

ANEXO

VACINA BCG LIOFILIZADA *Vaccinum BCG cryodesiccatum*

DEFINIÇÃO

A vacina BCG liofilizada é uma preparação de bactérias vivas atenuadas, obtida a partir do cultivo do Bacilo de Calmette e Guérin (*Mycobacterium bovis*), de inocuidade e eficácia reconhecidas, que tenha demonstrado capacidade para proteger o homem contra a tuberculose.

PRODUÇÃO

Considerações gerais

A produção da vacina é baseada no sistema de lote semente e não podem ser realizados mais do que oito subcultivos a partir da cepa original. Nas etapas dos subcultivos, a preparação deve ser liofilizada somente uma vez. O método de produção deve demonstrar que a vacina é consistente em induzir no homem sensibilidade adequada para a tuberculina, segura e apresenta uma potência protetora em animais.

Essa vacina deve ser produzida por equipe em boas condições de saúde, que não trabalhe com agentes infecciosos e, em particular, com cepas virulentas de *Mycobacterium tuberculosis*. O pessoal deverá ser controlado periodicamente para tuberculose. A vacina BCG liofilizada é sensível à luz solar e, portanto, os cultivos e as vacinas devem ser protegidos da luz solar direta e da luz ultravioleta em todas as etapas de produção, controle e armazenamento.

A cepa utilizada para estabelecer o lote semente primário deve ser selecionada e mantida de maneira que sejam preservadas suas características, a capacidade de sensibilizar o homem para a tuberculina e ausência de patogenicidade para o homem e para os animais de laboratório.

Um lote de vacina deve ser preparado a partir do primeiro lote semente de trabalho e reservada para utilização como vacina de referência interna. Quando se estabelece um novo lote semente de trabalho, deve ser realizado um ensaio de reatividade dérmica em cobaias no lote de vacina obtido deste novo lote semente de trabalho. A atividade da vacina não deve ser significativamente diferente em relação à vacina de referência interna.

O lote semente de trabalho deve cumprir com os ensaios de identificação, esterilidade, exceto pela presença de micobactérias, e micobactérias virulentas, como descrito para o lote final utilizando dez cobaias.

Cultivo

A bactéria deve ser cultivada em meio de cultura adequado, por um período máximo 21 dias, podendo ser utilizados cultivos em superfície ou profundidade. A suspensão bacteriana é diluída para o número estabelecido de doses e, antes do envase, o

produto é avaliado quanto ao número de unidades formadoras de colônias e esterilidade.

Um estabilizador pode ser adicionado na vacina final a granel e, caso haja interferência na determinação da concentração bacteriana, o ensaio deve ser realizado antes da adição do mesmo.

A vacina deve cumprir os ensaios de esterilidade, exceto pela presença de micobactérias, contagem de unidades viáveis por mL e concentração bacteriana.

VACINA FINAL

Quando os frascos da vacina forem conservados a uma temperatura menor ou igual a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, o prazo de validade não deve ser superior a 4 anos a partir da data de coleta.

O lote final somente pode ser utilizado se estiver de acordo com a contagem de unidades viáveis e cada um dos requisitos especificados em *Ensaio*.

O ensaio de *micobactérias virulentas* pode ser omitido na vacina final se foi obtido resultado satisfatório na vacina final a granel.

O ensaio de *Reatividade dérmica excessiva* na vacina final pode ser omitido se foi realizado no lote semente de trabalho e em cinco lotes finais consecutivos derivados do mesmo lote semente.

Se o ensaio de contagem de viáveis for substituído pela bioluminescência ou qualquer outro método, o mesmo deve ser validado contra o método de contagem de viáveis para cada etapa do processo em que seja utilizado.

PRODUTO FINAL

IDENTIFICAÇÃO

Realizar a identificação da vacina BCG liofilizada mediante observação microscópica dos bacilos corados pela técnica de Ziehl-Nielsen, para demonstrar sua propriedade de resistência ao ácido e pelo aspecto morfológico das colônias em cultivos no meio de Lowenstein-Jensen. As colônias são rugosas, predominantemente espreiadas e não-pigmentadas. Alternativamente, podem ser utilizadas técnicas de biologia molecular.

ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

pH (**Métodos gerais**) Determinar após a reconstituição da vacina com diluente apropriado. Os limites devem estar de acordo com o histórico do registro do produto.

Determinación de agua (**Métodos gerais**) Titulação volumétrica direta. No máximo 3,0 % p/p.

ENSAIOS BIOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS

Micobactérias virulentas

Injetar uma quantidade de vacina equivalente pelo menos a 50 doses humanas, por via subcutânea ou intramuscular, em seis cobaios de 250 g a 400 g de peso e que não tenham recebido qualquer tratamento que possa interferir no ensaio. Manter os animais em observação por 42 dias. Ao final do período, sacrificar e investigar por autópsia evidência de tuberculose progressiva, ignorando qualquer reação leve que possa aparecer no local de inoculação. Os animais que morrerem durante o período de observação também devem ser examinados para sinais de tuberculose. A vacina cumpre com o ensaio se nenhum dos cobaios apresentar evidências de tuberculose e não morrer mais de um animal durante o período de observação. No caso de dois animais morrerem durante este período e a autópsia não revelar sinais de tuberculose, repetir o ensaio em seis novos cobaios. A vacina cumpre com o ensaio se nenhum dos cobaios apresentar evidências de tuberculose e não morrer mais de um animal durante os 42 dias após a inoculação.

Reatividade dérmica excessiva

Utilizar seis cobaios sadios e brancos, de pelo menos 250 g de peso e que não tenham recebido qualquer tratamento que possa interferir no ensaio. Inocular, por via intradérmica, 0,1 ml da vacina reconstituída e de sucessivas diluições seriadas (1:10). Proceder conforme descrito para a vacina de referência. Observar por quatro semanas as lesões formadas nos pontos de inoculação. A vacina cumpre com o ensaio se a reação produzida pela amostra é semelhante à da vacina de referência.

Esterilidade (Métodos gerais). Cumpre com o ensaio, exceto para a presença de micobactérias.

VALORACIÓN

Determinar o número de unidades viáveis na vacina reconstituída, por contagem de das unidades formadoras de colônias (UFC) em meio sólido.

Reconstituir cinco ampolas ou frascos da vacina com diluente recomendado, tendo o cuidado de adicioná-lo suavemente para evitar a formação de espuma. Transferir o conteúdo para um único tubo de ensaio, homogeneizar e proceder três diluições, de modo a obter uma contagem de 40 – 100 UFC. Inocular em meio Lowenstein-Jensen, utilizando cinco tubos para cada uma das duas diluições mais concentradas e 10 tubos para a mais diluída. Vedar os tubos e incubar na posição vertical à temperatura de 37 °C, por quatro semanas. Analisar em paralelo uma amostra da vacina de referência e expressar os resultados em UFC/mL. A faixa de aceitação deve estar de acordo com o histórico do registro do produto, e o limite máximo não deve ultrapassar quatro vezes o limite mínimo.

Se for utilizada a bioluminescência ou qualquer outro método, o mesmo deve ser validado contra o método de contagem de viáveis.

TERMOESTABILIDADE

Manter amostras da vacina liofilizada à temperatura de 37 °C por quatro semanas. Determinar o número de unidades viáveis nas amostras submetidas ao calor e naquelas mantidas à temperatura de armazenamento, conforme indicado em Valoracion. O número de viáveis da vacina após incubação não deve ser inferior a 20% do conteúdo da vacina mantida à temperatura normal de armazenamento.

AONDICIONAMENTO E ARMAZENAMENTO

De acordo com a norma vigente da Autoridade Regulatória Nacional.

ROTULAGEM

De acordo com a norma vigente da Autoridade Regulatória Nacional.