

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SECRETARIA NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA

PORTARIA Nº 84, DE 19 DE OUTUBRO DE 1992.

O SECRETÁRIO NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA, no uso da atribuição que lhe confere o art. 78, inciso VII do Regimento Interno da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, aprovado pela Portaria Ministerial nº 212 de 21 de agosto de 1992, resolve:

Art. 1º. Aprovar as "Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Anemia Infecciosa Equina" em anexo.

Art. 2º. Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, revogando-se as disposições em contrário.

JOSÉ PEDRO GONZALES

ANEXO

NORMAS PARA CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE LABORATORIOS DE DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

Para efeito de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina, serão obedecidas as determinações constantes das Portarias nº 53 da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária (SNAD) de 20 de maio de 1991 e nº 1 da Divisão de Laboratório Animal (DLA) de 14 de agosto de 1991.

1. MATERIAL:

1.1. Antígeno e soro padrão:

1.1.1. Só poderão ser utilizados antígenos (Ag) e o soro controle positivo (SCP) registrados na Coordenação de Produtos Veterinários - Departamento de Defesa Animal, observado o prazo de validade.

1.1.2. O Ag e o SCP devem ser, dependendo da demanda dos testes, divididos em frações menores, identificadas e estocadas a - 20oC.

1.2. Amostra a ser testada : Soro sangüíneo

2. RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS:

2.1. As amostras deverão estar devidamente identificadas e acondicionadas em caixas isotérmicas.

2.2. As amostras deverão estar acompanhadas de requisição de exame assinada por médico veterinário com sua identificação profissional (modelo Portaria 77).

2.3. Não serão recebidas amostras com evidência de contaminação.

2.4. As amostras serão registradas em livro próprio, conforme modelo indicado pela CLA.(Anexo V).

2.5. As amostras serão obrigatoriamente divididas em duas alíquotas de 2ml e identificadas, uma para prova e outra para contra-prova na presença do Médico Veterinário requisitante ou seu portador nomeado.

2.6. A declaração de contra-prova (Anexo II) será preenchida e assinada pelo Médico Veterinário requisitante ou seu portador nomeado.

2.7. A tarjeta de identificação da contra-prova (Anexo IV) será preenchida e lacrada juntamente com as amostras para contra-prova; o lacre será plástico, numerado e inviolável.

2.8. No caso de recebimento de sangue, o mesmo deverá ser centrifugado, e o soro receberá o tratamento dos itens anteriores.

3. NOMEAÇÃO DE PORTADOR:

O Médico Veterinário requisitante, caso não seja portador do material coletado, deve nomear um portador conforme modelo indicado pela CGLA (Anexo III).

4. CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM:

4.1. A amostra a ser testada deverá ser conservada sob refrigeração até a realização da prova e destruída após a realização do exame.

4.2. As amostras destinadas a contra-prova deverão ser estocadas em congelador a -20°C, devendo ser mantidas estocadas durante um período de 30 dias após a realização dos exames.

5. SEGURANÇA BIOLÓGICA:

5.1. Deverão ser respeitadas as normas de segurança biológica em todos os procedimentos realizados com o material de exame. 5.2. As amostras destinadas à prova e contra-prova, serão destruídas após decorrido o prazo estabelecido para sua estocagem, obrigatoriamente através de autoclavagem a 120°C, com uma libra de pressão durante 30 minutos.

6. MÉTODOS: *(Redação dada pela Portaria 378/2014/SDA/MAPA)*

Redações

Anteriores

6.1 O teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), conforme descrito no Anexo I, e o teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) são os testes indicados pela Coordenação Geral de Apoio Laboratorial (CGAL) da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), para o diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina (AIE). *(Redação dada pela Portaria 378/2014/SDA/MAPA)*

Redação(ões) Anterior(es)

6.2 As amostras com resultado positivo no teste de ELISA devem ser submetidas ao teste de IDGA. *(Redação dada pela Portaria 378/2014/SDA/MAPA)*

Redações

Anteriores

6.3 Para a utilização dos kits de IDGA ou ELISA, deverá ser seguida a instrução do protocolo constante na bula. *(Acréscido pela Portaria 378/2014/SDA/MAPA)*

6.3.1 Somente poderão ser utilizados kits de ELISA cuja leitura seja realizada em "leitor de microplaca para ELISA" *(Acréscido pela Portaria 378/2014/SDA/MAPA)*

6.3.2 No caso de discordância entre os testes de ELISA e IDGA, prevalece o resultado obtido no teste de IDGA. *(Acréscido pela Portaria 378/2014/SDA/MAPA)*

7. RESULTADOS E RELATÓRIOS: Os resultados dos exames deverão ser emitidos em documento denominado Relatório de Ensaio, que deve informar o prazo de validade do exame, considerando a data de colheita da amostra. O relatório de ensaio deverá ser encaminhado de acordo com o fluxograma

Anteriores

7.1. Os resultados dos exames deverão ser emitidos em formulários próprios, segundo modelo estabelecido pela CLA e de acordo com o fluxograma determinado:

7.1.1. Resultado POSITIVO: Imediata e obrigatoriamente comunicado ao Serviço de Defesa Sanitária Animal (SSA) Diretoria Federal de Agricultura e Reforma Agrária (DFARA) da Unidade Federativa onde se encontra o animal reagente. Outro procedimento poderá ser adotado por instrução da DFARA.

7.1.2. Resultado NEGATIVO: Será comunicado ao Médico Veterinário que assinou o pedido de exames e/ou ao interessado.

7.1.3. Todo laboratório credenciado deverá encaminhar até o quinto dia útil do mês subsequente, relatórios das atividades mensais, em formulários próprios (Anexo VI e Anexo III da portaria SNAD no 77 de 28/09/92, publicada no D.O.U. em 13/10/92) a DFARA e ao laboratório da CGLA responsável pela Coordenação da Unidade Federativa onde se localiza o laboratório credenciado.

8. REALIZAÇÃO DOS EXAMES NA CONTRA-PROVA:

8.1. A realização de contra-prova somente será efetuada no laboratório realizador do exame.

8.2. A solicitação deverá obedecer ao prazo máximo de 8 dias a contar da data do recebimento do resultado.

8.3. A contra-prova será solicitada ao Serviço de Sanidade Animal / DFARA da Unidade Federativa onde se encontra o animal reagente. Este a encaminhará ao laboratório realizador do exame.

8.4. O Médico Veterinário requisitante do exame obriga-se a pessoalmente, ou por seu representante, a acompanhar, assistido ou não por técnicos de sua confiança, aos exames que serão realizados na contra-prova.

8.5. Cabe ao técnico indicado pelo Médico Veterinário requisitante do exame apenas assistir, fiscalizar e observar a exatidão do resultado dos exames.

8.6. É obrigatória a comunicação ao Serviço de Defesa Sanitária Animal / DFARA, da data e horário da realização do exame da contra-prova, podendo o técnico daquele Serviço assistir, fiscalizar e observar a exatidão do resultado.

8.7. A ausência do representante do Serviço de Defesa Sanitária Animal / DFARA não constitui óbice para a realização do mesmo, desde que tenha sido observado o disposto no item 8.6.

8.8. Após a realização do exame, será lavrada uma ata assinada pelos interessados presentes, onde constará o resultado desse exame e a descrição de todo método analítico nele utilizado.

8.9. A desistência do Médico Veterinário requisitante do exame, ou seu representante, mediante declaração escrita, ou a sua ausência na realização do exame da contraprova, importará no prevalecimento do resultado obtido no primeiro exame.

9. DO LABORATÓRIO:

9.1. O laboratório deve possuir instalações e equipamentos adequados para a realização da prova de imunodifusão em Gel de Agar e responsável técnico e substituto deste, devidamente habilitado pela CGLA para a realização da prova para diagnóstico de AIE.

9.2. As instalações devem fazer parte da mesma base física do laboratório e atender as normas de segurança biológica.

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

10. INSTALAÇÕES E EQUIPAMENTOS:

10.1. Instalações:

10.1.1. Protocolo:

Sala destinada ao recebimento das amostras, registro, expedição dos resultados e arquivos dos mesmos . Não requer instalações especiais.

10.1.2. Sala de exame:

Neste local as amostras serão processadas, incluindo-se a identificação, a centrifugação, a divisão em amostras de exames e contra-prova e a realização das etapas do exame propriamente dito. Deverá estar provido de bancada, fontes de eletricidade e gás, persianas ou cortinas (para diminuir a intensidade da luz) e paredes com superfície lavável.

10.1.3. Esterilização e Lavagem:

Deverá estar provido de fonte de alimentação elétrica, de água e de gás, tanques ou pias que permitam a esterilização e a lavagem de todo material utilizado na realização da prova de diagnóstico. As paredes devem estar revestidas por superfície lavável.

10.2. Equipamentos:

10.2.1. Protocolo:

- Arquivo com chave
- Máquina de escrever

10.2.2. Sala de exame:

- Balança analítica ou semi analítica;
- Banho-maria;
- Cuba com água sanitária;
- Câmara úmida;
- Iluminador com fundo preto, para leitura das lâminas;
- Pipetas automáticas de 25 microlitros;
- Bico de Bunsen;
- Vidraria;
- Cortador padrão;

- Geladeira;
- Freezer a -20°;
- Centrífuga clínica;
- pH de teste; 10.2.3.Lavagem e Esterilização:
- Autoclave
- Depósito para água sanitária
- Destilador de água

11. DO RESPONSÁVEL TÉCNICO E SUBSTITUTO

Para efeito de credenciamento e monitoramento, o responsável técnico e seu substituto serão submetidos a exames teóricos e / ou práticos em um laboratório especialmente designado pela CGLA para esta finalidade.

11.1. Prático:

11.1.1.Preparo de material de trabalho compreendendo:

- Tampão
- Gel

11.1.2.Realização do teste :

- Distribuição do gel na lâmina
- Corte do gel com furador
- Distribuição dos reagentes e / ou;
- Leitura de 36 reações com amostras desconhecidas dos candidatos.

11.1.3.Para efeito de monitoramento poderão ser realizados exames a distância, com a efetivação das provas com 36 soros que serão entregues ou enviados ao laboratório. A resposta deverá ser encaminhada ao laboratório da CGLA, responsável pela coordenação da Unidade Federativa onde se localiza o laboratório, em um máximo de 120 horas após o recebimento do teste, em envelope lacrado, com AVISO DE POSTAGEM E RECEBIMENTO (AR).

11.1.4.Para efeito de credenciamento e monitoramento o índice para aprovação no exame prático é de 100% de acerto .

11.2. Teórico:

Entrevista e / ou prova escrita sobre assuntos ligados à etiologia, patogenia, patologia e provas diagnósticas da AIE.

ANEXO I

TÉCNICA DE IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR PARA DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

A técnica baseia-se na migração radial dupla de antígeno (Ag) e anticorpo (Ac), através do gel de ágar. O encontro dos reagentes, em proporções ótimas, leva à formação de complexos Ag-Ac, insolúveis que precipitam, tornando-se visíveis sob a forma de uma linha ou banda de precipitação. Uma extrema variação na concentração de Ag e Ac pode alterar a localização ou inibir a formação da mesma. Esta reação pode ser, ainda, influenciada por uma variedade de condições físico químicas, dentre elas, concentração eletrolítica, tampão, pH e temperatura. Alterações bruscas de temperatura, durante a incubação, levam a formação de artefatos de técnicas indejáveis para o teste. Altos níveis de lipídeos e protídeos nos reagentes podem afetar a formação e observação da linha de precipitação.

1. MEIOS E SOLUÇÕES:

1.1. Gel à 1%

- Ágar Noble ou agarose 1g
- Tampão borato 100ml Aquecer em banho-maria ou vapor fluente até a completa fusão do ágar.

1.2. Tampão borato :

- NaOH 2g
- H₃BO₃ 9g
- Água destilada q.s.p 1.000 ml OBSERVAÇÕES: As substâncias a serem utilizadas na preparação das soluções deverão ser padrão pró análise (p.a.) .
- O tampão borato deverá ter seu pH entre 8,5 e 8,7.
- O gel deverá ser dividido em alíquotas de acordo com a demanda do laboratório.
- Não devem ser efetuadas sucessivas fusões do gel, desprezando-se o volume não utilizado.

2. PREPARO DE LÂMINAS:

Em lâminas para microscópio, medindo 25 x 75mm, colocar 4,5ml do gel. Após solidificação do gel, fazer os furos com o cortador padrão, com 7 furos, medindo 4mm de diâmetro e 3mm de distância entre os mesmos.

OBSERVAÇÕES: As lâminas não utilizadas devem ser desprezadas. Se houver presença de umidade nas cavidades, as lâminas não deverão ser utilizadas até a sua evaporação.

3. REALIZAÇÃO DA PROVA:

3.1. Distribuição dos reagentes:

3.1.1.Soro a ser testado: Colocar nas cavidades laterais, alternadamente 25 microlitros dos soros a serem testados.

3.1.2.Soro padrão: Colocar nas cavidades laterais, alternadamente 25 microlitros do soro controle positivo.

3.1.3.Antígeno: Colocar na cavidade central 25 microlitros de antígeno padrão.

3.2.Incubação: As lâminas devem ser incubadas, em câmara úmida, em temperatura entre 20° e 25°C, durante 48 horas .

7 3.3.Leitura: Deverão ser feitas leituras diárias, usando-se uma fonte de luz de intensidade variável com

feixe estreito, contra um fundo preto.

4. INTERPRETAÇÃO DA PROVA:

O tipo de reação varia com a concentração da amostra testada . A linha formada com SCP é a base para a leitura do teste . Se ela não estiver nítida o teste não é válido e deve ser repetido.

4.1.NEGATIVA: As linhas formadas entre o Ag e o SCP se dirigem para a cavidade onde se encontram as amostras testadas (Fig. 1).

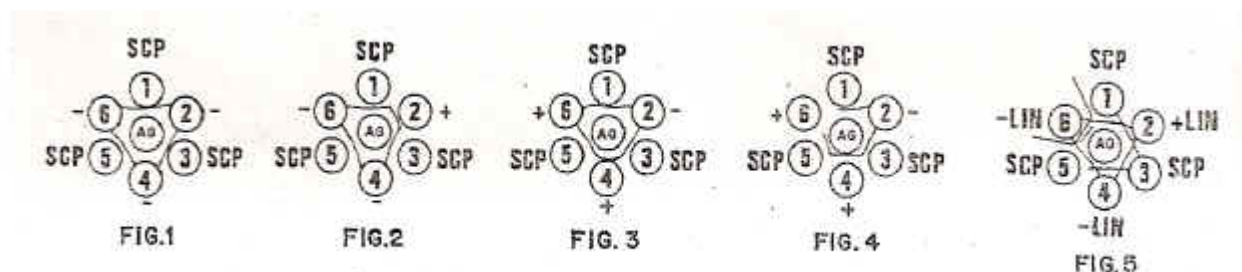
4.2.Positiva: As linhas formadas entre o Ag e o SCP se fundem com aquelas formadas pelas amostras testadas e formam uma linha contínua de identidade total (Fig.2).

4.3.FRACA POSITIVA: A linha de precipitação de uma amostra fraca positiva tende a se formar mais próximo à cavidade onde se encontra a amostra que está sendo testada. Em casos de títulos baixos de Ac pode-se visualizar somente uma convergência das duas linhas do controle, na direção da cavidade, onde se encontra o soro que está sendo testado (Fig. 3).

4.4.FORTE POSITIVA: A linha de precipitação de uma amostra com título alto de Ac apresenta-se como uma faixa difusa, entre as duas linhas de controle. Em casos extremos, pode haver a inibição da formação desta faixa e só serão visualizadas as duas linhas de controle, interrompidas, a mesma distância do soro testado, não se verificando nenhuma precipitação entre estas linhas. As amostras que apresentaram reações forte positiva devem ser diluídas em tampão borato e retestadas nas diluições, 1/4 e 1/8 (Fig. 4).

4.5. LINHAS INESPECÍFICAS: A reação inespecífica não forma uma linha contínua com as do controle. Elas são formadas por outras reações Ag-Ac que não aquela específica para AIE.

Uma amostra pode produzir uma reação específica de AIE (positiva) e uma linha de precipitação inespecífica (Fig. 5).



ANEXO II

Eu, _____ portador c

nome completo

emitida pelo _____ em ____/____/____

órgão

fins que acompanhei a centrifugação, fracionamento em prova
acompanhada(s) de _____

nº de amostras

númer

requisição (s) de exame de Anemia Infecciosa Equina (AIE) que foi
(s) com o (os) nºs _____ à _____

registro laboratório _____ sendo a(

razão social / nome fantasia

lacrada(s) com o(s) lacre(s) nºs _____.

Data: ____/____/____

Portador

ANEXO III

Eu, _____, Médico Veterinário (

nome completo

nomeio _____ portador da C.I nº

nome completo

portador de _____ amostra (s) de sangue, coletada (s) e i

número

mim conforme a (s) requisições número (s) _____

Data: ____/____/____

Médico Veterinário

ANEXO IV

