

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 12, DE 29 DE JANEIRO DE 2004

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA SUBSTITUTO, DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 15, inciso II, do Anexo I do Decreto nº 4.629, de 21 de março de 2003, o art 4º, da Portaria Ministerial nº 516, de 9 de dezembro de 1997, tendo em vista o disposto na Instrução Normativa SDA nº 51, de 27 de junho de 2003, e o que consta do Processo nº 21000.000039/2004-39, resolve:

Art. 1º Estabelecer os REQUISITOS DE QUALIDADE PARA O CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE LABORATÓRIOS PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO MORMO por meio da técnica de Fixação do Complemento, com seus respectivos procedimentos e anexos.

Art. 2º O credenciamento a que se refere o art. 1º será concedido a Laboratórios Públicos para inquéritos sorológicos oficiais, trânsito e vigilância em casos de foco e a Laboratórios Privados apenas para o trânsito de animais. Além dessas aplicações, o Departamento de Defesa Animal - DDA poderá estabelecer outras que se fizerem necessárias.

Art. 3º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

RUI EDUARDO SALDANHA VARGAS

ANEXO

REQUISITOS DE QUALIDADE PARA CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE LABORATÓRIOS PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO MORMO

1. OBJETIVO: Estabelecer os requisitos de qualidade para que o laboratório seja credenciado pela Coordenação de Laboratório Animal - CLA, do Departamento de Defesa Animal - DDA.

2. APLICAÇÃO: Aplicam-se aos laboratórios públicos e privados, limitados às necessidades do DDA no que se refere a número e localização geográfica e que atendam aos requisitos estabelecidos por esta Instrução Normativa.

3. MATERIAL:

3.1. Antígeno:

3.1.1. Só poderão ser utilizados antígenos (Ag) e soros controles registrados no MAPA ou importados mediante a autorização do MAPA, observado o prazo de validade.

3.2. Insumos de Referência:

- Complemento
- Hemolisina
- Hemácia de Carneiro a 2%
- Antígeno de Mormo
- Soro Controle Positivo Alto

- Soro Controle Positivo Baixo
- Soro Controle Negativo
- Kit reagente e padrão cianometahemoglobina

O suprimento destes insumos está a cargo de cada laboratório credenciado.

3.3. Amostra a ser analisada: soro sanguíneo de eqüídeos.

4. RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS:

4.1. As amostras deverão estar devidamente identificadas e acondicionadas sob refrigeração;

4.2. As amostras deverão estar acompanhadas de formulário de requisição e resultado de exame conforme modelo (Anexo III).

4.2.1. Os laboratórios credenciados públicos receberão amostras acompanhadas também dos formulários indicados pelo DDA, para os casos de vigilância epidemiológica da enfermidade.

4.3. As amostras serão registradas em livro próprio, diariamente, conforme modelo estabelecido pela CLA (Anexo IV).

4.4. As amostras serão obrigatoriamente divididas em duas alíquotas de volumes iguais, suficientes para a realização dos exames de prova e contraprova.

4.5. A tarjeta de identificação da contraprova (Anexo V) será preenchida e lacrada juntamente com as amostras para contraprova; o lacre será plástico, numerado e inviolável.

5. CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM:

5.1. A amostra a ser analisada deverá ser conservada, no máximo 7 (sete) dias, sob refrigeração e congelada após este período.

5.2. As amostras deverão ser estocadas em congelador a - 20° C, por 30 (trinta) dias para análise de contraprova.

6. SEGURANÇA BIOLÓGICA

6.1. Recomenda-se a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) durante a realização das atividades laboratoriais.

6.2. Por serem as amostras classificadas no grupo A de resíduos sólidos ([Resolução do Conselho Nacional de Meio Ambiente nº 5, de 5 de agosto de 1993](#), publicada no Diário Oficial da União nº 166, de 31 de agosto de 1993), as mesmas deverão ser autoclavadas a 120°C (cento e vinte graus Celsius) por 30 (trinta) minutos com 1 (uma) libra de pressão antes do descarte. Deverão ser respeitadas as normas vigentes de biossegurança.

7. RESULTADOS E RELATÓRIO:

7.1. Os resultados dos exames deverão ser emitidos em formulários próprios, segundo item 4.2 da presente Instrução Normativa (IN) e de acordo com o fluxograma determinado.

7.1.1. Resultado POSITIVO: Imediata e exclusivamente comunicado ao Serviço/Seção/Setor de Sanidade Animal (SSA) da Delegacia Federal de Agricultura (DFA) da Unidade Federativa onde se encontra o animal reagente, que deverá comunicar, oficialmente, ao interessado. A DFA local poderá determinar que a comunicação seja feita diretamente ao órgão executor.

7.1.2. Resultado NEGATIVO: Será comunicado ao médico veterinário que assinou o pedido de exame e/ou ao interessado.

7.2. Todo laboratório credenciado deverá encaminhar, até o quinto dia útil do mês subsequente, relatório das atividades mensais ao SSA da DFA onde se localiza o laboratório e à CLA, conforme Anexo IV, independente de terem sido ou não realizadas as análises.

7.3. Somente poderá assinar o formulário de resultado do exame e o Relatório Mensal o responsável técnico ou seu substituto.

8. DO LABORATÓRIO:

8.1. O laboratório deverá possuir instalações, equipamentos, vidrarias, utensílios e soluções adequadas para a realização da prova de Fixação do Complemento.

8.2. As instalações deverão obedecer a um fluxo operacional adequado ao desenvolvimento das atividades propostas.

9. INSTALAÇÕES:

9.1. Protocolo: Sala destinada ao recebimento das amostras, registro, expedição dos resultados e arquivo dos mesmos.

9.2. Sala de exame: Neste local, as amostras serão processadas, devendo estar provido de bancada impermeável e resistente à desinfecção, fontes de eletricidade suficientes e adequadas ao perfeito funcionamento dos equipamentos e paredes com superfície lavável.

9.3. Sala de lavagem e esterilização: Deverá estar provida de fontes de eletricidade, tanques ou pias que permitam a lavagem e esterilização do material utilizado na realização da prova de diagnóstico.

As paredes devem estar revestidas com superfície lavável.

10. DO RESPONSÁVEL TÉCNICO E SUBSTITUTO

10.1. O(s) responsável(is) técnico(s) deverá(ão) estar habilitado(s) para a realização da prova pelo protocolo estabelecido pela CLA nesta IN.

10.2. Para efeito de credenciamento e monitoramento do laboratório, o(s) responsável(is) técnico(s) será(ão) submetido(s) a auditorias técnicas com acompanhamento do ensaio no próprio laboratório, realizadas por auditores pertencentes à rede da CLA.

10.2.1. Como alternativa, serão realizadas provas de habilitação nas unidades da rede de laboratórios da CLA/MAPA, com critérios e cronograma, por ela definidos.

11. REALIZAÇÃO DOS EXAMES DE CONTRAPROVA

11.1. A realização de contraprova somente será efetuada no laboratório realizador do exame.

11.2. A solicitação deverá ser feita (Anexo VI), pelo interessado, no prazo máximo de 8 (oito) dias a contar da data do recebimento do resultado.

11.3. A contraprova será solicitada diretamente ao SSA/DFA da UF onde se encontra o animal reagente. O SSA da DFA comunicará ao laboratório responsável pelo exame, agendando data e horário da realização do exame da contraprova, podendo o técnico deste serviço assistir, fiscalizar e observar o resultado.

11.4. A ausência do representante do SSA/DFA não constitui óbice para a realização do mesmo, desde que tenha sido observado o disposto no item anterior.

11.5. As amostras destinadas a contraprova deverão ser mantidas por um período mínimo de 30 (trinta) dias após a emissão do resultado para eventual solicitação do MAPA.

11.6. Cabe ao interessado ou ao médico veterinário requisitante do exame de contraprova apenas assistir e observar a exatidão do resultado do(s) exame(s).

11.7. O resultado da contraprova será emitido em novo formulário de requisição e resultado de exame de MORMO e encaminhado de acordo com o fluxograma estabelecido no item 7.1.

11.7.1. Identificar como exame de contraprova, no campo observações do formulário, o número de lacre e número do registro do exame anterior.

11.8. A desistência do médico veterinário requisitante do exame ou seu representante, mediante declaração escrita ou sua ausência na realização do exame de contraprova, implicará na prevalência do resultado obtido no exame anterior.

12. DOCUMENTOS NECESSÁRIOS PARA CREDENCIAMENTO:

12.1. Solicitação de credenciamento emitida pelo representante legal da firma;

12.2. Formulário de Cadastro de Laboratório preenchido;

12.3. Currículo vitae resumido do responsável técnico e/ou do substituto (atividades relacionadas ao credenciamento);

12.4. Declaração do CRMV da jurisdição de que está inscrito regularmente, está em dia com suas obrigações e não responde a processo ético, do responsável técnico e/ou do substituto;

12.5. Cópia da carteira de registro profissional no CRMV do responsável técnico e/ou do substituto.

12.6. Documentos relativos à habilitação dos responsáveis técnicos (titular e substituto): certificado de habilitação expedido pelo MAPA e relatório da auditoria realizada pela CLA.

12.7. Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica, atualizado;

12.8. Planta baixa ou croqui do laboratório com a localização dos equipamentos necessários ao credenciamento;

12.9. Cópia da licença de funcionamento, atualizada, expedida pela Autoridade Sanitária competente local, explicitando as atividades para as quais o laboratório está habilitado.

12.10. Autorização de funcionamento, emitida por autoridade maior, no caso de Instituição de ensino e/ou pesquisa;

12.11. Manuais da Qualidade e Manuais de Procedimentos Técnicos;

12.12. Declaração do responsável técnico e substituto(s), formalizando ter conhecimento da legislação em vigor, para o credenciamento e monitoramento de laboratórios para o diagnóstico do Mormo;

12.13. Relação dos funcionários envolvidos nas análises objeto do credenciamento, vínculo e carga horária.

Obs:

1) No caso de responsável técnico e/ou substituto em laboratório de terceiros, os documentos de solicitação deverão ser expedidos pelo proprietário, dirigente e/ou responsável técnico.

2) No caso em que a prova de habilitação for realizada no momento da vistoria, toda a documentação acima solicitada deverá ser entregue ao auditor responsável pela vistoria, que a encaminhará à unidade responsável pelo credenciamento.

I - PROCEDIMENTOS

1. INTRODUÇÃO

Fixação do Complemento consiste em um método de diagnóstico sorológico de eleição para o mormo, por se tratar de um teste com alta sensibilidade e especificidade, segundo a OIE.

Esta técnica detecta quase que exclusivamente anticorpos IgG1, que são específicos da infecção. Um anti-soro teste é titulado em diluição seriada e uma quantidade fixa de antígeno é adicionada a cada poço. Se o anticorpo estiver presente no anti-soro, formam-se complexos imunes. O complemento é então adicionado à solução.

Nesta etapa, antígeno, soro teste e complemento estão reagindo juntos.

Se os complexos estiverem presentes, o complemento é ativado, sendo fixado e consumido. Na etapa final da reação, as células indicadoras (eritrócitos), juntamente com uma quantidade subaglutinante de anticorpo (anticorpo antieritrócito) são adicionados à mistura.

Se houver qualquer complemento remanescente, estas células serão lisadas; se o complemento tiver sido consumido na etapa dois pelos complexos imunes, as células não serão lisadas devido a quantidade insuficiente de complemento presente na solução. A quantidade de complemento utilizada é apenas suficiente para lisar as células indicadoras se absolutamente nada do complemento for consumido.

Os controles adequados são de fundamental importância neste método porque algumas preparações de anticorpos consomem complemento sem adição de antígeno, por exemplo, soros que já contém complexos imunes. Alguns antígenos também podem apresentar atividade anticomplementar. Portanto, os controles devem incluir somente anticorpo e somente antígeno para verificar que nenhum destes esteja, por si só, fixando complemento. O resultado do teste de Fixação do Complemento é baseado no percentual de hemólise dos eritrócitos sensibilizados.

2. EQUIPAMENTOS

Agitador de microplacas

Autoclave

Balança

Banho-maria: 58 °C

Banho-maria: 62 °C

Banho-maria: 37 °C

Centrífuga (900 x g) para tubos de 15 mL

Centrífuga (900 x g) para tubos de 50 mL

Centrífuga Refrigerada (900 x g)*

Destilador

Espectrofotômetro digital (alcance 540 nm)

Espelho leitor *

Estufa bacteriológica: 37 °C

Freezer: -70 °C *

Refrigerador

Potenciômetro

Relógio marcador de tempo - até 60 minutos

Vortex

(*) equipamentos opcionais

3. VIDRARIA E UTENSÍLIOS

Cuba para banho de gelo, com aproximadamente 44x30x08cm

Cubetas para reagentes

Estante para tubos de ensaio

Gaze

Microplaca em fundo U, com 96 poços

Papel de filtro retangular

Papel contato ou alumínio

Papel milimetrado di-Log

Pipeta monocal de 100 a 1000 µl

Pipeta multicanal de 10 a 200 µl

Pipetas de vidro de 1 mL

Pipetas de vidro de 10 mL

Pipetas de vidro de 2 mL (escala 1:10)

Pipetas de vidro de 2 mL (escala 1:100)

Pipetas de vidro de 5 mL

Pipetador automático ou pêra

Ponteiras para pipetas automáticas, descartáveis.

Provetas de 100 mL

Tubos cônicos milimetrado de 15 mL (para centrífuga)

Tubos cônicos de 50 mL (para centrífuga)

Tubos de ensaio 13 x 150 mm

Tubos de ensaio 18 x 180 mm

Tubos de ensaio 10 x 70 mm

Tubos de ensaio 10 x 50 mm

Balão fundo chato 250 e 1000 mL

Erlenmeyer 50 mL, 250 mL e 1000 mL

4. SOLUÇÕES

Solução Concentrada de Trietanolamina ou Veronal

Solução de Trabalho de Trietanolamina ou Veronal

Água Destilada

II - RECEPÇÃO E PREPARO DE AMOSTRAS

O teste de Fixação de Complemento detecta anticorpos apenas no soro. Plasma não é aceitável para este teste. O soro deve ser de boa qualidade e livre de contaminação bacteriana e excesso de hemólise. As amostras devem estar devidamente identificadas nos tubos com o nome ou número do animal. Estas amostras devem ser remetidas, refrigeradas ou congeladas, quando centrifugadas, e acondicionadas em caixa de isopor com gelo.

As amostras testes e o soro controle (positivo alto, baixo e negativo) serão diluídos na proporção de 1:5 em solução de trabalho (125 µl soro + 500µl).

Amostras de eqüinos e os controles devem ser inativados em banho-maria a 58 °C por 35 minutos. Amostras de muas, asininos e éguas prenhes serão inativados a 62,5 °C por 35 minutos. Remover as amostras após o período de inativação, deixar em temperatura ambiente, se for imediatamente testados ou guardar em temperatura de 4 °C, por um período máximo de 24 horas.

Preparação e Lavagem das Células Sangüíneas Vermelhas (RBCs)

Determinar o volume de hemácia requerido para a suspensão de 2%:

Para preparação do padrão de cor, são necessários 12,0 mL de RBCs 2%;

Determinar se a titulação de hemolisina é necessária. Se for, aumentar o volume requerido para 36,0 mL de RBCs 2%;

Para a titulação do complemento, aumentar o volume para 12,0 mL;

Para o teste diagnóstico, adicionar 2,0 mL para titulação do soro e 1,2 mL para cada soro no teste de screening;

Calcular o volume total de RBCs 2%, requerido de acordo com a etapa seguinte:

- 1 - Desprezar o sobrenadante (Alserver). Lavar a hemácia com diluente 3 (três) vezes.
 - 2 - Filtrar o sangue preservado em gaze estéril dentro de um tubo de centrífuga de 50 mL, adicionar solução de trabalho e centrifugar a 900 x g por 10 minutos.
 - 3 - Remover o sobrenadante por sucção. Adicionar solução trabalho ao tubo, mixar gentilmente por inversão, ressuspensão a hemácia e recentrifugar a 900 x g por 10 minutos.
 - 4 - Cuidadosamente, remover o sobrenadante e leucócitos por sucção. Adicionar solução de trabalho para ressuspender a hemácia e transferir para um tubo de centrífuga volumétrico de 15 mL.
- Mixar gentilmente e recentrifugar como no passo anterior.
- 5 - Inspeccionar a coloração do sobrenadante. Se colorido, descartar a hemácia e repetir o procedimento inicial com nova hemácia.
 - 6 - Cuidadosamente remover o sobrenadante por sucção sem destruir as células. Observar o volume final de hemácia.
 - 7 - Calcular a quantidade de diluente para ressuspensão da hemácia.

Para cada 1 mL de hemácia compactada, adicionar 34 mL de diluente.

- 8 - Padronização da Hemácia a 2%:

Ligar o espectrofotômetro antecipadamente, conforme instruções do fabricante. Cuidadosamente, pipetar 1,0 mL da suspensão de hemácia dentro de um frasco volumétrico contendo 25 mL de solução de Drabkin. Mixar bem invertendo 10 vezes para lisar as células. Calibrar o aparelho com o padrão de cianometahemoglobina, com comprimento de onda de 540 nm. Calcular o volume final da suspensão de célula usando a seguinte fórmula:

Diluir a suspensão com o diluente na quantidade encontrada.

Reagente e Padrão de Cianometahemoglobina

- a) Solução de Drabkin (DS):

Preparar uma diluição 1:100 da solução estoque de Drabkin em água destilada. Esta solução é estável por no mínimo 6 (seis) meses em frasco escuro. Descartar se apresentar turvação ou precipitados.

- b) Padrão de Hemoglobina (HS):

Preparar uma solução de HS, colocando 0,1 mL do HS em 12,5 mL da solução de Drabkin. Mixar bem.

- c) Preparação do Padrão de CMH:

Rotular 5 tubos (12x100 mm) para as concentrações padrões de 80, 60, 40, 20, e 0 mg%.

Adicionar DS e HS nos tubos de acordo com o seguinte:

Concentração CMH (mg%)

80	60	40	20	0
HS (mL) 4,0	3,0	2,0	1,0	0,0
DS (mL) 0,0	1,0	2,0	3,0	4,0

Zerar o espectrofotômetro com o tubo 0,0 mg% CMH.

Fazer 3 Três leituras da densidade óptica de cada tubo. Zerar o aparelho para cada tempo e calcular a média das leituras.

d) Cálculo da DO alvo:

Cada DO alvo da suspensão de célula de carneiro é o padrão

CMH % dividido pelo fator de instrumento. O padrão CMH mg% é um valor médio para um pool de hemácias de carneiro.

Suspensão de célula de carneiro (%) Padrão CMH mg%

2,0	25,03
2,8	35,04
3,0	37,54

Exemplo: DO alvo para suspensão a 2% :

Padrão de Cor 1 - Preparação da Solução de Hemoglobina (Hg):

Adicionar 18,0 mL de água destilada em erlenmeyer

Adicionar 6,0 mL da suspensão de hemácia a 2%.

Mixar em vortex até toda célula lisar.

Adicionar 6,0 mL da solução mãe.

Mixar a solução de hemoglobina e aguardar uso.

2 - Preparação de Solução de Hemácia a 0,4%:

Adicionar 24,0 mL da solução de trabalho em erlenmeyer.

Adicionar 6,0 mL da suspensão de hemácia a 2% para fazer uma suspensão de 0,4% de hemácia.

Mixar gentilmente por inversão.

3 - Padrão de Cor:

Rotular 13 tubos sorológicos (10 x 50) com as porcentagens de hemólise como mostrado na tabela 1. Rotule o padrão 0% com os dados e hora da preparação.

Tabela 1:

0%	10%	20%	25%	30%	40%	50%	60%	70%	75%	80%	90%	100%
Hg 0	0,4	0,8	1,0	1,2	1,6	2,0	2,4	2,8	3,0	3,2	3,6	4,0
Cel4,0	3,6	3,2	3,0	2,8	2,4	2,0	1,6	1,2	1,0	0,8	0,4	0

Mixar os tubos em vortex e centrifugar 900 x g durante 10 minutos e fazer leitura da D.O. Estocar em temperatura 4 °C até momento do uso.

I.V. Preparação das Células Sangüíneas Sensibilizadas (RBCs)

Adicionar 12,0 mL da hemácia a 2% em um frasco de 50 mL.

Preparar uma diluição de hemolisina a partir da hemolisina estoque 1:10

Adicionar 12,0 mL da solução da diluição acima à solução da hemácia.

Mixar rapidamente.

Incubar por 10 minutos em banho-maria a 37 °C.

Titulação do Complemento (C')

Para todo trabalho com o complemento, é necessário banho de gelo.

Adicionar 9,0 mL da solução de trabalho em tubo 13 x 150 mm.

Tomar uma alíquota do C' do freezer -70 °C ou -20 °C.

Retirar 1,0 mL do C' e adicionar na solução de trabalho e mixar gentilmente, obtendo a diluição 1:10 de complemento. Deixar a solução estabilizar por 20 minutos.

Preparar as diluições do C' de 1:500, 1:600 e 1:700. As diluições indicadas aqui são apenas exemplos e podem variar de acordo com a titulação do lote do complemento. Adicionar solução de trabalho e C' de acordo com a tabela 2.

Tabela 2:

TÍTULO	C 1/10	DILUENTE
200	0,4	7,6
250	0,3	7,2
300	0,3	8,7
400	0,3	11,7
500	0,3	14,7
600	0,3	17,7
700	0,3	20,7

Mixar gentilmente por inversão.

Estabilizar o C' diluído por 20 (vinte) minutos.

Rotular três séries de tubos 10 x 50 mm; uma série para cada diluição do C'.

Adicionar solução de trabalho nos tubos na quantidade indicada na tabela 3.

Adicionar o C' diluído nos tubos na quantidade indicada na tabela 3.

Adicionar 1,6 mL das células sensibilizadas em cada tubo.

Mixar os tubos no vortex e colocar em banho-maria a 37 °C por 15 minutos.

Remover os tubos e mixar em vortex.

Recolocar os tubos no banho-maria a 37 °C por mais 15 minutos.

Tabela 3.

REAGENTE	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4
DILUENTE	1,0	0,6	0,2	0,0
COMPLEMENTO	1,0	1,4	1,8	2,2
SISTEMA HEMOLÍTICO	1,4	1,4	1,4	1,4

Remover os tubos do banho-maria e centrifugar 900 x g por 10 minutos.

Ler a densidade óptica dos tubos com comprimento de onda de 540 nm.

Comparar cada tubo das séries com o padrão de cor.

Determinar o percentual de hemólise para cada tubo.

Construir o Gráfico Logarítmico:

1 - Para cada série de 4 tubos da titulação, plotar num papel logarítmico volume de C' em mL (eixo Y) versus o percentual de hemólise correspondente (eixo X). Os tubos 1, 2, 3 e 4 correspondem aos números logarítmicos 3, 4, 5 e 6 do eixo Y. Além disso, os números logarítmicos do eixo X, 3, 4, 5 e 6 correspondem a 0,3, 0,4, 0,5 e 0,6 mL do C' (Figura 1).

2 - Um gráfico é válido quando 2 pontos estão à esquerda e 2 pontos estão à direita da linha vertical 50. Um gráfico também é válido se um ponto médio passa sobre a linha 50. Se todos gráficos são inválidos, repetir a titulação do C' com diferentes diluições de C'.

3 - No gráfico válido, plotar os pontos dos tubos 1 e 2 e marcar o ponto médio. Repetir com os pontos 3 e 4 - Passar uma reta entre os pontos médios.

4 - Determinar a inclinação da linha.

Em qualquer ponto da reta, medir uma reta de 10 cm para a direita;

Medir a distância vertical em mm do final da reta horizontal com a reta inclinada dos pontos médios.

Para obter a inclinação, medir os dois pontos médios e marcar o centro. Deste ponto, traçar uma reta até o eixo y. Se a inclinação for $0,44 \pm 20\%$, continue como descrito abaixo. Se a inclinação não estiver dentro deste parâmetro, repetir a titulação do C' com novo lote de hemácia preservada.

Determinando a diluição do C' requerido para o teste diagnóstico:

Do ponto médio dos pontos médios, traçar uma reta horizontal para o eixo Y;

Ler o volume em mL para o gráfico. Este volume contém uma unidade de 50% de hemólise de C' (C'H50);

Determinar o volume contendo 5,0 C'H50, multiplicando o volume contendo uma unidade de C'H50 por 5 (5,0 C'H50 em 0,2 mL é a quantidade requerida para o teste diagnóstico);

Do gráfico válido, calcular a diluição de C' necessária para obter 5,0 C'H50 em 2,0 mL pela seguinte equação:

Exemplo: O volume de C' na titulação na diluição 1:500 é 2,15 mL ($5,0 \times 0,43$ mL). A quantidade de C' no teste é 0,2 (0,025 mL/poço x 8 poços). A diluição de C' para o teste é calculado como segue:

Execução do Teste 1- Preparação do C' diluído Determinar o volume de C' diluído requerido para o teste, multiplicando o número de poços no teste por 0,025 mL.

Calcular o volume de solução de trabalho e do C' 1:10 contendo 5,0 C'H50 , como determinado na titulação do C'.

Adicionar o volume calculado de solução em um frasco pequeno ou tubo de ensaio, dependendo da quantidade.

Adicionar o volume de C' 1:10 dentro do frasco com solução trabalho e mixar gentilmente.

Manter esta diluição em temperatura de 4 °C. Deixar estabilizar por 20 minutos.

2 - Rotulagem das Microplacas

Placa para Titulação de Soro:

A 1:5	1	2	3	4	5	6	7	CH	CL	CN	0%	1
B 1:10											25%	2
C 1:20											50%	3
D 1:40											75%	4
E 1:80											100%	5
F 1:160												6
G 1:320												7
AC											9	8

3 - Preparação do Antígeno:

Determinar o volume de antígeno requerido multiplicando o número de poços que recebem antígeno por 0,025 mL. Diluir o antígeno na diluição 1:125.

Preparar o volume requerido em solução trabalho e mixar.

Estocar a solução de antígeno a 4 °C até o momento do uso.

4 - Adição dos Reagentes e Amostras nas Placas:

4.1. Titulação do Soro:

Adicionar 25 µl da solução de trabalho nos poços de titulação 1:10 a 1:320 e na linha de AC.

Adicionar 25 µl do soro teste nos poços de diluição 1:5, 1:10 e AC.

Adicionar 25µl dos soros controles (positivo alto e baixo e negativo) nos poços de diluição 1:5, 1:10 e AC nas respectivas colunas, conforme figura I.

Com um microdiluidor de 25 µl, mixar os soros controles e soros testes nos poços de titulação 1:10 por quatro segundos. Transferir e mixar soro nas sucessivas diluições para cada poço. Na última diluição (1:320), desprezar 25 µl.

Adicionar 25 µl do antígeno diluído nos poços da diluição 1:5 a 1: 320.

Adicionar 25 µl do C' diluído nos poços da diluição 1:5 a 1:320 e linha AC.

Controle dos Reagentes (ver tabela 4).

Mixar as placas por 1 minuto. Cobrir as placas para minimizar a evaporação e incubar em estufa a 37°C por 1 (uma) hora.

4.2. Adição de Células Sensibilizadas e Não-Sensibilizadas Determine o volume de células sensibilizadas necessário para o teste multiplicando o total de poços no teste por 0,05 mL.

Remover a Hemácia a 2% estocada em 4 °C e agitar gentilmente até ressuspensão.

Adicionar, em um frasco, volume de hemácia igual ao volume de solução de trabalho com hemolisina diluída.

Incubar em banho-maria a 37 °C por 10 minutos.

Remover o sistema hemolítico do banho-maria.

Adicionar 50 µl das células sensibilizadas nos poços das diluições de 1:5 a 1:320 e AC das placas de titulação e colunas M e CC do teste screening.

Adicionar 25 µl da hemácia a 2% nos poços 7, 8 e 9 do controle dos reagentes.

4.3. Adição de Outros Reagentes e Incubação:

Adicionar 125 µl de cada padrão de cor, individualmente, nos poços rotulados de 0 a 4+.

Cobrir as placas e mixar por 1 minuto.

Incubar as placas em estufa a 37 °C por 20 minutos.

Remover as placas e mixar para ressuspender as células não lisadas. Incubar novamente por 25 minutos.

Centrifugar as placas por 5 minutos a 300 x g ou deixar por pelo menos duas horas em geladeira.

Tabela 4 - Controle dos Reagentes

POÇO	1 DIL	1 Ag	1 C'	1 SH	1 H2%	Resultados
1	25	25	25	50		0
2	50	25		50		4+
3	50		25	50		0
4	50		25:1/2	50		Traços a 3+
5	25	25	25:1/2	50		Traços a 3+
6	75			50		4+
7	100				25	4+
8	75		25		25	4+
9	75	25			25	4+

1 - Controle anticomplementar do antígeno

2 - Se houver hemólise, as hemácias estão com problema

3 - C' livre, hemólise total

4 - Verificar a força do C', 1+ é o ideal

5 - Controle anticomplementar do antígeno, se houver muito C'.

6 - Controle de hemolisina

7 - Controle das células

8 - Controle das células

9 - Células na presença do antígeno

Interpretação dos Resultados

Ler os resultados dos controles dos reagentes comparando o percentual de hemólise com o padrão de cor. Interpretar os resultados baseados na tabela 5.

Compare os controles dos reagentes para determinar se estão dentro dos padrões estabelecidos na tabela 4. Caso contrário, repita todo o procedimento.

Fazer a leitura do percentual de hemólise de cada poço testado. Este percentual é baseado no tamanho, cor do sobrenadante e espessura do botão, em respectiva ordem de importância.

As células sensibilizadas devem estar completamente hemolisadas no controle AC. Caso contrário, o soro é tido como anticomplementar, devendo-se solicitar nova amostra.

O título registrado é a diluição seguinte da última da fixação do complemento.

Se restarem poucas células no poço, o soro é tido como inconclusivo. Solicitar nova amostra.

Tabela 5: Equivalência da leitura do percentual de hemólise e valores numéricos

Percentual de Hemólise	Interpretação	Diagnóstico
0	4+	Positivo
25	3+	Positivo
50	2+	Positivo
75	1+	Positivo
100	Negativo	Negativo

Restando poucas células a amostra será considerada inconclusiva.

OBS: O preenchimento do laudo deverá ser conclusivo contendo as seguintes informações:

. NEGATIVO

. POSITIVO: Indicar o título encontrado.

. INCONCLUSIVO: Requer nova coleta.

. ANTICOMPLEMENTAR: Requer nova coleta.

ANEXO I

Titulação da Hemolisina:

Lavar as hemácias: Calcular o volume que será necessário de hemácia 2%. Fazer 3 (três) lavagens a 900 x g por 10 minutos.

Da Hemolisina (HL) pura, fazer a diluição 1/10 em solução salina 0,85%.

Da HL 1/10 fazer HL 1/100 = 1 mL HL 1/10 + 9,0 mL diluente.

Diluir HL 1:1000 = 18 mL dil. +2,0 1:100.

Rotular tubos 15x180 ou 18x180 de 1:1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 8000 e 16000. Diluir a hemolisina conforme o quadro 1.

Quadro 1: Diluições da Hemolisina

DIL. FINAL HL	DIL (mL)	HL 1:1000 mL
1:1500	1,0	2,0
1:2000	2,0	2,0
1:2500	3,0	2,0
1:3000	2,0	1,0
1:4000	3,0	1,0
1:8000	7,0	1,0
1:16000	15,0	1,0

Sistema Hemolítico:

Em tubos 12x100 mm ou 13x100 mm, rotular de 1:1000 até 1:16000 e colocar em cada tubo 2,0 mL de H2% e 2,0 mL da diluição de HL do quadro acima.

Agitar cada tubo em vortex e colocar em banho-maria a 37 °C por 10 minutos.

Preparar o Complemento (C') 1:200, 1:250 e 1:300:

Rotular 3 séries de tubos para leitura em espectrofotômetro das diluições do C'

	0,8 mL dil
1/1000 - 1/1500 - 1/2000 até 1/16000 - C' 1/200	0,4 mL C'1/200
	0,8 mL SH
	0,8 mL dil

1/1000 - 1/1500 - 1/2000 até 1/16000 - C' 1/250	0,4 mL C'1/250
	0,8 mL SH
	0,8 mL dil

1/1000 - 1/1500 - 1/2000 até 1/16000 - C'	0,4 mL C'1/300
	1/300
	0,8 mL SH

Misturar para agitação e levar a banho-maria 37 °C por 30 minutos (agitar com 15 minutos).

Preparação do Padrão de Cor:

Preparar padrão de cor (PC) igual a prova de mormo. Registrar o valor das D.O.

Centrifugar todos os tubos 900 x g por 10 minutos. Fazer leitura em espectrofotômetro e registrar os valores inclusive do PC.

Fazer o gráfico:

Em papel milimetrado, tomar uma reta na horizontal de 20 cm (ou 30 cm) e, deste, marcar a diluição 1:1000. Para calcular as demais frações, dividir 20000 por cada diluição.

Ex.:

A partir do ponto 0 (zero), marcar 13,3 cm. Calcular até diluição 1:16000.

Na reta vertical, marcar os percentuais de hemólise de 10 a 100%, com espaço de dois em dois quadrantes (2,0 em 2,0 cm).

Marcação dos Pontos: Fazer a leitura das D.O das três diluições do C' para todos os valores 1/1000 até 1/16000. Associar o valor da D.O ao percentual de hemólise do PC. Marcar os pontos e fazer o gráfico. O ponto ótimo será aquele que mostrar uma estabilidade (Figura 2).

Referências Bibliográficas

United States Department of Agriculture/National Veterinary Services Laboratories - Testing Protocol. Complement Fixation Test for Detection of Antibodies to *Burkholderia mallei*: Microtitration test. Ames, IA - April 30, 1997.

ROITT, I, BROSTOFF, J, MALE, D Imunologia. Editora Manole, 5ª ed., 1999, 421p.

ANEXO II

SOLUÇÕES E REAGENTES

Tampão de Trietanolamina (TEA) - Solução mãe

Colocar em um frasco com graduação para um litro:

28 mL de trietanolamina (Merck 108379)

180 mL de ácido Clorídrico 1N (Merck PA 15893)

75 g Cloreto de sódio (Merck 6404)

1 g Cloreto de magnésio hidratado (Merck 5833)

0,2 g Cloreto de cálcio (Merck 2382)

Colocar o volume com água destilada para (um) litro

Solução Diluída de Trietanolamina - Solução de trabalho

Adicionar em um frasco graduado para um litro:

100 mL da solução mãe

0,5 g de gelatina em água fervente (Merck 4070)

Medir o pH que deve estar entre 7,3 e 7,4. O pH pode corrigir com ácido cítrico.

Dissolver o Cloreto de Sódio em aproximadamente 600 mL de água destilada em um Balão Volumétrico de 1L. Acrescentar os demais reagentes na ordem relacionada. A Trietanolamina é um líquido muito viscoso e deve medir-se cuidadosamente, por exemplo:

transferindo para um cilindro graduado com um Bastão de Vidro ou uma Pipeta, de modo que a Trietanolamina não toque as paredes do cilindro, até o volume de 28 mL; também pode-se pesar a Trietanolamina em recipiente de precipitados (28 mL equivalem a 31,45 g). Como a densidade dos diferentes lotes pode variar ligeiramente, deve-se reajustar o peso requerido. Qualquer que seja o método adotado, o recipiente no qual se mediu a Trietanolamina deve enxaguar-se perfeitamente com a solução do Balão Volumétrico para ter-se a segurança de que toda a Trietanolamina se incorporou ao diluente. As soluções mãe de Cloreto de Magnésio e Cloreto de Cálcio, preparam-se segundo a explicação dada para o 1º diluente citado, mas com um grau de concentração 10 vezes maior, quer dizer: 10g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ resultam em 11,8 mL de solução mãe 4,16 mol/L e 10 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ resultam em 54,4 mL de solução mãe 1,25 mol/L.

O pH da solução diluída estará entre 7,3 - 7,4 a 20 °C; cada novo lote de diluente na concentração de razão 10 deverá ser aferido antes de seu uso.

Tampão Veronal (Solução mãe)

Adicionar 100 mL de água destilada em erlenmeyer de 250 mL.

Adicionar 20,3g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

Adicionar 4,4g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$.

Misturar gentilmente.

Estocar em refrigeração.

Alsever

Glicose - 18,66g

Cloreto de Sódio - 4,18g

Citrato de Sódio - 8,0g

Ácido Cítrico - 0,55g

Água destilada q.s.p - 1000 mL

A solução deve ser esterilizada em autoclave, após ser filtrada em filtro de Seitz. O sangue de carneiro pode ser conservado assepticamente em refrigerador em frascos com tampa de rosca. Não deve ser utilizado antes de 5 dias, pelo menos, após a sangria, e pode ser utilizado até 6 (seis) semanas após, desde que não esteja contaminado.

Hemácias de Carneiro

Deve ser escolhido um ou mais carneiros que produzam hemácias em um grau de sensibilidade satisfatório e constante, sangrando

se sempre os mesmos carneiros. O sangue deverá ser colhido assepticamente em um recipiente que contenha um volume de Solução de Alsever na mesma quantidade que o volume de sangue.

Deve-se agitar cuidadosamente. Aliquotar, em tubos de ensaio 18x180 e refrigerar. Usar após 5 dias.

Hemolisina (Amboceptor)

Trata-se de um soro que contém um alto título de anticorpos contra as hemácias de carneiro. Quando se combina este anticorpo com hemácias em suspensão, diz-se que estas estão sensibilizadas, isto é, em presença de complemento livre sofrem lise.

A Hemolisina deve ser preparada somente em coelhos. A maioria dos trabalhos de técnicas sorológicas (i.e. Campbell e cols., 1963 ou Cruickshank, 1965) apresentam detalhes sobre o método de preparação da Hemolisina. A Hemolisina encontrada no comércio, geralmente na forma líquida, é conservada em um volume igual de glicerina.

Complemento

Sangrar pelo menos 4 cobaias, separar o mais breve possível o soro do coágulo e misturar para preparar o Complemento. Os cobaias adultos e bem nutridos com verduras frescas produzem um complemento de boa qualidade. Os animais deverão estar em jejum de 12 horas. Não se utilizarão fêmeas prenhas nem recém-paridas. O Complemento deve permanecer congelado a -40°C ou temperaturas mais baixas, desde que com meios adequados. O armazenamento em nitrogênio líquido é um procedimento eficaz e prático. O Complemento pode ser adquirido liofilizado e/ou desidratado; ainda que neste caso deva ser armazenado em refrigerador ou congelador.

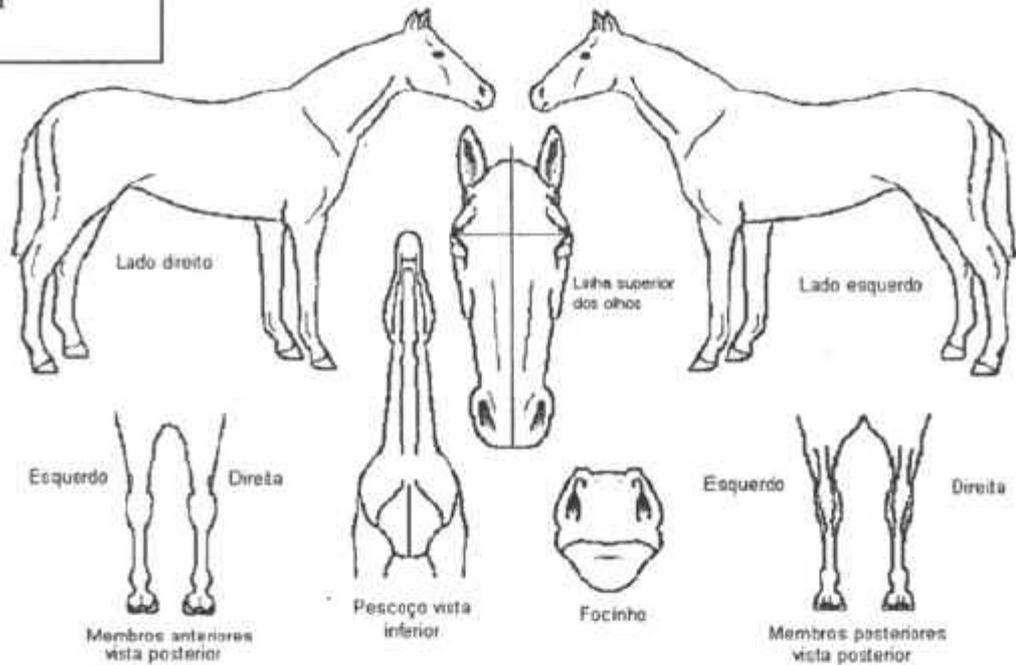
ANEXO III

ANEXO III

“Timbre do Laboratório” Credenciado por meio da Portaria nº/200: REQUISIÇÃO E RESULTADO DO EXAME PARA DIAGNÓSTICO DE MORMO

Proprietário		Propriedade				
Endereço da propriedade / endereço para contato:		Nº de cadastro estadual		Telefone		
Nome		Espécie:	Equina	Asinina	Muar	
Raça		Idade:		Sexo/Gestação:		
Nº de registro/marca		<i>CLASSIFICAÇÃO</i>				
Utilidade		JC	SH	CR	H	FC
Local onde se encontra						

PELAGEM



Descrição dos sinais

Observações:

REQUISITANTE OFICIAL

LABORATÓRIO:

O animal foi inspecionado por mim, nesta data:			Data do exame:		
Local e data:			Resultado:		
			Validade:		
Assinatura e carimbo do Médico Veterinário			Assinatura e carimbo do Responsável Técnico		
JC- Jockey Club	SH-Sociedade Hípica	CR-Cancha Reta	H- Haras	FC-Fazenda de Criação	UM-Unidade Mi
OBS.: XEROX DESTE DOCUMENTO NÃO SERÁ VALIDO					

LEGENDA

R- Remoinho	 Cicatriz
Br- Branco	AND- área não despigment
Rj- Rajado	LADRE- Mancha de Coloração (Lábio Superior)
Pbs- Pelos brancos	BETA- Mancha de Coloração (Lábio inferior)
MB- Mancha Branca	 Espiga

Instruções:

- Do campo observações, deverá constar informações referente a: histórico do animal, eventuais sintomas, contatos, deslocamentos.
- Resenha
 - Procure fazer a resenha o mais fielmente possível.
 - Utilizar caneta azul ou preta.
 - Indique o remoinho sempre com um simples x no local, puxando um traço que deverá - terminar com um R.
 - Indique a espiga com um traço ondulado.
 - Indique somente os contornos das marchas, estrelas ou calçados dos animais.
 - Nunca pinte ou preencha os contornos fazendo um sombreado mais escuro nas áreas de mancha.
 - Dois traços paralelos sobre um membro indicam que este membro não tem mancha branca, isto é, não é calçado.
 - Cicatrizes devem ser desenhadas.
 - Casco: de cor preta - não escrever, nem indicar nada

- de cor branca - indicar com a letra Br

- rajados - indicar com a letra Rj

- Mancha Branca deve ser indicada por MB.

- LADRE é a mancha de coloração rósea, presente no lábio superior, entre as narinas. Deve ser indicada, escrevendo-se a palavra LADRE por extenso.

- BETA é a mancha de coloração rósea presente no lábio inferior.

- Quando houver ÁREA NÃO DESPIGMENTADA (área da cor da pele do animal na parte interna do LADRE ou BETA), deve ser indicada por AND.

- Para animais pampas, indique apenas o contorno das manchas escrevendo nas áreas a inicial da cor existente (branco, B - castanho, C - ou alazão A).

ANEXO IV

LIVRO DE REGISTROS

Nº de Registro	Data de entrada	Referência	Remetente	Município/UF	Proprietário	Propriedade	Nome ou nº do Animal	Espécie	Idade /sexo/gestaçã

ANEXO V

ANEXO V
TARJETA DE IDENTIFICAÇÃO DE CONTRAPROVA

TARJETA DE IDENTIFICAÇÃO DE CONTRAPROVA	
LACRE N°	
AMOSTRA N°	
DATA	
	OBSERVAÇÕES:
_____ PORTADOR	_____ REPRESENTANTE DO LAE

ANEXO VI

ANEXO VII

ANEXO VII
SOLICITAÇÃO DE CONTRAPROVA

Ao: SSA/DFA/ _____

Laboratório: _____

Endereço: _____

Eu, _____ portador da CI nº _____

emitida pelo _____ /UF em ____ / ____ / ____

venho solicitar a realização de exame de contraprova para diagnóstico de MORMO amostra com registro nº _____ e nº de exame _____.

JUSTIFICATIVA: _____

_____.

Assinatura do interessado: _____

Local Data: ____ / ____ / ____.

_____.

Ciência do RT pelo laboratório credenciado