3)

ANTIMONIATO DE MEGLUMINA SOLUÇÃO INJETÁVEL

(...)

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

(...)

~~**Toxicidade (5.5.2.3).** Cumpre o teste. Injetar, via intravenosa, o equivalente a 1 mg/g de peso do animal.~~

(...)