

MINISTÉRIO DA SAUDE DA RÚSSIA

**O Centro Nacional de Pesquisa em Epidemiologia e Microbiologia nomeado em homenagem ao acadêmico honorário N.F. Gamaleya do Ministério da saúde da Rússia (NICEM Gamaleya)**

123098, Moscou, rua Gamaleya, 18

Tel. 8 499-193-30-01

Fax: 8 499-193-61-83

<http://www.gamaleya.org>

E-mail: info@gamaleya.org

3 de maio de 2021

Para Antônio Barra Torres, Diretor-Presidente  
Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)

Seguindo a carta da União Química datada de 28 de abril de 2021, o Instituto Federal Estatal NF Gamaleya - Centro Nacional de Pesquisa em Epidemiologia e Microbiologia do Ministério da Saúde da Federação Russa (“Centro Gamaleya”) gostaria de responder com a presente às alegações da ANVISA sobre as vacinas Sputnik V que foram divulgadas ao público ao longo da semana de 26 de abril, especificamente durante a reunião pública da ANVISA em 26 de abril e a coletiva de imprensa da ANVISA em 29 de abril, que causaram danos significativos à reputação do Centro Gamaleya e da vacina Sputnik V.

1. “Adenovírus replicante detectado em todos os lotes da vacina Sputnik apresentados ao componente II (Ad5): provável recombinação. Componente I (Ad26) não é avaliado para adenovírus replicante” (Apresentação em reunião pública da ANVISA em 26/04/2021).  
“Os dados que avaliamos mostram a presença de vírus replicantes” (Gustavo Mendes, gerente geral de medicamentos e produtos biológicos da ANVISA durante coletiva de imprensa em 29 de abril de 2021).

**Resposta do Centro Gamaleya**

- A ANVISA não pôde realizar testes dos lotes da Sputnik V para a presença de RCA porque nenhum frasco foi fornecido à ANVISA. Em entrevista coletiva no dia 29 de abril, a ANVISA corrigiu sua posição dizendo que não havia feito seus próprios testes e não havia encontrado nenhum RCA, mas estava preocupada com o limite regulatório teórico russo para esse parâmetro.

- De fato, o Centro Gamaleya já havia comunicado a ausência de RCAs na vacina Sputnik V à ANVISA em seu ofício de 26 de março de 2021, que diz claramente: “Além disso, gostaríamos de informar que durante o lançamento da vacina produto no site central e no site da empresa contratada Generium, nem um único lote contendo RCA foi registrado” (consulte a carta no Apêndice # 1).
- Os controles de qualidade duplos existentes que são realizados pelo Centro Gamaleya e pelo Laboratório Nacional Estatal da Federação Russa (Roszdravnadzor, roszdravnadzor.gov.ru, uma instituição independente como a ANVISA) não detectaram nenhuma presença de RCA na vacina Sputnik V (favor consultar a respectiva carta de Roszdravnadzor no Apêndice # 2). O controle para RCA é realizado não apenas para o produto acabado, mas também em etapas da produção diferentes, incluindo a semente viral e o concentrado de vacina. De agora em diante, os mesmos procedimentos de controle de qualidade duplo continuarão a garantir que a Sputnik V consista apenas em lotes onde o RCA não é detectado.
- Apêndice # 3 contém os protocolos de lote que confirmam a ausência de RCAs na vacina Sputnik V. Para evitar dúvidas, a coluna “Número de adenovírus competentes para replicação por dose”, seção 4 “Resultados dos testes de controle” de protocolos de lote faz referência a um limite teórico, enquanto os resultados reais dos testes de RCA são fornecidos na coluna “Número médio de placas em duas iterações”.
- Um artigo na revista Science (<https://www.sciencemag.org/news/2021/04/russias-covid-19-vacina-safe-brazils-veto-sputnik-v-sparks-judiciais-ameaca-e>) lança luz sobre a fonte do mal-entendido da ANVISA:
  - Artigo cita o entendimento correto de Jorge Kalil de que os rígidos duplos controles de qualidade do Instituto Gamaleya e de Roszdravnadzor confirmaram que nenhum RCA foi detectado. “O imunologista Jorge Kalil, especialista em vacinas da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, e membro do Conselho de Monitoramento de Dados e Segurança do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, discorda da interpretação da ANVISA. Ele acredita que os documentos de controle de qualidade russos estão na verdade se referindo à sensibilidade do teste”. E isso é correto e consistente com a

carta de 26 de março à ANVISA que confirma que não foi detectado nenhum RCA. Os controles de qualidade na Rússia que mostram “menos do que o limite de controle de qualidade” significam “não detectado”.

- No mesmo artigo, Gustavo Mendes mostra seu entendimento incorreto dos relatórios de Gamaleya. “Mendes disse à Science que não é o caso e que, se fosse, Gamaleya teria reportado “não detectado”. Esta afirmação é incorreta e altamente antiprofissional, pois mostra que Mendes nem mesmo verificou com o Instituto Gamaleya o significado dos relatórios antes de tirar suas conclusões errôneas e levá-los ao público, provocando danos significativos com base em uma interpretação incorreta.
- As normas em vigor para determinar as quantidades de RCA na vacina Sputnik V estão em total conformidade com as recomendações do FDA. De acordo com os regulamentos do FDA existentes, de 33 RCA (com base em uma dose intratumoral de  $10^{12}$  partículas) a 1000 RCA (com base em uma dose intravenosa máxima de  $3 \times 10^{13}$  partículas) podem entrar no corpo humano.

2. “E1 não é eliminado na vacina Sputnik V”.

**Resposta do Centro Gamaleya**

- A tecnologia de produção começa com a clonagem do gene-alvo (neste caso, o gene S) em um plasmídeo com um fragmento do genoma Ad5 já sem a região E1. Ou seja, a região E1 não existe inicialmente e os genes-alvo são clonados no local de sua deleção. A tecnologia dos vetores com o E1 deletado é conhecida há vinte anos, e em sua essência não permite “esquecer” a remoção do E1. É impossível esquecer de deletar algo que originalmente não existe na tecnologia.

A documentação fornecida à ANVISA afirma claramente que o E1 foi excluído da Sputnik V. Por exemplo, o Documento de Desenvolvimento Farmacêutico mostra o seguinte:

Table 2. Results of whole genome sequencing of 1-10 passages of rAd5-S-CoV2

Passage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
E1 region genes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3. Durante a coletiva de imprensa no dia 29 de abril, o Sr. Mendes mostrou um vídeo do encontro online ocorrido no dia 23 de março entre os funcionários da ANVISA e do desenvolvedor da vacina:

**Pergunta da ANVISA:** Acho que já fiz isso, mas de qualquer forma precisamos entender: uma vez que você detectou a ocorrência de RCA em sua produção, por que você não voltou atrás no desenvolvimento, escolhendo um outro substrato celular que tenha plasmídeos construídos de tal forma que permitem a existência de poucos lados de homologia e que geralmente não permitem uma recombinação entre o adenovírus e as células? E quando você considerou continuar com esse desenvolvimento, qual foi a avaliação de risco realizada para realmente avaliar o risco da presença dessas partículas na vacina? Porque vai ser administrado em pessoas saudáveis. Então, qual a justificativa que você tem para prosseguir com esse desenvolvimento de uma vacina que será usada geralmente em pessoas saudáveis? Isso é algo que deve ser abordado nesta avaliação de risco e queremos saber os detalhes sobre isso.

**Resposta de Gamaleya (traduzido do russo): 12:00** “Eles disseram que usaram para a produção da vacina uma linhagem celular caracterizada que pode ter suas falhas e você está obviamente certo em afirmar que poderíamos ter voltado, dado um passo para trás e começar a usar uma substância diferente, mas dizem que esse processo demoraria muito. Então, eles optaram por usar a mesma substância que usam desde o início ... ”

### **Resposta do Centro Gamaleya:**

- Ficamos lisonjeados com a decisão da ANVISA de gravar as negociações. O videoclipe em questão foi muito editado e não confirma de forma alguma a existência de RCA na vacina Sputnik V. A resposta do Centro Gamaleya no vídeo refere-se aos tópicos teóricos e fundamentais do desenvolvimento de vacinas usando células HEK293. E, especificamente, por causa dessas possibilidades teóricas, há controles de qualidade duplos para garantir que nenhum RCA seja detectado em qualquer lote de Sputnik V. Na verdade, é porque o Centro Gamaleya tem sido consistente que nenhum RCA é detectado em lotes de vacina Sputnik V que a ANVISA tem que usar um clipe que não mostra nada. Em vez disso, eles deveriam ter mostrado a carta datada de 26 de março de 2021 do Centro Gamaleya afirmando que não há RCA em nenhum lote da vacina Sputnik V produzida.

Pedimos, por gentileza, à ANVISA que confirme que nesta carta, bem como em correspondência anterior (incluindo a carta de 26 de março (Anexo 1), a carta com as respostas do Centro Gamaleya à ANVISA datada de 29 de abril), recebeu a posição tanto do Centro Gamaleya como a do regulador russo independente Roszdravnadzor de que, por meio de amplo controle de qualidade nenhum RCA foi detectado na vacina Sputnik V. Favor reconhecer também que a ANVISA baseou suas declarações sobre esse assunto em suposições incorretas, conforme descrito nesta carta e nos respectivos documentos de suporte. Acreditamos que tais declarações poderiam ter sido evitadas se a ANVISA seguisse um procedimento padrão e verificasse suas suposições e conclusões com o Centro Gamaleya antes de fazer quaisquer declarações públicas.

---

**Alexander Vasilievich Pronin**

Vice-Diretor do Instituto Federal N. F. Gamaleya, Centro Nacional de Pesquisa de Epidemiologia e Microbiologia do Ministério da Saúde da Federação da Rússia

**Anexo Nº 1**  
**Carta oficial do centro Gamaleya**  
**de 26 de Março de 2021.**

MINISTÉRIO DA SAUDE DA RÚSSIA

**O Centro Nacional de Pesquisa em Epidemiologia e Microbiologia nomeado em homenagem ao acadêmico honorário N.F. Gamaleya do Ministério da saúde da Rússia (FGBU “NICEM Gamaleya” Minzdrava Rossii)**

123098, Moscou, rua Gamaleya, 18

26.03.2021 No

Em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Tel. 8 499-193-30-01

Fax: 8 499-193-61-83

<http://www.gamaleya.org>

E-mail: info@gamaleya.org

**A QUEM INTERESSAR POSSA**

O Centro Nacional de Pesquisa em Epidemiologia e Microbiologia nomeado em homenagem ao acadêmico honorário N.F. Gamaleya informa a norma de admissão RCA (Replication-competent adenovirus) para a vacina Gam-Covid-Vac não é superior a 100 RCA por dose. Ao mesmo tempo, esse valor foi acordado pelas autoridades regulatórias russas e a segurança da preparação da vacina com tal valor de tolerância de RCA é confirmada por estudos pré-clínicos e clínicos realizados e também é confirmada no processo da vacinação em massa da população. Além disso, gostaríamos de informar que no curso de produção de vacina no local do Centro e nas instalações em regime de contrato da JSC «Generium», nenhum lote contendo RCA foi registrado.

Diretor do Centro Nacional de Pesquisa em Epidemiologia e Microbiologia nomeado em homenagem ao acadêmico honorário N.F. Gamaleya do Ministério da saúde da Rússia

/assinatura/

**A. L. Gintsburg**

Selo : Ministério da saúde da Rússia / Centro Nacional de Pesquisa em Epidemiologia e Microbiologia nomeado em homenagem ao acadêmico honorário N.F. Gamaleya do Ministério da saúde da Rússia (FGBU “NICEM Gamaleya” Minzdrava Rossii) \*  
OGRN 1027739443555 / ilegível

**Anexo № 2**  
**Carta Oficial de Roszdravnadzor.**

Ministério da saúde da Federação Russa  
SERVIÇO FEDERAL DE  
SUPERVISÃO NA SAÚDE  
(ROSZDRAVNADZOR)

SRL "VACINA HUMANA"

Presnenskaya nab., 8,  
ed. 1, 7º andar, local I  
Moscou, 123112

Slavianskaya pl., 4, ed.1, Moscou, 109074

Tel.: (495)6984538; 698 15 74

03.05.2021 № 02-24306/21

Ao № БЧ-1И/05.21 de 03.05.2021

#### Sobre a consideração do recurso

O Serviço federal de supervisão na saúde, dentro de sua competência, considerou o recurso da SRL "Vacina Humana" no qual se trata do controle de qualidade do medicamento Gam-COVID-Vac Vacina vetorial combinada para a prevenção da infecção por coronavírus causada pelo vírus SARS-CoV-2" (doravante - "Gam-COVID-Vak") e relata o seguinte :

De acordo com as regras de emissão de autorização de introdução na circulação civil de uma série ou lote de medicamento imunobiológico, emissão de parecer sobre a conformidade de série ou lote de medicamento imunobiológico com os requisitos estabelecidos ao seu registo estatal , aprovadas pelo Governo da Federação Russa em 26 de novembro de 2019 №1510 "Sobre o procedimento para a introdução de medicamentos para uso médico na circulação civil", a Instituição Orçamentária do Estado Federal "Centro de Informação e Metodologia para Exame, Contabilidade e Análise dy Circulação de Medicamentos" de Roszdravnadzor realiza testes de qualidade de medicamentos imunobiológicos.

De acordo com os resultados do teste sobre o indicador "Segurança específica" pelo método "Reação de formação de placa na cultura de células A549" de cento e quarenta e cinco séries do segundo componente do medicamento "Gam-COVID-Vac" introduzido na circulação civil no território da Federação Russa, nenhum adenovírus competente de replicação (replication-competent adenovirus) foi detectado.

Além disso, gostaríamos de informar que em 30 de abril de 2021, o Ministério da Saúde da Rússia aprovou uma alteração aos documentos contidos no dossiê de registro para o medicamento registrado Gam-COVID-Vac, de acordo com a qual o indicador de segurança específica não excede 50 adenovírus competente de replicação por dose.

Gerente interino

D.V. Parkhomenko

### **Anexo Nº 3**

**Três protocolos de lote selecionados, confirmando a ausência de quaisquer RCAs em todos os lotes.**

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página 1 de 11
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 1	08.01 -18.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. COMPONENTE II de segurança específico do parâmetro de teste de controle</b>	

1. Data do teste de controle \_\_ 08 \_\_\_\_ de janeiro \_\_\_\_ de 2021

2. Informações sobre o material de teste

2.1. Fundo:

Número do item	Nº de lote	Fabricado por	Uso pretendido	Quantidade a ser testada
1	II-011220	CJSC LEKKO	Controle de liberação	3 amostras
2	II-010121	CJSC LEKKO	Controle de liberação	3 amostras
3	II-020120	CJSC LEKKO	Controle de liberação	3 amostras
4	II- 030121	CJSC LEKKO	Controle de liberação	3 amostras
5	II-040120	CJSC LEKKO	Controle de liberação	3 amostras
6	ZB00121	GENERIUM JSC	Controle de liberação	3 amostras
7	ZB00221	GENERIUM JSC	Controle de liberação	3 amostras
8	487031220	BIOCAD	Controle de liberação	3 amostras
9				
10				

2.2. Condições de armazenamento

De acordo com a documentação regulatória	Condições reais de armazenamento	Conformidade
Máx -18 ° C	-20 ° C	Sim / Não
2 a 8 ° C		Sim Não

3 Protocolo de teste de controle

3.1 Equipamento de teste de controle

Equipamento	Número de série.	Status do equipamento O uso é aprovado
Incubadora de CO <sub>2</sub>	200260003	Sim Não
Caixa laminar classe II / tipo A2	221.120.00.3652	Sim Não
Dosímetro de volume variável de 20-200 mL.	39282545	Sim Não
Dosímetro de volume variável de 100-1000 mL.	39382220	Sim Não

3.2 Reagentes e materiais auxiliares usados em testes de controle

Material reagente / auxiliar	número de referência / número de OL / número de registro	Número do lote	Usar antes
Placas de cultura de 60 mm com monocamada de células A549 (10 pcs)	*	Passagem nº 15	*
Meio de cultura DMEM 1x (sem soro)	No. 128	-	14.01.21
Cubra meio cultural DMEM 2x (OVER) (para A549)	No. 129	-	14.01.21
Cubra a solução de ágar a 2%	No. 130	-	14.01.21
Corante vermelho neutro 100x	No. 97	-	06.04.21
Amostra de controle positivo Ad5-RCA, título $3,0 \cdot 10^9$ PFU / mL	-	040320	03.2021
pipetas sorológicas, 5 mL, estéreis, graduadas, embaladas individualmente	-	27520061	01.10.2023

Agência Medgama, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página 2 de 11
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 1	08.01 - 18.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. COMPONENTE II de segurança específico do parâmetro de teste de controle</b>	

pipetas sorológicas, 10 mL, estéreis, graduadas, embaladas individualmente	-	0329004	28.10.2023
Tubos Falcon, 50 mL	-	J1922390	28.09.2025
Tubos Eppendorf, 1,5 mL	-	J191482M	28.07.2028

### 3.3 Preparação da caixa para o trabalho

Controle de preparação de caixa	A limpeza está concluída	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
	O tratamento UV está concluído	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não

### 3.4 Preparação de reagentes

Número do item	Requisitos SOP	Requisito atendido
1	Aqueça o meio cultural DMEM 1x (sem soro), cubra o meio DMEM 2x (OVER) a $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
2	Derreta a solução de ágar a 2% da cobertura	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
3	Prepare tubos de 1,5 mL	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não

### 3.5 Procedimento

Número do item	Requisitos SOP	Requisito atendido
1	A monocamada celular nos placas de cultura deve ser de 70 a 90% (homogênea, sem 'buracos' e agregados celulares)	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não

#### 3.5.1 Preparação de uma série de diluições de 10x de amostras de controle

1	Para cada lote analisado, deixe os frascos com o material de teste em temperatura ambiente. Combine o conteúdo.	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
2	Prepare oito tubos de 1,5 mL para cada amostra de teste, rotule cada dois tubos da maneira seguinte: $(10^{-1})$ diluição; $(10^{-2})$ diluição; $(10^{-3})$ diluição; $(10^{-4})$ diluição	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
3	Prepare quatro diluições de 10x de cada amostra de teste em duas iterações de diluição de $10^{-1}$ a $10^{-4}$ (150 µl de amostra + 1350 µl de meio sem soro)	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não

#### 3.5.2 Preparando uma amostra de controle positivo

1	Prepare tantos tubos de 1,5 mL quanto corresponder à ordem de titulação do PCS. Rotule de acordo.	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
2	Prepare diluições de 10x de PCS de $10^{-1}$ a $10^{-9}$ (primeira diluição: 20 µl de PCS + 180 µl de meio sem soro; então - 150 µl de amostra + 1350 µl de meio sem soro)	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não

#### 3.5.3 Transferência de diluições (de PCS e amostras de teste) para placas de cultura

1	Rotule os placas de cultura com uma monocamada de células da maneira seguinte: C- - controle de monocamada PCS - $10^{-7}$ PCS - $10^{-8}$ PCS - $10^{-9}$ Para cada amostra de teste: Experiência $10^{-2}$ (duas placas) Experiência $10^{-3}$ (duas placas) Experiência $10^{-4}$ (duas placas)	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
2	Adicionar 1 ml de meio de crescimento sem soro à placa de controle em monocamada (controle negativo)	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página 3 de 11
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 1	08.01 -18.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. COMPONENTE II de segurança específico do parâmetro de teste de controle</b>	

Número do item	Requisitos SOP	Requisito atendido
3	Adicione a amostra de teste começando pela maior diluição. Agite o conteúdo do tubo (diluição $10^{-4}$ ) da primeira iteração e adicione 1 mL ao prato cultural. Da mesma forma, adicione a segunda diluição de iteração.	<input checked="" type="radio"/> Não
4	Da mesma forma, adicione as diluições $10^{-3}$ e $10^{-2}$ .	<input checked="" type="radio"/> Não
5	Da mesma forma, adicione cada amostra de teste de acordo com os itens 3-4	<input checked="" type="radio"/> Não
6	Agite o conteúdo do tubo (diluição $10^{-9}$ ), adicione 1 mL ao prato de cultura. Da mesma forma, adicione as diluições $10^{-8}$ e $10^{-7}$ .	<input checked="" type="radio"/> Não
7	Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ em uma atmosfera com $(5,0 \pm 0,5)\%$ de CO <sub>2</sub> por 4-6 horas. Começa em <u>12</u> <sup>10</sup> ; Termina <u>17</u> <sup>20</sup>	<input checked="" type="radio"/> Não
8	Prepare um meio de cobertura. Para 10 placas: adicione 25 mL de meio de cultura de cobertura DMEM 2x (OVER) e 25 mL de solução de ágar 2% em um tubo estéril de 50 mL. Misture cuidadosamente o conteúdo com uma pipeta evitando a formação de bolhas.	<input checked="" type="radio"/> Não
9	Remova o meio de diluição das placas. Transfira o meio de cobertura para as placas da maneira seguinte: placas com controle negativo → placas com diluições de amostras de teste, começando com a diluição mais baixa → placas com controle positivo. Despeje lentamente, ao longo da parede, 5 mL de meio de cobertura em cada prato.	<input checked="" type="radio"/> Não
10	Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ com $(5,0 \pm 0,5)\%$ de CO <sub>2</sub> por 3 dias.	<input checked="" type="radio"/> Não
Executivo		[assinatura] Goldovskaya P.P.
Data: <u>08.01.2021</u>		
11	Adicione 5 mL de meio a cada uma das placas de acordo com os itens 7-8. Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ com $(5,0 \pm 0,5)\%$ de CO <sub>2</sub> por 3 dias.	<input checked="" type="radio"/> Não
Executivo		[assinatura] Goldovskaya P.P.
Data: <u>11.01.2021</u>		
12	Adicione 5 mL de meio a cada uma das placas de acordo com os itens 7-8. Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ com $(5,0 \pm 0,5)\%$ de CO <sub>2</sub> por 2-3 dias.	<input checked="" type="radio"/> Não
Executivo		[assinatura] Goldovskaya P.P.
Data: <u>14.01.2021</u>		
<b>3.5.4 Coloração de monocamada de células com corante vermelho neutro</b>		
1	Prepare meio nutricional de cobertura tingida. Misture em um tubo de 50 mL 15 mL de meio de cobertura DMEM 2x, 13,2 mL de solução de ágar 2% e 1,8 mL de solução de corante vermelho neutro.	<input checked="" type="radio"/> Não
2	Adicione 3 mL de meio de cobertura tingido a cada prato	<input checked="" type="radio"/> Não
3	Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ com $(5,0 \pm 0,5)\%$ de CO <sub>2</sub> por 24 horas. Os resultados devem ser registrados nos dias 9-10.	<input checked="" type="radio"/> Não
Executivo		[assinatura] Goldovskaya P.P.
Data: <u>17.01.2021</u>		

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página 4 de 11
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 1	08.01 - 18.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. COMPONENTE II de segurança específico do parâmetro de teste de controle</b>	

Número do item	Requisitos SOP	Requisito atendido
<b>3.5.5 Registrando os resultados</b>		
1	Os resultados do controle devem ser registrados, desde que não haja degeneração da monocamada celular na placa de Petri com o controle negativo.	
2	Ao tingir em vermelho neutro, a monocamada de células vivas torna-se avermelhada enquanto as placas aparecem como manchas redondas não coradas. As placas devem ser contadas visualmente nas diluições das amostras onde não se fundem. Insira os resultados na Tabela 1.1.	
3	Os resultados dos testes de controle devem ser registrados se apenas placas individuais forem observáveis em placas de PCS com diluição de $10^{-9}$ , com seu número aumentando proporcionalmente nas diluições subsequentes ( $10^{-8}$ and $10^{-7}$ ).	
<b>3.5.6 Procedimento de cálculo (Excel pode ser usado para cálculos)</b>		
1	Determine o número médio de placas (em 2 placas) para cada diluição.	$n_{iav} = n_{i1} + n_{i2}$
2	Determine o número de partículas adenovirais recombinantes (RCA) para cada diluição em que as placas foram detectadas	onde $N_i = [(n_{iav} \times 10^a) / V] \times 0,5$ , onde $n_{iav}$ - o número médio de áreas de placa em 2 placas; $a$ - diluição do medicamento, mL; $V$ - volume de solução adicionado por placa, mL; $0,5$ - volume de uma dose de vacina, mL.
3	Calcule a média aritmética dos resultados para cada diluição	$N_{av} = (N_i + N_{i+1}) / 2$ , onde $N_i$ ; $N_{i+1}$ - número de RCA para cada diluição 2 - número de iterações

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página 5 de 11
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 1	08.01 -18.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. COMPONENTE II de segurança específico do parâmetro de teste de controle</b>	

#### 4. Resultados do teste de controle

Data de registro de resultados: 18.01.2021

Tabela 1.1 Registro de resultados.

Preparando a amostra de teste	Número de placas		Número médio de placas em duas iterações	Número de adenovírus competentes para replicação por dose
	1ª placa de cultura	2ª placa de cultura		
Controle negativo		-	-	-
<b>Amostra de controle positivo</b>				
Diluição 10 <sup>-7</sup>	> 200	-		
Diluição 10 <sup>-8</sup>	16	-		
Diluição 10 <sup>-9</sup>	2	-		
<b>1. Lote II-011220 CJSC LEKKO</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>2. Lote II-010120 CJSC LEKKO</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>3 Lote II-020120 CJSC LEKKO</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>4. Lote II-030120 CJSC LEKKO</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>5. Lote II-040120 CJSC LEKKO</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>6. Lote ZB00121 JSC GENERIUM</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>7. Lote ZB00221 JSC GENERIUM</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>8. Lote 487031220 BIOCAD</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		

Estimativa

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página 1 de 12
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 2	11.01-21.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. Componente de segurança específico do parâmetro de teste de controle II.</b>	

1. Data do teste de controle \_\_ 11 \_\_ de janeiro \_\_\_\_ de 2021

## 2. Informações sobre o material de teste

### 2.1. Fundo:

Número do item	Nº de lote	Fabricado por	Uso pretendido	Quantidade a ser testada
1	II-10121	BINNOPHARM	Controle de liberação	3 amostras
2	II-20121	BINNOPHARM	Controle de liberação	3 amostras
3	II-010121	Pharmstandard-UfaVITA OJSC	Controle de liberação	3 amostras
4	II-020121	Pharmstandard-UfaVITA OJSC	Controle de liberação	3 amostras
5	II-030121	Pharmstandard-UfaVITA OJSC	Controle de liberação	3 amostras
6	II-040121	Pharmstandard-UfaVITA OJSC	Controle de liberação	3 amostras
7	ZB00321	GENERIUM JSC	Controle de liberação	3 amostras
8	ZB00421	GENERIUM JSC	Controle de liberação	3 amostras
9	II-050120	CJSC LEKKO	Controle de liberação	3 amostras
10	II-060121	CJSC LEKKO	Controle de liberação	3 amostras

### 2.2. Condições de armazenamento

De acordo com a documentação regulatória	Condições reais de armazenamento	Conformidade
Máx -18 ° C	- 20 ° C	Sim / Não
2 a 8 ° C	-	Sim / Não

## 3. Protocolo de teste de controle

### 3.1 Equipamento de teste de controle

Equipamento	Número de série.	Status do equipamento O uso é aprovado
Incubadora de CO <sub>2</sub>	200260003	Sim / Não
Unidade de fluxo laminar classe II / tipo A2	221.120.00.3652	Sim / Não
Dosímetro de volume variável de 20-200 mL.	39282545	Sim / Não
Dosímetro de volume variável de 100-1000 mL.	39382220	Sim / Não

### 3.2 Reagentes e materiais auxiliares usados em testes de controle

Reagente / material auxiliar	número de referência / número de OL / número de registro	Número do lote	Validade
Placas de cultura de 60 mm com monocamada de células A549 (10 pcs)	*	Passagem nº 16	*
Meio de cultura DMEM 1x (sem soro)	N 128	-	14.01.21
Cubra meio cultural DMEM 2x (OVER) (para A549)	N 129	-	14.01.21
Cubra a solução de ágar a 2%	N 130	-	14.01.21
Corante vermelho neutro 100x	N 97	-	06.04.21
Amostra de controle positivo Ad5-RCA, título $3,0 \cdot 10^9$ PFU / mL	-	040320	01.10.2023
pipetas sorológicas, 5 mL, estéreis, graduadas, embaladas individualmente	-	27520061	08.10.2023

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página2 de 12
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 2	11.01-21.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. Componente de segurança específico do parâmetro de teste de controle II.</b>	

pipetas sorológicas, 10 mL, estéreis, graduadas, embaladas individualmente	-	0032004	14.01.21
Tubos Falcon, 50 mL	-	J1922390	28.09.25
Tubos Eppendorf, 1,5 mL	-	J191482M	28.07.28

### 3.3 Preparação da caixa para o trabalho

Controle de preparação de caixa	A limpeza está concluída	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
	O tratamento UV está concluído	Sim / Não

### 3.4 Preparação de reagentes

Número do item	Requisitos SOP	O requisito é atendido
1	Aqueça o meio cultural DMEM 1x (sem soro), cubra o meio DMEM 2x (OVER) a $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
2	Derreta a solução de ágar a 2% da cobertura	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
3	Prepare tubos de 1,5 mL	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não

### 3.5 Procedimento

Número do item	Requisitos SOP	O requisito é atendido
1	A monocamada celular nos placas de cultura deve ser de 70 a 90% (homogênea, sem 'buracos' e agregados celulares)	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não

#### 3.5.1 Preparação de uma série de diluições de 10x de amostras de controle

1	Para cada lote analisado, deixe os frascos com o material de teste em temperatura ambiente. Combine o conteúdo.	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
2	Prepare oito tubos de 1,5 mL para cada amostra de teste, rotule cada dois tubos da maneira seguinte: $(10^{-1})$ diluição; $(10^{-2})$ diluição; $(10^{-3})$ diluição; $(10^{-4})$ diluição	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
3	Prepare quatro diluições de 10x de cada amostra de teste em duas iterações de diluição de $10^{-1}$ to $10^{-4}$ (150 µl de amostra + 1350 µl de meio sem soro)	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não

#### 3.5.2 Preparando uma amostra de controle positivo

1	Prepare tantos tubos de 1,5 mL quanto corresponder à ordem de titulação do PCS. Rotule de acordo.	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
2	Prepare diluições de 10x de PCS de $10^{-1}$ a $10^{-9}$ (primeira diluição: 20 µl de PCS + 180 µl de meio sem soro; então - 150 µl de amostra + 1350 µl de meio sem soro)	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não

#### 3.5.3 Transferência de diluições (de PCS e amostras de teste) para placas de cultura

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página3 de 12
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 2	11.01-21.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. Componente de segurança específico do parâmetro de teste de controle II.</b>	

Número do item	Requisitos SOP	O requisito é atendido
1	Rotule os placas de cultura com uma monocamada de células da maneira seguinte: C- - controle de monocamada PCS - $10^{-7}$ PCS - $10^{-8}$ PCS - $10^{-9}$ Para cada amostra de teste: Experiência $10^{-2}$ (duas placas) Experiência $10^{-3}$ (duas placas) Experiência $10^{-4}$ (duas placas)	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
2	Adicionar 1 ml de meio de crescimento sem soro à placa de controle em monocamada (controle negativo)	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
3	Adicione a amostra de teste começando pela maior diluição. Agite o conteúdo do tubo (diluição $10^{-4}$ ) da primeira iteração e adicione 1 mL ao prato cultural. Da mesma forma, adicione a segunda diluição de iteração.	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
4	Da mesma forma, adicione as diluições $10^{-3}$ e $10^{-2}$ .	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
5	Da mesma forma, adicione cada amostra de teste de acordo com os itens 3-4	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
6	Agite o conteúdo do tubo (diluição $10^{-9}$ ), adicione 1 mL ao prato de cultura. Da mesma forma, adicione as diluições $10^{-8}$ e $10^{-7}$ .	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
7	Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ com $(5,0 \pm 0,5)\%$ de CO <sub>2</sub> por 4-6 horas. Começa às <u>11<sup>35</sup></u> ; Termina-se às <u>16<sup>15</sup></u>	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
8	Prepare um meio de cobertura. Para 10 placas: adicione 25 mL de meio de cultura de cobertura DMEM 2x (OVER) e 25 mL de solução de ágar 2% em um tubo estéril de 50 mL. Misture cuidadosamente o conteúdo com uma pipeta evitando a formação de bolhas.	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
9	Remova o meio de diluição das placas. Transfira o meio de cobertura para as placas da maneira seguinte: placas com controle negativo → placas com diluições de amostras de teste, começando com a diluição mais baixa → placas com controle positivo. Despeje lentamente, ao longo da parede, 5 mL de meio de cobertura em cada prato.	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
10	Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ com $(5,0 \pm 0,5)\%$ de CO <sub>2</sub> por 3 dias.	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
Executivo		[assinatura] Goldovskaya P.P.
Data <u>11.01.2021</u>		
11	Adicione 5 mL de meio a cada uma das placas de acordo com os itens 7-8. Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ com $(5,0 \pm 0,5)\%$ de CO <sub>2</sub> por 3 dias.	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
Executivo		[assinatura] Goldovskaya P.P.
Data <u>14.01.2021</u>		
12	Adicione 5 mL de meio a cada uma das placas de acordo com os itens 7-8. Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ com $(5,0 \pm 0,5)\%$ de CO <sub>2</sub> por 2-3 dias.	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página4 de 12
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 2	11.01-21.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. Componente de segurança específico do parâmetro de teste de controle II.</b>	

Número do item	Requisitos SOP	O requisito é atendido
Executivo	[assinatura]	Goldovskaya P.P.
Data <u>17.01.2021</u>		
<b>3.5.4 Coloração de monocamada de células com corante vermelho neutro</b>		
1	Prepare meio nutricional de cobertura tingida. Misture em um tubo de 50 mL 15 mL de meio de cobertura DMEM 2x, 13,2 mL de solução de ágar 2% e 1,8 mL de solução de corante vermelho neutro.	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
2	Adicione 3 mL de meio de cobertura tingido a cada prato	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
3	Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a (37 ± 1) ° C com (5,0 ± 0,5)% de CO <sub>2</sub> por 24 horas. Os resultados devem ser registrados nos dias 9-10.	<input checked="" type="radio"/> Sim / Não
Executivo	[assinatura]	Goldovskaya P.P.
Data <u>20.01.2021</u>		
<b>3.5.5 Registrando os resultados</b>		
1	Os resultados do controle devem ser registrados, desde que não haja degeneração da monocamada celular na placa de Petri com o controle negativo.	
2	Ao tingir em vermelho neutro, a monocamada de células vivas torna-se avermelhada enquanto as placas aparecem como manchas redondas não coradas. As placas devem ser contadas visualmente nas diluições das amostras onde não se fundem. Insira os resultados na Tabela 1.1.	
3	Os resultados dos testes de controle devem ser registrados se apenas placas individuais forem observáveis em placas de PCS com diluição de 10 <sup>-9</sup> , com seu número aumentando proporcionalmente nas diluições subsequentes (10 <sup>-8</sup> e 10 <sup>-7</sup> ).	
<b>3.5.6 Procedimento de cálculo</b> (Excel pode ser usado para cálculos)		
1	Determine o número médio de placas (em 2 placas) para cada diluição.	$n_{i\text{av}} = n_{i1} + n_{i2}$
2	Determine o número de partículas adenovirais recombinantes (RCA) para cada diluição em que as placas foram detectadas	onde $N_i = [(n_{i\text{av}} \times 10^{-a}) / V] \times 0,5$ , onde $n_{i\text{av}}$ - número médio em 2 placas; a - diluição do medicamento, mL; V - volume de solução adicionado por placa, mL; 0,5 - volume de uma dose de vacina, mL.
3	Calcule a média aritmética dos resultados para cada diluição	$N_{av} = (N_i + N_{i+1}) / 2$ , onde $N_i$ ; $N_{i+1}$ - número de RCA para cada diluição 2 - Número de iterações

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página5 de 12
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 2	11.01-21.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. Componente de segurança específico do parâmetro de teste de controle II.</b>	

#### 4. Resultados do teste de controle

Data de registro de resultados 21.01.2021

Tabela 1.1 Registro de resultados

Preparando a amostra de teste	Número de placas		Número médio de placas em duas iterações	Número de adenovírus competentes para replicação por dose
	1ª placa de cultura	2ª placa de cultura		
Controle negativo		-	-	-
<b>Amostra de controle positivo</b>				
Diluição 10 <sup>-7</sup>	> 200	-	-	-
Diluição 10 <sup>-8</sup>	12	-		
Diluição 10 <sup>-9</sup>	1	-		
<b>1. Lote: II-10121</b>	<b>BINNOPHARM</b>			
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	Menos de 50 / dose
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>2. Lote: II-20121</b>	<b>BINNOPHARM</b>			
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	Menos de 50 / dose
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>3. Lote II-010120</b>	<b>Pharmstandard-UfaVITA OJSC</b>			
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	Menos de 50 / dose
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>4. Lote II-020120</b>	<b>Pharmstandard-UfaVITA OJSC</b>			
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	Menos de 50 / dose
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>5. Lote II-030120</b>	<b>Pharmstandard-UfaVITA OJSC</b>			
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	Menos de 50 / dose
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>6. Lote II-040120</b>	<b>Pharmstandard-UfaVITA OJSC</b>			
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	Menos de 50 / dose
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>7. Lote ZB00321</b>	<b>GENERIUM JSC</b>			
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	Menos de 50 / dose
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>8. Lote ZB00421</b>	<b>GENERIUM JSC</b>			
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	Menos de 50 / dose
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>9. Lote II-050121</b>	<b>CJSC LEKKO</b>			

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCEM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página6 de 12
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 2	<u>11.01-21.01.2021</u>
<b>Gam-COVID-Vac. Componente de segurança específico do parâmetro de teste de controle II.</b>	

Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	Menos de 50 / dose
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>10. Lote II-060121</b>	<b>CJSC LEKKO</b>			
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		

Estimativa

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página 1 de 9
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 3 _____	18.01-28.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. Componente de segurança específico do parâmetro de teste de controle II.</b>	

1. Data do teste de controle \_\_ 18 \_\_ de janeiro \_\_\_\_ de 2021

## 2. Informações sobre o material de teste

### 2.1. Fundo:

Número do item	Nº de lote	Fabricado por	Uso pretendido	Quantidade a ser testada
1	II-050121	Pharmstandard-UfaVITA OJSC	Controle de liberação	3 amostras
2	II-060121	Pharmstandard-UfaVITA OJSC	Controle de liberação	3 amostras
3	II-070121	Pharmstandard-UfaVITA OJSC	Controle de liberação	3 amostras
4	II- 30121	BINNOPHARM	Controle de liberação	3 amostras
5	ZB00521	GENERIUM JSC	Controle de liberação	3 amostras
6	II-070121	CJSC LEKKO	Controle de liberação	3 amostras
7				
8				
9				
10				

### 2.2. Condições de armazenamento

De acordo com a documentação regulatória	Condições reais de armazenamento	Conformidade
Máx -18 ° C	-20 ° C	Sim / Não
2 a 8 ° C	-	Sim Não

## 3. Protocolo de teste de controle

### 3.1 Equipamento de teste de controle

Equipamento	Número de série.	Status do equipamento O uso é aprovado
Incubadora de CO <sub>2</sub>	200260003	Sim Não
Caixa laminar classe II / tipo A2	221.120.00.3652	Sim Não
Dosímetro de volume variável de 20-200 mL.	39282545	Sim Não
Dosímetro de volume variável de 100-1000 mL.	39382220	Sim Não

### 3.2 Reagentes e materiais auxiliares usados em testes de controle

Material reagente / auxiliar	número de referência / número de OL / número de registro	Número do lote	Validade
Placas de cultura de 60 mm com monocamada de células A549 (10 pcs)	*	Passagem nº 18	*
Meio de cultura DMEM 1x (sem soro)	Nº 2	-	11.02.21
Cubra meio cultural DMEM 2x (OVER) (para A549)	Nº 4	-	11.02.21
Cubra a solução de ágar a 2%	Nº 5	-	11.02.21
Corante vermelho neutro 100x	Nº 97	-	06.04.21
Amostra de controle positivo Ad5-RCA, título 3,0 · 10 <sup>9</sup> PFU / mL	-	040320	03.2021
pipetas sorológicas, 5 mL, estéreis, graduadas, embaladas individualmente	-	27520061	01.10.23

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página 2 de 9
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 3	18.01-28.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. Componente de segurança específico do parâmetro de teste de controle II.</b>	

pipetas sorológicas, 10 mL, estéreis, graduadas, embaladas individualmente	-	0329004	28.10.23
Tubos Falcon, 50 mL	-	J1922390	28.09.25
Tubos Eppendorf, 1,5 mL	-	J191482M	28.07.28

### 3.3 Preparação da caixa para o trabalho

Controle de preparação de caixa	A limpeza está concluída	<input type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não
	O tratamento UV está concluído	<input checked="" type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não

### 3.4 Preparação de reagentes

Número do item	Requisitos SOP	O requisito é atendido
1	Aqueça o meio cultural DMEM 1x (sem soro), cubra o meio DMEM 2x (OVER) a $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$	<input checked="" type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não
2	Derreta a solução de ágar a 2% da cobertura	<input checked="" type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não
3	Prepare tubos de 1,5 mL	<input checked="" type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não

### 3.5 Procedimento

Número do item	Requisitos SOP	O requisito é atendido
1	A monocamada celular nos placas de cultura deve ser de 70 a 90% (homogênea, sem 'buracos' e agregados celulares)	<input checked="" type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não

#### 3.5.1 Preparação de uma série de diluições de 10x de amostras de controle

1	Para cada lote analisado, deixe os frascos com o material de teste em temperatura ambiente. Combine o conteúdo.	<input checked="" type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não
2	Prepare oito tubos de 1,5 mL para cada amostra de teste, rotule cada dois tubos da maneira seguinte: $(10^{-1})$ diluição; $(10^{-2})$ diluição; $(10^{-3})$ diluição; $(10^{-4})$ diluição	<input checked="" type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não
3	Prepare quatro diluições de 10x de cada amostra de teste em duas iterações de diluição de $10^{-1}$ to $10^{-4}$ (150 µl de amostra + 1350 µl de meio sem soro)	<input checked="" type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não

#### 3.5.2 Preparando uma amostra de controle positivo

1	Prepare tantos tubos de 1,5 mL quanto corresponder à ordem de titulação do PCS. Rotule de acordo.	<input checked="" type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não
2	Prepare diluições de 10x de PCS de $10^{-1}$ a $10^{-9}$ (primeira diluição: 20 µl de PCS + 180 µl de meio sem soro; então - 150 µl de amostra + 1350 µl de meio sem soro)	<input checked="" type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não

#### 3.5.3 Transferência de diluições (de PCS e amostras de teste) para placas de cultura

1	Rotule os placas de cultura com uma monocamada de células da maneira seguinte: C- - controle de monocamada PCS - $10^{-7}$ PCS - $10^{-8}$ PCS - $10^{-9}$ Para cada amostra de teste: Experiência $10^{-2}$ (duas placas) Experiência $10^{-3}$ (duas placas) Experiência $10^{-4}$ (duas placas)	<input checked="" type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não
2	Adicionar 1 ml de meio de crescimento sem soro à placa de controle em monocamada (controle negativo)	<input checked="" type="radio"/> Sim / <input type="radio"/> Não

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página3 de 9
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 3	18.01-28.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. Componente de segurança específico do parâmetro de teste de controle II.</b>	

Número do item	Requisitos SOP	O requisito é atendido
3	Adicione a amostra de teste começando pela maior diluição. Agite o conteúdo do (diluição 10 <sup>4</sup> ) tubo da primeira iteração, adicione 1 mL na placa de cultura. Da mesma forma, adicione a segunda diluição de iteração.	<input checked="" type="radio"/> Não
4	Da mesma forma, adicione as diluições 10 <sup>-3</sup> e 10 <sup>-2</sup> .	<input checked="" type="radio"/> Não
5	Da mesma forma, adicione cada amostra de teste de acordo com os itens 3-4	<input checked="" type="radio"/> Não
6	Agite o conteúdo do tubo (diluição 10 <sup>-9</sup> ), adicione 1 mL na placa de cultura. Da mesma forma, adicione as diluições 10 <sup>-8</sup> e 10 <sup>-7</sup> .	<input checked="" type="radio"/> Não
7	Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a (37 ± 1) ° C em uma atmosfera com (5,0 ± 0,5)% de CO <sub>2</sub> por 4-6 horas. Começa às 12 <sup>00</sup> ; Termina-se às 17 <sup>00</sup>	<input checked="" type="radio"/> Não
8	Prepare um meio de cobertura. Para 10 placas: adicione 25 mL de meio de cultura de cobertura DMEM 2x (OVER) e 25 mL de solução de ágar 2% em um tubo estéril de 50 mL. Misture cuidadosamente o conteúdo com uma pipeta evitando a formação de bolhas.	<input checked="" type="radio"/> Não
9	Remova o meio de diluição das placas. Transfira o meio de cobertura para as placas da maneira seguinte: placas com controle negativo → placas com diluições de amostras de teste, começando com a diluição mais baixa → placas com controle positivo. Despeje lentamente, ao longo da parede, 5 mL de meio de cobertura em cada prato.	<input checked="" type="radio"/> Não
10	Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a (37,0 ± 1,0) ° C com (5,0 ± 0,5)% de CO <sub>2</sub> por 3 dias.	<input checked="" type="radio"/> Não

Executivo [assinatura] Goldovskaya P.P.

Data 18.01.2021

11	Adicione 5 mL de meio a cada uma das placas de acordo com os itens 7-8. Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a (37,0 ± 1,0) ° C com (5,0 ± 0,5)% de CO <sub>2</sub> por 3 dias.	<input checked="" type="radio"/> Não
----	---	--------------------------------------

Executivo [assinatura] Goldovskaya P.P.

Data 21.01.2021

12	Adicione 5 mL de meio a cada uma das placas de acordo com os itens 7-8. Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a (37,0 ± 1,0) ° C com (5,0 ± 0,5)% de CO <sub>2</sub> por 2-3 dias.	<input checked="" type="radio"/> Não
----	---	--------------------------------------

Executivo [assinatura] Goldovskaya P.P.

Data 24.01.2021

### 3.5.4 Coloração de monocamada de células com corante vermelho neutro

1	Prepare meio nutricional de cobertura tingida. Misture em um tubo de 50 mL 15 mL de meio de cobertura DMEM 2x, 13,2 mL de solução de ágar 2% e 1,8 mL de solução de corante vermelho neutro.	<input checked="" type="radio"/> Não
2	Adicione 3 mL de meio de cobertura tingido a cada prato	<input checked="" type="radio"/> Não
3	Incubar as placas em uma incubadora de CO <sub>2</sub> a (37 ± 1) ° C com (5,0 ± 0,5)% de CO <sub>2</sub> por 24 horas. Os resultados devem ser registrados nos dias 9-10.	<input checked="" type="radio"/> Não

Executivo [assinatura] Goldovskaya P.P.

Data 27.01.2021

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página 4 de 9
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 3 _____	18.01-28.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. Componente de segurança específico do parâmetro de teste de controle II.</b>	

Número do item	Requisitos SOP	O requisito é atendido
<b>3.5.5 Registrando os resultados</b>		
1	Os resultados do controle devem ser registrados, desde que não haja degeneração da monocamada celular na placa de Petri com o controle negativo.	
2	Ao tingir em vermelho neutro, a monocamada de células vivas torna-se avermelhada enquanto as placas aparecem como manchas redondas não coradas. As placas devem ser contadas visualmente nas diluições das amostras onde não se fundem. Insira os resultados na Tabela 1.1.	
3	Os resultados dos testes de controle devem ser registrados se apenas placas individuais forem observáveis em placas de PCS com diluição de $10^{-9}$ , com seu número aumentando proporcionalmente nas diluições subsequentes ( $10^{-8}$ e $10^{-7}$ ).	
<b>3.5.6 Procedimento de cálculo (Excel pode ser usado para cálculos)</b>		
1	Determine o número médio de placas (em 2 placas) para cada diluição.	$n_{i\text{av}} = n_{i1} + n_{i2}$
2	Determine o número de partículas adenovirais recombinantes (RCA) para cada diluição em que as placas foram detectadas	onde $N_i = [(n_{i\text{av}} \times 10^a) / V] \times 0,5$ , onde $n_{i\text{av}}$ - o número médio de áreas de placa em 2 placas; $a$ - diluição do medicamento, mL; $V$ - volume de solução adicionado por placa, mL; $0,5$ - volume de uma dose de vacina, mL.
3	Calcule a média aritmética dos resultados para cada diluição	$N_{av} = (N_i + N_{i+1}) / 2$ , onde $N_i$ ; $N_{i+1}$ - número de RCA para cada diluição 2 - número de iterações

Agência Medgamal, FSBI NF Gamaleya NRCEM do Ministério da Saúde da Rússia	SOP.15.650.01-F.01
Divisão: Departamento de controle biológico e de processo	Página 5 de 9
Tipo de documento: Folha de teste de controle nº 3	18.01-28.01.2021
<b>Gam-COVID-Vac. Componente de segurança específico do parâmetro de teste de controle II.</b>	

#### 4. Resultados do trabalho de controle

Data de registro de resultados: 28.01.2021

Tabela 1.1 Registro de resultados

Preparando a amostra de teste	Número de placas		Número médio de placas em duas iterações	Número de adenovírus competentes para replicação por dose
	1ª placa de cultura	2ª placa de cultura		
Controle negativo		-	-	-
<b>Amostra de controle positivo</b>				
Diluição 10 <sup>-7</sup>	> 200	-		
Diluição 10 <sup>-8</sup>	20	-		
Diluição 10 <sup>-9</sup>	2	-		
<b>1. Lote II-050121 Pharmstandard-UfaVITA OJSC</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>2. Lote II-060121 Pharmstandard-UfaVITA OJSC</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>3. Lote II-070121 Pharmstandard-UfaVITA OJSC</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>4. Lote II-30120 BINNOPHARM</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>5. Lote ZB00521 JSC GENERIUM</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		
<b>6. Lote II-040120 CJSC LEKKO</b>				
Diluição 10 <sup>-2</sup>	0	0	0	<i>Menos de 50 / dose</i>
Diluição 10 <sup>-3</sup>	0	0		
Diluição 10 <sup>-4</sup>	0	0		

Estimativa