

O futuro dos testes de pirogênios no Brasil: a nova estratégia de determinação do potencial de pirogenicidade

Evelin Elfriede Balbino
Especialista em regulação e vigilância sanitária
Gerência de Avaliação Produtos Biológicos/GPBIO
Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA

20/02/2025

- Todo produto de administração parenteral deve realizar um teste para a determinação de pirogênicos;
- Três possibilidades de ensaios para detecção e/ou quantificação de pirogênicos na amostra:

5.5.2.7 TESTES PARA AVALIAÇÃO DE PIROGÊNICOS	MG5.5.2.7-00
5.5.2.7.1 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS	MG5.5.2.7.1-00
5.5.2.7.2 TESTE DE PIROGÊNICOS EM COELHOS	MG5.5.2.7.2-01
5.5.2.7.3 TESTE DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS	MG5.5.2.7.3-02

- O teste de ativação de monócitos (MAT) é o teste de escolha para detecção de pirogênicos totais, visando a redução do uso de animais;
- Teste de pirogênicos em coelhos, apenas quando:
 - Mitigação de risco da contaminação por pirogênicos comprovada;
 - Interferência da amostra no MAT inviabiliza a sua aplicação.

Farmacopeia Brasileira 7ª Edição

Volume I

- O teste de ativação de monócitos (MAT) tem a capacidade de detectar os pirogênios totais, isto é, os pirogênios do tipo endotoxina bacteriana e os pirogênios do tipo não-endotoxina (NEPs);
- O teste de pirogênios em coelhos tem capacidade de detectar e quantificar os pirogênios totais;
- O teste de endotoxinas bacterianas (BET) tem a capacidade de detectar ou quantificar somente pirogênios do tipo endotoxinas bacterianas;
- O BET pode substituir os testes de pirogênios totais, quando acompanhado de uma análise de risco produto-específica para evidenciar o baixo risco da presença de NEPs na amostra e a correlação de resultados obtidos por meio do BET e um método de pirogênios totais;
- Podem ser empregados outros métodos de detecção de pirogênios, aprovados em compêndios oficiais reconhecidos pela legislação vigente da Anvisa, que versa sobre a admissibilidade de compêndios estrangeiros.

RESOLUÇÃO RDC Nº 511, DE 27 DE MAIO DE 2021

Dispõe sobre a admissibilidade de códigos farmacêuticos estrangeiros.

Art. 1º Na ausência de monografia oficial de matéria-prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais inscritos na Farmacopeia Brasileira, poderá ser adotada monografia oficial, última edição, de um dos seguintes compêndios internacionais:

- I - Farmacopeia Alemã;
- II - Farmacopeia Americana;
- III - Farmacopeia Argentina;
- IV - Farmacopeia Britânica;
- V - Farmacopeia Europeia;
- VI - Farmacopeia Francesa;
- VII - Farmacopeia Internacional (Organização Mundial da Saúde - OMS);
- VIII - Farmacopeia Japonesa;
- IX - Farmacopeia Mexicana; e
- X - Farmacopeia Portuguesa.

Art. 2º Na ausência de Substâncias Químicas de Referência da Farmacopeia Brasileira poderão ser utilizadas as substâncias químicas de referência das Farmacopeias referidas no art. 1º.

RESOLUÇÃO Nº 948, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2024

Dispõe sobre os requisitos sanitários para a regularização de medicamentos de uso humano.

Art. 25. Os ensaios de controle de qualidade dos IFAs e produtos acabados podem utilizar métodos farmacopeicos oficiais ou de desenvolvimento interno (*in house*), desde que sejam devidamente validados nos termos da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, e suas atualizações.

§1º São considerados oficiais os métodos farmacopeicos constantes na(s):

I - Farmacopeia Brasileira (FB), conforme Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 940, de 14 de novembro de 2024, e suas atualizações; e

II - farmacopeias reconhecidas, conforme Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 511, de 27 de maio de 2021, e suas atualizações.

§2º Quando da adoção de métodos de desenvolvimento interno (*in house*), nos termos do caput deste artigo, estes deverão ser equivalentes ou superiores aos da Farmacopeia Brasileira, se existentes, e poderão ser acessados, apreciados e incorporados pela FB, salvo se expressa negativa da empresa titular da regularização.

§3º A Anvisa poderá requerer, mediante justificativa técnica, a adoção de critérios de aceitação mais restritos ou a inclusão de ensaios de controle de qualidade adicionais àqueles dispostos nos métodos farmacopeicos oficiais ou de desenvolvimento interno (*in house*) caso estes se mostrem inadequados ou insuficientes para o medicamento objeto da regularização.

§4º Regulamentos específicos da Anvisa podem definir compêndios estrangeiros, ensaios e critérios de aceitação alternativos aos estabelecidos no §1º deste artigo.

Art. 26. O produto acabado deve atender aos ensaios e critérios de aceitação das monografias específicas e dos métodos gerais aplicáveis da Farmacopeia Brasileira (FB) vigente, ainda que adote método de análise de controle de qualidade diverso.

Parágrafo único. Quando os ensaios e critérios de aceitação da FB não forem adequados ao produto, a empresa deve apresentar justificativa fundamentada em critérios técnico-científicos.

Teste compendial  teste de desenvolvimento interno (*in house*)

Dados necessários: validação completa e equivalência ou superioridade ao método compendial;

Validação completa: Resolução RDC nº 166/2017;

Equivalência ou superioridade de métodos:

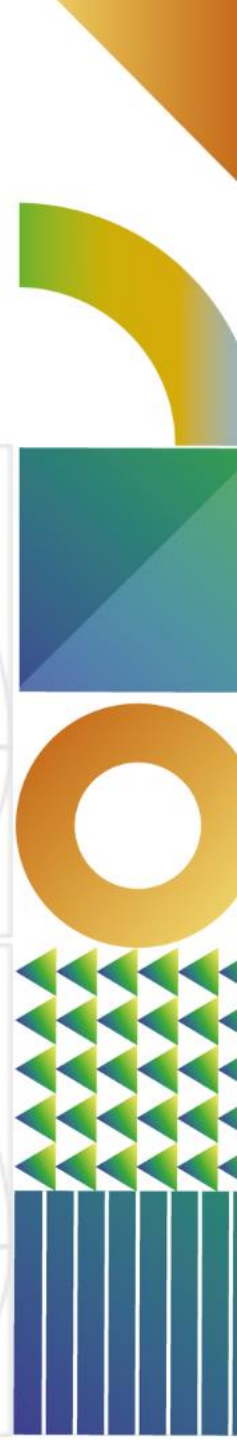
- Sensibilidade do método;
- Comparação de resultados históricos do método compendial com resultados do teste de desenvolvimento interno;
- Lotes reprovados pelo teste compendial devem se reprovados pelo teste de desenvolvimento interno;
- Testes *in vivo* de desenvolvimento interno devem ser evitados.

Princípio dos 3 R's no mundo

- Compromisso da comunidade científica mundial
 - Redução do número de animais por procedimento experimental;
 - Substituição (*replacement*) do uso de animais;
 - Refinamento: aprimorar métodos para minimizar o desconforto animal.

Outros 2 R's

- Respeito: conhecer o comportamento animal, suprimindo necessidades, com manipulação e instalações adequadas;
- Relevância: justificar o uso animal, pensar até que ponto os procedimentos e resultados podem ser extrapolados para a realidade de um tratamento para o ser humano ou outro animal.



Princípio do 3 R's no Brasil

➤ **Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**

Art. 225. Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.

§ 1º Para assegurar a efetividade desse direito, incumbe ao Poder Público:

(...)

VII - proteger a fauna e a flora, vedadas, na forma da lei, as práticas que coloquem em risco sua função ecológica, provoquem a extinção de espécies ou submetam os animais a crueldade.

(...) (g.n.)

➤ **Lei nº 11.794/2008**

Art. 1º A criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, obedece aos critérios estabelecidos nesta Lei.

(...)

§ 2º São consideradas como atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

(...)

Art. 4º Fica criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA)

Resolução RDC nº 35/2015 da Anvisa

- Aceitação de métodos alternativos ao uso de animais nas petições submetidas à análise pela Anvisa, nos termos da Resolução Normativa CONCEA nº 17/2014;
- Excetuam-se casos específicos em que a Anvisa, mediante justificativa técnica, apresente a inadequação e inaplicabilidade dos métodos reconhecidos pelo CONCEA;
- As regras aplicam-se também às petições pendentes de análise na data de publicação desta Resolução.

Resolução Normativa CONCEA nº 45/2019

- Reconhecimento do MAT para avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis;
- Método alternativo validado por centros internacionais de validação, seguindo o Guia 34 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OCDE, e possui aceitação regulatória internacional;
- Prazo de até 5 (cinco) anos para substituição obrigatória do método original pelo método alternativo.

Resolução Normativa CONCEA nº 54/2022


- Os métodos alternativos validados e reconhecidos por Resoluções Normativas do CONCEA passarão a ser obrigatórios no País;
- Prazo de até 5 (cinco) anos para a observância dos referidos métodos, a contar da publicação da Resolução Normativa;
- O não cumprimento do determinado nesta Resolução Normativa sofrerão as sanções previstas na legislação aplicável.

Resolução nº 68/2024 CONCEA

- Prorrogação por um ano do prazo previsto na Resolução Normativa CONCEA nº 45/2019, para a substituição do teste de pirogênio em coelhos pelo MAT, para todos os produtores de Soros Hiperimunes em território nacional.

MAT

- Teste de pirogênios de escolha, visando a redução do uso de animais;
- Pirogênios se ligam a receptores Toll-like receptors (TLR) de células monocíticas;
- Liberação de mediadores endógenos por células monocíticas humanas;
- Mediadores endógenos: citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 beta (IL-1 β) e a interleucina-6 (IL-6);
- Indução de febre, hipotensão, coagulação intravascular, entre outros, em humanos.



Detecção de
mediadores
endógenos

MAT

- O capítulo da FB7 descreve duas possibilidades de métodos para a execução do MAT
 - Método I – Teste semi-quantitativo
 - Leituras da amostra são comparadas a uma curva padrão de endotoxina
 - Método II – Teste por comparação com lote controle
 - Leituras da amostra são comparadas a um lote controle do produto

- Método alternativo aos Métodos I e II
 - Validação completa
 - Equivalência aos métodos oficiais

MAT

- Método validado e reconhecido pelo CONCEA
- Incluído na FB7
- Adequabilidade produto-específica do método compendial
 - Concentração limite de contaminantes – maior concentração de pirogênios permitida no produto
 - Sensibilidade do teste – menor concentração de endotoxina detectável
 - Qualificação dos doadores de sangue – produção de mediadores endógenos apropriada
 - Qualificação da fonte de células
 - Adequabilidade da curva padrão de endotoxinas – estimulação dose-dependente pelo padrão endotoxina
 - Capacidade de detecção de NEPs – estimulação dose-dependente por NEPs
 - Ausência de interferência da amostra com o teste – adição do padrão endotoxina e recuperação adequada
 - Ausência de interferência no Sistema de detecção – diluições em série do mediador endógeno com e sem amostra

Produtos biológicos sujeitos ao MAT

Todos os produtos biológicos de administração parenteral.

Requerimentos da FB7 para alguns produtos biológicos específicos:

- **HEPARINAS, INSULINAS**
 - Teste de endotoxinas bacterianas (5.5.2.7.3).
- **SOROS HIPERIMUNES PARA USO HUMANO**
 - Teste para avaliação de pirogênios (5.5.2.7);
 - **Análises de risco para a realização do teste de endotoxina bacteriana;**
 - Nos casos em que o teste de pirogênios em coelhos (5.5.2.7.2) for permitido, para a análise de pirogênios totais, injetar 1 mL/kg e não reutilizar os animais utilizados no teste.
- **VACINAS PARA USO HUMANO**
 - Salvo quando justificado e autorizado em contrário, um teste de endotoxina bacteriana (5.5.2.7.3) é realizado no produto final.
 - Vacinas para as quais o teste para avaliação de pirogênios (5.5.2.7) é requerido na monografia específica:
 - VACINA HAEMOPHILUS INFLUENZAE B (CONJUGADA)
 - VACINA HEPATITE B (RECOMBINANTE)
 - VACINA MENINGOCÓCICA ACWY (POLISSACARÍDICA)
 - VACINA RAIVA (INATIVADA)
 - **Análises de risco para a realização do teste de endotoxina bacteriana.**

Análise de risco para endotoxinas

- Produto específica;
- Procedimentos para minimizar o risco de contaminação;
 - procedimentos assépticos na produção;
 - equipamento operado em regime fechado ou descartável (estéril e apirogênico) ou rígido com capacidade *clean in place/steam in place* (SIP/CIP) validada;
 - filtros com tamanho de poro $\leq 0,2 \mu\text{m}$ ou menor e testados por integridade no final do processo.
- Procedimentos para detectar a contaminação microbiológica;
 - teste de biocarga em produtos intermediários chaves, substância ativa e produto acabado;
 - identificação de microrganismo na estratégia de monitoramento de biocarga;
 - lista de microrganismos críticos (relacionados a NEPs).
- Investigação de excursão dos limites de controle em-processo ou da especificação do produto;
- Teste para pirogênios totais durante o desenvolvimento do produto e alterações pós-registro.

Dispõe sobre a terceirização de etapas de produção, de análises de controle de qualidade, de transporte e de armazenamento de medicamentos e produtos biológicos, e dá outras providências.

Seção I - Objetivo

Art. 1º Esta Resolução institui regras para a **terceirização** de etapas de produção, **de análises de controle de qualidade**, de transporte e de armazenamento de **medicamentos e produtos biológicos**.

...

Art. 3º Esta Resolução se aplica também à **terceirização de análises de controle de qualidade de insumos farmacêuticos**, por fabricantes de medicamentos **e de produtos biológicos**, com vistas à sua aprovação para o uso em produção.

Seção III – Definições

XII - terceirização: **prestação de serviços, por Empresa Contratada**, em atividades de produção, **controle de qualidade**, transporte ou armazenamento de medicamentos e de produtos biológicos.

CAPÍTULO V - DA TERCEIRIZAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE

Art. 17. A Empresa Contratada para a realização da atividade de Controle de Qualidade deve ser qualificada pela Empresa Contratante, que é a responsável por avaliar a competência da contratada.

Parágrafo único. No processo de qualificação, a Empresa Contratante deve garantir o atendimento de requisitos de boas práticas laboratoriais pela Empresa Contratada, os quais podem ser demonstrados por meio de:

- I - habilitação junto à Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS) para os ensaios contratados;
- II - atendimento às disposições da Resolução RDC nº 11, de 16 de fevereiro de 2012 e suas posteriores atualizações (RE nº 512/2021);
- III - Certificação de Boas Práticas de Fabricação, quando se tratar de empresa fabricante de medicamentos ou produtos biológicos;
- IV - acreditação de acordo com a norma ISO 17025 para os ensaios contratados; ou
- V - comprovação do cumprimento das Boas Práticas de Laboratório, conforme diretrizes reconhecidas internacionalmente.

...

Art. 19. A aprovação final para liberação do produto deve ser dada pela pessoa designada da Empresa Contratante, de acordo com os princípios de Boas Práticas de Fabricação e com os requisitos do registro, como especificado no contrato.



Muito obrigada!

Gerência de Avaliação de Produtos Biológicos

produtos.biologicos@anvisa.gov.br

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)

www.anvisa.gov.br
www.twitter.com/anvisa_oficial