

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

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

ANEXO

Para efeito de credenciamento e monitoramento de laboratório 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 Geral de Saúde Animal (CGSA) , 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 -20°C .
- 1.2. Amostra a ser testada : Soro sanguíneo

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** (modelo CGSA).
- 2.3. Não serão recebidas amostras com evidência de contaminação.
- 2.4. As amostras serão **registradas em livro próprio**, conforme modelo indicado pela CGLA. (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 **autoclavação a 120°C** , com uma libra de pressão durante 30 minutos.

6. MÉTODOS:

O teste de imunodifusão em gel de agar (IDGA) para o diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina (AIE) , conforme descrito no Anexo I é o teste indicado pela CGLA do Departamento Nacional de Produção e Defesa Animal (DNPDA) da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária (SNDA) do Ministério da Agricultura e Reforma Agraria , para o diagnóstico desta enfermidade.

7. RESULTADOS E RELATÓRIOS:

- 7.1. Os resultados dos exames deverão ser emitidos em formulários próprios, segundo modelo estabelecido pela CGSA 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 Agraria (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.

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 o 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 contra-prova, importará no preavalecimento 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°C
- 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 agarose1g
- Tampão borato100ml

Aquecer em banho-maria ou vapor fluente até a completa fusão do ágar.

1.2. Tampão borato :

- Na OH2g
- H3 BO39g
- Água destilada q.s.p1.000ml

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 .

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).

4.1. 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).

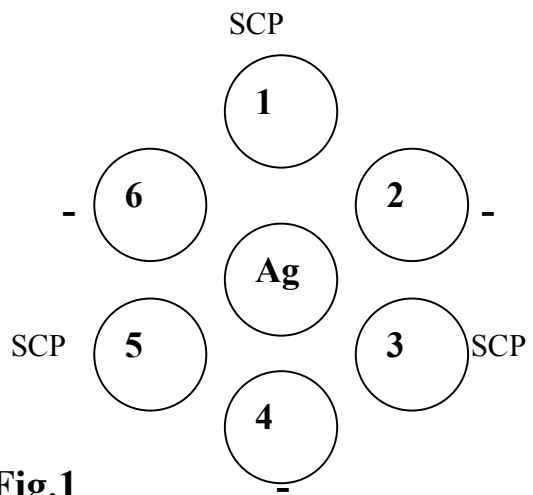


Fig.1

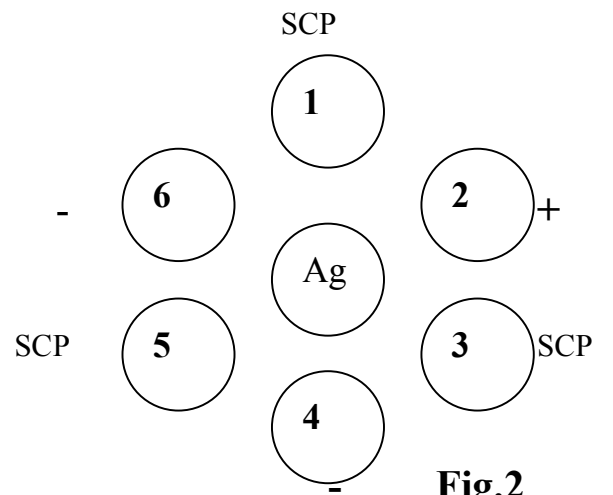


Fig.2

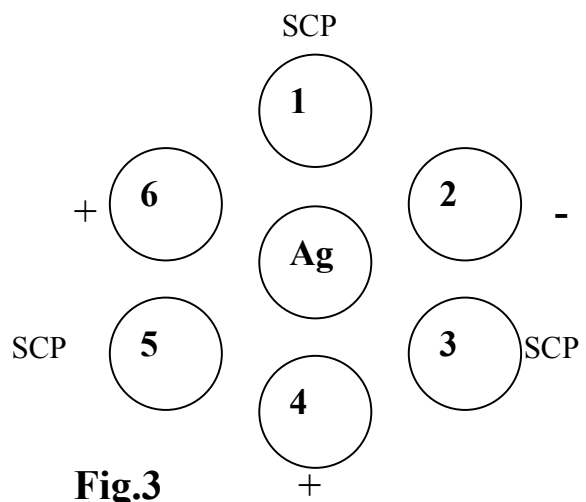


Fig.3

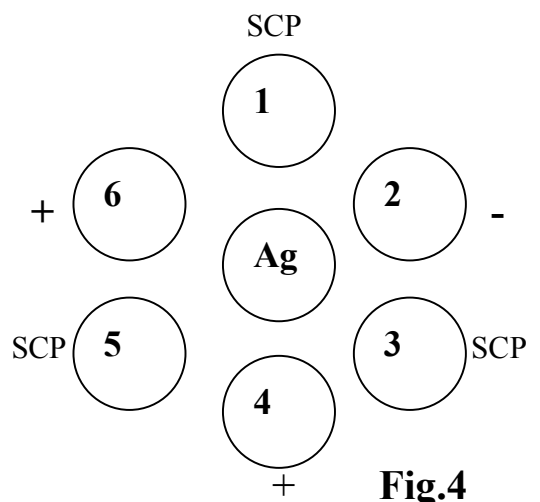


Fig.4

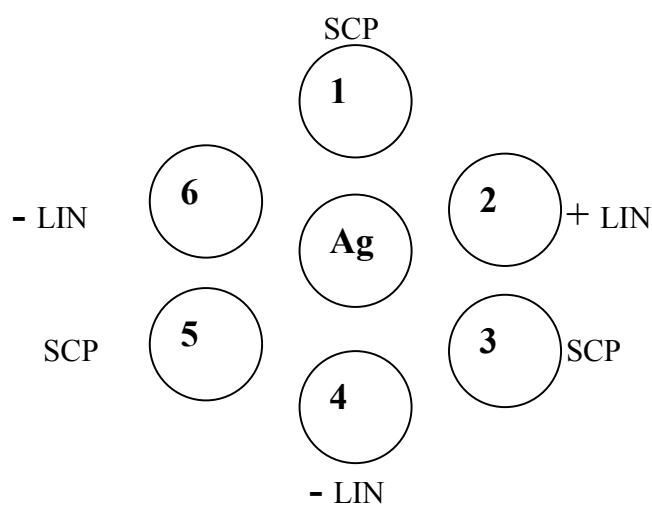


Fig.5

ANEXO II

DECLARAÇÃO DE CONTRAPROVA

Eu , _____ portador da CI nº _____
nome completo
emitida pelo _____ em ____/____/____, declaro para os
órgão
devidos fins que acompanhei a centrifugação , fracionamento em prova e
contra-prova de _____acompanhada(s) de _____
nº de amostras número (s)
requisição(s) de exame de Anemia Infecciosa Equina (AIE) que foi (foram)
identificada(s) com o (os) nº _____ à _____ do livro de registro
laboratório _____ sendo a(s) contra-prova(s)
razão social / nome fantasia
lacrada(s) com o(s) lacre(s) nº(s) _____.

Data : ____/____/____

Portador

ANEXO III

NOMEAÇÃO DE PORTADOR

Eu , _____, Médico Veterinário CRMV/nº _____
nome completo
nomeio _____ portador da C.I nº _____ como
nome completo
portador de _____ amostra(s) de sangue , coletada(s) e identificada(s)
número
por mim conforme a(s) requisições número(s) _____

Data : ____/____/____

Médico Veterinário

ANEXO IV

TARGETA DE IDENTIFICAÇÃO DE CONTRA-PROVA

CONTRA-PROVA Nº

LACRE Nº

PORTADOR :

IDENTIDADE Nº

ORGÃO EXPEDIDOR

PORTADOR

REPRESENTANTE DO LABORATÓRIO

ANEXO V

DATA	NR. REGISTRO	MUNICÍPIO	PROPRIETÁRIO	PROPRIEDADE	IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL				RESULTADO	Nº LACRE	RESULTADO CONTRAPROVA
					RAÇA	PELAGEM	SEXO	IDADE			

ANEXO VI

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E REFORMA AGRÁRIA

RELATÓRIO MENSAL
DE
ANEMIA INFECCIOSA EQUINA 2

LABORATÓRIO: _____

CÓDIGO : _____

MÊS / ANO : _____ / _____

PAG _____ / _____

KIT DE DIAGNÓSTICO

ESTOQUE	ADQUIRIDO	UTILIZADO OU EM USO		
		KIT 1	KIT 2	KIT 3
QUANTIDADE _____	QUANTIDADE _____	FABRICANTE _____	FABRICANTE _____	FABRICANTE _____
FABRICANTE _____	DATA _____ / _____	_____	_____	_____
_____	FABRICANTE _____	PARTIDA _____ / _____	PARTIDA _____ / _____	PARTIDA _____ / _____
PARTIDA _____ / _____	_____	VALIDADE _____ / _____	VALIDADE _____ / _____	VALIDADE _____ / _____
VALIDADE _____ / _____	PARTIDA _____ / _____	DATA DA ABERTURA _____ / _____	DATA ABERTURA _____ / _____	DATA ABERTURA _____ / _____
	VALIDADE _____ / _____	EXAME REALIZADO MÊS _____	EXAME REALIZADO MÊS _____	EXAME REALIZADO MÊS _____
		EXAME REALIZADO (KIT) _____	EXAME REALIZADO (KIT) _____	EXAME REALIZADO (KIT) _____
		DATA DO TÉRMINO _____ / _____	DATA DO TÉRMINO _____ / _____	DATA DO TÉRMINO _____ / _____

OBSERVAÇÕES :

ASSINATURA E CARIMBO :

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DA REFORMA AGRÁRIA

RELATÓRIO MENSAL
DE
ANEMIA INFECCIOSA EQUINA

LABORATÓRIO : _____

CÓDIGO : _____

MÊS / ANO _____ / _____

PAG : ____ / ____

UF	MUNICÍPIO	RESULTADO																		TOTAL				
		JC			SH			CR			H			FC			UM			EN TIDA DE	POSI TI VO	NEGA TIVO	EXA MINA DA	
		ENT	POS	NEG	ENT	POS	NEG	ENT	POS	NEG	ENT	POS	NEG	ENT	POS	NEG	ENT	POS	NEG					
TOTAL																								

OBSERVAÇÕES :

ASSINATURA E CARIMBO :

