

FARMACOPEIA BRASILEIRA

6ª EDIÇÃO



Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Farmacopeia
Brasileira,
6ª edição

Volume II – Monografias

Hemocomponentes e Hemoderivados

Brasília
2019

HEMOCOMPONENTES E HEMODERIVADOS

COLA DE FIBRINA	HD001-00
COMPLEXO PROTROMBÍNICO HUMANO TOTAL LIOFILIZADO	HD002-00
FATOR IX DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA LIOFILIZADO	HD003-00
FATOR VII DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA LIOFILIZADO	HD004-00
FATOR VIII DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA LIOFILIZADO	HD005-00
FIBRINOGENIO HUMANO LIOFILIZADO	HD006-00
IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-D	HD007-00
IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-HEPATITE A	HD008-00
IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-HEPATITE B	HD009-00
IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-HEPATITE B PARA USO INTRA VENOSO	HD010-00
IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTIRRÁBICA	HD011-00
IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTIRRUBÉOLA	HD012-00
IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTISSARAMPO	HD013-00
IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTITÉTANO	HD014-00
IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTIVARICELA	HD015-00
IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTIVARICELA PARA USO INTRA VENOSO	HD016-00
IMUNOGLOBULINA HUMANA NORMAL	HD017-00
IMUNOGLOBULINA HUMANA NORMAL PARA ADMINISTRAÇÃO POR VIA INTRA VENOSA	HD018-00
MISTURAS DE PLASMA HUMANO EXCEDENTE TRATADO POR INATIVAÇÃO VIRAL	HD019-00
MISTURAS DE PLASMA HUMANO TRATADO POR INATIVAÇÃO VIRAL	HD020-00
PLASMA HUMANO PARA FRACIONAMENTO	HD021-00
SOLUÇÃO DE ALBUMINA HUMANA	HD022-00

COLA DE FIBRINA

Fibrini glutinum

DEFINIÇÃO

Cola de fibrina é uma preparação farmacêutica, estéril e apirogênica, constituída por um conjunto contendo dois componentes: o componente 1 (concentrado de fibrinogênio), uma fração proteica que contém fibrinogênio humano e Fator XIII humano, e o componente 2, uma preparação que contém trombina humana; este último componente converte o primeiro em fibrina depois de sua reconstituição e mistura em presença de íons cálcio.

Pode conter outros ingredientes como a fibronectina humana e um inibidor de plasmina, como a aprotinina, e estabilizadores, como a albumina humana, adicionados antes ou durante a formação da fibrina induzida pela trombina. Nenhum antimicrobiano é adicionado à preparação.

Os constituintes são obtidos a partir do plasma humano, que cumpre os requisitos da monografia *Plasma humano para fracionamento*.

Descongelado ou reconstituído com o volume do diluente indicado no rótulo, o componente 1 contém, no mínimo, 40 g/L de proteínas coaguláveis; a atividade de trombina do componente 2 varia em um amplo intervalo (aproximadamente 4 - 1000 UI/mL).

PRODUÇÃO

Sua obtenção deve ser de acordo com o cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos Biológicos e Boas Práticas do Ciclo Produtivo do Sangue, conforme a legislação vigente, visando garantir a sua qualidade, segurança e eficácia.

O método de preparação inclui uma ou várias etapas de inativação viral que demonstrem a eliminação ou inativação dos agentes infecciosos virais conhecidos. Caso sejam usadas substâncias para inativar os vírus durante a produção, o processo de purificação posterior deve demonstrar, mediante validação, que a concentração das substâncias inativadoras foi eliminada ou reduzida a níveis aceitáveis segundo normas vigentes e que os eventuais resíduos não possam vir a trazer riscos aos pacientes.

Os constituintes ou as suas misturas devem ser estéreis e apirogênicas, sendo então distribuídos assepticamente nos recipientes finais e imediatamente congelados. Os mesmos devem ser liofilizados e os recipientes fechados sob vácuo ou sob gás inerte de forma que se evite qualquer contaminação microbiana.

Caso o componente 1 contenha Fator XIII, a concentração deste último deverá ser, no máximo, 10 UI/mL. Caso o rótulo venha indicar que a atividade do Fator XIII da coagulação é maior que 10 UI/mL, a atividade estimada deve ser, no mínimo, 80% e, no máximo, 120% da atividade declarada no rótulo.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Os constituintes liofilizados são pós ou sólidos friáveis de cor branca ou amarelo pálido. Os constituintes congelados são sólidos opacos, incolores ou amarelo pálido. Os constituintes líquidos são incolores ou amarelo pálido.

COMPONENTE 1 (CONCENTRADO DE FIBRINOGENO)

Nota: reconstituir os constituintes liofilizados e descongelar os constituintes congelados como indicado no rótulo imediatamente antes de realizar a identificação e os ensaios, exceto os de solubilidade e água.

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder aos ensaios de precipitação com a amostra do produto acabado, usando soros específicos de pelo menos quatro diferentes espécies animais e um soro anti-humano. O ensaio é realizado com soros específicos contra as proteínas plasmáticas das espécies animais que normalmente se usam no país para a preparação de produtos de origem biológica. A amostra contém somente proteínas de origem humana e não precipita com os soros específicos contra as proteínas plasmáticas de outras espécies animais, porém precipita diante do soro anti-humano.

B. A determinação do fibrinogênio, conforme descrito em *Doseamento*, contribui para a identificação do componente 1.

C. A determinação do Fator XIII, conforme descrito em *Doseamento*, contribui para a identificação do componente 1.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto da preparação. Os concentrados liofilizados dissolvem-se em 20 minutos no volume do diluente para a sua reconstituição, à temperatura indicada no rótulo, resultando em uma preparação límpida ou ligeiramente turva, praticamente incolor.

pH (5.2.19). 6,5 a 8,0.

Estabilidade da dissolução. Durante os 120 minutos que seguem à reconstituição ou ao descongelamento não se forma nenhum gel, à temperatura ambiente.

Água. Determinar por um dos métodos a seguir: *Determinação da água pelo método semimicro (5.2.20.3)*, *Perda por dessecação (5.2.9.1)* ou *Espectrofotometria de absorção no infravermelho próximo (5.2.14)*. No máximo, 2,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Fibrinogênio (proteínas coaguláveis). A quantidade estimada de proteínas coaguláveis, expressa em miligramas é, no mínimo, 70% e, no máximo, 130% da quantidade declarada.

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Proteínas coaguláveis. Dosar o nitrogênio no resíduo pelo método de *Determinação de nitrogênio (5.3.3.2)*. Misturar 0,2 mL da preparação reconstituída e 2 mL de uma solução tampão apropriada (pH 6,6 a 7,4) que contenha uma quantidade suficiente de trombina humana (aproximadamente 3 UI/mL) e cálcio (0,05 M). Manter a mistura a 37 °C durante 20 minutos, separar o precipitado por centrifugação (5000 × g, por 20 minutos) e lavar exaustivamente com uma solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v). Dosar o nitrogênio no resíduo pelo método de *Determinação de nitrogênio (5.3.3.2)*. Calcular o teor em proteínas devendo ser o resultado multiplicado por 6.

B. Teste de coagulação. Diluir a preparação reconstituída com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até obter uma concentração de fibrinogênio compreendida entre 0,1 mg/mL e 1 mg/mL. Utilizar 0,2 mL da diluição, mantendo a 37 °C durante 60 segundos e adicionar 0,2 mL de uma solução apropriada de trombina humana (aproximadamente 20 UI/mL e que contenha pelo menos 1 mM de cálcio). Determinar o tempo de coagulação por um método apropriado. Repetir o processo com pelo menos três diluições diferentes, no intervalo indicado anteriormente por meio de uma solução apropriada de fibrinogênio (por exemplo, plasma humano normal calibrado, por meio de uma determinação, diante de uma mistura de plasma recém preparada (> 100 doadores). Representar uma curva de calibração com os tempos de coagulação medidos para as diluições padrão e o conteúdo em fibrinogênio; a partir da curva, determinar o conteúdo de fibrinogênio na preparação a examinar.

Fator XIII. Onde o rótulo indicar que a atividade do Fator XIII da coagulação é maior que 10 UI/mL, a atividade estimada deve ser, no mínimo, 80% e, no máximo, 120% da atividade declarada no rótulo.

Fazer três diluições do componente 1 descongelado ou reconstituído e da preparação de referência de plasma humano normal, usando como diluente plasma deficiente em Fator XIII da coagulação ou outro diluente apropriado. Adicionar a cada diluição quantidades apropriadas dos seguintes reagentes:

Reagente ativador: contendo trombina humana ou bovina, tampão apropriado, cloreto de cálcio e um inibidor apropriado tal como Gli-Pro-Arg-Ala-Ala-NH₂, que inibirá a coagulação da amostra e não evitará a ativação do Fator XIII pela trombina.

Reagente de detecção: contendo substrato peptídico específico de Fator XIII ativado tal como Leu-Gli-Pro-Gli-Glu-Ser-Lis-Val-Ile-Gli-NH₂ e éster de etil glicina como segundo substrato em solução tampão adequada.

Reagente NADH: contendo glutamato desidrogenase, α -cetogluturato e NADH em solução tampão adequada.

Após a mistura, são mensuradas as variações de absorvância (ΔA /minutos) no comprimento de onda de 340 nm (**5.2.14**) após ser atingida a fase linear da reação. A unidade de Fator XIII é igual à atividade de 1 mL de plasma humano normal. Calcular a atividade da preparação teste através de métodos estatísticos usuais (**8.2**). Os limites de confiança ($P = 0,95$) devem ser, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade estimada.

COMPONENTE 2 (PREPARAÇÃO DE TROMBINA)

IDENTIFICAÇÃO

A. Proceder aos ensaios de precipitação com a amostra do produto acabado, usando soros específicos de pelo menos quatro diferentes espécies animais e um soro anti-humano. O ensaio é realizado com soros específicos contra as proteínas plasmáticas das espécies animais que normalmente se usam no

país para a preparação de produtos de origem biológica. A amostra contém somente proteínas de origem humana e não precipita com os soros específicos contra as proteínas plasmáticas de outras espécies animais, porém precipita diante do soro anti-humano.

B. A determinação da trombina, conforme descrito em *Doseamento*, contribui para a identificação do componente 2.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto da preparação. Os concentrados liofilizados dissolvem-se, em cinco minutos, no volume de diluente para a sua reconstituição, à temperatura indicada no rótulo, resultando em uma preparação incolor e límpida ou ligeiramente turva.

pH (5.2.19). 5,0 a 8,0.

Água. Determinar por um dos métodos a seguir: *Determinação da água pelo método semimicro (5.2.20.3)*, *Perda por dessecação (5.2.9.1)* ou *Espectrofotometria de absorção no infravermelho próximo (5.2.14)*. No máximo, 2,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Trombina. Se necessário, diluir a preparação reconstituída a ser examinada a aproximadamente 2 - 20 UI por mililitro de trombina usando como diluente um tampão pH 7,3 a 7,5, tal como a solução tampão de imidazol pH 7,3, contendo 10 g/L de albumina humana ou albumina bovina. A um volume adequado da diluição, adicionar volume apropriado de fibrinogênio (1 g/L de proteína coagulada) aquecido a 37 °C e começar a medir o tempo de coagulação imediatamente. Repetir o procedimento com cada uma das três diluições de uma preparação de referência de trombina calibrada em unidades internacionais. Calcular a atividade da preparação teste por meio de métodos estatísticos usuais (**8.2**). Os limites de confiança ($P = 0,95$) devem ser, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade estimada.

ARMAZENAMENTO

Protegido da luz.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente. O rótulo deve indicar:

- a quantidade de fibrinogênio (miligramas de proteínas coaguláveis) e de trombina (Unidades Internacionais) por frasco;
- a atividade de Fator XIII (unidades) quando superior a 10 UI/mL;
- quando aplicável, o volume de diluente necessário para reconstituir a preparação.

COMPLEXO PROTROMBÍNICO HUMANO TOTAL LIOFILIZADO

Prothrombinum multiplex total humanum cryodesiccatus

O complexo protrombínico humano total é uma fração de proteínas plasmáticas que contém, obrigatoriamente, os Fatores II, VII, IX e X da coagulação humana. A presença e as quantidades dos Fatores II, VII e X dependem do método de fracionamento utilizado e sua obtenção é realizada a partir do plasma humano que satisfaça as condições da monografia *Plasma humano para fracionamento*.

A atividade da preparação, reconstituída de acordo com as indicações que figuram no rótulo, é, no mínimo, 20 UI de Fator IX por mililitro. Se o conteúdo de algum fator de coagulação estiver declarado em valor unitário, a potência estimada deve estar entre 80% e 125% da potência declarada; se o conteúdo de algum fator estiver declarado em intervalo, a potência estimada deve estar dentro dos limites mínimo e máximo declarados.

O método de preparação deve evitar, tanto quanto possível, a ativação dos fatores da coagulação, de modo a reduzir seu potencial trombogênico, e compreende uma ou várias etapas que demonstrem a eliminação ou inativação dos agentes infecciosos conhecidos e não conhecidos. Se forem acrescentadas substâncias para inativação viral na etapa de produção, um procedimento de purificação deve ser validado, de modo a demonstrar que a concentração dessas substâncias foi reduzida a um nível aceitável, e que tais resíduos não comprometem a segurança da preparação.

A atividade específica é, no mínimo, 0,6 UI do Fator IX por miligrama de proteínas totais, antes da eventual adição de um estabilizante proteico. A fração que contém o complexo protrombínico é dissolvida em diluente apropriado. Podem ser adicionadas heparina, antitrombina e outras substâncias auxiliares, como um estabilizante. Não deve ser adicionado nenhum conservante antimicrobiano. A solução sofre uma filtração esterilizante e depois é envasada, asépticamente, nos recipientes e, imediatamente, congelada. Em seguida é liofilizada e os recipientes são fechados a vácuo ou em presença de um gás inerte.

Nota: reconstituir a amostra como indicado no rótulo imediatamente antes de realizar a Identificação, os ensaios (exceto os de solubilidade e de teor de água) e o Doseamento.

IDENTIFICAÇÃO

A amostra satisfaz os limites estabelecidos em *Doseamento* para os Fatores II, VII, IX e X da coagulação sanguínea humana.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Pó ou sólido friável, branco ou ligeiramente corado, muito higroscópico.

Osmolalidade (5.2.28). No mínimo, 240 mosmol/kg.

pH (5.2.19). 6,5 a 7,5.

Solubilidade. Adicionar o volume do líquido diluente especificado no rótulo, observando a temperatura recomendada. Agitar suavemente por, no máximo, 10 minutos. A preparação dissolve-se completamente e observa-se a formação de uma solução que pode ser levemente corada.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Água. Determinar por um dos métodos a seguir: *Determinação da água pelo método semimicro (5.2.20.3)*, *Determinação da perda por dessecação (5.2.9.1)* ou *Espectrofotometria de absorção no infravermelho (5.2.14)*. O teor de água deve ser inferior a 2,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Pirogênios (5.5.2.1). Cumpre o teste. Injetar em cada coelho, por quilograma de peso corporal, um volume da amostra reconstituída correspondente a, pelo menos, 30 UI de Fator IX.

DOSEAMENTO

Fator IX

Proceder conforme descrito em *Determinação do Fator IX da coagulação sanguínea humana (5.5.1.4)*. A atividade determinada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade declarada. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 125%.

Fator II

Proceder conforme descrito em *Determinação do Fator II da coagulação sanguínea humana (5.5.1.3)*. A atividade determinada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade declarada. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada está compreendido entre 90% e 111%.

Fator VII

Proceder conforme descrito em *Determinação do Fator VII da coagulação sanguínea humana (5.5.1.5)*. A atividade determinada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade declarada. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada está compreendido entre 80% e 125%.

Fator X

Proceder conforme descrito em *Determinação do Fator X da coagulação sanguínea humana (5.5.1.6)*. A atividade determinada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade declarada. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada está compreendido entre 90% e 111%.

Fatores da coagulação ativados

Proceder conforme descrito em *Determinação dos fatores da coagulação ativados (5.5.1.8)*. Se necessário, diluir a amostra para obter uma solução que contenha 20 UI de Fator IX por mililitro. Para cada uma das diluições, o tempo de coagulação é, no mínimo, 150 segundos.

Heparina

Caso se tenha adicionado heparina durante a preparação, determinar o seu teor de acordo com o método *Determinação da heparina nos fatores da coagulação (5.5.1.1)*. A amostra não contém mais

que a quantidade de heparina indicada no rótulo e nunca contém mais de 0,5 UI de heparina por unidade internacional de Fator IX.

Proteínas totais

Se necessário, deve-se diluir a preparação reconstituída com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) de forma a obter-se uma solução que contenha cerca de 15 mg de proteínas em 2 mL. Em um tubo de centrífuga de fundo redondo, introduzir 2 mL dessa solução. Adicionar 2 mL de solução de molibdato de sódio a 75 g/L e 2 mL de uma mistura de ácido sulfúrico isento de nitrogênio e água (1:30). Agitar e centrifugar durante cinco minutos. O líquido sobrenadante deve ser decantado possibilitando que o tubo seja enxuto sobre um papel de filtro. Determinar o nitrogênio no resíduo pelo método de *Determinação de nitrogênio (5.3.3.2)*. Calcular o teor em proteínas devendo ser o resultado multiplicado por 6,25.

Trombina

Caso a amostra contenha heparina, determinar o seu teor como indicado no *Ensaio biológico da heparina* e neutralizá-la por adição de sulfato de protamina (10 µg de sulfato de protamina neutralizam 1 UI de heparina). Utilizar dois tubos de ensaio e, em cada um, misturar volumes iguais da amostra reconstituída de uma solução de fibrinogênio a 3 g/L. Manter um dos tubos a 37 °C durante seis horas e o outro à temperatura ambiente durante 24 horas. Num terceiro tubo, misturar volumes iguais da solução de fibrinogênio e de solução de trombina humana a 1 UI/mL e colocar o tubo em banho-maria a 37 °C. Não se produz coagulação nos tubos que contêm a amostra. Produz-se coagulação dentro de 30 segundos no tubo que contém a trombina.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. O rótulo deve declarar:

- a denominação: complexo protrombínico total;
- o número de Unidades Internacionais dos Fatores IX, VII e X e o número ou intervalo de Unidades Internacionais do Fator II por frasco;
- a quantidade de proteínas em cada recipiente;
- o nome e a quantidade de qualquer substância adicionada, compreendendo a heparina e trombina, se esse for o caso;
- o nome e o volume do diluente necessário para reconstituir a preparação.

FATOR IX DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA LIOFILIZADO

Fator IX coagulationis sanguinis humanus cryodesiccatus

fator IX de coagulação; 03806

O fator IX de coagulação sanguínea de origem humana liofilizado é a fração proteica do plasma que contém o fator IX de coagulação sanguínea de origem humana, obtido por um método que permite a separação do fator IX dos outros fatores do complexo protrombínico humano (Fatores II, VII e X). É preparado a partir de plasma humano, de acordo com a monografia *Plasma humano para fracionamento*. A atividade da preparação, reconstituída de acordo com as indicações que figuram no rótulo, é de, no mínimo, 20 UI de fator IX por mililitro.

O método de preparação deve ser desenvolvido de modo a manter a integridade funcional do fator IX, minimizar a ativação de qualquer fator de coagulação (para limitar o potencial trombogênico) e deve incluir uma ou várias etapas que demonstrem eliminar ou inativar os agentes infecciosos conhecidos e não conhecidos. Se forem acrescentadas substâncias para inativação viral na etapa de produção, um procedimento de purificação deve ser validado, de modo a demonstrar que as concentrações dessas substâncias foram reduzidas a um nível aceitável e que tais resíduos não comprometem a segurança da preparação. A atividade específica é de, no mínimo, 50 UI de fator IX por miligrama de proteínas totais, antes de eventual adição de um estabilizante proteico.

A fração que contém o fator IX é solubilizada em diluente apropriado. Pode ser adicionado heparina, antitrombina e outras substâncias auxiliares, como um estabilizante. Não devem ser adicionados conservantes antimicrobianos. A solução é filtrada em um filtro esterilizante e distribuída assepticamente nos recipientes finais e imediatamente congelada. Em seguida, é liofilizada e os recipientes são fechados a vácuo ou sob gás inerte.

A regularidade do método de produção é avaliada por procedimentos analíticos apropriados durante os estudos de desenvolvimento entre os quais figuram habitualmente os seguintes:

- determinação do fator IX;
- determinação dos fatores de coagulação ativados;
- determinação da atividade dos fatores de coagulação II, VII e X, que não é superior a 5% da atividade do fator IX.

IDENTIFICAÇÃO

Reconstituir a amostra como indicado no rótulo, imediatamente antes de realizar a identificação, os ensaios (com exceção dos ensaios de solubilidade e água) e o doseamento.

A. Proceder aos ensaios de precipitação com a amostra, usando uma gama apropriada de soros específicos de espécies animais. O ensaio é realizado com soros específicos que contenham proteínas plasmáticas das espécies animais que normalmente se usam no país para a preparação de produtos de origem biológica. A amostra contém proteínas de origem humana e não precipita com os soros específicos que contenham proteínas plasmáticas de outras espécies animais.

B. A determinação da atividade coagulante do fator IX contribui para identificar a preparação.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Pó ou sólido friável, branco ou amarelo claro.

pH (5.2.19). 6,5 a 7,5.

Osmolalidade (5.2.28). No mínimo, 240 mosmol/kg.

Solubilidade. Ao conteúdo de um recipiente da amostra, juntar o volume de diluente indicado no rótulo e agitar suavemente durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Há dissolução total, formando-se uma solução límpida ou ligeiramente opalescente e incolor.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Água. Determinar por um método apropriado, como *Determinação da água pelo método semimicro (5.2.20.3)*, *Perda por dessecação (5.2.9.1)* ou por *Espectrofotometria de absorção no infravermelho (5.2.14)*. No máximo, 2,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Pirogênios (5.5.2.1). Cumpre o teste. Injetar em cada coelho, por quilograma de massa corporal, um volume da amostra reconstituída correspondente a, no mínimo, 30 UI do Fator IX e, no máximo, 50 UI do Fator IX.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Fator IX de coagulação sanguínea

Proceder conforme descrito em *Determinação do fator IX de coagulação sanguínea (5.5.1.4)*. A atividade determinada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade declarada. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada não ultrapassa 80% a 125%.

Fatores de coagulação ativados

Proceder conforme descrito em *Determinação de fatores de coagulação ativados (5.5.1.8)*. Se necessário, diluir a amostra para obter uma solução contendo 20 UI do fator IX por mililitro. Para cada uma das diluições, o tempo de coagulação é, no mínimo, 150 segundos.

Heparina

Caso tenha sido adicionada heparina durante a produção, determinar sua quantidade de acordo com o ensaio *Determinação da heparina nos fatores de coagulação (5.5.1.1)*. A amostra contém, no máximo, a quantidade de heparina indicada no rótulo e, no máximo, 0,5 UI de heparina por unidade internacional de fator IX.

Proteínas totais

Se necessário, deve-se diluir a preparação reconstituída com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) de forma a obter-se uma solução que contenha cerca de 15 mg de proteínas em 2 mL. Num tubo

de centrifuga de fundo redondo deve-se introduzir 2,0 mL dessa solução. Adicionar 2 mL de solução de molibdato de sódio a 7,5% (p/v) e 2 mL de uma mistura de ácido sulfúrico isento de nitrogênio e água (1:30). Agitar e centrifugar durante cinco minutos. O líquido sobrenadante deve ser decantado permitindo-se que o tubo seja enxuto sobre um papel de filtro. Determinar o nitrogênio no resíduo pelo método de *Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl* (5.3.3.2). Calcular o teor em proteínas, multiplicando o resultado por 6,25. Este método pode não ser aplicável a certos produtos, notadamente aos que não contêm estabilizante proteico, como a albumina, sendo utilizado outro método validado para o doseamento.

ARMAZENAMENTO

Ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

No rótulo indica-se no mínimo:

- o número de unidades internacionais do fator IX em cada frasco; a quantidade de proteínas em cada frasco;
- o nome e a quantidade de qualquer substância adicionada, incluindo a heparina, quando aplicável;
- o nome e o volume do diluente necessário para reconstituir a preparação; as condições de conservação;
- o prazo de validade; que a transmissão de agentes infecciosos não pode ser totalmente excluída quando se administram medicamentos derivados do sangue ou do plasma humanos (este último pode ser indicado alternativamente no texto de bula).

FATOR VII DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA LIOFILIZADO

Fator VII coagulationis humanus cryodesiccatus

fator VII de coagulação; 03808

O fator VII da coagulação sanguínea de origem humana liofilizado é uma fração proteica do plasma que contém o fator VII (um derivado glicoproteico de cadeia simples), podendo igualmente conter pequenas quantidades da sua forma ativada (o derivado de duas cadeias ou fator VIIa), assim como os fatores II, IX, e X, a Proteína C e a Proteína S. É preparado a partir de plasma humano de acordo com a monografia *Plasma humano para fracionamento*. A atividade da preparação, reconstituída de acordo com as indicações que figuram no rótulo, é de, no mínimo, 15 UI de fator VII por mililitro.

O método de preparação deve ser desenvolvido de modo a manter a integridade funcional do fator VII, minimizar a ativação de qualquer fator de coagulação (para limitar o potencial trombogênico) e deve incluir uma ou várias etapas que demonstrem eliminar ou inativar os agentes infecciosos conhecidos e não conhecidos. Se forem acrescentadas substâncias para inativação viral na etapa de produção, um procedimento de purificação deve ser validado, de modo a demonstrar que as concentrações dessas substâncias foram reduzidas a um nível aceitável e que tais resíduos não comprometem a segurança da preparação. A atividade específica é de, no mínimo, 2 UI de fator VII por miligrama de proteínas totais, antes da eventual adição de um estabilizante proteico.

A fração que contém o fator VII é dissolvida em um diluente apropriado. Pode ser adicionado heparina, antitrombina e outras substâncias auxiliares, como um estabilizante.

Não se adiciona qualquer conservante antimicrobiano. A solução é filtrada em um filtro esterilizante e depois distribuída asépticamente nos recipientes finais e imediatamente congelada. Em seguida, é liofilizada e os recipientes são fechados sob vácuo ou sob gás inerte.

É demonstrada a regularidade do método de produção, no que diz respeito às atividades dos fatores II, IX e X da preparação, expressas em unidades internacionais e em relação à atividade do fator VII.

É demonstrada a regularidade do método de produção, no que diz respeito à atividade do fator VIIa da preparação. A atividade do fator VIIa pode ser determinada, com um fator tissular recombinante solúvel, que não ativa o fator VII em fator VIIa, mas que tem função de cofator específico do fator VIIa: após incubação da mistura do fator tissular recombinante solúvel e fosfolipídios com uma diluição da amostra e do plasma deficiente em fator VII, junta-se cloreto de cálcio e determina-se o tempo, de coagulação; o tempo de coagulação é inversamente proporcional à atividade do fator VIIa da amostra.

IDENTIFICAÇÃO

Reconstituir a amostra como indicado no rótulo, imediatamente antes de realizar a identificação, os ensaios (com exceção dos ensaios de solubilidade e água) e o doseamento.

A. Realizar com a amostra ensaios de precipitação com uma série adequada de soros específicos para as várias espécies. Recomenda-se que o ensaio seja realizado com soros específicos de proteínas plasmáticas de cada uma das espécies domésticas normalmente utilizadas na preparação de produtos biológicos. Demonstra-se que a preparação contém proteínas de origem humana e apresenta resultados negativos com soros específicos para as proteínas plasmáticas de outras espécies.

B. A determinação da atividade coagulante do fator VII contribui para identificar a preparação.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Pó ou sólido friável, podendo ser branco, amarelo claro, verde ou azul.

pH (5.2.19). 6,5 a 7,5.

Osmolalidade (5.2.28). No mínimo, 240 mosmol/kg.

Solubilidade. Ao conteúdo de um frasco da amostra, juntar o volume do diluente indicado no rótulo, à temperatura recomendada, e agitar suavemente por no máximo 10 minutos. A amostra dissolve-se completamente formando uma preparação límpida ou ligeiramente opalescente, que pode ser corada.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Água. Determinar por um método apropriado, como *Determinação da água pelo método semimicro (5.2.20.3)*, a *Perda por dessecação (5.2.9.1)* ou por *Espectrofotometria de absorção no infravermelho (5.2.14)*. No máximo, 2,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Pirogênios (5.5.2.1). Cumpre o teste. Injetar em cada coelho, por quilograma de massa corporal, um volume da amostra reconstituída correspondente a, no mínimo, 30 UI do fator VII.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Fator VII de coagulação sanguínea

Proceder conforme descrito em *Determinação do fator VII de coagulação sanguínea (5.5.1.5)*. A atividade determinada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade declarada. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada não ultrapassa 80% a 125%.

Fatores de coagulação ativados

Proceder conforme descrito em *Determinação de fatores de coagulação ativados (5.5.1.8)*. Para cada uma das diluições, o tempo de coagulação é, no mínimo, 150 segundos.

Heparina

Caso tenha sido adicionada heparina durante a produção, determinar a sua quantidade de acordo com o ensaio *Determinação da heparina nos fatores de coagulação (5.5.1.1)*. A amostra contém, no máximo, a quantidade de heparina indicada no rótulo e, no máximo, 0,5 UI de heparina por unidade internacional de Fator VII.

Proteínas totais

Se necessário, deve-se diluir a preparação reconstituída com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) de forma a obter-se uma solução que contenha cerca de 15 mg de proteínas em 2 mL. Num tubo de centrifuga de fundo redondo deve-se introduzir 2 mL dessa solução. Adicionar 2 mL de solução de molibdato de sódio a 7,5% (p/v) e 2 mL de uma mistura de ácido sulfúrico isento de nitrogênio e água (1:30). Agitar e centrifugar durante cinco minutos. O líquido sobrenadante deve ser decantado, permitindo-se que o tubo seja enxuto sobre um papel de filtro. Determinar o nitrogênio no resíduo pelo método de *Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl* (5.3.3.2). Calcular o teor em proteínas, multiplicando o resultado por 6,25.

Trombina

Se a amostra contiver heparina, determinar a quantidade presente, conforme indicado na *Determinação da heparina nos fatores de coagulação* (5.5.1.1), e neutralizá-la, juntando sulfato de protamina (10 µg de sulfato de protamina neutralizam 1 UI de heparina). Utilizar dois tubos de ensaio e em cada um misturar volumes iguais da amostra reconstituída e de solução de fibrinogênio a 0,3% (p/v). Manter um dos tubos a 37 °C durante seis horas e o outro à temperatura ambiente durante 24 horas. Num terceiro tubo, misturar um volume da solução de fibrinogênio com um volume de solução de trombina humana contendo 1 UI por mililitro e colocar o tubo em banho-maria a 37 °C. Não se produz coagulação nos tubos da amostra. Produz-se coagulação em 30 segundos no tubo que contém trombina.

ARMAZENAMENTO

Ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

No rótulo indica-se no mínimo:

- o número de unidades internacionais do fator VII em cada frasco;
- a quantidade de proteínas em cada frasco;
- o nome e a quantidade de qualquer substância adicionada, incluindo a heparina, quando aplicável;
- o nome e o volume do diluente necessário para reconstituir a preparação; as condições de conservação;
- o prazo de validade; que a transmissão de agentes infecciosos não pode ser totalmente excluída quando se administram medicamentos derivados do sangue ou do plasma humanos (este último pode ser indicado alternativamente no texto de bula).

FATOR VIII DE COAGULAÇÃO SANGUÍNEA HUMANA LIOFILIZADO

Factor VIII coagulationis sanguinis humanus cryodesiccatus

fator VIII de coagulação; 03809

O fator VIII da coagulação sanguínea de origem humana liofilizado é uma fração proteica do plasma que contém uma glicoproteína chamada fator VIII de coagulação e, em função do método de purificação, quantidades variáveis do fator de Von Willebrand. É preparado a partir de uma mistura de plasma obtida de doadores sadios. A atividade da preparação, reconstituída de acordo com as indicações que figuram no rótulo, é, no mínimo, 20 UI de fator VIII:C por mililitro.

O método de preparação inclui duas ou mais etapas de inativação viral que demonstrem a eliminação ou inativação dos agentes infecciosos virais conhecidos. Se forem acrescentadas substâncias para inativação viral na etapa de produção, um procedimento de purificação deve ser validado, de modo a demonstrar que as concentrações dessas substâncias foram reduzidas a um nível aceitável e que tais resíduos não comprometem a segurança da preparação. A atividade específica é, no mínimo, 1 UI de fator VIII:C por miligrama de proteínas totais, antes de eventual adição de um estabilizante proteico.

O fator VIII liofilizado é dissolvido em diluente especificado pelo fabricante. Podem ser adicionadas substâncias auxiliares, como por exemplo, um estabilizante. Não são adicionados conservantes antimicrobianos. A solução é filtrada de modo a proporcionar retenção de bactérias, sendo então distribuída assepticamente nos recipientes finais e imediatamente congelada. Em seguida, é liofilizada e os recipientes são fechados sob vácuo ou sob gás inerte.

Validação aplicada aos produtos com indicação de possuírem uma atividade do tipo fator de Von Willebrand. Nos produtos destinados ao tratamento da doença de Von Willebrand, tem sido demonstrado que o processo de fabricação dá origem a um produto com uma composição constante no que diz respeito ao fator de Von Willebrand. Esta composição pode ser demonstrada de várias maneiras. Por exemplo, o número e os vários múltiplos do fator de Von Willebrand podem ser determinados por eletroforese em gel de agarose (aproximadamente 1% de agarose) em presença de dodecilsulfato de sódio (DSS), com ou sem análise de *Western Blot*, utilizando uma mistura de plasma humano normal como referência. A visualização do perfil multimérico pode ser realizada por uma técnica imunoenzimática e a avaliação quantitativa por densitometria ou outros métodos apropriados.

Produtos que apresentam flocos ou partículas depois da reconstituição para uso. Se ínfimas partículas ou flocos permanecem após a preparação reconstituída, durante o estudo de validação deve ser demonstrado que a potência não é significativamente influenciada após a filtração da preparação.

IDENTIFICAÇÃO

Atende ao teste de *Fator VIII da coagulação sanguínea humana liofilizado* descrito em *Doseamento*.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Pó ou sólido friável branco ou ligeiramente amarelo e higroscópico.

pH (5.2.19). 6,5 a 7,5.

Osmolalidade (5.2.28). No mínimo, 240 mosmol/kg.

Solubilidade. Ao conteúdo de um frasco contendo a amostra, adicionar um volume do diluente indicado no rótulo à temperatura recomendada e agitar suavemente por no máximo 10 minutos. A amostra dissolve-se completamente formando uma solução límpida ou ligeiramente opalescente e incolor ou ligeiramente amarelada. Quando o frasco do produto apresentar ínfimas partículas ou flocos após a reconstituição, deve-se reconstituir e filtrar a preparação, como descrito no rótulo. A solução filtrada é clara ou ligeiramente opalescente.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Água. Determinar por um método apropriado, como *Determinação da água pelo método semimicro (5.2.20.3)*, *Perda por dessecação (5.2.9.1)* ou por *Espectrofotometria de absorção no infravermelho (5.2.14)*. No máximo 2,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Pirogênios (5.5.2.1). Cumpre o teste. Injetar em cada coelho, por quilograma de massa corporal, um volume da amostra reconstituída correspondente a, no mínimo, 30 UI do fator VIII:C.

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Antígenos de superfície da hepatite B

Proceder conforme descrito em *Métodos imunológicos (5.6)*. Examinar a amostra reconstituída. Não se detecta o antígeno de superfície da hepatite B.

Fator de Von Willebrand humano

Empregar um dos métodos descritos a seguir.

A. Proceder conforme descrito em *Determinação do fator de Von Willebrand humano (5.5.1.2)*.

B. Determinar a atividade do cofator da ristocetina. Preparar diluições apropriadas da amostra reconstituída e da preparação de referência, utilizando como diluente solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) e albumina humana a 5% (p/v). Adicionar, a cada preparação, quantidade apropriada de uma mistura contendo plaquetas humanas estabilizadas e ristocetina A. Misturar numa lâmina de vidro com movimentos circulares suaves durante um minuto. Deixar em repouso durante um minuto e efetuar a leitura do resultado em fundo escuro e iluminação lateral. A última diluição que apresentar uma aglutinação nitidamente visível indicará o título da amostra. Como testemunho negativo deve ser utilizado o diluente. A atividade determinada é de, no mínimo, 60% e, no máximo, 140% da atividade aprovada para o produto.

Fator VIII da coagulação sanguínea humana liofilizado

Proceder conforme descrito em *Determinação do fator VIII da coagulação sanguínea humana liofilizado (5.5.1.7)*. A atividade determinada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 120% da atividade indicada.

Hemaglutininas anti-A e anti-B

Proceder conforme descrito em *Determinação de títulos de hemaglutininas anti-A e anti-B (5.5.1.9)*. Diluir a amostra reconstituída com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até uma concentração de 3 UI/mL. As diluições a 1/64 não apresentam sinais de aglutinação. Cumpre o teste.

Proteínas totais

Proceder conforme descrito em *Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (5.3.3.2)*. Se necessário, diluir a preparação reconstituída com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) de forma a obter uma solução contendo cerca de 15 mg de proteínas em 2 mL. A um tubo de centrífuga de fundo redondo, adicionar 2 mL dessa solução, 2 mL de solução de molibdato de sódio a 7,5% (p/v) e 2 mL de mistura de ácido sulfúrico isento de nitrogênio e água (1:30). Agitar e centrifugar durante cinco minutos. O líquido sobrenadante deve ser decantado permitindo-se que o tubo seja enxuto sobre um papel de filtro. Calcular o teor em proteínas multiplicando o resultado por 6,25. Este método pode não ser aplicável a certos produtos, notadamente aos que não contêm estabilizante proteico como a albumina, sendo utilizado outro método validado para o doseamento.

ARMAZENAMENTO

Ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. No rótulo indica-se:

- o número de unidades internacionais do fator VIII:C e, nos casos apropriados, do fator de Von Willebrand;
- a quantidade de proteínas em cada recipiente;
- o nome e a quantidade de qualquer substância adicionada;
- o nome e o volume do líquido necessário para reconstituir a preparação; as condições de conservação;
- o prazo de validade; que a transmissão de agentes infecciosos não pode ser totalmente excluída quando se administram medicamentos derivados do sangue ou do plasma humanos (este último pode ser indicado alternativamente no texto da bula).

FIBRINOGÊNIO HUMANO LIOFILIZADO

Fibrinogenum humanum cryodesiccatus

fibrinogênio; 04045

O fibrinogênio humano liofilizado contém a fração solúvel do plasma humano que, por adição da trombina, é transformado em fibrina. O fibrinogênio deve ser obtido a partir do *Plasma humano para fracionamento*. A preparação pode conter aditivos, como sais, tampões ou estabilizantes. A preparação reconstituída com o volume de diluente indicado no rótulo deve conter, no mínimo, 10 g/L de fibrinogênio.

O método de preparação compreende uma ou várias etapas que demonstraram eliminar agentes infecciosos conhecidos; tem sido demonstrado que os resíduos, no produto final das substâncias eventualmente utilizadas nos processos destinados à inativação viral ou nos processos de purificação devidamente validados posteriores não têm qualquer efeito indesejável nos pacientes.

Não se deve adicionar ao plasma nenhum antibiótico e a preparação não deve conter nenhum conservante antimicrobiano.

O método de preparação deve ser tal que a atividade específica (teor em fibrinogênio em relação ao teor em proteínas totais) é, no mínimo, 80%. Se for adicionado à preparação um estabilizante proteico (por exemplo, a albumina humana) essa deve satisfazer às exigências para a atividade específica do fibrinogênio, antes da adição do estabilizante.

Durante o fracionamento do plasma humano, poderá ser obtido ao mesmo tempo o fibrinogênio e a albumina. A determinação da atividade específica da albumina deve ser, então, determinada por um método imunoquímico apropriado e a quantidade determinada deve ser subtraída da quantidade de proteínas totais para o cálculo de atividade específica.

IDENTIFICAÇÃO

Reconstituir a amostra, segundo as indicações que constam no rótulo, realizar ensaios de precipitação com vários soros específicos de diferentes espécies. É recomendável que o ensaio seja realizado com soros específicos das proteínas plasmáticas de cada espécie de animal doméstico, correntemente, utilizado para a preparação de produtos de origem biológica. A amostra deve conter proteínas de origem humana e dá resultados negativos com os soros específicos das proteínas plasmáticas de outras espécies. O doseamento da amostra contribui para identificação da preparação.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Pó ou sólido friável, branco, ou amarelo pálido.

pH (5.2.19). 6,5 a 7,5.

Osmolalidade (5.2.28). No mínimo, 240 mosmol/kg.

Solubilidade. Adicionar o volume de diluente, indicado no rótulo, ao conteúdo do frasco. À temperatura de 20 °C a 25 °C, o fibrinogênio dissolve-se em 30 minutos, originando uma preparação quase incolor e ligeiramente turva.

Estabilidade da preparação. Após reconstituição da preparação à temperatura de 20 °C a 25 °C, deixar em repouso. Não deve aparecer qualquer sinal de gelificação no decurso dos 60 minutos que seguem à reconstituição.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Água. Determinar por um dos métodos: *Determinação da água pelo método semimicro (5.2.20.3)*, *Perda por dessecação (5.2.9.1)* ou por *Espectrofotometria de absorção no infravermelho (5.2.14)*. No máximo 2,0%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Pirogênios (5.5.2.1). Cumpre o teste. Injetar em cada coelho, por quilograma de massa corporal, um volume correspondente a, no mínimo, 30 mg de fibrinogênio, calculado em relação à quantidade indicada no rótulo.

DOSEAMENTO

Antígenos de superfície da hepatite B

Examinar a amostra reconstituída conforme descrito em *Métodos imunoquímicos (5.6)*. Não deve ser detectado o antígeno de superfície da hepatite B.

Fibrinogênio

Misturar 0,2 mL da amostra reconstituída com 2 mL de tampão apropriado (pH 6,6 a 6,8) contendo uma quantidade suficiente de trombina (cerca de 3 UI/mL) e cálcio (0,05 mol/L). Manter a mistura à temperatura de 37 °C durante 20 minutos, separar o precipitado por centrifugação (5000 × g por 20 minutos) e lavar, cuidadosamente, com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v). Determinar o teor de nitrogênio pelo método *Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (5.3.3.2)* e calcular a quantidade de fibrinogênio (proteínas coaguláveis) multiplicando o resultado por 6. O teor é, no mínimo, 70,0% e, no máximo, 130,0% da quantidade indicada no rótulo. Também, estão disponíveis no mercado, conjuntos destinados às determinações quantitativas, manuais ou automatizadas, de fibrinogênio em plasma citratado por método de formação do coágulo. Esses conjuntos baseiam-se numa quantidade ótima de trombina bovina que é adicionada a um plasma diluído a 1:10. O tempo de coagulação medido deve ser inversamente relacionado à concentração de fibrinogênio na amostra testada. Esses conjuntos devem estar registrados no órgão competente e devidamente validados em conformidade com os padrões do *National Committee for Clinical Standards: Collection Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and Performance of Coagulation Assays*. 1991. NCCLS Document H21 - A2 podem ser utilizados em unidades hemoterápicas que produzam crioprecipitados a partir do plasma fresco congelado e tenham necessidade de quantificar o fibrinogênio plasmático.

ARMAZENAMENTO

Ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

O rótulo deve indicar a quantidade de fibrinogênio contida no frasco, o nome e o volume do diluente a ser utilizado para reconstituir a preparação, nos casos apropriados, o nome e a quantidade de estabilizante proteico utilizado na preparação.

IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-D

Immunoglobulinum humanum anti-D

imunoglobulina humana anti-D; 11440

A imunoglobulina humana anti-D é uma preparação estéril, líquida ou liofilizada, contendo imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G. A preparação é destinada a ser administrada por via intramuscular. É obtida a partir do plasma proveniente de doadores D-negativos, contendo títulos elevados de imunoglobulinas contra o antígeno D específico e pequenas quantidades de anticorpos contra outros grupos sanguíneos. Pode ser adicionada a ela imunoglobulina humana normal. A imunoglobulina humana anti-D satisfaz às exigências estabelecidas na monografia *Imunoglobulina humana normal*, exceto no que se refere ao número mínimo de doadores e ao teor mínimo em proteínas totais.

Estabilidade. Para a preparação líquida, realizar ensaio de degradação acelerada, realizado por aquecimento a 37 °C durante quatro semanas no produto final; a perda de atividade anti-D é, no máximo, 20% do valor inicial.

Para limitar a carga viral do vírus B19 em *pools* de plasma utilizados por fabricantes da imunoglobulina anti-D, o *pool* de plasma é testado quanto à presença do vírus B19, mediante o emprego de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos devidamente validadas. No máximo 10 UI/μL.

Um controle positivo com 10 UI do DNA do vírus B19 por microlitro e um controle interno preparado por meio da adição de um marcador apropriado a uma amostra do *pool* de plasma são usados no teste. O teste é inválido se o controle positivo for não reagente ou se o resultado obtido com o controle interno indicar a presença de inibidores.

Se for adicionada à preparação imunoglobulina humana e/ou solução de albumina humana, o *pool* ou *pools* de plasma de origem devem cumprir os requisitos apresentados anteriormente para o DNA de vírus B19.

DOSEAMENTO

Proceder conforme descrito em *Determinação da imunoglobulina humana anti-D (5.5.1.15)*. A potência estimada é, no mínimo, 90% da potência declarada. Os limites de confiança (P = 0,95) são, no mínimo, 80% e, no máximo, 120% da potência estimada.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ver a monografia *Imunoglobulina humana normal*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. Ver a monografia *Imunoglobulina humana normal*. No rótulo indica-se o número de Unidades Internacionais por recipiente.

IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-HEPATITE A

Immunoglobulinum humanum hepatitis A

imunoglobulina humana anti-hepatite A; 11441

A imunoglobulina humana anti-hepatite A é uma preparação estéril, líquida ou liofilizada, contendo imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G. A preparação é destinada a ser administrada por via intramuscular. É obtida a partir do plasma proveniente de doadores selecionados contendo anticorpos contra o vírus da hepatite A. Pode ser adicionada a ela a imunoglobulina humana normal. A imunoglobulina humana anti-hepatite A satisfaz às exigências estabelecidas na monografia *Imunoglobulina humana normal*, exceto no que se refere ao número mínimo de doadores e ao teor mínimo em proteínas totais.

DOSEAMENTO

A atividade da imunoglobulina humana contra a hepatite A é avaliada por comparação com a atividade de uma preparação de referência aferida em unidades internacionais, por meio de um ensaio com sensibilidade e especificidade apropriadas (Proceder conforme descrito em *Métodos imunológicos (5.6)*). A Unidade Internacional corresponde à atividade de uma determinada quantidade da preparação de referência internacional da imunoglobulina humana anti-hepatite A. A correspondência entre a Unidade Internacional e a preparação de referência internacional é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

A atividade declarada é, no mínimo, 600 UI/mL. A atividade estimada não é inferior à atividade declarada. Os limites de confiança ($P = 0,95$) são, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade estimada.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ver a monografia de *Imunoglobulina humana normal*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. Ver a monografia de *Imunoglobulina humana normal*. No rótulo indica-se o número de Unidades Internacionais por mililitro.

IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-HEPATITE B

Immunoglobulinum humanum hepatitis B

imunoglobulina humana anti-hepatite B; 10809

A imunoglobulina humana anti-hepatite B é uma preparação estéril, líquida ou liofilizada, contendo imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G. A preparação é destinada a ser administrada por via intramuscular. É obtida a partir do plasma proveniente de doadores selecionados contendo anticorpos contra o vírus da hepatite B. Pode ser adicionada a ela imunoglobulina humana normal. A imunoglobulina humana anti-hepatite B satisfaz às exigências estabelecidas na monografia *Imunoglobulina humana normal*, exceto no que se refere ao número mínimo de doadores e ao teor mínimo em proteínas totais.

DOSEAMENTO

A atividade da imunoglobulina humana anti-hepatite B é avaliada por comparação com a atividade de uma preparação de referência aferida em Unidades Internacionais, por meio de um ensaio com sensibilidade e especificidade apropriadas (Proceder conforme descrito em *Métodos imunoquímicos* (5.6). A Unidade Internacional corresponde à atividade de uma determinada quantidade da preparação de referência internacional da imunoglobulina humana anti-hepatite B. A correspondência entre a Unidade Internacional e a preparação de referência é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

A atividade declarada é, no mínimo, 100 UI/mL. A atividade estimada não é inferior à atividade declarada. Os limites de confiança ($P = 0,95$) são, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade estimada.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Cumprir o estabelecido na monografia de *Vacinas para uso humano*.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente.

IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTI-HEPATITE B PARA USO INTRAVENOSO

Immunoglobulinum humanum hepatitis B ad usum intravenosum

A imunoglobulina humana anti-hepatite B para uso intravenoso é uma preparação estéril, líquida ou liofilizada, contendo imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G. É obtida a partir do plasma proveniente de doadores portadores de anticorpos específicos contra o antígeno de superfície da hepatite B. Pode ser adicionada de imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa. A imunoglobulina humana anti-hepatite B para uso intravenoso satisfaz às exigências estabelecidas na monografia *Imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa*, exceto no que se refere ao número mínimo de doadores, ao teor mínimo em proteínas totais e ao limite de osmolalidade.

DOSEAMENTO

A atividade da imunoglobulina humana anti-hepatite B para administração por via intravenosa é avaliada por comparação do título em anticorpos da amostra com a atividade de uma preparação de referência aferida em Unidades Internacionais, por meio de um imunodoseamento com sensibilidade e especificidade apropriadas (Proceder conforme descrito em *Métodos imunoquímicos (5.6)*). A Unidade Internacional corresponde à atividade de uma determinada quantidade da preparação internacional de referência da imunoglobulina humana anti-hepatite B. A correspondência entre a Unidade Internacional e a preparação de referência internacional é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

A atividade declarada é, no mínimo, 50 UI/mL. A atividade estimada não é inferior à atividade declarada. Os limites de confiança ($P = 0,95$) são, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade estimada.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ver a monografia de *Imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. Ver a monografia de *Imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa*. No rótulo indica-se o número mínimo de Unidades Internacionais por recipiente.

IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTIRRÁBICA

Immunoglobulinum humanum rabicum

imunoglobulina humana antirrábica; 11442

A imunoglobulina humana antirrábica é uma preparação estéril, líquida ou liofilizada, contendo imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G. A preparação é destinada a ser administrada por via intramuscular. É obtida a partir do plasma proveniente de doadores portadores de anticorpos específicos contra a raiva. Pode ser adicionada a ela a imunoglobulina humana normal. A imunoglobulina humana antirrábica satisfaz às exigências estabelecidas na monografia *Imunoglobulina humana normal*, exceto no que se refere ao número mínimo de doadores e ao teor mínimo em proteínas totais.

DOSEAMENTO

A atividade da imunoglobulina humana antirrábica é avaliada por comparação entre a dose necessária para neutralizar o poder infeccioso do vírus da raiva e a dose de uma preparação de referência aferida em Unidades Internacionais necessária para assegurar o mesmo grau de neutralização (*Métodos imunoquímicos (5.6)*). Realizar a aferição em culturas celulares sensíveis e revelar a presença do vírus não neutralizado por imunofluorescência. A Unidade Internacional corresponde à atividade neutralizante específica para o vírus da raiva de uma determinada quantidade de uma preparação de referência internacional de imunoglobulina humana antirrábica.

A correspondência entre a Unidade Internacional e a preparação de referência internacional é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

Realizar a aferição em células sensíveis apropriadas. Utilizar a linha celular BHK 21, multiplicada no meio de cultura descrito a seguir, e submeter entre 18 a 30 passagens a partir do lote semente do ATCC. Recolher as células após uma incubação de dois a quatro dias. Tratar as células com tripsina. Preparar uma suspensão de 500 000 células por mililitro (suspensão de células). Para aumentar a sensibilidade das células, juntar, se necessário, 10 minutos antes da utilização desta suspensão, 10 µg de dietilaminoetil-dextrano por mililitro.

Utilizar uma cepa de vírus fixa multiplicada em células sensíveis, por exemplo, a cepa CVS, adaptada à cultura na linha celular BHK 21 (suspensão-mãe do vírus). Titular a suspensão-mãe do vírus do seguinte modo:

Preparar uma série de diluições da suspensão do vírus. Em placas com câmaras para culturas celulares (oito câmaras por placa), distribuir 0,1 mL de cada diluição. Adicionar 0,1 mL do meio de cultura e 0,2 mL da suspensão de células. Incubar a 37 °C em atmosfera de dióxido de carbono, durante 24 horas. Fixar, corar por imunofluorescência e realizar os cálculos segundo as indicações descritas a seguir. Determinar o título da suspensão-mãe do vírus e preparar uma diluição de trabalho do vírus correspondente a 100 DICC₅₀ por 0,1 mL.

Em cada ensaio verificar a quantidade do vírus realizando uma titulação controle: a partir da diluição correspondente a 100 DICC₅₀ por 0,1 mL, realizar três diluições sucessivas de razão 10. Distribuir respectivamente 0,1 mL de cada diluição em quatro câmaras contendo 0,1 mL do meio de cultura e acrescentar 0,2 mL da suspensão de células. O ensaio só é válido se o título se situar entre 30 e 300 DICC₅₀.

Diluir a preparação de referência com meio de cultura não suplementar até à concentração de 2 UI/mL (diluição-mãe de referência e conservar a uma temperatura inferior a -80 °C). Preparar duas pré-diluições apropriadas (1/8 e 1/10) da diluição-mãe de referência de modo que a diluição da preparação de referência que reduz de 50% o número de campos fluorescentes na placa de cultura celular se encontre entre as quatro diluições. Adicionar 0,1 mL de meio a cada câmara, exceto na 1ª de cada uma de duas filas às quais se junta, respectivamente, 0,2 mL das duas pré-diluições da diluição-mãe de referência e a seguir transferir 0,1 mL sucessivamente para as outras câmaras.

Diluir a amostra a 1/100 com meio de cultura não suplementado (diluição-mãe de imunoglobulina) para reduzir ao mínimo os erros devidos à viscosidade da preparação não diluída. Preparar três pré-diluições apropriadas da diluição-mãe de imunoglobulina de modo que a diluição da amostra que reduz de 50% o número de campos fluorescentes na placa de cultura celular se encontre entre as quatro diluições.

Adicionar 0,1 mL de meio a cada câmara, exceto na 1ª de cada uma de três filas às quais se adiciona, respectivamente, 0,2 mL das três pré-diluições da diluição-mãe de imunoglobulina. Preparar uma série de diluições de razão 2 transferindo 0,1 mL sucessivamente para as outras câmaras.

A todas as câmaras contendo as diluições da preparação de referência e as diluições da amostra, adicionar 0,1 mL da suspensão de vírus correspondente a 100 DIC₅₀ por 0,1 mL (diluição de trabalho), agitar manualmente e deixar em repouso a 37 °C em atmosfera de dióxido de carbono durante 90 minutos, acrescentar 0,2 mL da suspensão de células, agitar manualmente e deixar em repouso a 37 °C em atmosfera de dióxido de carbono, durante 24 horas. Após 24 horas eliminar o meio e retirar as paredes de plástico.

Lavar as câmaras monocelulares com tampão fosfatosalina de pH 7,4 e depois com uma mistura de 20 volumes de água e 80 volumes de acetona e fixar durante três minutos com uma mistura de 20 volumes de água e 80 volumes de acetona a -20 °C. Espalhar nas lâminas o conjugado fluorescente de soro antirrábico pronto a ser utilizado.

Deixar em repouso durante 30 minutos a 37 °C numa atmosfera com uma umidade muito elevada. Lavar com tampão fosfato-salina de pH 7,4 e secar. Examinar 20 campos de cada câmara com uma ampliação de 250 vezes com um microscópio equipado para leitura com fluorescência. Registrar o número de campos contendo, no mínimo, uma célula fluorescente. Verificar a dose do vírus de prova utilizado na placa para a titulação do vírus e determinar a diluição da preparação de referência e da amostra que reduz de 50% o número de campos fluorescentes realizando os cálculos para o conjunto das duas ou três diluições, por meio de uma análise de probabilidade iterativa. O ensaio só é válido quando a análise estatística demonstrar uma inclinação significativa da curva dose/efeito e não revelar desvio da linearidade ou do paralelismo.

A atividade declarada é de, no mínimo, 150 UI/mL. A atividade estimada não é inferior à atividade declarada nem superior a duas vezes a atividade declarada. Os limites de confiança (P = 0,95) são, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade estimada.

MEIOS DE CULTURA PARA O CRESCIMENTO DAS CÉLULAS BHK 21

Os meios comercializados com uma composição ligeiramente diferente daquela que se indica podem igualmente ser utilizados.

cloreto de sódio	6,4 g
cloreto de potássio	0,40 g

cloreto de cálcio anidro	0,20 g
sulfato de magnésio heptaidratado	0,20 g
fosfato de sódio monoidratado	0,124
glicose monoidratada	4,5 g
nitrito férrico nonaidratado	0,10 mg
cloridrato de L-arginina	42,0 mg
L-cistina	24,0 mg
L-histidina	16,0 mg
L-isoleucina	52,0 mg
L-leucina	52,0 mg
cloridrato de L-lisina	74,0 mg
L-fenilalanina	33,0 mg
L-treonina	48,0 mg
L-triptofano	8,0 mg
L-tirosina	36,0 mg
L-valina	47,0 mg
L-metionina	15,0 mg
L-glutamina	0,292 g
I-inositol	3,60 mg
cloreto de colina	2,0 mg
ácido fólico	2,0 mg
nicotinamida	2,0 mg
pantotenato de cálcio	2,0 mg
cloridrato de piridoxal	2,0 mg
cloridrato de tiamina	2,0 mg
riboflavina	2,0 mg
vermelho de fenol	15,0 mg
bicarbonato de sódio	2,75 g
água q.s.p.	1000 mL

Adicionar ao meio o seguinte suplemento:

soro fetal de vitela (aquecido durante 30 minutos a 56° C)	10%
caldo triptose fosfato	10%
benzilpenicilina sódica	60 mg/L
estreptomicina	0,1 g/L

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ver a monografia *Imunoglobulina humana normal*.

ROTULAGEM

Ver a monografia *Imunoglobulina humana normal*. No rótulo indica-se o número de Unidades Internacionais por recipiente.

IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTIRRUBÉOLA

Immunoglobulinum humanum rubellae

imunoglobulina humana antirrubéola; 11443

A imunoglobulina humana antirrubéola é uma preparação estéril; líquida ou liofilizada contendo imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G. A preparação é destinada a ser administrada por via intramuscular. É obtida a partir do plasma contendo anticorpos específicos contra o vírus da rubéola. Pode ser adicionada de imunoglobulina humana normal. A imunoglobulina humana antirrubéola satisfaz às exigências estabelecidas na monografia *Imunoglobulina humana normal*, exceto no que se refere ao número mínimo de doadores e ao teor mínimo em proteínas totais.

DOSEAMENTO

A atividade da imunoglobulina humana antirrubéola é avaliada por comparação com a atividade de uma preparação de referência aferida em Unidades Internacionais, por meio de um ensaio apropriado de inibição de hemaglutinação. A Unidade Internacional corresponde à atividade de uma determinada quantidade da preparação de referência internacional de soro humano contra a rubéola. A correspondência entre a Unidade Internacional e a preparação de referência internacional é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

A atividade estimada é, no mínimo, 4500 UI/mL. Os limites de confiança ($P = 0,95$) da atividade estimada são, no mínimo, 50% e, no máximo, 200% da atividade declarada.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ver a monografia *Imunoglobulina humana normal*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. Ver a monografia de *Imunoglobulina humana normal*. No rótulo indica-se o número de Unidades Internacionais por mililitro.

IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTISSARAMPO

Immunoglobulinum humanum morbillicum

imunoglobulina humana antissarampo; 11444

A imunoglobulina humana antissarampo é uma preparação estéril; líquida ou liofilizada contendo imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G. A preparação é destinada a ser administrada por via intramuscular. É obtida a partir do plasma contendo anticorpos específicos contra o vírus do sarampo. Pode ser adicionada de imunoglobulina humana normal. A imunoglobulina humana antissarampo satisfaz às exigências estabelecidas na monografia *Imunoglobulina humana normal*, exceto no que se refere ao número mínimo de doadores e ao teor mínimo em proteínas totais.

DOSEAMENTO

A atividade da preparação líquida ou da preparação liofilizada reconstituída segundo as indicações contidas no rótulo é de, no mínimo, 50 UI/mL de anticorpos neutralizantes do vírus do sarampo.

A atividade é avaliada por comparação entre o título em anticorpos da amostra e de uma preparação de referência aferida em unidades internacionais, utilizando uma dose de prova de vírus do sarampo em cultura celular apropriada.

A Unidade Internacional corresponde à atividade neutralizante específica para o vírus do sarampo de uma determinada quantidade da preparação internacional de referência do soro humano do sarampo.

A correspondência entre a Unidade Internacional e a preparação de referência internacional é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

Preparar diluições seriadas da amostra e da preparação de referência. Misturar volumes iguais de cada diluição e de uma suspensão de vírus do sarampo contendo cerca de 100 DICC₅₀ em 0,1 mL. Incubar essas misturas ao abrigo da luz a 37 °C durante duas horas. Utilizar, no mínimo, seis culturas celulares para cada mistura e inocular 0,2 mL da mistura por cultura. Incubar, pelo menos, durante 10 dias. Examinar as culturas quanto ao desenvolvimento do vírus.

Determinar a atividade comparando a diluição que contém a menor quantidade da amostra que tenha neutralizado o vírus com a da preparação de referência que manifeste idêntica atividade. Calcular a atividade da amostra em unidades internacionais de anticorpos neutralizantes do vírus do sarampo por mililitro.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ver a monografia *Imunoglobulina humana normal*.

ROTULAGEM

Ver a monografia *Imunoglobulina humana normal*. No rótulo indica-se o número de Unidades Internacionais por recipiente.

IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTITÉTANO

Immunoglobulinum humanum tetanicum

imunoglobulina humana antitétano; 11445

A imunoglobulina humana antitétano é uma preparação estéril, líquida ou liofilizada, contendo imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G. É obtida a partir do plasma contendo anticorpos específicos contra a toxina do *Clostridium tetani*. Pode ser adicionada de imunoglobulina humana normal. A imunoglobulina humana antitétano satisfaz às exigências estabelecidas na monografia *Imunoglobulina humana normal*, exceto no que se refere ao número mínimo de doadores e ao teor mínimo em proteínas totais.

Durante a produção é conveniente ser estabelecida uma relação satisfatória entre a atividade determinada por imunodoseamento pelo método *Determinação da atividade humana contra o tétano* e a atividade determinada pelo método *Atividade antitóxica em camundongos em Doseamento*.

DOSEAMENTO

Atividade antitóxica em camundongos

Avaliar a atividade pela determinação da dose que permite assegurar a proteção de camundongos contra os efeitos paralisantes de uma determinada dose de toxina tetânica. Essa dose é comparada com uma preparação de referência de uma imunoglobulina humana tetânica aferida em unidades internacionais, necessária para assegurar a mesma proteção. A Unidade Internacional de antitoxina corresponde à atividade neutralizante específica relativamente à toxina tetânica contida numa determinada quantidade do padrão internacional constituído pela imunoglobulina humana liofilizada. A correspondência entre a Unidade Internacional e o Padrão Internacional é indicada pela Organização Mundial de Saúde. A imunoglobulina humana contra o tétano é aferida em unidades internacionais por comparação com o padrão internacional.

Escolha dos animais. Utilizar camundongos com peso compreendido entre 16 e 20 g.

Preparação da toxina de teste. Preparar a toxina de teste por um método apropriado a partir do filtrado estéril de uma cultura de *C. tetani* em meio líquido. Os dois métodos a seguir referidos são dados a título de exemplo, mas qualquer outro método apropriado pode ser utilizado.

(1) Ao filtrado de uma cultura de cerca de nove dias, adicionar 1 a 2 volumes de glicerina e conservar a mistura no estado líquido a uma temperatura ligeiramente inferior a 0 °C.

(2) Precipitar a toxina por adição à cultura de sulfato de amônio, secar o precipitado sob vácuo em presença de pentóxido de fósforo, pulverizá-lo e conservá-lo seco em ampolas fechadas sob vácuo em presença de pentóxido de fósforo.

Determinação da dose da toxina de teste (dose Lp/10).

Preparar uma solução da preparação de referência em líquido apropriado de modo que contenha 0,5 UI de antitoxina por mililitro. Se a toxina for conservada no estado seco, reconstituir usando um líquido apropriado. Preparar uma série de misturas da solução da preparação de referência e da amostra de modo que cada uma contenha 2 mL da solução da preparação de referência e uma quantidade variável da amostra. Completar cada mistura com o mesmo volume final de 5 mL utilizando um líquido apropriado. Deixar em repouso e ao abrigo da luz, durante 60 minutos. Utilizar

um grupo de seis camundongos para cada mistura. Injetar a cada um deles, por via subcutânea, 0,5 mL da mistura atribuída ao seu grupo. Manter os camundongos em observação durante 96 horas. Os que forem atingidos por paralisia podem ser sacrificados. A dose de teste da toxina corresponde à quantidade presente em 0,5 mL da mistura contendo a menor quantidade de toxina que provoca, durante o período de observação, a paralisia nos seis camundongos aos quais foi administrada, apesar da neutralização parcial devido a preparação de referência.

Determinação da atividade da imunoglobulina

Preparar uma solução da preparação de referência em líquido apropriado de modo que contenha 0,5 UI de antitoxina por mililitro. Preparar uma solução da toxina de teste em líquido apropriado de modo que contenha cinco doses/mL. Preparar uma série de misturas da solução da toxina de prova e da amostra de modo que contenham cada uma 2 mL da solução da toxina de prova e uma quantidade variável da amostra. Completar cada mistura com o mesmo volume final de 5 mL com líquido apropriado. Preparar uma segunda série de misturas da solução da toxina de teste e da solução da preparação de referência de modo que contenha cada uma 2 mL da solução da toxina de teste e uma quantidade variável da preparação de referência. Nessa segunda série, a diluição média da preparação de referência corresponde à mistura que contém 1 UI de antitoxina (2 mL da solução da preparação de referência). Completar cada mistura com o mesmo volume final de 5 mL, utilizando um líquido apropriado. Deixar em repouso as misturas das duas séries ao abrigo da luz, durante 60 minutos. Utilizar um grupo de seis camundongos para cada mistura. Injetar a cada um deles por via subcutânea, 0,5 mL da mistura atribuída ao seu grupo. Manter os camundongos em observação durante 96 horas. Os que forem atingidos por paralisia podem ser sacrificados. A mistura contendo a quantidade máxima de imunoglobulina que não protege nenhum camundongo da paralisia corresponde a 1 UI. Essa quantidade serve para calcular a atividade da imunoglobulina em unidades internacionais por mililitro.

O ensaio só é válido se todos os camundongos inoculados com a mistura contendo, até, 2 mL da solução da preparação de referência forem atingidos por paralisia e se todos os camundongos inoculados com as misturas contendo maiores volumes dessa solução não apresentarem sintomas de paralisia.

Determinação da atividade da imunoglobulina humana contra o tétano

A atividade da imunoglobulina humana contra o tétano é avaliada por comparação do título de anticorpos da amostra e o de uma preparação de referência, aferida em unidades internacionais, com o auxílio de um ensaio de imunodoseamento com sensibilidade e especificidade apropriadas (*Métodos imunoquímicos*). A imunoglobulina humana contra o tétano é aferida em unidades internacionais por comparação com o padrão internacional. A atividade indicada não é inferior a 100 UI de antitoxina tetânica por mililitro. A atividade determinada não é inferior à atividade indicada. Os limites de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada não são inferiores a 80%, nem superiores a 125%.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ver a monografia *Imunoglobulina humana normal*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. Ver a monografia *Imunoglobulina humana normal*. O rótulo deve indicar o número de unidades internacionais contido no frasco.

IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTIVARICELA

Immunoglobulinum humanum varicellae

imunoglobulina humana antivaricela; 11446

A imunoglobulina humana antivaricela é uma preparação estéril, líquida ou liofilizada, contendo imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G. A preparação é destinada a ser administrada por via intramuscular. É obtida a partir do plasma contendo anticorpos específicos contra o *Herpesvirus varicellae*. Pode ser adicionada de imunoglobulina humana normal. A imunoglobulina humana antivaricela satisfaz às exigências estabelecidas na monografia *Imunoglobulina humana normal*, exceto no que se refere ao número mínimo de doadores, ao teor mínimo em proteínas totais e, nos casos autorizados, ao ensaio dos anticorpos contra o antígeno de superfície da hepatite B.

DOSEAMENTO

A atividade da imunoglobulina humana antivaricela é avaliada por comparação com a atividade de uma preparação de referência aferida em Unidades Internacionais, por meio de um ensaio com sensibilidade e especificidade apropriadas (Proceder conforme descrito em *Métodos imunoquímicos (5.6)*). A Unidade Internacional corresponde à atividade de uma determinada quantidade da preparação de referência internacional da imunoglobulina humana contra a varicela. A correspondência entre a Unidade Internacional e a preparação de referência internacional é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

A atividade declarada é, no mínimo, 100 UI/mL. A atividade estimada não é inferior a atividade declarada. Os limites de confiança ($P = 0,95$) são, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade estimada.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ver a monografia *Imunoglobulina humana normal*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. Ver a monografia de *Imunoglobulina humana normal*. No rótulo indica-se o número de Unidades Internacionais por mililitro.

IMUNOGLOBULINA HUMANA ANTIVARICELA PARA USO INTRAVENOSO

Immunoglobulinum humanum varicellae ad usum intravenosum

A imunoglobulina humana antivaricela para uso intravenoso é uma preparação estéril, líquida ou liofilizada, contendo imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G. É obtida a partir do plasma contendo anticorpos específicos contra o herpes vírus humano 3 (vírus da varicela-zoster 1). Pode ser adicionada de imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa. A imunoglobulina humana antivaricela para uso intravenoso satisfaz às exigências estabelecidas na monografia *Imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa*, exceto no que se refere ao número mínimo de doadores, ao teor mínimo em proteínas totais e ao limite de osmolalidade.

DOSEAMENTO

A atividade da imunoglobulina humana antivaricela para uso intravenoso é avaliada por comparação do título de anticorpos da amostra com a atividade de uma preparação de referência aferida em Unidades Internacionais, por meio de um imunodoseamento com sensibilidade e especificidade apropriadas (Proceder conforme descrito em *Métodos imunoquímicos (5.6)*). A Unidade Internacional corresponde à atividade de uma determinada quantidade da preparação de referência internacional da imunoglobulina humana antivaricela. A correspondência entre a Unidade Internacional e a preparação de referência internacional é indicada pela Organização Mundial de Saúde.

A atividade declarada é, no mínimo, 25 UI/mL. A atividade estimada não é inferior à atividade declarada. Os limites de confiança ($P = 0,95$) são, no mínimo, 80% e, no máximo, 125% da atividade estimada.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ver a monografia *Imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa*.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. Ver a monografia de *Imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa*. No rótulo indica-se o número de Unidades Internacionais por mililitro.

IMUNOGLOBULINA HUMANA NORMAL

Immunoglobulinum humanum normale

imunoglobulina humana; 04865

Imunoglobulina humana normal é uma preparação estéril, líquida ou liofilizada, contendo principalmente IgG. Outras proteínas também podem estar presentes. A imunoglobulina humana normal contendo anticorpos IgG pode ser administrada via intramuscular ou via subcutânea. A imunoglobulina humana normal é obtida do plasma humano, o qual cumpre os requisitos da monografia *Plasma humano para fracionamento*. Não deve ser adicionado antibiótico na preparação.

O método de preparação deve incluir uma ou mais etapas que demonstrem remover ou inativar agentes infecciosos conhecidos. Se substâncias são usadas para inativação viral, deverá demonstrar que não há nenhum resíduo na preparação final que apresente efeitos adversos nos pacientes tratados com a imunoglobulina. É necessário demonstrar, por meio de testes adequados em animais e avaliação durante os ensaios clínicos, que o produto é bem tolerado quando administrado por via intramuscular ou subcutânea. A imunoglobulina humana normal é preparada com *pool* de plasma de no mínimo 1000 doadores, por um método conhecido, que proporcione um produto final estéril e com concentração de proteínas de 160 g/L, contendo anticorpos de, no mínimo, dois agentes (dos quais um viral e um bacteriano) disponíveis na Preparação de Referência, ou Padrão Internacional. A concentração de cada anticorpo deve ser, no mínimo, dez vezes maior que no *pool* do plasma inicial.

Se a imunoglobulina humana normal for preparada para a administração subcutânea, o método de produção deve ser adequado para um rendimento consistente do produto, que cumpre com o teste de função F_c da imunoglobulina. A imunoglobulina humana normal é preparada como uma solução estabilizada, por exemplo, em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v); em solução de glicina 2,25% (p/v); ou, se a preparação é liofilizada, em solução de glicina 6% (p/v). Preparações multidoses devem conter um agente antimicrobiano. Preparações dose única não devem conter agentes antimicrobianos. No produto final a quantidade de agentes antimicrobianos ou estabilizadores usados não deve apresentar efeitos nocivos à saúde. A substância deve ser filtrada através de filtro de retenção das bactérias (filtração esterilizante). A preparação pode subsequentemente ser liofilizada e os frascos vedados sob vácuo ou um gás inerte.

A estabilidade da preparação deve ser demonstrada, por meio de testes adequados, durante o desenvolvimento do estudo de estabilidade.

IDENTIFICAÇÃO

A. Realizar na amostra ensaios de precipitação com uma gama apropriada de soros específicos, de diferentes espécies de animais domésticos. É recomendável que o ensaio seja realizado com soros específicos das proteínas plasmáticas de cada espécie de animal doméstico correntemente utilizado para a preparação de produtos de origem biológica. A imunoglobulina humana normal contém proteínas de origem humana e dá resultados negativos com os soros específicos das proteínas plasmáticas de outras espécies.

B. Realizar na amostra um ensaio de imunoeletroforese segundo técnica apropriada. Usando um antissoro humano normal, comparar o soro humano normal com a amostra diluída, de modo a conter 10 g/L de proteínas. O componente principal da amostra corresponde ao componente IgG do soro humano normal, podendo existir outras proteínas plasmáticas em pequenas quantidades. Se a albumina humana foi adicionada como estabilizante, pode ser visto como um composto importante.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. A preparação líquida é clara ou amarelo pálido ou ligeiramente marrom durante a estocagem, podendo apresentar uma leve turbidez ou uma pequena quantidade de formação de partículas. A preparação liofilizada é um pó ou sólido de massa friável, branco ou ligeiramente amarelado. Para a preparação liofilizada, a reconstituição deve ser de acordo com a rotulagem, imediatamente antes da *Identificação* e outros testes, exceto para *Solubilidade* e *Água*.

pH (5.2.19). 5,0 a 7,2. Diluir a preparação a ser examinada em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) a uma concentração de proteínas de 1% (p/v).

Osmolalidade (5.2.28). No mínimo, 240 mosmol/kg.

Solubilidade. Para a preparação liofilizada, adicionar o volume do diluente de acordo com o rótulo. A preparação dissolve completamente dentro de 20 minutos à temperatura de 20 °C a 25 °C.

Composição proteica. Proceder conforme descrito em *Eletroforese (5.2.22)*, utilizar a técnica *Eletroforese de zona*. Utilizar tiras adequadas de gel de acetato de celulose ou de agarose, como meio suporte, e tampão barbital pH 8,6 como solução eletrolítica. Se o acetato de celulose é o material suporte, utilizar o método descrito a seguir. Se é o gel de agarose, e porque ele é normalmente parte do sistema automático, utilizar o manual de instrução do fabricante.

Solução da amostra: diluir a amostra com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até uma concentração de 50 g/L em proteínas.

Solução de referência: reconstituir um padrão de referência para eletroforese de imunoglobulina humana e diluir com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até a concentração de 5% (p/v) em proteínas.

Adequabilidade do sistema: no eletroforetograma obtido com a *Solução de referência*, em gel de acetato de celulose ou de agarose, a proporção de proteínas na banda principal está de acordo com os limites estabelecidos na bula que acompanha a preparação de referência.

Procedimento: aplicar na tira 2,5 µL da *Solução amostra* ou 0,25 µL por mililitro se for utilizada uma tira mais estreita. Para outras tiras, aplicar da mesma maneira o mesmo volume da *Solução de referência*. Aplicar um campo elétrico adequado, de forma que a banda de albumina do soro humano, aplicada na tira controle, migre, no mínimo, 30 mm. Corar a tira com negro de amido 10B SR por cinco minutos. Descolorar com uma mistura de ácido acético glacial e álcool metílico (10:90), de forma que o fundo esteja livre de coloração. Desenvolver a transparência das tiras com uma mistura de ácido acético glacial e álcool metílico (19:81). Medir a absorvância da banda em instrumentos de resposta linear e comprimento de onda de 600 nm. Calcular o resultado como a média de três medidas de cada banda.

A mobilidade da proteína não é maior que 10% da banda proteica principal.

Distribuição do tamanho molecular. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 280 nm; coluna de 600 mm de comprimento e 7,5 mm de diâmetro interno ou de 300 mm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica-gel hidrofílica (de um grau adequado para fracionamento de

proteínas globulares, com massa molecular relativa entre 10 000 e 500 000); fluxo da *Fase móvel* de 0,5 mL/minuto.

Fase móvel: dissolver 4,873 g de fosfato de sódio dibásico di-hidratado, 1,741 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado, 11,688 g de cloreto de sódio e 50 mg de azida sódica em 1000 mL de água.

Solução amostra: diluir a amostra com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até concentração apropriada ao sistema cromatográfico utilizado. A faixa de concentração de 4 g/L a 12 g/L e a injeção de 50 µg a 600 µg de proteínas é normalmente adequada.

Solução padrão: diluir o padrão de imunoglobulina humana com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até obter uma concentração em proteínas igual à da *Solução amostra*.

No cromatograma obtido com a *Solução padrão*, o pico principal corresponde ao monômero de IgG e há um pico correspondente ao dímero, com retenção relativa do pico principal de 0,85. Identificar os picos no cromatograma obtido com a *Solução amostra* por comparação com o cromatograma da *Solução padrão*. Nenhum pico com o tempo de retenção menor que o do dímero corresponde aos polímeros e agregados. A preparação a ser examinada cumpre com o teste se o cromatograma obtido com a *Solução amostra* atender aos seguintes itens:

- o tempo de retenção relativa, em relação ao pico correspondente do cromatograma obtido com a *Solução padrão*, for de $1 \pm 0,02$ para o monômero e o dímero;
- *área sob o pico*: a soma das áreas sob os picos do monômero e dímero representa, no mínimo, 85% da área total do cromatograma e a soma das áreas sob os picos dos polímeros e agregados representa, no máximo, 10% da área total do cromatograma. Essa exigência não se aplica às preparações adicionadas de albumina como estabilizante. No caso de preparações estabilizadas com albumina, realiza-se um ensaio de distribuição do tamanho molecular durante a fabricação, antes da adição do estabilizante.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Água. Determinada por um método apropriado como *Método semimicro (5.2.20.3)*, *Perda por dessecação (5.2.9.1)* ou *Espectrofotometria de absorção no infravermelho (5.2.14)*. No máximo 2%.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Pirogênios (5.5.2.1). Cumpre o teste. Injetar em cada coelho, por quilograma de massa corporal, um volume correspondente a 1 mL de imunoglobulina.

DOSEAMENTO

Anticorpo anti-D

Se a imunoglobulina normal for destinada à administração subcutânea deve cumprir com a *Determinação da imunoglobulina humana anti-D (5.5.1.15)* na imunoglobulina normal para administração intravenosa.

Anticorpo para o antígeno de superfície da hepatite B

Determinar por um *Método imunológico* (5.6) apropriado. No mínimo, 0,5 UI/g de imunoglobulina.

Anticorpo para vírus da hepatite A

Se a intenção for usar para a profilaxia da Hepatite A, deve cumprir com os seguintes requerimentos adicionais. Determinar o conteúdo de anticorpos por comparação com a preparação de um padrão de referência calibrado em UI, usando um *Método imunológico* (5.6) apropriado, específico e sensível.

A Unidade Internacional é a quantidade de atividade do padrão internacional de imunoglobulina anti-hepatite A. O equivalente na Unidade do padrão internacional está declarado pela Organização Mundial de Saúde.

O padrão de referência da imunoglobulina humana anti-hepatite A é calibrado em unidades internacionais em comparação com o padrão internacional. A potência declarada é, no mínimo, 100 UI/mL. A potência estimada não é menor que a potência declarada. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da potência estimada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 125%.

Hemaglutininas anti-A e anti-B

Realizar o teste se a imunoglobulina humana normal é para a preparação subcutânea. Proceder conforme descrito em *Determinação de títulos de hemaglutininas anti-A e anti-B* (5.5.1.9). Diluir a preparação a ser examinada na concentração de 30 g/L de imunoglobulina antes da preparação da série de diluições a serem usadas no teste. A aglutinação é inferior à diluição de 1:64.

Proteínas totais

Proceder conforme descrito em *Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl* (5.3.3.2). Diluir a amostra com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até obter uma concentração de cerca de 15 mg de proteínas em 2 mL. A um tubo de centrífuga de fundo redondo, adicionar 2 mL dessa solução, 2 mL de molibdato de sódio a 7,5% (p/v) e 2 mL de uma mistura de ácido sulfúrico isento de nitrogênio e água (1:30). Agitar e centrifugar durante cinco minutos. O líquido sobrenadante deve ser decantado possibilitando que o tubo seja enxuto sobre um papel de filtro. Calcular o teor em proteínas multiplicando a quantidade de nitrogênio por 6,25. O teor em proteínas é, no mínimo, 100 g/L e, no máximo, 180 g/L. Contém, no mínimo, 90% e, no máximo, 100% da quantidade indicada no rótulo.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Conservar a preparação líquida em recipiente de vidro incolor, ao abrigo da luz e à temperatura indicada no rótulo. Conservar a preparação liofilizada em recipiente de vidro incolor, à pressão reduzida ou sob gás inerte, ao abrigo da luz e a uma temperatura que não ultrapasse 25 °C.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. O rótulo deve declarar:

- para a preparação líquida, o volume da preparação e o conteúdo proteico em g/L;
- para a preparação liofilizada, a quantidade de proteínas no frasco;
- a via de administração;

- para a preparação liofilizada, o nome ou composição e o volume do diluente para reconstituição a ser adicionado;
- quando aplicável, que a preparação é adequada para o uso na profilaxia da infecção da hepatite A;
- quando aplicável, a atividade da imunoglobulina anti-hepatite A em UI/mL;
- nas preparações multidoses, o nome e a concentração do agente antimicrobiano.

IMUNOGLOBULINA HUMANA NORMAL PARA ADMINISTRAÇÃO POR VIA INTRAVENOSA

Immunoglobulinum humanum normale ad usum intravenosum

A imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa é uma preparação estéril, líquida ou liofilizada, contendo imunoglobulinas, principalmente a imunoglobulina G (IgG). Podem estar presentes outras proteínas. Contém anticorpos IgG de indivíduos normais. Essa monografia não se aplica às preparações produzidas por um processo que tenha por fim obter uma preparação contendo fragmentos ou quimicamente modificada. A imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa é obtida a partir de plasma que satisfaz às exigências da monografia *Plasma humano para fracionamento*. Não é adicionado ao plasma utilizado nenhum antimicrobiano.

O método de preparação compreende uma ou várias etapas que eliminam ou inativam os agentes infecciosos conhecidos. Deve-se demonstrar que os resíduos no produto final das substâncias eventualmente utilizadas nos processos destinados a inativar os vírus não têm qualquer efeito indesejável nos pacientes tratados com a imunoglobulina. A inocuidade da preparação pronta para administração por via intravenosa é demonstrada por ensaios apropriados em animais e por um estudo durante os ensaios clínicos. A imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa é preparada a partir do plasma recolhido de, no mínimo, 1000 doadores, segundo um método que possibilite obter uma preparação que:

- não transmitirá infecção;
- na concentração em imunoglobulina de 5% (p/v) contenha, pelo menos, dois anticorpos (um viral e outro bacteriano) para os quais exista um padrão internacional ou uma preparação de referência; a concentração de tais anticorpos é, pelo menos, três vezes superior à da matéria-prima inicial;
- tenha uma distribuição definida em subclasses da imunoglobulina G;
- satisfaça ao teste de *Determinação da função Fc da imunoglobulina (5.5.1.16)*.

A imunoglobulina humana normal para administração por via intravenosa é preparada, quer na forma de solução estabilizada, quer liofilizada. Pode ser adicionada de um estabilizante. Nos dois casos, a preparação é submetida a uma filtração esterilizante. Nenhum conservante antimicrobiano é adicionado durante o fracionamento do plasma e no *pool* de plasma final. A estabilidade do produto final é demonstrada por ensaios realizados durante os estudos de desenvolvimento.

IDENTIFICAÇÃO

A. Realizar na amostra ensaios de precipitação com uma gama apropriada de soros específicos de diferentes espécies de animais domésticos. É recomendável que o ensaio seja realizado com soros específicos das proteínas plasmáticas de cada espécie de animal doméstico correntemente utilizado para a preparação de produtos de origem biológica. A imunoglobulina humana normal contém proteínas de origem humana e dá resultados negativos com os soros específicos das proteínas plasmáticas de outras espécies.

B. Realizar na amostra um ensaio de imunoeletroforese segundo técnica apropriada descrita em *Métodos imunoquímicos (5.6)*. Utilizar um antissoro humano normal, comparar o soro humano normal com a amostra diluída de modo a conter 10 g/L de proteínas. O componente principal da amostra corresponde ao componente IgG do soro humano normal, podendo existir outras proteínas plasmáticas em pequenas quantidades. Se a albumina humana foi adicionada como estabilizante, pode ser visível como um composto importante.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. A preparação líquida é límpida ou ligeiramente opalescente e incolor ou amarela clara. A preparação liofilizada é um pó branco ou ligeiramente amarelado ou uma massa sólida e friável. No caso de uma preparação liofilizada, a sua reconstituição é feita segundo as indicações do rótulo, imediatamente antes de realizar a identificação e os ensaios, salvo os de solubilidade e de teor em água.

pH (5.2.19). Entre 4,0 e 7,4. Diluir a amostra com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até a concentração de 1% (p/v) em proteínas.

Osmolalidade (5.2.28). No mínimo, 240 mosmol/kg.

Solubilidade. No caso de uma amostra liofilizada, adicionar o volume do diluente indicado no rótulo. A amostra dissolve-se, completamente, em temperatura de 20 °C a 25 °C, em 30 minutos.

Composição em proteínas. Proceder conforme descrito em *Eletroforese (5.2.22)*, utilizar a técnica *Eletroforese de zona*. Utilizar tiras de gel de acetato de celulose apropriadas, como suporte, e tampão barbital pH 8,6, como solução de eletrólito.

Solução amostra: diluir a amostra com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até uma concentração de 3% (p/v) em imunoglobulina.

Solução padrão: reconstituir um padrão de referência para eletroforese de imunoglobulina humana e diluir com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até a concentração de 3% (p/v) em proteínas.

Aplicar numa tira 4 µL da *Solução amostra* em *spot* de 10 mm ou aplicar 0,4 µL por milímetro, se utilizar uma tira mais estreita. Numa outra tira aplicar, nas mesmas condições, o mesmo volume da *Solução padrão*. Aplicar um campo elétrico apropriado, de modo que a banda da albumina do soro humano normal em um eletroforetograma padrão migre, pelo menos, 30 mm. Tratar as tiras com negro de amido 10B SR durante cinco minutos e com uma mistura de 10 volumes de ácido acético glacial com 90 volumes de álcool metílico durante o tempo estritamente necessário para obter a descoloração da moldura. Provocar a transparência da moldura com uma mistura de 19 volumes de ácido acético glacial com 81 volumes de álcool metílico. Determinar a absorvância das bandas em 600 nm com auxílio de um aparelho que nesse comprimento de onda dê resposta linear no intervalo de medida. Realizar três determinações sobre cada tira e calcular a média das leituras em cada tira. No eletroforetograma da amostra, no máximo 5% das proteínas podem ter mobilidade diferente da banda principal. Esse limite não é aplicável se foi adicionada albumina à preparação, como estabilizante; no caso de preparações estabilizadas com albumina, realiza-se um ensaio de composição em proteínas durante a produção, antes de adicionar o estabilizante. O ensaio só é válido se no eletroforetograma obtido com a *Solução padrão*, a proporção de proteínas contidas na banda principal estiver compreendida entre os limites indicados na literatura que acompanha a preparação do padrão de referência.

Distribuição do tamanho molecular. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 280 nm; coluna de 300 mm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica-gel hidrófila para cromatografia. Fluxo da *Fase móvel* de 0,5 mL/minuto.

Fase móvel: dissolver 4,873 g de fosfato de sódio dibásico di-hidratado, 1,741 g de fosfato de sódio monobásico monoidratado, 11,688 g de cloreto de sódio e 50 mg de azida sódica em 1000 mL de água.

Solução amostra: diluir quantidade da amostra em solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até concentração apropriada ao sistema cromatográfico utilizado. Geralmente são convenientes uma concentração entre 4 g/L e 12 g/L e a injeção de 500 µg a 600 µg de proteína.

Solução padrão: diluir o padrão de imunoglobulina humana com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até obter uma concentração em proteínas igual à da *Solução amostra*.

Injetar a *Solução amostra* e a *Solução padrão*. No cromatograma obtido com a *Solução padrão*, o pico principal corresponde ao monômero IgG e aparece um pico correspondente ao dímero com um tempo de retenção em relação ao monômero de cerca de 0,85. Identifique os picos no cromatograma obtido com a *Solução amostra* por comparação com o cromatograma obtido com a *Solução padrão*; os picos com tempos de retenções menores que o do dímero correspondem aos polímeros e aos agregados. A amostra satisfaz ao ensaio se no cromatograma obtido com a *Solução amostra* o tempo de retenção, em relação ao pico correspondente do cromatograma obtido com a *Solução padrão*, for de $1 \pm 0,02$ para o monômero e o dímero; e se a soma do monômero e do dímero representar, no mínimo, 90,0% da área total do cromatograma e os polímeros e agregados representarem, no máximo, 3,0% da área total. Essa exigência não se aplica às preparações a que se adicionou albumina como estabilizante; no caso de preparações estabilizadas com albumina, realizar um ensaio de distribuição do tamanho molecular durante a fabricação, antes da adição do estabilizante.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Água. Determinar por um dos métodos: *Determinação da água pelo método semimicro (5.2.20.3)*, *Perda por dessecação (5.2.9.1)* ou por *Espectrofotometria de absorção no infravermelho (5.2.14)*. No máximo 2,0%.

Ativador da pré-caliceína. Proceder conforme descrito em *Determinação do título do ativador da pré-caliceína (5.5.1.11)*. No máximo, 35 UI/mL, calculado em relação a uma diluição da amostra contendo 30 g/L de imunoglobulina.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Pirogênios (5.5.2.1). Cumpre o teste. Injetar em cada coelho um volume correspondente a 1 mL de imunoglobulina, por quilograma de massa corporal.

DOSEAMENTO

Anticorpos contra o antígeno de superfície da hepatite-B

O teor da amostra em anticorpos contra o antígeno de superfície da hepatite-B, determinado por um *Método imunoquímico (5.6)* apropriado, é, no mínimo, 0,5 UI/g de imunoglobulina.

Atividade anticomplementar

Proceder conforme descrito em *Determinação da atividade anticomplementar da imunoglobulina (5.5.1.13)*. A proporção de complemento consumido é de, no máximo, 50,0% (1 CH₅₀ por miligrama de imunoglobulina).

Hemaglutininas anti-A e anti-B

Proceder conforme descrito em *Determinação de títulos de hemaglutininas anti-A e anti-B (5.5.1.9)*. Realizar os ensaios das hemaglutininas anti-A e anti-B. Se a amostra contiver um teor de imunoglobulinas superior a 30 g/L, diluir até essa concentração antes de preparar as diluições para o ensaio. As diluições a 1/64 não apresentam sinais de aglutinação.

Imunoglobulina A

Utilizar *Método imunoquímico (5.6)* apropriado. O conteúdo de imunoglobulina A não é superior ao indicado no conteúdo do rótulo.

Proteínas totais

Diluir a amostra com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até obter uma concentração de cerca de 15 mg de proteínas em 2 mL. Num tubo de centrífuga de fundo redondo introduzir 2 mL dessa solução. Adicionar 2 mL de solução de molibdato de sódio a 7,5% (p/v) e 2 mL de uma mistura de um volume de ácido sulfúrico isento de nitrogênio com 30 volumes de água. Agitar, centrifugar durante cinco minutos. O líquido sobrenadante deve ser decantado, possibilitando que o tubo seja enxuto sobre um papel de filtro. Dosar o nitrogênio no resíduo pelo método de *Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (5.3.3.2)*. Calcular o teor em proteínas multiplicando a quantidade de nitrogênio por 6,25. A preparação contém, no mínimo, 30 g/L e entre 90,0% e 110,0% da quantidade de proteína indicada no rótulo.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Conservar a preparação líquida em recipiente de vidro incolor, ao abrigo da luz e à temperatura indicada no rótulo. Conservar a preparação liofilizada em recipiente de vidro incolor, a pressão reduzida ou sob gás inerte, ao abrigo da luz e a uma temperatura que não ultrapasse 25 °C.

ROTULAGEM

No rótulo indica-se:

- no caso de um produto líquido, o volume da preparação no recipiente e o teor em proteínas expresso em gramas por litro;
- no caso de um produto liofilizado, a quantidade de proteínas no frasco;
- a quantidade de imunoglobulina no frasco;
- a via de administração;
- as condições de conservação;
- o prazo de validade;
- no caso do produto liofilizado, o nome ou a composição e o volume do diluente;
- a distribuição das subclasses da imunoglobulina G na preparação;
- nos casos apropriados, a quantidade de albumina adicionada como estabilizante;
- o teor máximo de imunoglobulina A.

MISTURAS DE PLASMA HUMANO EXCEDENTE TRATADO POR INATIVAÇÃO VIRAL

Plasma humanum collectum excederem deinde conditum ad viros exstinguendos

Preparação congelada ou liofilizada, estéril, apirogênica, obtida a partir de plasma humano excedente proveniente de doadores do mesmo grupo sanguíneo ABO e Rh(Du). A preparação é descongelada ou reconstituída antes de seu uso, de modo a obter uma solução injetável. O plasma humano utilizado deve satisfazer às exigências da monografia *Plasma humano para fracionamento*.

As unidades de plasma destinadas à produção são congeladas a uma temperatura igual ou inferior a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ dentro das primeiras seis horas seguintes à separação das frações celulares sanguíneas e, no máximo, nas 24 horas que se seguem à coleta. A mistura é preparada a partir de unidades de plasma pertencentes ao mesmo grupo sanguíneo ABO e Rh(Du).

A mistura de plasma é examinada a partir de métodos de sensibilidade e especificidade apropriados, quanto à presença do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), de anticorpos contra o vírus da hepatite C e de anticorpos contra o HIV. Nesses ensaios, a mistura do plasma deve fornecer resultados negativos.

A mistura de plasma também deve ser submetida à pesquisa do RNA do vírus da hepatite C, conforme descrito em *Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (5.5.1.10)*, devidamente validada. O ensaio inclui um padrão positivo com 100 UI de RNA do vírus da hepatite C por mililitro e, para identificar a presença eventual de inibidores, um padrão interno preparado por adição de um marcador apropriado à amostra da mistura de plasma. O ensaio só é válido se o padrão positivo for reativo ou se o resultado obtido com o padrão interno não indicar a presença de inibidores. A mistura satisfaz ao ensaio se não for reativa para o RNA do vírus da hepatite C.

A mistura de plasma também deve ser submetida à pesquisa do DNA do vírus B19, conforme descrito em *Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (5.5.1.10)*, devidamente validada. O *pool* deve conter, no máximo, 10 UI/ μL . O ensaio inclui um controle positivo com 10 UI de DNA por microlitro do vírus B19 e, para identificar a presença eventual de inibidores, um padrão interno preparado por adição de um marcador apropriado à amostra da mistura de plasma. O ensaio só é válido se o padrão positivo for reativo ou se o resultado obtido com o padrão interno não indicar a presença de inibidores.

O método de preparação é realizado de modo a evitar a ativação de qualquer fator de coagulação e, assim, limitar o seu potencial de ação trombogênico. Compreende uma ou várias etapas para as quais se tenha demonstrado a eliminação ou inativação de agentes infecciosos conhecidos. No caso de serem utilizadas substâncias para inativação viral durante a produção, o processo de purificação subsequente deve ser validado, de modo a demonstrar que a concentração destas substâncias se encontra em um nível apropriado e que os eventuais resíduos não comprometem a inocuidade da preparação.

O método típico utilizado para a inativação de vírus envelopados é o processo solvente-detergente, que consiste no tratamento com uma mistura de fosfato de tributíla e de octoxinol 10; em seguida, esses reagentes são removidos por extração em fase oleosa ou sólida, de modo a que o teor residual no produto final seja inferior a $2\text{ }\mu\text{g/mL}$, para o fosfato de tributíla e a $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ para o octoxinol 10. Não deve ser adicionado nenhum conservante antimicrobiano.

A solução é filtrada em membrana esterilizante, distribuída assepticamente nos recipientes finais e imediatamente congelada. Os recipientes finais são compostos por material plástico, satisfazendo às

exigências para *Recipientes de plástico (6.2)*; ou vidro, satisfazendo às exigências para os *Recipientes de vidro (6.1)*. Pode, em seguida, ser liofilizada.

IDENTIFICAÇÃO

Reconstituir ou descongelar a amostra como indicado no rótulo, imediatamente antes de realizar a identificação, testes e ensaios.

A. Examinar a amostra por eletroforese, comparando com o plasma humano normal. Os eletroforetogramas apresentam as mesmas bandas.

B. Realizar ensaios de precipitação a partir de uma gama apropriada de soros específicos de espécies de animais domésticos. É aconselhável que o ensaio seja realizado com soros específicos de proteínas plasmáticas de cada uma das espécies domésticas normalmente utilizadas no país para a preparação de produtos de origem biológica. A amostra contém proteínas de origem humana e dá resultado negativo para as proteínas específicas plasmáticas de outras espécies.

C. A mistura satisfaz a *Determinação do título de hemaglutininas anti-A e anti-B* (ver *Doseamento*).

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Após o seu descongelamento, a preparação apresenta-se como líquido límpido ou ligeiramente opalescente, isenta de partículas sólidas e gelatinosas. A preparação liofilizada apresenta-se como pó branco ou amarelo claro ou sólido friável.

pH (5.2.19). 6,5 a 7,6.

Osmolalidade (5.2.28). No mínimo, 240 mosmol/kg.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Água. Determinar por um dos métodos a seguir: *Determinação da água pelo método semimicro (5.2.20.3)*, *Determinação da perda por dessecação (5.2.9.1)* ou por *Espectrofotometria de absorção no infravermelho (5.2.14)*. O teor está compreendido dentro dos limites aprovados pelas autoridades competentes.

Citrato. No máximo, 25 mmol/L. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 215 nm; coluna de 300 mm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, empacotada com resina trocadora de cátions (9 µm); fluxo da *Fase móvel* de 0,5 mL/minuto.

Fase móvel: solução de ácido sulfúrico a 0,051% (p/v).

Solução amostra: diluir a amostra com um volume igual de uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v). Filtrar em filtro de porosidade 0,45 µm.

Solução padrão: dissolver 0,3 g de citrato de sódio em água e diluir a 100 mL com o mesmo solvente.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 µL da *Solução padrão* e da *Solução amostra*. O tempo de retenção do citrato é cerca de 10 minutos. Tempo de equilíbrio da coluna: 15 minutos.

Cálcio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Determinar no comprimento de onda de 622 nm. No máximo, 5 mmol/L.

Potássio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de emissão atômica (5.2.13.2)*. Determinar no comprimento de onda de 766,5 nm. No máximo, 5 mmol/L.

Sódio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de emissão atômica (5.2.13.2)*. Determinar no comprimento de onda de 589 nm. No máximo, 200 mmol/L.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Pirogênios (5.5.2.1). Cumpre o teste. Injetar em cada coelho 3 mL da amostra por quilograma de massa corporal.

DOSEAMENTO

Anticorpos contra eritrócitos irregulares.

Quando examinada por exame indireto de antiglobulinas, a amostra não diluída não revela sinais de presença de anticorpos contra eritrócitos irregulares.

Anticorpos contra o vírus da hepatite A.

No mínimo 2 UI/mL, determinado de acordo com *Método Imunoquímico (5.6)* apropriado. O padrão de imunoglobulina humana da hepatite A é adequado para uso como uma preparação de referência.

Hemaglutininas anti-A e anti-B.

Proceder conforme descrito em *Determinação de títulos de hemaglutininas anti-A e anti-B (5.5.1.9)*. A presença das hemaglutininas (anti-A ou anti-B) corresponde ao grupo sanguíneo indicado no rótulo.

Fatores de coagulação ativados.

Proceder conforme descrito em *Determinação de fatores da coagulação ativados (5.5.1.8)*. Realizar o ensaio com 0,1 mL da amostra em vez de diluições a 1/10 e 1/100. O tempo de coagulação no tubo que contém a amostra é, no mínimo, 150 segundos. Cumpre o teste.

Fator V.

Com tampão de imidazol pH 7,4, preparar, de preferência em duplicata, três diluições a 1/10 e a 1/40 da amostra. Para cada diluição proceder do seguinte modo: misturar 0,1 mL de substrato de plasma deficiente em Fator V, 0,1 mL da diluição da amostra, 0,1 mL de reagente de tromboplastina e 0,1 mL de solução de cloreto de cálcio a 0,35% (p/v). Registrar o tempo de coagulação, ou seja, o intervalo entre o momento da adição da solução de cloreto de cálcio e os primeiros sinais de formação de fibrina. Observar mediante aparelho apropriado. Determinar, em duplicata e nas mesmas

condições, os tempos de coagulação de quatro diluições entre 1/10 e 1/80 de plasma humano normal no tampão de imidazol pH 7,4. Uma unidade de Fator V corresponde à atividade de 1 mL de plasma humano normal. O plasma humano normal é preparado a partir de mistura de unidades de plasma provenientes de pelo menos 30 doadores e é conservado a uma temperatura igual ou inferior a -30 °C. Verificar a validade do ensaio e calcular a atividade da amostra por meio de *Procedimentos estatísticos aplicáveis aos ensaios biológicos (8.2)*. A atividade determinada é, no mínimo, 0,5 unidades/mL. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 120%.

Fator VIII.

Proceder conforme descrito em *Determinação do fator VIII de coagulação humana liofilizado (5.5.1.7)* utilizando um plasma padrão calibrado em relação ao padrão internacional do fator VIII da coagulação sanguínea humana. A atividade determinada não é inferior a 0,5 UI/mL. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 120%.

Proteínas totais.

Diluir a amostra em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v), de modo a obter uma solução que contenha cerca de 15 mg de proteínas em 2 mL. Num tubo de centrífuga de fundo redondo, introduzir 2 mL dessa solução. Adicionar 2 mL de uma solução de molibdato de sódio a 7,5% (p/v) e 2 mL de uma mistura de ácido sulfúrico 1 volume, isento de nitrogênio, e 30 volumes de água. Agitar, centrifugar durante cinco minutos, decantar o líquido sobrenadante e deixar escoar com o tubo invertido sobre um papel de filtro. Realizar o doseamento do nitrogênio no resíduo por meio do método de digestão com ácido sulfúrico, conforme descrito em *Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (5.3.3.2)* e calcular o teor de proteínas multiplicando o resultado por 6,25. O teor em proteínas totais é, no mínimo, 45 g/L.

ROTULAGEM

O rótulo deve indicar o grupo sanguíneo ABO e Rh(Du) e o método utilizado para a inativação viral. Observar a legislação vigente.

MISTURAS DE PLASMA HUMANO TRATADO POR INATIVAÇÃO VIRAL

Plasma humanum collectum deinde conditum ad viros exstinguendos

Preparação congelada ou liofilizada, estéril, apirogênica, obtida a partir de plasma humano proveniente de doadores do mesmo grupo sanguíneo ABO e Rh(Du). A preparação é descongelada ou reconstituída antes de seu uso, de modo a obter uma solução injetável. O plasma humano utilizado deve satisfazer às exigências da monografia *Plasma humano para fracionamento*.

As unidades de plasma destinadas à produção são congeladas a uma temperatura igual ou inferior a -30 °C dentro das primeiras seis horas seguintes à separação das frações celulares sanguíneas e, no máximo, nas 24 horas que se seguem à coleta. A mistura é preparada a partir de unidades de plasma pertencentes ao mesmo grupo sanguíneo ABO e Rh(Du).

A mistura de plasma é examinada a partir de métodos de sensibilidade e especificidade apropriados quanto à presença do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg), de anticorpos contra o vírus da hepatite C e de anticorpos contra o HIV. Nesses ensaios, a mistura do plasma deve fornecer resultados negativos.

A mistura de plasma também deve ser submetida à pesquisa do RNA do vírus da hepatite C de acordo com a monografia *Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (5.5.1.10)*, devidamente validada. O ensaio inclui um padrão positivo com 100 UI de RNA do vírus da hepatite C por mililitro e, para identificar a presença eventual de inibidores, um padrão interno preparado por adição de um marcador apropriado à amostra da mistura de plasma. O ensaio só é válido se o padrão positivo for reativo ou se o resultado obtido com o padrão interno não indicar a presença de inibidores. A mistura satisfaz ao ensaio se não for reativa para o RNA do vírus da hepatite C.

A mistura de plasma também deve ser submetida à pesquisa do DNA do vírus B19 de acordo com a monografia *Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (5.5.1.10)*, devidamente validada. O *pool* deve conter no máximo 10 UI/μL. O ensaio inclui um controle positivo com 10 UI de DNA por microlitro do vírus B19, e para identificar a presença eventual de inibidores, um padrão interno preparado por adição de um marcador apropriado à amostra da mistura de plasma. O ensaio só é válido se o padrão positivo for reativo ou se o resultado obtido com o padrão interno não indicar a presença de inibidores.

O método de preparação é realizado de modo a evitar a ativação de qualquer fator de coagulação e, assim, limitar o seu potencial de ação trombogênico. Compreende uma ou várias etapas para as quais se tenha demonstrada a eliminação ou inativação de agentes infecciosos conhecidos. No caso de serem utilizadas substâncias para inativação viral durante a produção, o processo de purificação subsequente deve ser validado, de modo a demonstrar que a concentração destas substâncias se encontra em um nível apropriado e que os eventuais resíduos não comprometem a inocuidade da preparação.

O método típico utilizado para a inativação de vírus envelopados é o processo solvente-detergente, que consiste no tratamento com uma mistura de fosfato de tributílica e de octoxinol 10; em seguida, esses reagentes são removidos por extração em fase oleosa ou sólida, de modo a que o teor residual no produto final seja inferior a 2 μg/mL para o fosfato de tributílica e a 5 μg/mL para o octoxinol 10. Não deve ser adicionado nenhum conservante antimicrobiano.

A solução é filtrada em membrana esterilizante, distribuída asépticamente nos recipientes finais e imediatamente congelada. Os recipientes finais são compostos por material plástico, satisfazendo às

exigências para *Recipientes de plástico (6.2)*; ou vidro, satisfazendo às exigências para os *Recipientes de vidro (6.1)*. Pode, em seguida, ser liofilizada.

IDENTIFICAÇÃO

Reconstituir ou descongelar a amostra como indicado no rótulo, imediatamente antes de realizar a identificação, testes e ensaios.

A. Examinar a amostra por eletroforese, comparando com o plasma humano normal. Os eletroforetogramas apresentam as mesmas bandas.

B. Realizar ensaios de precipitação a partir de uma gama apropriada de soros específicos de espécies de animais domésticos. É aconselhável que o ensaio seja realizado com soros específicos de proteínas plasmáticas de cada uma das espécies domésticas normalmente utilizadas no país para a preparação de produtos de origem biológica. A amostra contém proteínas de origem humana e dá resultado negativo para as proteínas específicas plasmáticas de outras espécies.

C. A mistura satisfaz a *Determinação do título de hemaglutininas anti-A e anti-B* (ver *Doseamento*).

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Após o seu descongelamento, a solução apresenta-se como líquido límpido ou ligeiramente opalescente, isenta de partículas sólidas e gelatinosas. A preparação liofilizada apresenta-se como pó branco ou amarelo claro ou sólido friável.

pH (5.2.19). 6,5 a 7,6.

Osmolalidade (5.2.28). No mínimo, 240 mosmol/kg.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Água. Determinar por um dos métodos a seguir: *Determinação da água pelo método semimicro (5.2.20.3)*, *Determinação da perda por dessecação (5.2.9.1)* ou por *Espectrofotometria de absorção no infravermelho (5.2.14)*. O teor está compreendido dentro dos limites aprovados pelas autoridades competentes.

Citrato. No máximo, 25 mmol/L. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 215 nm; coluna de 300 mm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, empacotada com resina trocadora de cátions (9 µm); fluxo da *Fase móvel* de 0,5 mL/minuto.

Fase móvel: solução de ácido sulfúrico a 0,051% (p/v).

Solução amostra: diluir a amostra com um volume igual de uma solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v). Filtrar em filtro de porosidade 0,45 µm.

Solução padrão: dissolver 0,3 g de citrato de sódio em água e diluir a 100 mL com o mesmo solvente.

Procedimento: injetar, separadamente, 10 µL da Solução padrão e da Solução amostra. O tempo de retenção do citrato é cerca de 10 minutos. O tempo de equilíbrio da coluna é cerca de 15 minutos.

Cálcio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Determinar no comprimento de onda de 622 nm. No máximo, 5 mmol/L.

Potássio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de emissão atômica (5.2.13.2)*. Determinar no comprimento de onda de 766,5 nm. No máximo, 5 mmol/L.

Sódio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de emissão atômica (5.2.13.2)*. Determinar no comprimento de onda de 589 nm. No máximo, 200 mmol/L.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Pirogênios (5.5.2.1). Injetar em cada coelho 3 mL da amostra por quilograma de massa corporal. Cumpre o teste.

DOSEAMENTO

Anticorpos contra eritrócitos irregulares.

Quando examinada por exame indireto de antiglobulinas, a amostra não diluída não revela sinais de presença de anticorpos contra eritrócitos irregulares.

Anticorpos contra o vírus da hepatite A.

No mínimo 2 UI/mL, determinado de acordo com o *Método imunológico (5.6)* apropriado. O padrão de imunoglobulina humana da hepatite A é adequado para uso como uma preparação de referência.

Hemaglutininas anti-A e anti-B.

Proceder conforme descrito em *Determinação de títulos de hemaglutininas anti-A e anti-B (5.5.1.9)*. A presença das hemaglutininas (anti-A ou anti-B) corresponde ao grupo sanguíneo indicado no rótulo.

Fatores de coagulação ativados.

Proceder conforme descrito em *Determinação de fatores da coagulação ativados (5.5.1.8)*. Realizar o ensaio com 0,1 mL da amostra em vez de diluições a 1/10 e 1/100. O tempo de coagulação no tubo que contém a amostra é, no mínimo, 150 segundos. Cumpre o teste.

Fator V.

Com tampão imidazol pH 7,4, preparar, de preferência em duplicata, três diluições a 1/10 e a 1/40 da amostra. Para cada diluição proceder do seguinte modo: misturar 0,1 mL de substrato de plasma deficiente em fator V, 0,1 mL da diluição da amostra, 0,1 mL de reagente de tromboplastina e 0,1 mL de solução de cloreto de cálcio a 0,35% (p/v). Registrar o tempo de coagulação, ou seja, o intervalo entre o momento da adição da solução de cloreto de cálcio e os primeiros sinais de formação de fibrina. Observar mediante aparelho apropriado. Determinar, em duplicata e nas mesmas condições,

os tempos de coagulação de quatro diluições entre 1/10 e 1/80 de plasma humano normal no tampão imidazol pH 7,4. Uma unidade de Fator V corresponde à atividade de 1 mL de plasma humano normal. O plasma humano normal é preparado a partir de mistura de unidades de plasma provenientes de pelo menos 30 doadores e é conservado a uma temperatura igual ou inferior a -30 °C. Verificar a validade do ensaio e calcular a atividade da amostra por meio de *Procedimentos estatísticos aplicáveis aos ensaios biológicos (8.2)*. A atividade determinada é, no mínimo, 0,5 unidades/mL. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 120%.

Fator VIII.

Proceder conforme descrito em *Determinação do fator VIII de coagulação humana liofilizado (5.5.1.7)* utilizando um plasma padrão calibrado em relação ao padrão internacional do fator VIII da coagulação sanguínea humana. A atividade determinada é, no mínimo, 0,5 UI/mL. O intervalo de confiança ($P = 0,95$) da atividade determinada é, no mínimo, 80% e, no máximo, 120%.

Proteínas totais.

Diluir a amostra em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v), de modo a obter uma solução que contenha cerca de 15 mg de proteínas em 2 mL. Num tubo de centrífuga de fundo redondo, introduzir 2 mL dessa solução. Adicionar 2 mL de uma solução de molibdato de sódio a 7,5% (p/v) e 2 mL de uma mistura de ácido sulfúrico 1 volume, isento de nitrogênio, e 30 volumes de água. Agitar, centrifugar durante cinco minutos, decantar o líquido sobrenadante e deixar escoar com o tubo invertido sobre um papel de filtro. Realizar o doseamento do nitrogênio no resíduo por meio do método de digestão com ácido sulfúrico, conforme descrito em *Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (5.3.3.2)*, e calcular o teor de proteínas multiplicando o resultado por 6,25. O teor em proteínas totais é, no mínimo, 45 g/L.

ROTULAGEM

O rótulo deve indicar o grupo sanguíneo ABO e Rh(Du) e o método utilizado para a inativação viral. Observar a legislação vigente.

PLASMA HUMANO PARA FRACIONAMENTO

Plasma humanum ad separationem

Plasma humano para fracionamento é a parte líquida remanescente do sangue total, após separação das frações celulares sanguíneas, utilizando sistema fechado de coleta de sangue apropriado, que cumpra os requisitos exigidos para os recipientes plásticos utilizados na coleta do sangue humano, contendo uma solução anticoagulante conservadora e preservadora ou separada por filtração contínua ou por centrifugação do sangue anticoagulado no procedimento de aférese, para obtenção de produtos derivados do plasma humano.

DOADORES

Somente o plasma de um doador saudável e cuidadosamente selecionado que, após exames médicos, testes sanguíneos laboratoriais e estudo de sua história médica, esteja isento de agentes infecciosos transmissíveis pelo plasma pode ser aceito para coleta de seu plasma para fracionamento. Reportar-se à legislação vigente para produtos hemoterápicos.

Imunização dos doadores. Plasma proveniente de imunização deliberada de doadores para a obtenção de gamaglobulinas hiperimunes pode ser utilizado para fracionamento, quando quantidades suficientes desse material não puderem ser obtidas de doadores naturalmente imunizados. Recomenda-se que a imunização dos doadores seja realizada em conformidade com os procedimentos adotados pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Registro. Dados e informações sobre os doadores e doações realizadas devem ser mantidos, de forma que possibilite a confidencialidade da identidade do doador, a origem de cada doação no *pool* de plasma e a rastreabilidade correspondente aos testes laboratoriais.

Testes laboratoriais. Testes laboratoriais devidamente validados são realizados a cada doação, para detectar marcadores virais e outros agentes infecciosos, como os descritos a seguir.

- A. Anticorpos contra o vírus tipo 1 e tipo 2 da imunodeficiência humana (anti-HIV-1 e anti-HIV-2).
- B. Antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg).
- C. Anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV).

Os métodos analíticos utilizados devem apresentar sensibilidade e especificidade adequadas. Se um resultado positivo repetido for confirmado em qualquer um dos testes a doação deve ser rejeitada.

UNIDADES INDIVIDUAIS DE PLASMA

O plasma deve ser preparado por um método que remova completamente, tanto quanto possível, as demais frações celulares, por centrifugação do sangue total. Deve ser obtido a partir do sangue total ou por aférese. O plasma deve ser separado de suas células por um método desenvolvido para prevenir a introdução de micro-organismos. Nenhum agente antibacteriano ou antifúngico pode ser adicionado ao plasma. Os sistemas de envase para coleta e processamento do sangue humano devem satisfazer às exigências para os sistemas fechados de coleta de sangue humano, devendo prevenir qualquer possibilidade de contaminação.

Se duas ou mais unidades forem misturadas antes do congelamento, a operação deve ser feita utilizando-se conectores estéreis ou sob condições assépticas, com recipientes que não tenham sido previamente utilizados.

Quando obtido por plasmáférese ou sangue total (após a separação dos elementos celulares), o plasma pode ser destinado à recuperação de proteínas lábeis, quando congelado dentro das 24 horas desde a coleta, com resfriamento rápido, sob condições validadas, para assegurar que a temperatura de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou inferior seja atingida no interior de cada unidade de plasma dentro de 12 horas do início da inserção no congelador.

Quando obtido por plasmáférese, o plasma destinado somente para a recuperação de proteínas não-lábeis deve ser congelado por resfriamento rápido em câmara fria a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou inferior, tão logo quanto possível, não ultrapassando 24 horas após a coleta.

Quando obtido por sangue total, separado dos elementos celulares, o plasma destinado somente para a recuperação de proteínas não-lábeis deve ser congelado por resfriamento rápido, em câmara fria a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou inferior, tão logo quanto possível, não ultrapassando 72 horas após a coleta. Não é necessário determinar o teor de proteínas totais e fator VIII, descritos em *Doseamento*, em cada unidade de plasma. Essas determinações são parâmetros das boas práticas de fabricação, sendo o teste *fator VIII* relevante para uso nas preparações de concentrados de proteínas lábeis.

O conteúdo proteico total em cada unidade de plasma depende do conteúdo de proteínas no soro do doador e do grau de diluição inerente ao procedimento de doação.

Quando o plasma é obtido de um doador selecionado e utilizando uma proporção adequada da solução anticoagulante conservadora e preservadora, o conteúdo proteico total obtido se encontra no limite mínimo de 50 g/L. Se o volume de sangue ou plasma coletado junto com a solução anticoagulante conservadora e preservadora for menor do que o estabelecido, o plasma resultante não é necessariamente inadequado para o fracionamento. O objetivo pretendido com as boas práticas de fabricação deve ser atingir o limite prescrito para todas as doações normais.

A preservação do fator VIII da coagulação humana depende do procedimento da coleta e, subsequentemente, do manuseio da unidade de plasma. Com boas práticas, 0,7 UI/mL pode ser usualmente alcançada nas unidades de plasma, no entanto unidades de plasma com atividades de fator VIII inferior ainda podem ser adequadas para a produção de concentrados de fatores de coagulação. O objetivo pretendido com as boas práticas de fabricação é preservar, no máximo possível, as proteínas lábeis.

MISTURAS DE PLASMA (POOL DE PLASMA)

Durante a fabricação de derivados plasmáticos, a primeira mistura do *pool* de plasma (por exemplo, depois da remoção do crioprecipitado) deve ser testada para o antígeno de superfície do vírus B da hepatite (HBsAg) e para anticorpos contra HIV utilizando métodos de sensibilidade e especificidade adequados. Os resultados devem ser negativos em todos os ensaios.

Também deve ser realizado um ensaio para RNA do vírus da hepatite C, utilizando uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos validada. No ensaio incluem-se um controle positivo com 100 UI/mL de RNA do vírus da hepatite C e, para testar inibidores, um controle interno preparado pela adição do marcador adequado a uma amostra de pool de plasma. O ensaio não é válido se o controle positivo não for reativo ou se o resultado obtido indicar a presença de inibidores.

A mistura de plasma satisfaz o ensaio, se não for reativa para o RNA do vírus da hepatite C. O teste deve ser realizado comparando com um padrão internacional reconhecido pela OMS.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Antes do congelamento, o plasma para fracionamento, um líquido claro ou levemente turvo, sem sinais de hemólise visíveis, pode variar em cor, de um tom levemente amarelo a esverdeado.

DOSEAMENTO

Fator VIII:C

Proceder conforme descrito em *Determinação do fator VIII da coagulação sanguínea humana liofilizado (5.5.1.7)*. Realizar o teste utilizando um *pool* de plasma com, no mínimo, 10 unidades da amostra de plasma. Se necessário, descongelar as amostras a serem examinadas a uma temperatura que não exceda a 37 °C. Utilizar um plasma de referência calibrado contra um *Padrão Internacional de fator VIII*. A atividade não é menor que 0,7 UI/mL.

Proteínas totais

Proceder conforme descrito em *Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (5.3.3.2)*. Realizar o teste utilizando uma mistura com, no mínimo, 10 unidades de plasma. Diluir a mistura de plasma com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v), de forma a obter uma solução contendo cerca de 15 mg de proteína em 2 mL. A um tubo de centrífuga de fundo arredondado, adicionar 2 mL dessa solução, 2 mL de solução de molibdato de sódio a 7,5% (p/v) e 2 mL de mistura de ácido sulfúrico livre de nitrogênio e água (1:30). Agitar, centrifugar durante cinco minutos, decantar o líquido sobrenadante e inverter o tubo, possibilitando que o seu conteúdo escorra sobre papel de filtro. Determinar o teor de nitrogênio no resíduo após mineralização e calcular o teor de proteínas, multiplicando a quantidade de nitrogênio por 6,25. O teor total de proteínas é, no mínimo, 50 g/L.

ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

O plasma congelado deve ser armazenado e transportado em condições desenvolvidas para manter a temperatura a -20 °C ou inferior; por razões acidentais, a temperatura de armazenamento pode subir acima de -20 °C em uma ou mais ocasiões durante o armazenamento e transporte, todavia, o plasma é aceitável para fracionamento se todas as condições abaixo forem preenchidas:

- o período de tempo total durante o qual a temperatura exceder a -20 °C deve ser, no máximo, 72 horas;
- a temperatura não deve exceder -15 °C em mais de uma ocasião;
- em nenhuma ocasião a temperatura pode exceder -5 °C.

ROTULAGEM

Observar a legislação vigente. O rótulo deve possibilitar que cada unidade individual seja rastreável ao seu doador específico.

SOLUÇÃO DE ALBUMINA HUMANA

Albumini humani solutio

Solução de albumina humana é uma solução proteica, estéril e apirogênica obtida do plasma humano que está de acordo com as exigências da monografia *Plasma humano para fracionamento*.

A obtenção da albumina é realizada sob condições controladas particularmente no que tange ao pH, à força iônica e à temperatura, de modo que a concentração em albumina no produto final seja, no mínimo, 96% do teor total de proteínas.

A solução de albumina humana é preparada como uma solução concentrada contendo 150 g/L a 250 g/L de proteína total ou como uma solução isotônica contendo 35 g/L a 50 g/L de proteína total. Pode ser acrescentado contra os efeitos do calor um estabilizador como o caprilato de sódio (octanoato de sódio) ou *N*-acetiltryptofano ou uma combinação desses dois, a uma concentração adequada. Se forem acrescentadas substâncias para inativação viral na etapa de produção, um procedimento de purificação deve ser validado de modo a demonstrar que as concentrações dessas substâncias foram reduzidas a um nível aceitável, e que tais resíduos não comprometem a segurança da preparação.

Nenhum conservante antimicrobiano é adicionado em qualquer fase da preparação. A solução final é submetida a uma filtração esterilizante e é distribuída asépticamente em recipientes estéreis que são, então, fechados de modo a evitar a contaminação. A solução no seu recipiente final é aquecida a $(60,0 \pm 1,0)$ °C e mantida a essa temperatura por tempo não inferior a 10 horas. Os recipientes são então incubados à temperatura entre 30 °C e 32 °C durante pelo menos 14 dias ou entre 20 °C e 25 °C durante pelo menos quatro semanas e analisados visualmente para evidenciar uma possível contaminação microbiana.

IDENTIFICAÇÃO

A. Fazer ensaios de precipitação utilizando soros antialbumina de diferentes espécies. Recomenda-se que o ensaio seja efetuado com soros específicos para albumina humana de cada espécie de animal doméstico habitualmente utilizado no país para a preparação de produtos de origem biológica. A solução contém proteínas humanas e dá resultados negativos com os soros antialbumina de outras espécies.

B. Fazer um ensaio utilizando um dos *Métodos imunoquímicos (5.6)*, segundo técnica apropriada. Com o auxílio de um soro humano normal, comparar um soro normal com a amostra, após diluição prévia de ambos, de modo a conterem 10 g/L de proteínas. O componente principal da amostra corresponde ao componente principal do soro humano normal, podendo existir outras proteínas plasmáticas em pequenas quantidades.

CARACTERÍSTICAS

Aspecto. Líquido límpido, ligeiramente viscoso, geralmente incolor, amarelo acastanhado ou esverdeado.

Determinação de volume (5.1.2). Cumpre o teste.

pH (5.2.19). 6,7 a 7,3. Diluir a preparação a ser examinada com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) para obter uma solução contendo 10 g/L de proteína.

Composição de proteínas. Proceder conforme descrito em *Eletroforese (5.2.22)*, utilizando, como suporte, tiras de gel de acetato de celulose ou gel de agarose e, como solução de eletrólito, o tampão de barbital pH 8,6.

Nota: se a tira de acetato de celulose for a escolhida para a corrida, o método descrito abaixo pode ser utilizado. Se géis de agarose são utilizados, é porque eles fazem parte de um sistema automatizado de eletroforese e as instruções do fabricante deverão ser seguidas em seu lugar.

Solução amostra: diluir a amostra em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) de modo a obter uma concentração de 20 g/L em proteínas.

Solução padrão: diluir um padrão de albumina humana para eletroforese com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até obter uma concentração de 20 g/L em proteínas.

Aplicar, em uma tira, 2,5 µL da *Solução amostra* em traços de 10 mm, ou depositar 0,25 µL por milímetro se for utilizada uma tira mais estreita. Aplicar nas mesmas condições um volume igual da *Solução padrão* em uma outra tira. Aplicar um campo elétrico apropriado de modo que o composto que se desloca mais rapidamente migre pelo menos 30 mm. Tratar as tiras com negro de amido 10B SR durante cinco minutos e em seguida com uma mistura de 10 volumes de ácido acético glacial e 90 volumes de álcool metílico durante o tempo estritamente necessário para obter a descoloração do suporte. Provocar a transparência do suporte com uma mistura de 19 volumes de ácido acético glacial e 81 volumes de álcool metílico. Determinar a absorvância das bandas em 600 nm com auxílio de um aparelho que, nesse comprimento de onda, dê uma resposta linear no intervalo de medida. Realizar três determinações sobre cada tira e calcular a média das leituras para cada tira. No eletroforetograma da solução amostra, 5% das proteínas, quando muito, podem ter uma mobilidade diferente da banda principal. O ensaio só é válido se, no eletroforetograma obtido com a solução de referência, a proporção de proteínas contidas na banda principal estiver compreendida entre os limites estabelecidos pelo fabricante que acompanha a preparação de referência.

Distribuição do tamanho molecular. Proceder conforme descrito em *Cromatografia a líquido de alta eficiência (5.2.17.4)*. Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 280 nm; coluna de 600 mm de comprimento e 7,5 mm de diâmetro interno ou 300 mm de comprimento e 7,8 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica-gel hidrofílica (adequada ao fracionamento de proteínas globulares com relação massa moleculares na faixa de 10 000 a 500 000); fluxo da *Fase móvel* de 0,5 mL/minuto.

Fase móvel: solução contendo 4,873 g de fosfato de sódio dibásico di-hidratado, 1,741 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado, 11,688 g de cloreto de sódio e 50 mg de azida sódica, por litro de água ultrapurificada.

Solução amostra: diluir a amostra em uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até uma concentração apropriada ao sistema cromatográfico utilizado. Uma concentração compreendida entre 4 g/L e 12 g/L e a injeção de 50 µg a 600 µg de proteínas são geralmente adequadas.

O tempo de retenção será definido pelo equipamento e o tamanho da coluna utilizada, devendo ser desconsiderado o pico de estabilização. O pico produzido pela albumina deve ser simétrico e ser igual ou superior a 95% da área total do cromatograma. Após um breve espaço vazio, deverão surgir os picos produzidos pela presença de polímeros e agregados. A área deste pico dividida por dois deve ser, no máximo, 5% da área total do cromatograma.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Alumínio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de absorção atômica (5.2.13.1)*. Empregar as seguintes condições: utilizar um forno de grafite como gerador de átomos, chama entre leituras, comprimento de onda de 309,3 nm ou outro adequado, largura da fenda de 0,5 nm, tubo piroliticamente revestido, com plataforma integrada e prioridade de correção desligado. Preparar as soluções como descrito a seguir.

Nota: utilizar recipientes de matéria plástica para a preparação das soluções e equipamentos plásticos, sempre que possível. Lavar a aparelhagem com ácido nítrico a 200 g/L antes da utilização.

Solução amostra: utilizar a amostra a ser analisada, diluída se necessário.

Solução de validação: utilizar um padrão internacional de albumina para validação do ensaio de alumínio.

Soluções de referência: preparar pelo menos três soluções de referência em uma escala que mede a concentração de alumínio esperada na preparação a ser examinada, por exemplo, diluindo a *Solução padrão de alumínio (10 ppm de alumínio Al)* com solução de octoxinol 10 a 1,0 g/L.

Solução de monitoramento: adicionar *Solução padrão de alumínio (10 ppm alumínio Al)* ou um material de referência certificado para a adequada solução em uma quantidade suficiente para aumentar a concentração de alumínio para 20 µg/L.

Solução branco: solução de octoxinol 10 a 1,0 g/L.

As condições de funcionamento encontradas na **Tabela 1** são citadas como um exemplo de condições adequadas encontradas para determinado aparelho e podem ser modificadas para obter melhores resultados.

Tabela 1 – Condições adequadas de funcionamento encontradas, citadas como exemplo.

<i>Passo</i>	<i>Temperatura final (°C)</i>	<i>Tempo de deslocamento (s)</i>	<i>Tempo decorrido (s)</i>	<i>Gás</i>
1	120	10	80	Argônio
2	200	5	20	Argônio
3	650	5	10	Argônio
4	1300	5	10	Argônio
5	1300	1	10	Nenhum gás
6	2500	0,7	4	Nenhum gás
7	2600	0,5	3	Argônio
8	20	12,9	3	Nenhum gás

Procedimento: injetar três vezes a *Solução branco*, as *Soluções de referência*, a *Solução amostra* e a *Solução de monitoramento*. A recuperação do alumínio adicionado na preparação da *Solução de monitoramento* está dentro do intervalo de 80% a 120%. Determinar as absorvâncias. Construir uma curva analítica a partir da média das leituras obtidas com as *Soluções de referência* e determinar o teor de alumínio na preparação a ser analisada através da curva analítica. No máximo 200 µg/L.

Ativador da pré-caliceína. Proceder conforme descrito em *Determinação do título do ativador da pré-caliceína (5.5.1.11)*. A amostra contém, no máximo, 35 UI de ativador da pré-caliceína por mililitro.

Hemoglobina. Diluir a amostra com solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) até uma concentração de 10 g/L em proteínas. Determinar a absorvância (5.2.14) em 403 nm, utilizando água como branco. A absorvância é, no máximo, 0,15.

Potássio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de emissão atômica (5.2.13.2)*. Determinar a intensidade emitida em 766,5 nm. A amostra contém, no máximo, 0,05 milimol de K⁺ por grama de proteínas.

Sódio. Proceder conforme descrito em *Espectrometria de emissão atômica (5.2.13.2)*. Determinar a intensidade emitida em 589 nm. A amostra contém, no mínimo, 95% e, no máximo, 105% do teor de sódio indicado no rótulo e, no máximo, 160 milimol de Na⁺ por litro.

TESTES DE SEGURANÇA BIOLÓGICA

Esterilidade (5.5.3.2.1). Cumpre o teste.

Pirogênios (5.5.2.1). Cumpre o teste.

Nota: no caso de uma solução contendo 35 g/L a 50 g/L de proteínas, injetar em cada coelho, por quilograma de massa corporal, 10 mL da preparação a ser examinada. No caso de uma solução contendo 150 g/L a 250 g/L de proteínas, injetar em cada coelho, por quilograma de massa corporal, 5 mL da preparação a ser examinada.

DOSEAMENTO

Proteínas totais

Diluir a preparação com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) para obter uma solução que se espera conter aproximadamente 15 mg de proteína em 2 mL. Em um tubo de centrifugação de fundo arredondado introduzir 2 mL dessa solução. Adicionar 2 mL de solução de molibdato de sódio a 75 g/L e 2 mL de uma mistura de ácido sulfúrico livre de nitrogênio e água (1:30). Agitar, centrifugar durante cinco minutos, decantar o líquido sobrenadante e inverter o tubo, permitindo que o seu conteúdo escorra sobre papel de filtro. Determinar o teor de nitrogênio presente no resíduo após mineralização de acordo com *Determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl (5.3.3.2)* e calcular o teor de proteínas multiplicando a quantidade de nitrogênio por 6,25. A preparação contém, no mínimo, 96% e, no máximo, 105% da quantidade de proteína declarada no rótulo.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Ao abrigo da luz.

ROTULAGEM

Observar legislação vigente. O rótulo deve conter o nome da preparação, volume da preparação, conteúdo em proteínas expresso em gramas por litro, conteúdo de sódio expresso em milimol por litro, nome e concentração de qualquer substância adicionada à preparação (exemplo: estabilizante) e que o produto não deverá ser usado se houver turvação ou depósito.