

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA.
GABINETE DO MINISTRO.

PORTARIA Nº 713, DE 12 DE NOVEMBRO DE 1995.

O Ministro de Estado, da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, no uso da atribuição que lhe confere o artigo 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o que dispõe o Decreto-lei n.º 467, de 13 de fevereiro de 1969, regulamentado pelo Decreto n.º 1.662, de 6 de outubro de 1995, e o que consta do Processo n.º 21000.004183/95-10, resolve:

Art. 1º. Aprovar as Instruções anexas a esta Portaria, que versam sobre Normas de Produção, Controle e Emprego de Vacinas contra a Febre Aftosa.

Art. 2º. Esta Portaria entra em vigor 60 (sessenta) dias após a data de sua publicação, ficando revogada a Portaria Ministerial n.º 533, de 22 de outubro de 1993.

José Eduardo de Andrade Vieira
Ministro da Agricultura, do Abastecimento,
e da Reforma Agrária.

ANEXO - NORMAS PARA PRODUÇÃO, CONTROLE E EMPREGO DE VACINAS CONTRA FEBRE AFTOSA.

**ESTE TEXTO NÃO SUBSTITUI O PUBLICADO NO DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO DE 07/11/1995,
SEÇÃO 1,
PÁGINA 17760.**

Copyright © 2003 - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação de Info
Dúvidas e sugestões devem ser encaminhadas para o e-mail: sislegis@agricultura.gov.br

ANEXO

NORMAS PARA PRODUÇÃO, CONTROLE E EMPREGO DE VACINAS CONTRA FEBRE AFTOSA.

I - DISPOSIÇÃO PRELIMINAR

Visando estabelecer e compatibilizar os procedimentos para produção, controle e uso de vacinas contra febre aftosa, serão adotados os seguintes critérios:

1. DA PRODUÇÃO

1.1. Instalações: Para efeito da fabricação de produtos biológicos os estabelecimentos devem atender integralmente o disposto na legislação vigente.

1.2. Responsabilidade Técnica: Os responsáveis pela elaboração da vacina deverão ser médicos veterinários especializados com a devida apresentação de documentos que permitam julgar sua especialização e de seu eventual substituto, os quais deverão acompanhar todas as etapas de elaboração e controle do produto.

1.3. Controle de Elaboração: Todas as fases de produção e controle serão registradas em protocolos específicos, os quais deverão acompanhar o produto na ocasião da colheita de amostra e remessa ao laboratório de controle. O fabricante deverá comunicar ao Serviço local de Sanidade Animal com antecedência mínima de dez dias do início da elaboração da partida, bem como a data do seu término.

1.4. Amostras de Vírus: As partidas de vacinas serão elaboradas a partir das amostras de vírus devidamente estabelecidas pelo Departamento de Defesa Animal, em função da situação epidemiológica prevalente.

2. DOS PROCESSOS DO CONTROLE DE QUALIDADE

2.1. Prova de ELISA por Competição Fase Líquida (CFL)

2.1.1. Princípio: O título 50% em ELISA por Competição em Fase Líquida (CFL) com anticorpos policlonais de um soro frente ao vírus da febre aftosa, está definido pela recíproca da diluição deste soro, expresso em log base 10, que proporciona a leitura de Densidade Ótica (DO) igual a 50% da média das DO obtidas no controle do antígeno.

2.1.2 - Material

a) Bovinos: Os bovinos com 18 a 24 meses de idade homogêneos, com peso mínimo de 200kg, homogêneos, em bom estado sanitário e de nutrição, que não tenham sido previamente vacinados contra a febre aftosa, nem haver padecido da enfermidade e cujos soros não possuam anticorpos anti via e neutralizantes para os vírus da febre aftosa, quarentenados por trinta dias antes de serem submetidos à vacinação, sob supervisão dos técnicos da CGLA/DDA/SDA.

2.1.3. Métodos

a) Vacinação: Os bovinos são vacinados com uma dose de 5,0ml. Serão utilizados 30 bovinos na 1ª etapa de controle. Havendo uma 2ª etapa, serão acrescentados mais 16 bovinos.

b) Sangria: Os bovinos serão sangrados no momento da vacinação (dia zero) e aos 28 dias após a vacinação (28 DPV). Uma vez separado o soro, este será inativado a 56°C, sendo então congelado durante 30 minutos até o momento do uso.

c) Diluição dos Soros: Todos os soros (bovinos vacinados, bovinos controles, controle positivo e controle negativo) serão diluídos em PBS e serão realizadas diluições de base 5, iniciando-se pela diluição 1:2 até a diluição 1:6250.

d) Inoculação das Placas:

1) Soro Problema: para o soro problema serão utilizadas 2 cavidades de uma placa para cada diluição de cada soro de 28 DPV (bovinos vacinados e bovinos controles);

2) Soro Controle Positivo: para o soro controle positivo colocar cada diluição em uma cavidade de cada placa;

3) Soro Controle Negativo: para o soro controle negativo colocar cada diluição em uma cavidade de cada placa;

4) Controle do Antígeno: para o controle do antígeno colocar em sua diluição de uso, em 12 cavidades de cada placa;

5) Controle do Branco - o branco será constituído por todos os componentes de prova menos o antígeno e soros (problemas e controles). Serão usadas 12 cavidades de cada placa para este controle;

6) Leitura das Placas - as placas deverão ser lidas em espectrofotômetro de placas, com filtro de 492 nm, subtraindo o valor da média das densidades óticas do branco de todas as leituras.

e) Cálculo do Título do Soro: O título 50% de ELISA, por Competição em Fase Líquida (CFL) com anticorpos policlonais, de um soro frente ao vírus de febre aftosa está definido pela recíproca da diluição deste soro, expresso em logo base 10, que proporciona uma leitura em espectrofotômetro (492 nm) igual a 50% da média das DO obtidas no controle do antígeno.

f) Controle de Qualidade da Prova: A prova é considerada válida quando na inspeção visual não for constatada nenhuma anormalidade e após a leitura, todos os controles de prova (antígeno, soro positivo, soro negativo e brancos), apresentem resultados que estejam contidos dentro das especificações estabelecidas por suas respectivas cartas de controle.

g) Transformação em Expectativa Percentual de Proteção: Os títulos de ELISA (CFL) dos soros dos bovinos são transformados em Expectativa Percentual de Proteção (EPP). Calcular para cada vacina, a média das EPP (MEPP). A seguir, calcular o Limite Inferior de 95% de Confiança (LIC) unilateral, segundo a fórmula:

$$LIC = MEPP - 1,64 \sqrt{\frac{EPP(100 - EPP)}{n}}$$

Onde:

MEPP - Média das EPP

n - Número de bovinos

1,64 - Abscissa da curva normal para 95% de confiança (unilateral).

2.1.4 - Critérios para julgamento dos resultados

a) Interpretação da 1ª Etapa (utilizando-se 30 bovinos):

1. uma partida de vacina é aprovada quando o LIC da média da EPP for igual ou superior a 75%;
2. uma partida de vacina é reprovada quando o LIC da média da EPP for inferior a 69%;
3. uma partida de vacina é submetida a inspeção dupla por amostragem quando na primeira etapa de controle, o LIC da média da EPP for menor que 75% e igual ou maior que 69%.

b) Interpretação da 2ª etapa (com incorporação de mais 16 bovinos):

1. os títulos obtidos são transformados em EPP. Calcular uma nova média das EPP acumuladas (primeira etapa mais segunda etapa de controle) e o novo LIC para esta nova média;

2. uma vacina é aprovada quando o LIC da média da EPP (primeira mais segunda etapa de controle) for igualou maior que 75%;
3. uma vacina é reprovada quando o LIC da média da EPP (primeira mais segunda etapa do controle) for menor que 75%.

2.2. Proteção à Generalização Podal em Bovinos

2.2.1. Princípios: Está representado pelo número de bovinos protegidos, a doze semanas, após a vacinação.

2.2.2. Material

a) Bovinos: Os bovinos com 18 a 24 meses de idade homogêneos, com peso mínimo de 200kg, homogêneos, em bom estado sanitário e de nutrição, que não tenham sido previamente vacinados contra a febre aftosa, nem haver padecido da enfermidade e cujos soros não possuam anticorpos anti-via e neutralizantes para os vírus da febre aftosa; quarentenados por trinta dias antes de serem submetidos à vacinação, sob supervisão dos técnicos da CGLA/DDA/SDA.

b) Vírus Desafio: São vírus de origem bovina, provenientes de epitélio lingual, conservados em nitrogênio líquido, sob a forma de suspensões virulentas monovalentes fracionadas. Estas suspensões devem ser tipificadas, tituladas e subtipificadas por fixação do complemento. Ademais devem ser tituladas em bovinos e camundongos lactentes. Devem, também possuir as doses infectantes 50% bovinos (DI 50% bovinos) necessárias para realizar a prova. As amostras de desafio serão fornecidas pelo MAARA aos laboratórios produtores de vacina 60 dias antes da introdução nos testes de eficiência. Em casos excepcionais a(s) amostra(s) dever(ão) ser entregue(s) com antecedência de 120 dias.

2.2.3 - Métodos

a) Sangria de Bovinos: Os bovinos deverão ser sangrados no momento exato da vacinação (dia zero) e a intervalos de quatro semanas até o término da prova. Os soros deverão ser mantidos congelados até o momento da realização das provas sorológicas.

b) Vacinação: A dose vacinal é de 5ml, cuja via de aplicação será de acordo com as indicações do produto. Para as provas de desafio a doze semanas, serão utilizados 17 bovinos e 3 testemunhos. Em cada teste poderá ser incluída uma vacina de referência.

c) Inoculação dos Bovinos: Após doze semanas 16 bovinos e 2 testemunhos serão inoculados com uma diluição de vírus desafio, que contenha 10.000 doses infectantes 50% (10.000 DI 50% bovinos) com 0,2ml, por via intradermolingual, em 2 pontos no volume de 0,1ml por ponto.

d) Leitura: A leitura é realizada após sete dias da inoculação do vírus desafio. Todos os bovinos serão examinados e anotadas as lesões linguais e podais. Um bovino é considerado protegido quando não apresentar lesões de febre aftosa em nenhuma das patas.

2.2.4. Critério de Julgamento dos Resultados de Proteção à Generalização Podal (PGP Bovinos)

a) Interpretação:

1. uma partida de v.acina será considerada aprovada quando obtiver no mínimo 12 bovinos protegidos dos 16 desafiados (mínimo de 75% de proteção à generalização podal);

2. uma partida de vacina ser considerada reprovada, sem direito a contra prova, quando obtiver resultado igualou inferior a 6 bovinos protegidos dos 16 bovinos desafiados (37,50% de proteção à generalização podal);

3. será concedida somente uma contraprova para a partida de vacina, que obtiver entre 7 e 11 bovinos protegidos de 16 bovinos desafiados (entre 43,75% e 68,75% de Proteção à Generalização Podal). Os critérios de julgamento serão os mesmos indicados no item 2.2.4 letra "a. 1. Será considerada reprovada a partida de vacina que obtiver resultado igualou inferior a 11 bovinos protegidos dos 16 desafiados, podendo ser incluída uma vacina de referência.

2.3. Proteção à Generalização Podal em Suínos

2.3.1 – Princípio: Está representado pelo número de suínos protegidos a doze semanas após a vacinação.

2.3.2 - Material

a) Suínos: Os suínos desmamados com idade de 45 a 60 dias, homogêneos, em bom estado sanitário e de nutrição, provenientes de mães não vacinadas e de granjas sem histórico de enfermidade e de vacinação contra a Febre Aftosa.

b) Vírus Desafio: Os vírus desafio devem ser os mesmos utilizados nas provas de PGP Bovino.

2.3.3 - Métodos

a) Vacinação: A dose vacinal é de 3ml e a via de aplicação de acordo com a indicação do produto. Serão utilizados 17 suínos vacinados e 5 controles.

b) Inoculação dos Suínos: Após doze semanas de vacinação, os 16 suínos vacinados e os testemunhos serão inoculados com uma diluição da suspensão virulenta que contenha 10.000 doses infectantes 50% Bovino (DI 50% Bovino) por 0,4ml por via intraplantar em 2 pontos com 0,2ml da suspensão por ponto.

c) Leitura: A leitura será cinco dias após a inoculação do vírus desafio. Todos os suínos serão examinados e anotadas as lesões linguais e podais. Um suíno é considerado protegido quando não apresentar lesões de Febre Aftosa em nenhuma das patas.

2.3.4. Critérios de Julgamento dos Resultados de Proteção à Generalização Podal (PGP Suínos)

a) Interpretação:

1) uma partida de vacina será considerada aprovada quando obtiver no mínimo 12 suínos protegidos de 16 inoculados (mínimo de 75% de proteção à generalização podal);

2. uma partida de vacina será considerada reprovada, sem direito a contra prova, quando obtiver resultado igualou inferior a 6 (seis) suínos protegidos dos 16 (dezesesseis) suínos inoculados (37,50% de proteção à generalização podal);

3. será concedida somente uma contraprova para partida que obtiver entre 7 e 11 suínos protegidos dos 16 inoculados (entre 43,75% e 68,75% de proteção à generalização podal). Os critérios de julgamento serão os mesmos indicados no item 2.3.4 letra "a.1" Será considerada reprovada, a partida que obtiver resultado igual ou inferior a 11 suínos protegidos dos 16 inoculados.

2.4. Controle de Estabilidade Térmica da Vacina Oleosa: Avalia-se a estabilidade das vacinas oleosas sob a influência da temperatura. Dois frascos de vacina serão mantidos a 37°C durante 20 dias. A presença da fase aquosa no fundo do frasco significa quebra de emulsão e a partida de vacina é considerada reprovada.

2.5. Controle de Esterilidade: O controle de esterilidade através da utilização de métodos microbiológicos usuais tem por objetivo avaliar a presença de microorganismos viáveis no produto distribuído.

2.5.1. Procedimento Analítico

a) A amostra será constituída de cinco frascos de cada apresentação, da mesma partida, tomados ao acaso e testada sob forma de "pool" por apresentação.

b) Vacinas oleosas ou com avridine: transferir 2ml de cada recipiente para frascos contendo 90ml de solução aquosa a 5% de "teepol" ou "tween" 80 estéril. Agitar até que se obtenha homogeneização completa (quebra de emulsão), Vacinas com hidróxido: transferir 2ml de cada recipiente para frascos contendo 90ml de água peptonada a 0,1% e homogeneizar.

Paralelamente, transferir alíquotas de 2ml de cada recipiente para 2 frascos estéreis, os quais deverão ser mantidos sob refrigeração até quinze dias após a emissão dos resultados para uma eventual contraprova.

c) Semear 5ml da vacina diluída conforme item 2.5.1 letra "b", em quatro tubos de cada meio de cultura em concentração 1,5 vez.

d) Selar os tubos de caldo de carne cozida, com vaselina em pasta estéril, evitando-se a formação e/ou a presença de bolhas de ar no meio de cultura.

e) Incubar os tubos semeados, equitativamente entre 35°C a 37°C e a 22°C em estufa BOD.

f) A verificação de crescimento nos tubos deve ser feita no prazo de vinte e um dias. Durante este período devem ser realizadas observações de três em três dias. É comum o aparecimento de turbidez em grau variável nos meios inoculados com vacinas adicionadas de avridine e em menor grau com vacinas oleosas.

g) Caldo de carne cozida que apresentar turvação com ou sem produção de gás, deve ser repicado em placas contendo agar cérebro coração ou agar tripticase soja, em duplicata, e incubadas em aerobiose e anaerobiose na temperatura do tubo de origem, por 48 horas.

h) Os tubos de caldo "Sabouraud" que apresentarem turvação devem ser repicados em placas contendo agar cérebro coração ou agar tripticase soja e agar batata glicosado ou agar "sabouraud" e incubados na temperatura do tubo de origem por até 96 horas.

i) Os tubos de caldo tioglicolato que apresentarem turvação devem ser repicados em placas agar cérebro coração ou agar tripticase soja e incubadas na temperatura dos tubos de origem por 48 horas.

2.5.2 - Critérios para emissão de resultados

a) Os resultados obtidos nas análises somente serão válidos quando todos os procedimentos de garantia da qualidade analítica apresentarem resultados compatíveis;

b) Quando o controle de qualidade analítica mostrar alguma falha, medidas corretivas adequadas devem ser tomadas imediatamente e uma amostra da mesma apresentação e partida deverá ser analisada segundo o critério estabelecido no item 2.5.1. letra "a", desconsiderando-se os resultados obtidos com a amostra anterior;

c) A partida será considerada negativa quando nenhum tubo semeado apresentar confirmação de crescimento bacteriano nos meios sólidos utilizados. O resultado será expresso como: Negativo;

d) A apresentação será considerada positiva quando os resultados de controle analíticos forem compatíveis e ocorrer crescimento em um ou mais tubos, confirmados em meios sólidos. O resultado será expresso como Positivo para aquela apresentação em uma ou mais provas (especificadas pelos Códigos 001 a 006):

- 001 - Aeróbios a 35° - 37°C
- 002 - Aeróbios a 22°C
- 003 - Anaeróbios a 35° - 37°C
- 004 - Anaeróbios a 22°C
- 005 - Fungos a 35° - 37°C
- 006 - Fungos a 22°Ce)

e) Será concedida contraprova no prazo de até quinze dias contados da emissão do resultado, quando será reanalisado o "pool" mantido pelo laboratório, conforme item 2.5.1. letra "b";

f) Após a contraprova da apresentação que mostrou contaminação, esta será considerada Negativa quando nenhum tubo apresentar crescimento.

2.6. Controle de inocuidade: A vacina contra a febre aftosa não deve produzir qualquer manifestação patológica.

2.6.1. Controle de vírus infectante: A presença de vírus infectante na partida de vacina é investigada utilizando-se cultivos celulares, camundongos lactentes ou bovinos.

a) Cultivos Celulares:

1. Método: O antígeno eluído e concentrado será inoculado em garrafas de "Roux" com monocamadas de células BHK21 clone 13 e/ou células IBRS2. As células deverão ser observadas por 48 horas e previamente à inoculação o meio de crescimento será substituído por 80ml de meio de manutenção. Serão realizadas três passagens e em cada uma são utilizadas três garrafas inoculadas e uma controle. Os volumes de inóculo serão de 1ml na 1ª passagem, 3ml na 2ª passagem e 5ml na 3ª passagem. A colheita de cada garrafa é feita desprezando-se 50% do meio e congelando-se o restante. A 2ª e 3ª passagens são feitas de garrafa a garrafa, a partir dos antígenos descongelados das passagens anteriores. O tempo de incubação é de 24 horas para a 1ª passagem e de 48 horas para as demais. Todas as passagens são incubadas a 37°C. Os cultivos celulares das três passagens serão examinados por fixação de complemento.

2. Interpretação: A prova será considerada válida, quando a mono camada das garrafas controles das três passagens apresentarem aspecto normal durante toda a prova;

A partida de vacina será liberada quando as garrafas das três passagens não apresentarem efeito citopático, nem for detectado vírus por fixação de complemento.

b) Camundongos Lactentes:

1. Método: Serão utilizados animais, branco suíço de 5-7 dias de idade.

2. Interpretação: Considera-se que uma partida de vacina estará livre de vírus residual ativo quando não morrer nenhum camundongo na primeira inoculação ou quando o antígeno preparado com os camundongos mortos, for negativo na fixação de complemento e não for infeccioso na reinoculação.

c) Bovinos:

1. Método: Os bovinos devem ser maiores de 8 meses de idade que atendam as condições descritas no item 2.1.2 letra "a". Para cada partida da vacina serão utilizados no mínimo 5 bovinos.

Cada bovino será inoculado por via intradermolingual em dois pontos com 0,10ml de inóculo por ponto e deverão ser observados diariamente durante dez dias.

2. Interpretação: A partida de vacina será considerada livre de vírus ativo quando os bovinos não apresentarem lesões de febre aftosa:

2.6.2. Controle de tolerância: Este controle visa também a observar reações locais e outros efeitos colaterais. Também deverão ser realizadas inspeções veterinárias e exames anatomo-patológicos em animais vacinados e revacinados quando se considere necessário.

a) Matérias-Primas: Os estabelecimentos produtores de vacinas deverão realizar o controle de qualidade nos aspectos físico-químicos e biológicos das matérias-primas utilizadas na elaboração da vacina contra a febre aftosa: matérias-primas oleosas (mineral/vegetal), emulsificante, hidróxido de alumínio e adjuvantes. Os estabelecimentos produtores deverão manter amostras representativas dos componentes relacionados no item anterior utilizadas na produção da vacina por lote de matéria-prima, até o seu vencimento. A matéria-prima utilizada deverá estar dentro do prazo de validade do produto acabado.

b) Provas de Bovinos a Campo: Os estabelecimentos produtores deverão realizar o controle biológico de tolerância para cada partida a campo, paralelamente aos testes do Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária, e comunicar ao Serviço de Sanidade Animal (SSA) o programa com: identificação dos animais, local, data e hora da realização da prova com antecedência mínima de dez dias. A prova terá duração de 28 dias e deverá finalizar em dia útil.

1. Método: Para cada partida de vacina serão utilizados dez bovinos de no mínimo doze meses de idade em bom estado sanitário. Os animais utilizados serão homogêneos dentro de suas respectivas faixas etárias, em bom estado sanitário e de nutrição, e deverão ter identificação individual.

A dose e via de aplicação deverão ser de acordo com o aprovado no registro. O produto que for indicado para mais de uma via de aplicação será submetido à prova nas diferentes vias.

A leitura deverá ser realizada durante 28 dias. Deverão ser realizadas no mínimo cinco leituras, a primeira às 48 horas, a segunda às 96 horas, a terceira aos 7 dias, a quarta aos 14 dias e a quinta aos 28 dias.

2 - Interpretação: A partida da vacina não poderá apresentar reações indesejáveis. Consideram-se reações indesejáveis para efeito desta prova: morte, torção e rigidez do pescoço, sintomas nervosos, transtornos da locomoção e nódulos em que a média das áreas do grupo seja igualou superior a 45,0cm² até o 14º dia pós-vacinação. Caso isso não ocorra, uma nova leitura deverá ser efetuada no 28º dia.

3. Da Colheita das Amostras de Partidas para Controle

A colheita deverá ser efetuada de acordo com as normas específicas, atendendo ainda aos seguintes itens:

3.1. Qualquer partida de vacina produzida e apresentada ao controle oficial para fins de comercialização, não deverá ter volume inferior em número de doses, a 50% de seu lote comercial.

3.2 - Quando for enviada ao controle oficial duas ou mais partidas de um mesmo laboratório em um só teste, cada uma destas não deverá ter número de doses inferior a 70% do lote comercial da indústria em questão.

4 - Da Comunicação dos Resultados e Outros Procedimentos:

De acordo com os procedimentos constantes das normas específicas.

II. Disposições Gerais

1. A contra prova será concedida conforme a legislação vigente.

2. As provas de registro ou alteração serão concedidas de acordo com a disponibilidade no calendário de testes.

3. O prazo de validade comercial das vacinas contra febre aftosa é de no máximo 24 meses a partir da data da primeira inativação. Os antígenos incorporados ao produto devem ter sido inativados no máximo sessenta dias antes do envase.

4. O volume por dose de vacina é de 5ml para bovinos e bubalinos. A vacinação deverá ser efetuada até os quatro meses de idade, revacinando-se os primo-vacinados noventa dias após e daí em diante de 6 em 6 meses, até a idade de dois anos.

Após dois anos revacinar de doze em doze meses.

5. A vacinação massiva e sistemática não é obrigatória para as espécies suína, ovina e caprina.

No caso de vacinação emergencial ou estratégica, o esquema será determinado pelo Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, e o volume por dose para as referidas espécies será de 3ml.

6. Os animais que eventualmente não tenham sido submetidos a esse esquema de vacinação, somente poderão ser vacinados anualmente após terem sido vacinados no mínimo por quatro semestres consecutivos.

7. A utilização do esquema de vacinação descrito no item 4 permite que bovino com idade superior a dois anos aumente o período de imunidade para um ano.

8. Os resultados dos controles de qualidade oficial serão divulgados através da Imprensa.

9. No caso de vacinas associadas à vacina contra febre aftosa, deverá ser obedecido o previsto nesta Norma, não excluindo os itens específicos de cada norma de produção e controle.

10. Em se tratando de novos registros ou de partidas iniciais, o produto será submetido inicialmente à prova direta (PGP).