

## **PORTARIA N.º 24, DE 17 DE JANEIRO DE 1980**

O Ministro de Estado da Agricultura, no uso das atribuições que lhe confere o artigo 86 do regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal aprovado pelo Decreto n.º 24548, de 03 de julho de 1934 e de acordo com o artigo 19 do Decreto n.º 80831 de 28 de novembro de 1977, combinado com o regimento Interno da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária – SNAD, aprovado pela Portaria n.º 241, de 10 de março de 1979,

### **RESOLVE:**

I – Aprovar as Normas anexas, elaboradas pelo Secretário Nacional de Defesa Agropecuária, a serem observadas na produção, controle e emprego da vacina contra a Bronquite Infecciosa.

II – Determinar que esta Portaria entrará em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário.

Ângelo Amaury Stabile

## **NORMAS PARA A PRODUÇÃO, CONTROLE E EMPREGO DE VACINAS CONTRA A BRONQUITE INFECCIOSA**

### **1 - DA PRODUÇÃO**

#### **1.1. Instalações**

Para efeito de fabricação de vacinas, os laboratórios devem atender integralmente o disposto na legislação vigente.

#### **1.2. Responsabilidade Técnica**

Os laboratórios produtores, oficiais e particulares disporão, como Responsável Técnico e Substituto de Médicos Veterinários especializados, devidamente credenciados no órgão competente do Ministério da Agricultura, mediante apresentação de documentos que permitam julgar sua especialização. O responsável Técnico ou seu Substituto deverá participar de todas as etapas de elaboração e controle do produto.

1.3. Todas as fases de produção e controle serão registradas em protocolos específicos, devendo ser comunicado ao Serviço de Defesa Sanitária Animal –SDSA, da Delegacia Federal da Agricultura – DFA, do estado correspondente, com antecedência mínima de 10 (dez) dias, o início da elaboração da partida bem como a data do seu término.

#### **1.4. Origem dos ovos utilizados**

Os ovos empregados na fabricação e controle da vacina deverão ser livres de patógenos específicos (SPF).

### 1.5. Origem das aves utilizados nas provas

As aves empregadas nos testes de controle de vacinas devem ser procedentes de plantéis livres de bronquite infecciosa (BI), comprovados por teste de soroneutralização.

## **2 – DAS VACINAS**

### 2.1. Amostras de vírus

Serão utilizadas na profilaxia da Bronquite infecciosa vacinas preparadas com amostras indicadas pelo Setor competente do Ministério da Agricultura, ficando vedada a utilização de quaisquer outras amostras de vírus. As vacinas somente serão produzidas da 1ª a 5ª passagem a partir da amostra semente.

### 2.2. Apresentação e Conservação

A vacina deve ser apresentada sob a forma liofilizada, devendo ser conservada à temperatura entre 2 e 8°C.

### 2.3. Prazo de Validade

O prazo de validade das vacinas, será, no máximo, de 15 meses a contar da data de sua fabricação, consideradas a partir da liofilização do produto.

### 2.4. Duração de imunidade e esquema de vacinação

Constarão das respectivas bulas, previamente aprovadas na SDSA/DIPROD.

## **3 – DOS PROCESSOS DE CONTROLE DAS VACINAS**

Somente poderão ser utilizadas as vacinas previamente submetidas aos processos de controle, mediante a realização das seguintes provas e respectivos critérios, para efeito de liberação do produto.

### 3.1. Controle de Elaboração

#### 3.1.1. Identificação e controle do vírus semente e suspensão virulenta

a) provas de esterilidade para *Mycoplasma* e *Salmonella* em meios apropriados ao crescimento desses germes. Prova de esterilidade para outras bactérias e fungos;

b) prova de identificação da amostra, realização da prova de vírus neutralização e título da semente;

c) prova de verificação da patogenicidade amostra em embriões (patógenos estranhos).

#### 3.1.2. Conservação das amostras sementes

As amostras de vírus devem ser conservadas em temperatura de pelo menos 40°C abaixo de zero, a fim de preservar as suas características.

#### 4 – Controle de Qualidade

##### 1.2.1. Prova de Esterilidade

###### a) Bactérias e Fungos

Para cada partida de vacina serão testados cinco (5) frascos, reidratados com seu próprio diluente ou água destilada estéril, na proporção de 3,0 ml para cada 100 doses.

De cada frasco reconstituído se inoculam duas (2) placas de Petri com o correspondente a 10 doses vacinais por placa, adicionando-se 20 ml de meio específico (Ágar de infusão de cérebro e coração), incubando-se posteriormente um placa à 37°C por 7 dias e outra à temperatura ambiente por 14 dias, admitindo-se para efeito de aprovação da partida, no máximo uma colônia de germes apatógenos por dose vacinal.

###### b) *Mycoplasma*

A vacina é diluída na proporção de 3,0 ml em meio específico para *Mycoplasma*, para 100 doses e semeada na seguinte seqüência:

A – Meio líquido PPLO – 3 dias a 17°C

B – Ágar PPLO com indicador de crescimento

A incubação por 37°C é realizada com alta umidade de 4 a 6% CO<sub>2</sub>. O exame é feito 10 a 14 dias após. Ocorrendo crescimento de colônia a vacina é reprovada. Paralelamente devem ter realizadas as provas de controle positivo e negativo.

###### c) *Salmonella*

A vacina é diluída em 3,0 ml de água destilada estéril para 100 doses, e semeada na seguinte seqüência:

A – Pré enriquecimento

5 a 10 ml da vacina previamente diluída são semeados em 100 ml de caldo lactosado e incubados por 24 horas a 37°C.

B – Enriquecimento

O material da prova anterior é semeado em meios de enriquecimento; Kauffmann, Tetrationsato, Selenito (modificação de Osborne) e incubados por 24 a 48 horas a 37°C.

C – Meios Seletivos

Podem ser usados o Ágar SS (Salmonella-Shigella) Mac Conkey, Teague, Kristensea. A incubação é por 24 a 48 horas a 37°C, qualquer crescimento implica na reprovação da vacina.

##### 3.2.2. Detecção de patógenos estranhos

###### a) Inoculação em embriões

A vacina é diluída na proporção de 3,0 ml de água destilada para cada 100 doses.

Após a reconstituição, um (1) volume é misturado a nove (9) volumes de soro específico contra a Bronquite Infecciosa, estéril, instivado pelo calor.

Inocula-se 0,2 ml dessa mistura em 20 ovos embrionados de 9 a 11 dias de idade, sendo 10 inoculados na membrana corioalantóide e 10 no saco alantóide.

No mínimo 18 embriões devem sobreviver 24 horas após inoculação para que a prova tenha validade.

Os embriões mortos depois de 24 horas da incubação são examinados. Não encontrando-se a causa da morte efetua-se inoculações a partir desses embriões.

No final de 7 dias, todos os embriões são examinados não devendo ocorrer anormalidades atribuíveis à vacina.

Em casos de resultados inconclusivos procede-se a repetição da prova.

Após a repetição, continuando a apresentar resultados inconclusivos, efetua-se a prova em aves.

#### b) Incubação em aves

A vacina será reidratada na proporção de 3,0 ml de água destilada estéril, para cada 100 doses. Serão utilizados no mínimo, 25 pintos susceptíveis do mesmo lote e idade em torno de 15 a 20, em bom estado de saúde os quais serão imunizados, no mínimo 14 dias antes do início do teste, com vacina contra 81 previamente testada e aprovada nos vários controles. Essas aves são divididas em 05 grupos e inoculados com 10 doses vacinais, da seguinte forma.

- Grupo A – 5 aves pela via subcutânea;
- Grupo B – 5 aves por via intratraqueal;
- Grupo C – 5 aves por via ocular;
- Grupo D – 5 aves, escarificação da crista;
- Grupo E – controle.

Todas as aves serão observadas por 21 dias, quanto às doenças septicêmicas, respiratórias, epiteloma e outras condições patológicas.

Se os controles morrem ou adoecem, o teste estará prejudicado, em caso contrário, ocorrendo distúrbios patológicos ou mortes entre os vacinados, a partida será reprovada.

#### c) Verificação de vírus hemaglutinante

Após a reidratação da vacina em 3,0 ml de água destilada para cada 100 doses, são feitas inoculações de 0,2 ml na cavidade alantóica de 10 embriões de 9 a 10 dias de idade. Após 3 a 5 dias será retirada uma amostra de líquido alantóico de cada embrião vivo ou morto. É realizado a prova Hemaglutinação. Serão utilizados controle positivo e negativo. A vacina contendo atividade hemaglutinante será reprovada.

#### 3.2.2. Inocuidade

Serão utilizados no mínimo 50 pintos susceptíveis do mesmo lote e idade (com 5 dias ou menos de vida) sendo 25 inoculados por via ocular com 10 doses vacinais e o restante inoculados com água destilada estéril pela mesma via e dose. O período de observação será de 21 dias. Sintomas respiratórios severos ou mortes, nos pintos vacinados e testemunhos serão computados como insucessos, sendo admissíveis até 2 (dois) insucessos, para tanto de liberação do produto. Caso ocorra 3 (três) insucessos a prova será repetida nas mesmas condições descritas anteriormente, admitindo-se somente 2 (dois) insucessos para que a partida seja considerada aprovada.

#### 4. Prova de Potência

##### a) Titulação do vírus

Toda partida de vacina será titulada usando-se, para cada diluição, pelo menos 5 embriões com 10 dias de incubação. Inocula-se 0,2 ml via corioalantóide e desprezam-se os embriões mortos nas primeiras 24 horas pós inoculação.

O teste só será válido, se no mínimo, 4 embriões, para cada diluição, sobreviverem às 24 horas. Os embriões serão examinados do 5º ao 9º dia após inoculação considerando-se positivos aqueles que evidenciarem lesões típicas do vírus da BI e presença de vírus revelada por imunofluorescência.

A vacina deve conter não menos de  $10^{3.5}$  DIE 50 de vírus por dose, até o final do seu prazo de validade indicado pelo produtor, e não menos que  $10^{2.5}$  DIE 50 por dose vacinal, após a realização da prova de Estabilidade Térmica que consiste na determinação do título infeccioso, mantendo-se a vacina em temperatura de 37°C durante 7 (sete) dias.

##### b) Prova de Eficiência

Será aferida, no mínimo, uma partida em cada passagem, realizada a partir da amostra semente. Serão utilizadas 20 aves ou mais, susceptíveis, do mesmo lote e idade, em bom estado de saúde, com 3 a 4 semanas de vida, metade das quais vacinadas segundo recomendações constante da bula. Três a quatro semanas após a vacinação, todas as aves (vacinadas e controle) deverão ser inoculadas por via nasal ou ocular, com a amostra desafio, previamente indicada pelo M.A. de modo que cada uma receba  $10^3 - 10^{3.5}$  DIE 50.

Entre o 4º e o 5º dia após o desafio, “swabs” são colhidos da traquéia de cada ave e colocados, individualmente, em tubos contendo 2 ml de caldo triptose fosfato, previamente tratados com antibióticos. Os tubos são agitados vigorosamente, podendo ser congelados, preferentemente à temperatura de 4°C abaixo de zero, até o momento do uso. O líquido contido em cada tubo será testado para presença de vírus da BI, através inoculação de 0,2 ml na cavidade alantóide de ovos com 10 dias de incubação, usando-se pelo menos 5 ovos embrionados por “swab”. Todos os embriões sobreviventes, no 3º dia, serão usados para avaliação do produto. Entretanto, se um “swab” é representado por menos de 4 embriões, o teste para este “swab” será invalidado.

Um resultado positivo será indicado pela presença, em 20 ou mais de embriões inoculados, de morte e lesões típicas do vírus da BI (nanismo, enrolamento dos embriões e depósitos de gratos nos rins) entre o 4º e 5º dia após inoculação.

Se as lesões forem constatadas em menos de 20% dos embriões, 5 ou mais ovos embrionados serão inoculados com o fluido alantóico de cada um dos embriões suspeitos. A apresentação de 20% ou mais desses embriões com lesões típicas e/ou presença de vírus revelada por imunofluorescência, confirma a recuperação de vírus do “swab”.

A vacina será aprovada se no mínimo 80% dos “swabs” traqueais das aves vacinadas forem negativos para recuperação de vírus da BI e se 80% ou mais “swabs” tomados de aves testemunhos, evidenciarem a presença do vírus.

#### 3.2.5. Prova de Esterilidade do diluente

Dez amostras de cada partida, colhidas ao acaso, serão assim testados: 1,0 ml será retirado de cada frasco e semeado em meio de tioglicolato (12 ml). Uma bateria de 10 tubos dos quais, metade será incubada à 37°C e os demais à temperatura ambiente, por 5 dias.

Durante o curso dos testes descritos não poderá haver evidência de organismos contaminantes.

#### 3.2.6. Umidade residual

Será tolerada no máximo 3% de umidade, verificada pelos métodos convencionais.

#### 3.2.7. Vácuo

O vácuo deve ser satisfatório, pesquisável através do detector de vácuo.

### **4 – DISPOSIÇÕES GERAIS**

4.1. As vacinas deverão ser apresentadas ao controle oficial para efeito de liberação com fins comerciais, como produto acabado em embalagem comercial e acompanhadas dos respectivos protocolos de produção e controle.

4.2. Os testes realizados pelo laboratório oficial de controle serão custeados pelo laboratório produtor, de acordo e as instruções específicas a serem baixadas pelo órgão competente do Ministério da Agricultura.

4.2.1. Enquanto não forem baixadas as referidas instruções, os laboratórios produtores ficarão comprometidos a fornecer os animais necessários à realização das diversas provas e custear a sua manutenção no decorrer das mesmas, bem como outros materiais indispensáveis.

4.3. Mediante comunicação do órgão competente do Ministério da Agricultura, a partida da vacina será liberada para fins comerciais ou inutilizadas pelo referido órgão.

4.4. Cada partida de vacina corresponderá a uma liofilização deverá conter, no mínimo, 1.000.000 (um milhão) de doses.

4.5. As dúvidas e casos omissos serão resolvidos pela Secretaria de Defesa Sanitária Animal – SDSA, que baixará instruções complementares quando necessário.

(Publicada no DOU de 17/01/80)