

Manual de Métodos Oficiais para Diagnóstico de Doenças Animais

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

(Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Secretaria de Defesa Agropecuária
Coordenação Geral de Laboratórios Agropecuários

Manual de Métodos Oficiais para Diagnóstico de Doenças Animais

Missão do Mapa:
“Promover o desenvolvimento sustentável
das cadeias produtivas agropecuárias,
em benefício da sociedade brasileira.”

MAPA
Brasília 2022

@2022 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Todos os direitos reservados. Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é do autor.

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA

Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários – CGAL

Coordenação de Gestão de Demandas Laboratoriais - CDL

Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Anexo B, 4º andar, sala 434B

CEP: 70043-900, Brasília – DF

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br>

E-mail: manualdia.cgal@agricultura.gov.br

Central de Relacionamento: 0800 704 1995

Coordenação Editorial: Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários – CGAL

Equipe Técnica

Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha

Ana Carolina de Oliveira Nascimento

Anapolino Macedo de Oliveira

Aerlen Cynara Silva Vieira

Ana Karina Cunha Calado

Andrea Padilha de Alencar

Anselmo Vasconcelos Rivetti Júnior

Antônio Augusto Fonseca Júnior

Cid Aristóteles Siqueira Alencar

Dilmara Reischak

Fernanda Gomes Cardoso

Isabela Ciarline de Azevedo

João Marcos Nacif da Costa

Juliana Nabuco Pereira Otaka

Luanda Bispo Santos do Nascimento Maués

Luciana Amaral Pinto

Luciana Rabello Ferreira

Luciana Taborda Corrêa

Marcelo Fernandes Camargos

Marco Antônio de Carvalho Marques Serqueira

Paulo Martins Soares Filho

Patrícia Gomes de Souza

Rene Ribeiro da Silva

Sheila de Matos Xavier

Silvio Orlan de Castro Chaves

Sheila de Matos Xavier

Soraya Cecilia Albieri Camillo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Nacional de Agricultura - BINAGRI

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Manual de Métodos Oficiais para Diagnóstico de Doenças Animais /Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária/Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários. 1. Ed. - Brasília: MAPA/SDA/CGAL, 2022 .

Recurso: Digital

Formato: PDF

Modo de Acesso.....

ISBN: XXXXXXXXXX

1. Diagnóstico Animal
2. Manual de Métodos Oficiais
3. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA
4. Secretaria de Defesa Agropecuária-SDA
5. Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários-CGAL
6. Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária-LFDA
7. Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários
8. Salmonelose Aviária
9. Micoplasmose Aviária
10. Influenza Aviária - IA
11. Doença de Newcastle - DNC
12. Laringotraqueíte Infecciosa das Aves - LTI
13. Encefalopatia Espongiforme Bovina – EEB
14. Anemia Infecciosa Equina - AIE
15. Mormo
16. Peste Suína Clássica – PSC
17. Peste Suína Africana - PSA
18. Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos - PRRS
19. Gastroenterite Transmissível dos Suínos - TGE
20. Diarreia Epidêmica dos Suínos PED
21. Senecavirus A
22. Scrapie
23. Febre Aftosa - FA
24. Estomatite Vesicular - EV
25. Raiva
26. Brucelose
27. Doença de Aujeszky
28. Língua Azul

APRESENTAÇÃO

O Manual de Métodos Oficiais para Diagnóstico de Doenças Animais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece as normas e diretrizes para a realização de ensaios da área de Diagnóstico Animal.

Tem como objetivo realizar a padronização, harmonização, atualização e a unificação dos procedimentos, tornando-os mais concisos e claros.

Suas disposições devem ser cumpridas na íntegra pela Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, do Sistema Unificado de Atenção a Sanidade Agropecuária – SUASA, que realizam diagnóstico das doenças dos animais terrestres e aquáticos.

O Manual contém capítulos introdutórios e específicos relacionados ao diagnóstico das doenças dos animais.

A disposição dos capítulos teve como base o Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres, da Organização Mundial de Saúde Animal - OIE. Este modelo foi escolhido devido ao seu formato amigável e objetivo.

As enfermidades selecionadas para integrar a primeira edição foram aquelas de maior impacto econômico e que são objeto de Programas e Controles Oficiais do MAPA, bem como algumas de suas diferenciais.

A construção do referido Manual foi realizada pela equipe técnica da Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários - CGAL/SDA/MAPA e dos Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária - LFDA/CGAL/SDA/MAPA, sendo estes o LFDA-PA, LFDA-PE, LFDA-MG, LFDA-SP e LFDA-RS.

A revisão do Manual ocorrerá a cada três anos, podendo ocorrer em períodos inferiores em casos de excepcionalidade.

Nas revisões todas as inclusões no texto estarão destacadas em azul. As exclusões estarão tachadas. Na revisão seguinte as inclusões passarão a ter seu texto na formatação do restante do manual e os trechos tachados serão excluídos.

SUMÁRIO

		Página
Parte 1	Normas Gerais	
Seção 1.1	Capítulos Introdutórios	
Capítulo .1.1.1	Instalações (mês ano)	10
Capítulo .1.1.2	Responsabilidade Técnica (mês ano)	12
Capítulo 1.1.3	Seleção de Métodos e Garantia de Resultados (mês ano)	13
Capítulo 1.1.4	Amostras (mês ano)	17
Capítulo 1.1.5	Escopo (mês ano)	21
Parte 2	Diagnóstico das Doenças dos Animais Terrestres	
Seção 2.1.	Aves	
Capítulo 2.1.1	Salmonelose Aviária (mês ano)	27
Capítulo 2.1.2	Micoplasmose Aviária (mês ano)	75
Capítulo 2.1.3	Influenza Aviária - IA (mês ano)	90
Capítulo 2.1.4	Doença de Newcastle – DNC (mês ano)	117
Capítulo 2.1.5	Laringotraqueíte infecciosa das aves – LTI (mês ano)	140
Seção 2.2	Bovinos	
Capítulo 2.2.1	Encefalopatia Espongiforme Bovina – EEB (mês ano)	159
Seção 2.3	Equinos	
Capítulo 2.3.1	Anemia Infecciosa Equina - AIE (mês ano)	173

Capítulo 2.3.2	Mormo (mês ano)	184
Seção 2.4	Suínos	
Capítulo 2.4.1	Peste Suína Clássica - PSC (mês ano)	209
Capítulo 2.4.2	Peste Suína Africana - PSA (mês ano)	227
Capítulo 2.4.3	Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos - PRRS. (mês ano)	241
Capítulo 2.4.4	Gastroenterite Transmissível dos Suínos – TGE (mês ano)	251
Capítulo 2.4.5	Diarreia Epidêmica dos Suínos – PED (mês ano)	265
Capítulo 2.4.6	Senecavirus A (mês ano)	270
Seção 2.5	Pequenos Ruminantes	
Capítulo 2.5.1	Scrapie (mês ano)	287
Seção 2.6	Multiespécies	
Capítulo 2.6.1	Febre Aftosa – FA (mês ano)	302
Capítulo 2.6.2	Estomatite Vesicular – EV (mês ano)	342
Capítulo 2.6.3	Raiva (mês ano)	359
Capítulo 2.6.4	Brucelose (mês ano)	378
Capítulo 2.6.5	Doença de Aujeszky (mês ano)	423
Capítulo 2.6.6	Língua Azul (mês ano)	443

Parte 1
Normas Gerais

Seção 1.1

CAPÍTULOS INTRODUTÓRIOS

CAPÍTULO 1.1.1 INSTALAÇÕES

1. Disposições Gerais

1.1. O laboratório deverá dispor de instalações e equipamentos adequados à realização das técnicas de acordo com seu escopo junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e localizado em uma única base física (mesmo endereço).

a) Não é permitido posto de coleta ou de armazenamento de amostras.

1.2. As instalações devem possuir separação física efetiva entre os ambientes e procedimentos adequados de modo a prevenir a contaminação cruzada, não sendo permitida a execução de atividades incompatíveis no mesmo ambiente ou sala.

1.3. As amostras devem ser manipuladas somente na área laboratorial destinada à conferência e identificação de amostras ou à realização dos ensaios. Fica proibida a abertura de embalagens na área administrativa ou em outras áreas do laboratório.

1.4. O laboratório deverá dispor de procedimentos e instalações que assegurem a biocontenção e a segurança biológica compatíveis com suas atividades.

1.5. As instalações devem permitir a realização de limpeza e desinfecção compatíveis com suas atividades.

1.6. As instalações devem ser providas de fontes de água e energia elétrica compatíveis com suas atividades.

2. Instalações Mínimas

2.1. Área administrativa

a) Destinada ao recebimento das amostras, registros, expedição dos resultados e arquivamento.

2.2. Área laboratorial

2.2.1. Área específica destinada à conferência e identificação de amostras (opcional)

a) Área destinada à conferência e identificação das amostras recebidas.

2.2.2. Área destinada à realização dos ensaios

a) Ambientes especificamente destinados à realização dos ensaios podendo também ser utilizados para a conferência e identificação de amostras.

2.2.3. Área destinada à manutenção de animais

a) Caso a realização do ensaio empregue a utilização de animais de experimentação, o laboratório deve possuir instalações específicas para este fim;

b) As instalações devem atender às legislações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

c) O laboratório deve ter esta instalação credenciada junto ao CONCEA.

2.3. Áreas de apoio técnico

2.3.1. Preparo de meios, reagentes e soluções.

a) Ambiente destinado ao preparo e esterilização de meios, reagentes e soluções. Ambiente opcional quando os ensaios não exigirem a esterilização de meios, reagentes e soluções.

2.3.2. Descontaminação de amostras e materiais contaminados ou potencialmente contaminados

a) Ambiente destinado à autoclavação de amostras e materiais contaminados ou potencialmente contaminados.

2.3.3. Lavagem, Embalagem e Esterilização.

a) Ambiente destinado à lavagem, embalagem e esterilização pelo calor de materiais novos ou previamente descontaminados. Ambiente opcional quando os ensaios não exigirem a esterilização de materiais.

CAPÍTULO 1.1.2 RESPONSABILIDADE TÉCNICA

1. Disposições Gerais

1.1. O laboratório deverá dispor de Responsável Técnico - RT Médico Veterinário, do quadro efetivo de funcionários do laboratório, legalmente habilitado, inscrito no Conselho Regional de Medicina Veterinária – CRMV da Unidade Federativa em que se encontra o laboratório.

1.2. A responsabilidade técnica não poderá ser exercida em mais de um laboratório, mesmo que os diferentes laboratórios (bases físicas) possuam o mesmo CNPJ.

1.3. A Responsabilidade Técnica será exercida para cada ensaio de seu escopo, sendo o RT responsável por todas as etapas do ensaio, pelos resultados emitidos e pela assinatura dos relatórios de ensaio.

1.4. O RT poderá ser responsável por mais de um ensaio do escopo.

1.5. É facultado ao laboratório ter mais de um RT por ensaio.

1.6. O RT deve ter qualificação técnica compatível com o ensaio.

a) A critério do MAPA poderá ser exigida a habilitação de RT através da realização de provas de habilitação, encaminhamento de amostras controle para processamento ou outra modalidade de avaliação que venha a ser instituída e publicada no sítio eletrônico do MAPA.

b) Somente serão habilitados RT de laboratórios com escopo suspenso, quando a falta de RT habilitado for a causa da suspensão.

1.7. O disposto nos itens 1.1 a 1.6 se aplica aos RT Substitutos

CAPÍTULO 1.1.3 SELEÇÃO DE MÉTODOS E GARANTIA DE RESULTADOS

1. Disposições Gerais

1.1. O laboratório deverá empregar somente métodos e procedimentos adequados ao escopo.

1.2. Para a realização de ensaios de amostras pertencentes aos programas e controles oficiais do MAPA, deverão ser utilizados os métodos publicados neste Manual de Diagnóstico.

1.2.1. Os Laboratórios Federais de Defesa Agropecuários - LFDA poderão utilizar outras técnicas e métodos desde que previamente autorizados pela Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários - CGAL. Estes serão incluídos na próxima revisão do Manual.

2. Verificação dos Métodos

2.1. O laboratório deverá ter procedimentos para verificar sua capacidade em utilizar os métodos de diagnóstico de forma adequada, antes de colocá-lo efetivamente em uso.

2.2. O laboratório deve realizar a verificação (comprovação) de desempenho dos métodos de diagnóstico.

2.3. A verificação deve ser realizada com a utilização de Material de Referência Certificado (MRC), Material de referência primário (MR1^a), Material de referência secundário (MR2^a) ou Material de referência terciário (MR3^a).

2.4. Material de referência certificado (MRC) é padrão de análise com a mais alta confiabilidade metrológica. Devem estar acompanhados de documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos. São produzidos seguindo a norma ISO 17034, preconizando o conhecimento da exatidão metrológica, incerteza de medição, estabilidade e a homogeneidade. Utilizado para calibração, validação de métodos e garantia na determinação da exatidão de resultados.

a) Material de referência (MR) é o padrão de análise com alta confiabilidade metrológica utilizado para validação de métodos e garantia de resultados. Suficientemente homogêneo e estável com respeito a uma ou mais propriedades especificadas, que foi estabelecido como sendo adequado para o seu uso pretendido em um processo de medição. São estabelecidos como sendo adequados para o seu uso pretendido em um processo de medição.

I. Os MR podem ainda ser categorizados de acordo com seu reconhecimento em primário, secundário e terciário.

ii) Material de referência primário (MR1^a) é o padrão reconhecido por uma entidade internacional. Produzidos e fornecidos por laboratórios de referência (por exemplo por entidades com reconhecimento da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO, Organização Mundial de Saúde – OMS, União Europeia – EU, etc.)

iii) Material de referência secundário (MR2^a) ou padrão de medição nacional é o padrão reconhecido por uma entidade nacional para servir dentro de um Estado ou economia, como base para atribuir valores a outros padrões de medição de grandezas da mesma natureza. Produzido e fornecido por Laboratórios e Instituições Governamentais.

iv) Material de referência terciário (MR3^a) é o material utilizado em uma análise com o objetivo de contribuir para o aumento da confiabilidade relacionada ao requisito da garantia dos resultados. Obtidos por meio da comparação dos resultados alcançados para este material e um MRC ou MR primário ou secundário durante uma mesma análise.

v) Controles internos (CI): Materiais cuja rastreabilidade não foi estabelecida por comparação a materiais de referência, mas foram confirmados por análises independentes ou submetidos a ensaio confirmatório.

b) Os MRC, MR e CIs devem:

I. Estar alíquotados, acondicionados e mantidos de forma adequada quando as características desses materiais requererem tais cuidados;

II. Estar identificados de forma unívoca e

III. Estar inventariados de forma a permitir sua rastreabilidade.

2.5. MRCs somente serão exigidos para a comprovação de desempenho de técnicas de diagnóstico ou outra finalidade, quando sejam tecnicamente imprescindíveis e seu uso estabelecido nesse Manual.

a) Quando o MRC, MR1^a, MR2^a e MR3^a não estiverem disponíveis para aquisição comercial ou por obtenção junto a organismo, laboratório ou instituição de referência a verificação pode ser realizada utilizando controles internos ou produtos biológicos (como antígenos e vacinas) de origem comprovada e capazes de manter suas características de homogeneidade e estabilidade.

b) Para verificação de métodos de diagnóstico molecular é obrigatória a utilização do Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, disponível no sítio eletrônico do MAPA em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/>

2.6. Validade dos Materiais de Referência - MR e Controle Interno - CI:

a) Materiais que necessitem de passagens ou subcultivos:

- I. Deve obedecer ao estabelecido no item 2.4. b).
- II. O número de passagens dos microrganismos deve ser documentado e devem ser minimizados os subcultivos excessivos para prevenir alterações genotípicas, fenotípicas e contaminação, tanto quanto possível.
- III. Os laboratórios deverão adotar um sistema de lotes de culturas que garanta a rastreabilidade, o controle de passagens, utilização de culturas até a quinta passagem, o correto armazenamento e também a verificação das características esperadas durante o período de utilização.
- IV. Poderão ser utilizados micro-organismos além da quinta passagem quando forem únicos, raros ou de difícil obtenção e desde que estejam mantidas as características exigidas para o ensaio.
- V. Se os micro-organismos de teste forem obtidos de coleções de referência ou outra certificação apropriada, devem ser seguidas as instruções do fabricante para seu cultivo e uso, devendo também verificar se as características esperadas estão presentes.
- VI. A primeira passagem deverá ser produzida antes da expiração do prazo de validade comercial do material de referência, e serão armazenadas em condições adequadas preferencialmente ultracongeladas (-70° C ou inferior) ou liofilizadas;
- VII. A partir da primeira passagem o prazo para utilização dos micro-organismos é estabelecido pelo laboratório, enquanto a cepa mantiver as características pertinentes ao seu uso.
- VIII.** Compete aos LFDA emitir o certificado de análise para as cepas por eles isoladas.

b) Materiais que não necessitem de passagens ou subcultivos:

- I. Deve obedecer ao estabelecido no item 2.4. b)
- II. O prazo de validade dos soros sanguíneos e antígenos ou outros materiais que não necessitem de passagens ou subcultivos é indeterminado, enquanto mantiverem as características pertinentes ao seu uso.
- III. O prazo de validade dos tecidos para proteína priônica, preservados por congelamento (-20° C ou inferior), em formol ou bloco de parafina é indeterminado, enquanto mantiverem as características pertinentes ao seu uso.

3. Monitoramento de Desempenho e Garantias de Resultados

3.1. O laboratório deverá ter procedimentos para monitorar seu desempenho e garantir o resultado de seus ensaios.

3.2. Ensaio de Proficiência:

- a) Os provedores de ensaios de proficiência deverão ser acreditados na ISO/IEC 17043 ou ser laboratório de referência da Organização Mundial de Saúde Animal – OIE, Organização para a Alimentação e Agricultura - FAO ou União Europeia - UE.
- b) Desde que comprovada a inexistência de provedor, nacional ou internacional, que atendam a esses requisitos, poderão ser utilizados como provedores laboratórios de reconhecida competência.
- c) É vetada a participação de laboratórios credenciados em qualquer etapa da organização e da avaliação de resultados de ensaios de proficiência, considerando seus escopos de credenciamento.
- d) O fornecimento de amostras para provedores de ensaio de proficiência que atendam aos requisitos estabelecidos nos itens a) e b), poderá ser permitido com autorização prévia da CGAL.
- e) Na solicitação à CGAL deverão constar todos os dados das amostras a serem fornecidas.

3.3. Aceitação de Produtos providos externamente (insumos) antes do uso

Antes da aceitação de insumos para utilização o laboratório deve:

- a) Definir os requisitos para a avaliação e aceitação;
- b) Realizar a sua avaliação e
- c) Analisar criticamente os resultados obtidos antes de aceitá-lo.

Esta avaliação pode ser realizada utilizando amostras de controle interno do laboratório.

3.4. Realização do ensaio

- a) Os ensaios deverão ser realizados com a utilização de insumos registrados no MAPA, segundo legislação em vigor.
- b) Para a realização dos ensaios não é necessária a utilização de MRC ou MR.
- c) O encaminhamento dos Relatórios de Ensaio deverá obedecer ao estabelecido pelo Departamento de Saúde Animal – DSA.

4. Insumo, Reagentes e Consumíveis

4.1. Para fins de auditoria os laboratórios credenciados deverão manter registros prontamente disponíveis, que comprovem a aquisição de insumos, reagentes e consumíveis compatíveis com o número de ensaios realizados.

CAPÍTULO 1.1.4. AMOSTRAS

1. Disposições Gerais

1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na Legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento;

1.2. As amostras recebidas pelos laboratórios credenciados, que sejam oriundas dos programas e controles oficiais do MAPA, são de propriedade deste Ministério e deverão ser utilizadas para realização dos ensaios solicitados no documento de seu encaminhamento ao laboratório, obedecido o escopo de credenciamento.

1.3. Caso haja a previsão legal da realização de ensaios complementares ou confirmatórios, o laboratório deverá realizá-los sem a necessidade de que esses estejam solicitados no documento de encaminhamento.

1.4. Não é permitido que as amostras passem por Posto de Coleta ou de Armazenagem antes de seu recebimento pelo laboratório.

1.5. Amostras cujos prazos legais de armazenamento no laboratório estejam expirados poderão ser descartadas obedecendo ao estabelecido neste Manual.

a) O descarte deve ser registrado;

b) Devem ser realizadas conferência do material a ser descartado, antes da efetivação.

1.6.1. Amostras com prazo de armazenamento expirado e não descartadas poderão ser utilizadas para:

a) Realização de treinamento dos colaboradores do próprio laboratório;

b) Controle interno de ensaio;

c) Ensaios intralaboratoriais;

d) Verificação de insumos;

e) Ensaio de proficiência e

f) Ensino ou pesquisa.

1.6.1.1. O fornecimento de amostras para as finalidades listadas nos itens e) e f) somente será permitido com autorização prévia da CGAL e do Departamento de Saúde Animal - DSA. Na solicitação deverão constar todos os dados das amostras a serem fornecidas.

1.6.1.2. Os Laboratórios Federais de Defesa Agropecuários - LFDA poderão utilizar as amostras para outras finalidades, não previstas no item 1.4.1., desde que previamente autorizados pela CGAL.

1.7. Adicionalmente ao determinado nos capítulos desse Manual, a CGAL poderá solicitar ao laboratório credenciado o encaminhamento das amostras e seus produtos (DNA, RNA, agentes isolados, etc.) a um LFDA.

1.8. Quando os ensaios solicitados, ainda que para doenças diferentes, forem realizados com a mesma matriz, o laboratório deverá receber amostra única por animal.

1.9. As amostras devem ser recebidas:

a) Acompanhadas do Formulário de encaminhamento de amostras, definido pelo MAPA.

- I. Sua geração, impressão, preenchimento, numeração sequencial do formulário, assinatura e encaminhamento ao laboratório é de responsabilidade do médico veterinário requisitante, responsável pela coleta da amostra.
- II. Este formulário não será emitido por laboratório da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários.
- III. Quando as legislações que estabelecem os formulários fizerem a previsão de requisição apenas para uma doença, não será permitido o recebimento de formulário único solicitando ensaios para múltiplas doenças, mesmo quando acompanhado de amostra única coletada de um mesmo animal.
- IV. Não é permitida a utilização de vias carbonadas.
- V. Enquanto as legislações em vigor fizerem a previsão de que nos formulários de requisição existam campos para preenchimento de dados do ensaio, insumos e seus resultados, estes campos deverão ser inutilizados e no campo "Resultado" deve constar a seguinte frase: "Relatório de ensaio emitido conforme o Manual de Métodos Oficiais para Diagnóstico de Doenças Animais".
- VI. O formulário de encaminhamento deve:
 - i) Estar fixado no lado externo da caixa;
 - ii) Estar completamente preenchido;
 - iii) Estar preenchido de forma legível;
 - iv) Não possuir rasuras;
 - v) Estar assinado pelo médico veterinário requisitante;
 - vi) Conter o número de registro do médico veterinário requisitante no Conselho Regional de Medicina Veterinária;
 - vii) Conter o número de identificação preenchido pelo requisitante.
- b) Em embalagem externa (caixa de transporte) íntegra e inviolada;
- c) Acondicionadas de forma a manter sua integridade;
- d) Devidamente lacradas, caso seja determinado pelo DSA;
- e) Univocamente identificadas;
- f) Acondicionadas em meio de transporte adequado (Ex: MEM, Líquido de valleé, água peptonada, etc.);
- g) Em quantidade suficiente para a realização dos ensaios solicitados, sua repetição e realização de ensaios complementares, caso necessário;

h) Em temperatura de conservação adequada para o ensaio solicitado, conforme estabelecida na Tabela Critérios de Conformidade, disponível no sitio eletrônico do MAPA em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/>;

I. no caso de amostras para diagnóstico de doenças não previstas nesse manual o LFDA/CGAL deve ser consultado.

- i) Sem evidência de contaminação;
- j) Soros de aves não devem estar lipêmicos;
- k) Sem evidência de autólise;

I. As amostras destinadas aos ensaios de Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) e Scrapie devem obedecer a critérios específicos.

l) Sem evidência de hemólise, no caso de soros. Quando apresenta-la ser \leq grau 6 conforme estabelecido na FIGURA1.

FIGURA 1. Grau de hemólise de soro sanguíneo



Fonte: LFDA-MG

1.8. Não é permitido o processamento de amostras que apresentem qualquer Não Conformidade (NC), inclusive documentais, salvo o disposto no item 2.0 a seguir.

1.9. Quando for detectada NC, que afete a realização de todos os ensaios solicitados o laboratório deverá informar ao demandante o motivo da rejeição da amostra.

1.10. Quando for detectada NC que afete a realização de parte dos ensaios o laboratório deverá informar ao demandante o motivo da não realização (rejeição) do ensaio afetado.

a) No caso dos LFDAs a definição sobre os Órgãos que deverão receber essas informações será definida pelo DSA.

2.0. Amostra recebida com NC pelo LFDA, para o diagnóstico de doenças de notificação obrigatória imediata à OIE, poderá ser processada a critério do RT do laboratório.

a) A NC deve ser imediatamente comunicada aos Órgãos definidos pelo DSA.

b) Caso a NC seja documental, o Relatório de Ensaio não será emitido até a sua correção.

d) A NC documental deve adicionalmente ser reportada no Relatório Ensaio informando o número de dias que o LFDA aguardou a solução da NC por parte do demandante do ensaio.

c) A NC não documental deve adicionalmente ser reportada no Relatório de Ensaio.

CAPÍTULO 1.1.5.

ESCOPO

1. Disposições Gerais

1.1. Somente serão credenciados laboratórios que atenderem ao escopo mínimo para cada grupo de doenças: Doença das Aves, Doenças dos Bovinos, Doenças dos Equinos, Doenças dos Suínos, Doenças de Pequenos Ruminantes e Doenças que acometem múltiplas espécies.

a) O escopo mínimo será composto pelo conjunto de uma ou mais doenças e suas respectivas técnicas diagnósticas, conforme listados no item 2.

1.2. As solicitações de credenciamento e extensão de escopo devem obedecer ao estabelecido no escopo de referência disponível no sítio eletrônico do MAPA em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/>

a) Na solicitação é facultado ao laboratório a escolha das matrizes e espécies disponíveis em cada ensaio do escopo de referência, desde que atenda ao escopo mínimo estabelecido no item 2.

b) Na solicitação de credenciamento deverão ser incluídas as legislações do Departamento de Saúde Animal - DSA onde estão previstos o credenciamento de laboratórios, o tipo de laboratório apto a ser credenciado (público ou privado) e a finalidade do ensaio.

1.3. O escopo mínimo será obrigatório a partir da data da vigência da primeira edição desse Manual, para laboratórios já credenciados ou em processo de credenciamento.

a) As exceções estão informadas no item 2. Escopo mínimo para o laboratório credenciado

b) No caso de inclusão de enfermidades ou nova técnica de diagnóstico em futuras revisões, o prazo para atendimento ao escopo mínimo será de 2 anos a partir da vigência da nova edição do Manual

c) A abertura de processos para novos credenciamentos ou extensão de escopo deve contemplar o escopo mínimo.

1.4. O escopo mínimo e os capítulos relativos a animais terrestres e aquáticos não contempladas neste manual serão incluídos em próximas revisões.

2. Escopo mínimo para laboratório credenciado

2.1. Doenças das Aves

a) O escopo mínimo será composto por Salmonelose Aviária e Micoplasmose Aviária e suas respectivas técnicas diagnósticas.

I. Salmonelose Aviária

- i) Soroaglutinação rápida em placa - SAR e
- ii) Isolamento em meio de cultura e
- iii) Caracterização Antigênica básica da cepa isolada ou
- iv) Caracterização Antigênica Intermediária da cepa isolada ou
- v) Caracterização da cepa isolada por Microarranjo.

II. Micoplasmose Aviária

- i) Soroaglutinação rápida em placa - SAR e
- ii) Ensaio Imunoenzimático - ELISA ou Inibição de Hemoaglutinação – HI e
- iii) PCR em Tempo Real ou
- iv) PCR convencional.

Para laboratórios já credenciados, escopo mínimo relativo ao diagnóstico das Micoplasmose Aviária por meio de técnicas moleculares, entra em vigor 2 anos da data da publicação da primeira edição deste manual.

2.2. Doenças dos Bovinos

a) Não se aplica o determinado no item 1.1. a I., sendo permitida a realização dos ensaios apenas para uma das enfermidades e suas respectivas técnicas diagnósticas.

I. Encefalopatia Espongiforme Bovina - EEB

- i) Ensaio Imunoenzimático – ELISA.

Para laboratórios já credenciados, escopo mínimo entra em vigor 2 anos após da publicação da primeira edição deste manual.

II. Brucelose

- i) Teste do Antígeno Acidificado Tamponado – AAT e
- ii) Teste do 2 – Mercaptoetanol - 2-ME ou
- iii) Polarização Fluorescente.

2.3 Doenças dos Equinos

a) O escopo mínimo será composto por Anemia Infecciosa Equina e Mormo e suas respectivas técnicas diagnósticas.

I. Anemia Infecciosa Equina - AIE

i) IDGA.

II. Mormo

i) Ensaio Imunoenzimático – ELISA.

Para laboratórios já credenciados, o escopo mínimo entra em vigor 2 anos após da publicação da primeira edição deste manual.

2.4. Doenças dos suínos

a) O escopo mínimo será composto por Peste Suína Clássica, Peste Suína Africana, Doença de Aujeszky, Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos – PRRS e suas respectivas técnicas diagnósticas.

I. Peste Suína Clássica

i) Ensaio Imunoenzimático – ELISA.

II. Peste Suína Africana

i) Ensaio Imunoenzimático – ELISA.

III. Doença de Aujeszky

i) Ensaio Imunoenzimático – ELISA.

IV Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos - PRRS

i) Ensaio Imunoenzimático – ELISA.

Para laboratórios já credenciados, o escopo mínimo entra em vigor 2 anos após da publicação da primeira edição deste manual.

2.5. Doenças de Pequenos Ruminantes

a) Scrapie

I. Ensaio Imunoenzimático – ELISA.

Para laboratórios já credenciados, o escopo mínimo entra em vigor 2 anos após da publicação da primeira edição deste manual.

2.6. Doenças que acometem múltiplas espécies

a) Não se aplica o determinado no item 1.1. a I, sendo permitida a realização dos ensaios apenas para uma das enfermidades.

I. Febre Aftosa

- i) Ensaio Imunoenzimático - ELISA 3ABC e
- ii) Ensaio enzimático de Imunoeletrotransferência – EITB.

II. Raiva

- i) Imunofluorescência Direta e
- ii) Inoculação em células ou
- iii) Prova Biológica - Inoculação em camundongo.

Parte 2

Diagnóstico das Doenças dos Animais Terrestres

Seção 2.1

Aves

CAPÍTULO 2.1.1. SALMONELOSE AVIÁRIA

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da Salmonelose Aviária:

1.1. Detecção da Resposta Imune

- a) Soro sanguíneo

1.2. Identificação do Agente

a) Material Fecal

- I. Mecônio
- II. Fezes frescas.

b) Material Ambiental e suabes

- I. Suabe de arrasto;
- II. Propé;
- III. Suabe de fundo de caixa;
- IV. Papel de fundo de caixa
- V. Suabe de cloaca;
- VI. Poeira de aviário.

c) Órgãos e tecidos

- I. Coração;
- II. Fígado e vesícula biliar;
- III. Baço;
- IV. Ceco com tonsilas cecais;
- V. Saco da gema;
- VI. Ovário ou gônadas.

d) Ovos bicados, aves mortas e pintos de um dia (órgãos e tecidos)

- I. Fígado, baço e vesícula biliar;
- II. Saco da gema;
- III. Ceco.

1.3. Triagem por Biologia Molecular - PCR

a) Material Fecal

- I. Mecônio;
- II. Fezes frescas;

b) Material Ambiental e suabes

- I. Suabe de arrasto;
- II. Propé;
- III. Suabe de fundo de caixa;
- IV. Papel de fundo de caixa
- V. Suabe de cloaca;
- VI. Poeira de aviário.

c) Órgãos e tecidos

- I. Coração;
- II. Fígado e vesícula biliar;
- III. Baço;
- IV. Ceco com tonsilas cecais;
- V. Saco da Gema;
- VI. Ovário ou Gônadas.

d) Ovos bicados, aves mortas e pintos de um dia (órgãos e tecidos)

- I. Fígado, baço e vesícula biliar;
- II. Saco da gema;
- III. Ceco.

1.4. Triagem por Biologia Molecular - BAX

a) Gema, Material Fecal e Ambiental

- I. Mecônio;
- II. Gema;
- III. Fezes frescas;
- IV. Suabe de Fundo de caixa;
- V. Papel de fundo de caixa;
- VI. Suabe de cloaca;

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na Legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento;

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo Legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos.

a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente.

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25 °C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios de interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório;

3.1.8. O laboratório deve identificar no Relatório de Ensaio o sorovar que estiver contemplado entre os sorovares da caracterização básica (S. Typhimurium, S. Enteritidis, S. Gallinarum e S. Pullorum) ou da ampliada (S. Typhimurium, S. Enteritidis, S. Gallinarum, S. Pullorum, S. Heidelberg, S. Virchow, S. Hadar e S. Infantis), identificando no escopo de credenciamento e acreditação qual das técnicas utiliza. A identificação dos sorovares não contemplados no Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) é opcional e somente pode ser realizada através de tipificação por microarranjo de DNA ou caracterização antigênica completa;

3.1.9. O laboratório pode utilizar um provedor externo para a realização da tipificação por microarranjo de DNA, desde que este provedor seja credenciado pelo MAPA com o escopo mínimo para doenças das aves conforme estabelecido capítulo 1.1.5 – Escopo, Doença das aves;

3.1.10. No caso de o laboratório optar pela caracterização antigênica completa, esta somente poderá ser realizada por um dos laboratórios de referência para salmonela como o Instituto Oswaldo Cruz e o Instituto Adolfo Lutz. Os LFDAs não prestarão este serviço.

3.1.11. O envio de cepas a provedores externos deverá ser previamente acordado.

a) É facultado ao provedor externo como o Instituto Oswaldo Cruz e o Instituto Adolfo Lutz o aceite ou não do acordo;

3.1.12. Os custos da caracterização ou tipificação serão cobertos pelo laboratório que encaminhou a cepa.

3.2. Detecção da Reposta Imune - Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.2.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Ponteiras descartáveis
- g) Reservatórios para soluções (cubetas);
- h) Papel absorvente;
- i) Selador ou tampa para placas de ELISA;
- j) Caneta para identificação de vidraria;
- k) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.2.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Geladeira;
- b) Freezer;
- c) Estufa;
- d) Termômetros;
- e) Micropipetas monocal e multicanal de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Leitora de ELISA;
- h) Cronômetros;
- i) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- j) Agitador de microplacas (opcional);
- k) Lavadora de microplacas (opcional);
- l) Autoclave.

3.2.3. Insumos

- a) Kits de ELISA para a detecção de anticorpos para salmonela.

3.2.4. Soluções

- a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados;
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;

c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;

d) Diluir a soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5. Realização do ensaio

a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;

b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;

c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;

d) Utilizar ponteiras distintas para cada controle e amostra de soro;

e) Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;

f) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;

g) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;

h) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2.6. Critérios de aceitação do Ensaio

a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles e os demais parâmetros calculados a partir delas estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos resultados

a) De acordo com as DOs obtidas, consideram-se as amostras como POSITIVAS ou NEGATIVAS ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

3.2.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como POSITIVO ou NEGATIVO ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

b) Expressar a quantidade de amostras de soro positivas dentre o total de analisadas.

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.2.10;

b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;

c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

a) Amostras de soros podem ser descartadas após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.3. Detecção da Resposta Imune - Soroaglutinação rápida em placa (SAR)

3.3.1. Materiais

- a) Luvas descartáveis;
- b) Placa de vidro (ou outro material rígido) quadriculada;
- c) Ponteiras descartáveis para micropipetas de volume apropriado;
- d) Bastões de vidro ou misturador múltiplo para homogeneizar;
- e) Recipientes para descarte.

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Micropipeta de volume regulável;
- b) Banho-maria;
- c) Fonte de luz;
- d) Cronômetro;
- e) Microcentrífuga;
- f) Autoclave.

3.3.3. Insumos

- a) Antígeno corado para aglutinação rápida de *Salmonella Pullorum/Gallinarum* (SAR);
- b) Soro controle POSITIVO para salmonela;
- c) Soro controle NEGATIVO para salmonela.

3.3.4. Soluções

Não aplicável.

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1. Preparo das amostras

- a) Este ensaio não pode ser realizado com amostras que foram congeladas;
- b) Deixar as amostras atingirem temperatura ambiente ou a temperatura indicada pela bula do fabricante do Antígeno antes de realizar o ensaio;
- c) Em caso de haver traços de hemólise nas amostras de soro, centrifugá-las antes de realizar o ensaio.

3.3.5.2. Preparo dos reagentes

- a) Os antígenos devem estar na temperatura ambiente, conforme estabelecido no capítulo 1.1.4 deste Manual. Homogeneizar o frasco contendo o antígeno constantemente durante a realização do ensaio para evitar precipitação.

3.3.5.3. Soroaglutinação Rápida - SAR

- a) Realizar o ensaio na temperatura indicada pelo fabricante;
- b) Homogeneizar suavemente o frasco contendo o antígeno durante a realização do ensaio para evitar precipitação;
- c) Depositar o volume indicado pelo fabricante do antígeno no centro de um quadradinho da placa limpa e desprezar a ponteira. Caso a bula do produto não indique o volume exato a utilizar, o fabricante deverá ser contatado;
- d) Depositar mesma quantidade do soro a ser testado sobre a gota do antígeno e homogeneizar ambas com auxílio de ponteira, bastão ou homogeneizador múltiplo, formando um círculo de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro;
- e) Agitar suavemente a placa, fazendo movimentos circulares;
- f) Observar a formação de grumos colocando a placa contra a fonte luminosa e fundo branco após transcorrido o tempo especificado pelo fabricante;
- g) Em paralelo às amostras, devem sempre ser incluídos:
 - I. Soro controle POSITIVO;
 - II. Soro controle NEGATIVO.

3.3.6. Critérios de aceitação do ensaio

- a)** O ensaio será válido quando:
 - I.** O controle POSITIVO apresentar formação de grumos sob as condições especificadas para o ensaio pelo fabricante do insumo;
 - II.** O controle NEGATIVO não apresentar nenhuma formação de grumos.

3.3.7. Interpretação dos resultados

- a)** Considerar a amostra positiva quando houver qualquer grau de formação de grumos, dentro do tempo preconizado pelo fabricante, ainda que com menor intensidade que o controle POSITIVO;
- b)** Considerar a amostra negativa quando não houver qualquer grau de formação de grumos.

3.3.8. Emissão dos resultados

- a)** Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como POSITIVO ou “NEGATIVO”;
- b)** Expressar a quantidade de amostras de soro positivas dentre o total de analisadas.

3.3.9. Descarte das amostras e Resíduos

- a)** Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.3.10;
- b)** Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c)** Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- d)** O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.3.10. Retenção de Itens de Ensaio

- a)** As amostras de soros poderão ser descartadas após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.4. Detecção da Resposta Imune - Soroaglutinação Lenta em Tubos -SAL

3.4.1. Materiais

- a) Luvas descartáveis;
- b) Tubos de plástico ou vidro transparentes e com tampa, de capacidade adequada;
- c) Estante para os tubos;
- d) Ponteiras;
- e) Recipiente para descarte de ponteiras e tubos.

3.4.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Micropipetas de volume apropriado ou pipeta graduada que dispense os volumes necessários;
- b) Cronômetro;
- c) Fonte de Luz;
- d) Estufa;
- e) Autoclave.

3.4.3. Insumos

- a) Antígeno para soroaglutinação lenta de *Salmonella Pullorum/Gallinarum* -SAL;
- b) Soro controle POSITIVO para salmonela;
- c) Soro controle NEGATIVO para salmonela.

3.4.4. Soluções

- a) Solução salina 0,9% ou solução de PBS 0,01M pH 7,0-7,2.

3.4.5. Realização do ensaio

3.4.5.1. Preparo das amostras

- a) Caso indicado pelo fabricante, inativar as amostras a 56 °C por 30 minutos antes da realização do ensaio.

3.4.5.2. Preparo dos reagentes

- a) Antes e durante a realização do ensaio, homogeneizar bem o frasco de antígeno para SAL de salmonela, observando se não há nenhum depósito no fundo.

3.4.5.3. Técnica da SAL

- a) As etapas de realização do ensaio podem variar de acordo com o fabricante, devendo o analista sempre verificar a bula do antígeno e seguir as recomendações por ela fornecidas;
- b) Identificar um tubo para cada soro a ser testado e um para cada controle;
- c) Distribuir volume especificado pelo fabricante do antígeno em cada tubo, utilizando a pipeta graduada ou a micropipeta;
- d) Adicionar volume especificado pelo fabricante de cada soro a ser analisado em seu respectivo tubo, assim como os controles POSITIVO e NEGATIVO, utilizando a micropipeta;
- e) Tampar os tubos e homogeneizar para que haja mistura total da amostra/controlado com o antígeno;
- f) Adicionar ao ensaio um tubo contendo apenas o antígeno, como forma de controle de possível auto aglutinação;
- g) Incubar os tubos em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16 a 24 horas ou de acordo com instrução do fabricante;
- h) Proceder com a leitura, com luz indireta, contra fundo escuro.

3.4.6. Critérios de aceitação do ensaio

- a) Controle POSITIVO apresenta sobrenadante límpido com depósito granular. Sob agitação leve, o precipitado forma grumos;
- b) Controle NEGATIVO apresenta sobrenadante turvo, com ausência de grumos quando da agitação leve do tubo;
- c) Controle de antígeno apresenta sobrenadante turvo, com ausência de grumos quando da agitação leve do tubo, semelhante ao controle NEGATIVO.

3.4.7. Interpretação dos resultados

- a) São consideradas positivas as amostras que apresentarem características de formação de grumos semelhante ao controle POSITIVO, ainda que em menor dimensão e quantidade.

3.4.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como “POSITIVO” ou “NEGATIVO”;
- b) Expressar a quantidade de amostras de soro positivas dentre o total de analisadas.

3.4.9. Descarte das amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.4.10;
- b) Todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavagem apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- c) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.4.10. Retenção de itens de ensaio

a) Amostra de soros poderão ser descartadas após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.5. Identificação do Agente - Isolamento de Salmonela

3.5.1. Materiais

- a) Luvas para procedimento;
- b) Alças bacteriológicas descartáveis ou flambáveis;
- c) Agulhas bacteriológicas descartáveis ou flambáveis;
- d) Placas de Petri com meio de cultura de diâmetro mínimo de 9 cm;
- e) Pipetas estéreis de volumes variados (opcional);
- f) Seringas descartáveis de volumes variados (opcional);
- g) Micropipetas de volumes variados;
- h) Pinça ou pазinha estéril;
- i) Tesoura estéril (opcional);
- j) Tubos;
- k) Conta-gotas;
- l) Suporte para placas;
- m) Suporte para tubos;
- n) Cubas para descarte com líquido desinfetante (opcional).

3.5.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de Segurança Biológica classe II A2 (preferencial) ou bancada com bico de Bunsen;
- b) Esterilizador de alças bacteriológicas (opcional);
- c) Estufa;
- d) Geladeira;
- e) Balança semi-analítica (opcional);
- f) Agitador tipo vórtex (opcional);
- g) Homogeneizador para laboratórios de microbiologia (opcional);
- h) Autoclave.

3.5.3. Insumos

- a) Caldo BHI;
- b) Caldo Tetracionato com Novobiocina a 4%;
- c) Caldo Rappaport Vassiliadis;
- d) Meio semi-sólido modificado Rappaport-Vassiliadis (MRSV);
- e) Ágar MacConkey;
- f) Ágar Hektoen;
- g) Ágar Xilose Lisina Deoxicolato (XLD) ou ágar verde brilhante (BPLS);
- h) Ágar Rambach;
- i) Ágar tríplice açúcar ferro (TSI);
- j) Ágar lisina ferro (LIA);
- k) Meio SIM;
- l) Caldo Uréia;

- m) Caldo fermentação de carboidratos - vermelho de fenol;
- n) Caldo fermentação de carboidratos - vermelho de fenol em frasco com tubo de Duhran;
- o) Caldo base Moeller;
- p) Caldo base Moeller arginina;
- q) Caldo base Moeller ornitina;
- r) Caldo base Moeller lisina;
- s) Ágar citrato Simmons em bisel;
- t) Ágar fenilalanina em bisel;
- u) Caldo malonato;
- v) Meio Clark-Lubs (VM-VP);
- w) Ágar nutriente;
- x) Ágar Stock;
- y) Reativos de Kovacs ou Ehrlich;
- z) Óleo mineral estéril;
- aa) Controle POSITIVO (cepa de referência de *Salmonella* spp ou de um sorovar de controle do PNSA).

3.5.4. Soluções

- a) Água Peptonada 1% pH 7,2 + 0,2;
- b) Solução de Iodo-Iodeto a 10%;
- c) Solução de Lactose 10%;
- d) Solução de Sacarose 10%;
- e) Solução de Dulcitol 5%;
- f) Solução de Maltose 5%;
- g) Solução de Manitol 10%;
- h) Solução de Glicose 10%;
- i) Solução de Cloreto Férrico 10%;
- j) Solução de Vermelho de Metila 0,06%;
- k) Solução Alcoólica de Alfa Naftol 5%;
- l) Solução de Hidróxido de Potássio 40%.

3.5.5. Realização do ensaio

3.5.5.1. Considerações gerais

- a) Todas as etapas devem ser realizadas em cabine de segurança biológica ou no raio de esterilidade do bico de Bunsen;
- b) Deve ser utilizado um controle POSITIVO (cepa de *Salmonella* spp ou um sorovar de controle do PNSA) em todas as etapas do isolamento;
- c) Inicialmente deve ser escolhido um dos métodos de triagem (QUADRO 1) de acordo com o tipo da amostra. As colônias encontradas como suspeitas de salmonela devem seguir para a etapa de purificação (item 3.5.5.2.7 e 3.5.5.3.4);
- d) O laboratório pode optar por realizar a triagem por qPCR para *Salmonella* spp. (técnica 3.8) ou por BAX® (técnica 3.9) antes da realização do Isolamento;
- e) Após a realização do Isolamento deve ser feita a caracterização da cultura isolada, através da Caracterização antigênica (técnica 3.6), Tipificação por microarranjo de DNA (técnica 3.7) ou qPCR específico para os sorovares do PNSA (técnica 3.8). No caso de ser utilizado um dos métodos

moleculares, é possível abreviar as etapas do Isolamento desde que a verificação de desempenho realizada pelo laboratório tenha contemplado essa possibilidade. Vide fluxograma do item 4. (ANEXO).

3.5.5.2. Triagem em meio seletivo diferencial

3.5.5.2.1. Enriquecimento de material fecal

- a) Adicionar 400 µL de solução de iodo-iodeto a 10% em cada um dos tubos de caldo Tetrionato com Novobiocina a 4%, no momento do uso;
- b) Homogeneizar a amostra e inocular:
 - I. 2 mL ou 2 g da amostra em 20 mL de caldo BHI;
 - II. 2 mL ou 2 g da amostra em 20 mL de Caldo Tetrionato;
 - III. 0,2 mL ou 0,2 g da amostra em 20 mL de Caldo Rappaport;
- c) Ao final do procedimento inocular uma cepa de controle POSITIVO (cepa de referência de *Salmonella* spp ou de um sorovar de controle do PNSA) nos caldos listados no item b);
- d) Incubar o caldo BHI a 37 °C ± 1 °C por 18-24 h;
- e) Incubar os caldos Tetrionato e Rappaport a 42°C ± 1 °C por 18-24 horas;
- f) Sempre que houver qualquer impedimento à continuação imediata dos procedimentos do método de Isolamento, amostras enriquecidas podem ser armazenadas sob refrigeração (entre 2 e 8°C) por até 72 horas após a incubação.

3.5.5.2.2. Pré-Enriquecimento de material ambiental e suabes

- a) Realizar o pré-enriquecimento da amostra, adicionando aproximadamente 20 a 50 mL de água peptonada 1%, na quantidade suficiente para cobrir a amostra com o líquido;
- b) Incubar em estufa a 37 °C ± 1°C por 18-24 horas;
- c) Sempre que houver qualquer impedimento à continuação imediata dos procedimentos do método de Isolamento, amostras enriquecidas podem ser armazenadas sob refrigeração (entre 2 e 8°C) por até 72 horas após a incubação.

3.5.5.2.3. Enriquecimento de material ambiental e suabes

- a) Adicionar 400 µL de solução de iodo-iodeto a 10% em cada um dos tubos de caldo Tetrionato com Novobiocina a 4%, no momento do uso;
- b) Homogeneizar a amostra pré-enriquecida e inocular:
 - I. 2 mL em 20 mL de caldo BHI;
 - II. 2 mL em 20 mL de Caldo Tetrionato;
 - III. 0,2 mL em 20 mL de Caldo Rappaport;
- c) Ao final do procedimento inocular o controle POSITIVO (cepa de referência de *Salmonella* spp ou de um sorovar de controle do PNSA) nos caldos listados no item b);
- d) Incubar o caldo BHI a 37 °C ± 1 °C por 18-24 h;
- e) Incubar os caldos Tetrionato e Rappaport a 42°C ± 1 °C por 18-24 horas;
- f) Sempre que houver qualquer impedimento à continuação imediata dos procedimentos do método de Isolamento, amostras enriquecidas podem ser armazenadas sob refrigeração (entre 2 e 8°C) por até 72 horas após a incubação.

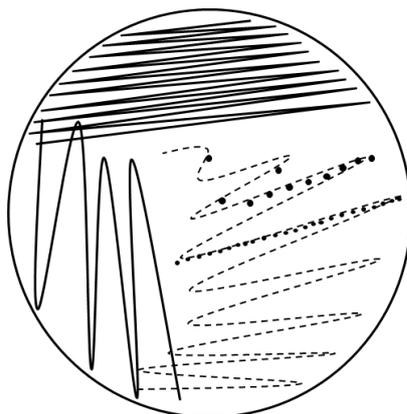
3.5.5.2.4. Enriquecimento de órgãos e tecidos

- a) Adicionar 400 µL de solução de iodo-iodeto a 10% em cada um dos tubos de caldo Tetrionato com Novobiocina a 4%, no momento do uso;
- b) Triturar/macerar/homogeneizar a amostra e inocular:
 - I. 2 g em 20 mL de caldo BHI;
 - II. 2 g em 20 mL de Caldo Tetrionato (em 2 tubos);
 - III. 0,2 g em 20 mL de Caldo Rappaport (em 2 tubos);
- c) Ao final do procedimento inocular o controle POSITIVO (cepa de referência de *Salmonella* spp ou de um sorovar de controle do PNSA) nos caldos listados no item b);
- d) Incubar o caldo BHI a 37 °C ± 1 °C por 18-24 h;
- e) Incubar um dos tubos dos caldos Tetrionato e Rappaport a 37 ± 1 °C e o outro a 42 ± 1 °C por 18-24 horas;
- f) Sempre que houver qualquer impedimento à continuação imediata dos procedimentos do método de Isolamento, amostras enriquecidas podem ser armazenadas sob refrigeração (entre 2 e 8°C) por até 72 horas após a incubação.

3.5.5.2.5. Plaqueamento seletivo diferencial para material fecal, ambiental, suabes, órgãos e tecidos

- a) Secar as placas a serem utilizadas em fluxo laminar ou cabine de segurança biológica;
- b) As placas devem ser mantidas, durante todo o tempo de armazenamento, secagem e incubação com o ágar voltado para baixo;
- c) Agitar o tubo contendo o material enriquecido;
- d) Retirar uma alíquota do inóculo do caldo de enriquecimento;
- e) Plaquear cada tubo de caldo de enriquecimento em pelo menos um meio de cultura com alta seletividade (ágar XLD ou BPLS) e pelo menos um meio de média seletividade (ágar Hektoen ou ágar MacConkey). Pode ser realizada uma única alçada para cada caldo a ser plaqueado;
- f) Esgotar o inóculo na extremidade do ágar e estriar a partir deste ponto. As estrias devem ser próximas e deve-se aproveitar toda a extensão da placa (FIGURA 1);
- g) Inocular uma placa de cada ágar utilizado com as culturas de controle POSITIVO de salmonela provenientes dos caldos BHI, Tetrionato e Rappaport enriquecidos na etapa de enriquecimento;
- h) Incubar as placas à temperatura de 37 °C ± 1 °C por 18-24 horas;
- i) Caso haja necessidade de divisão de placas entre duas alíquotas, elas deverão pertencer à mesma amostra. Para que haja divisão, a placa deverá ter, no mínimo, 9 cm de diâmetro;
- j) Em nenhuma hipótese deve-se estriar uma amostra e um controle POSITIVO na mesma placa.

FIGURA 1. Técnica de semeadura por esgotamento em ágar



(Fonte: LFDA-SP)

QUADRO 1. Caldos e ágar utilizados para incubação por material

Método de Triagem	Amostras	Pré-enriquecimento	Enriquecimento				Ágar		
		Água peptonada	Caldo BHI	Tetracionato		Rappaport	BPLS ou XLD Mac ou Hek	MSRV	
		37°C	37°C	37°C	42°C	37°C	42°C	37°C	42°C
Meio seletivo diferencial	Material Fecal		X		X		X	X	
	Material ambiental e suabes	X	X		X		X	X	
	Órgãos e tecidos		X	X	X	X	X	X	
	Controle POSITIVO		X		X		X	X	
Meio MSRV	Material Fecal	X							X
	Material Ambiental e suabes	X							X
	Controle POSITIVO	X							X

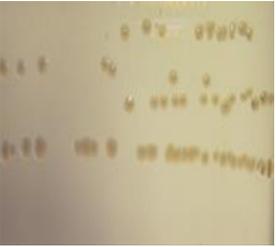
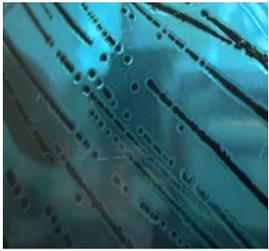
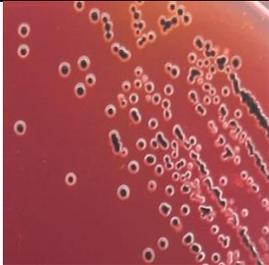
Mac: MacConkey; Hek: Hektoen

(Fonte: LFDA-SP)

3.5.5.2.6. Leitura das placas

- A leitura deverá ser realizada, primeiramente, verificando-se a efetividade do controle POSITIVO utilizado, que deverá ter crescimento bem-sucedido;
- Quando não houver crescimento nas primeiras 24 horas, incubar por mais 24 horas em estufa a 37 ± 1 °C;
- Selecionar, no mínimo, 3 colônias de cada material com características suspeitas de salmonela para a realização em Purificação em ágar Rambach ou XLD conforme item 3.5.5.2.7, conforme indicado no QUADRO 2.

QUADRO 2. Aspecto das colônias de salmonela típicas em meios de cultura seletivos

Meio de cultura	Aspecto das colônias típicas	
Ágar MacConkey	Transparente ou incolor	
Ágar Hektoen	Verdes azuladas podendo apresentar um centro negro	
Ágar BPLS	Cor rosada, entre translúcida ou ligeiramente opaca	
Ágar XLD	Cor-de-rosa (colônias H ₂ S NEGATIVO) e avermelhadas com centro negro (colônias H ₂ S POSITIVO)	
Ágar Rambach	Cor rosa claro a rosa escuro	
	Transparentes e amareladas	

(Fonte: fotos de LFDA-SP; adaptado de DUARTE, S. C. et al, 2016 e ISO 6579-1:2017)

3.5.5.2.7. Purificação em ágar Rambach ou XLD (Opcional)

- a) As colônias suspeitas obtidas nos ágares de triagem podem passar pela etapa de purificação a fim de dar continuidade ao método de isolamento;
- b) Inocular uma alçada da cultura em ágar XLD ou Rambach de modo a obter colônias bem isoladas, estriando o inóculo em três direções diferentes. Utilizar uma alça bacteriológica estéril a cada mudança de direção do estriamento sem recarregá-la com a cultura bacteriana;
- c) Ao final do procedimento, inocular uma placa com o controle POSITIVO (cepa de referência de *Salmonella* spp ou de um sorovar de controle do PNSA);
- d) Incubar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas.

3.5.5.2.8. Leitura das placas

- a) A leitura deverá ser realizada, primeiramente, verificando-se a efetividade do controle POSITIVO utilizado, que deverá ter crescimento bem-sucedido;
- b) Colônias típicas de salmonela em ágar Rambach se apresentam com variações da coloração rosa, sendo que alguns sorovares podem se apresentar transparentes e mais amareladas (QUADRO 2);
- c) Colônias típicas de salmonela em ágar XLD se apresentam com variações da coloração rosa (colônias H₂S NEGATIVO) e avermelhadas com centro negro (colônias H₂S POSITIVO) (QUADRO 2);
- d) Quando não houver crescimento nas primeiras 24 horas, incubar por mais 24 horas em estufa a $37 \pm 1\text{ °C}$;
- e) Sempre que houver qualquer impedimento à continuação imediata dos procedimentos do método de Isolamento, deve-se inocular as colônias selecionadas em ágar nutriente inclinado, incubar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas e manter em temperatura ambiente, até que seja possível o retorno das atividades.

3.5.5.3. Triagem de material fecal e ambiental em meio MSR/V (opcional)

3.5.5.3.1. Pré-enriquecimento

3.5.5.3.1.1. Material fecal

- a) Adicionar 2 g em 20 mL de água peptonada 1%;
- b) Incubar em estufa a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas;
- c) Após incubação, amostras pré-enriquecidas podem ser armazenadas sob refrigeração (entre 2 e 8°C) por até 72 horas antes da etapa de enriquecimento.

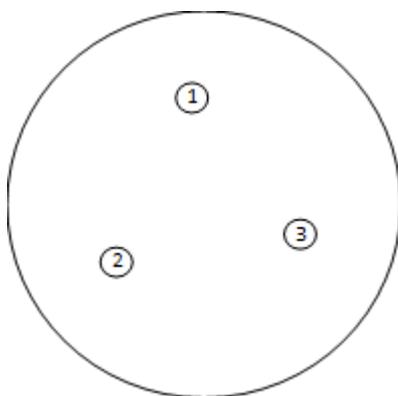
3.5.5.3.1.2. Materiais ambientais e suabes

- a) Adicionar aproximadamente 20 a 50 mL de água peptonada 1%, na quantidade suficiente para cobrir o material com o líquido, e
- b) Incubar em estufa a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas;
- d) Após incubação, amostras pré-enriquecidas podem ser armazenadas sob refrigeração (entre 2 e 8°C) por até 72 horas antes da etapa de enriquecimento.

3.5.5.3.2. Inoculação em meio MSRV

- a) Homogeneizar a amostra pré-enriquecida e coletar 100µL;
- b) Aplicar o volume em um ponto do meio MSRV, podendo ser inoculadas até três amostras na mesma placa, dispostas em pontos equidistantes. As gotas não poderão se espalhar pela placa (Figura 2);
- c) Ao final do procedimento, inocular um controle POSITIVO (cepa de referência de *Salmonella* spp ou de um sorovar de controle do PNSA) e um controle NEGATIVO (água peptonada);
- d) Aguardar a secagem das gotas inoculadas e incubar a 42 °C ± 1 °C por 18-24 horas, mantendo a superfície do ágar voltada para cima.

FIGURA 2. Inoculação em meio MSRV (até três amostras por placa)

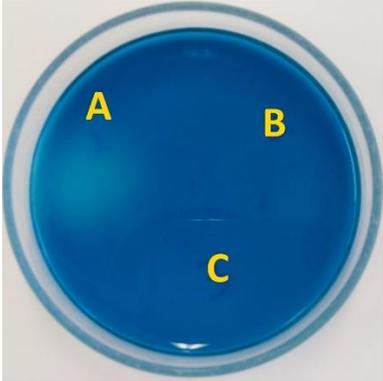


(Fonte: LFDA-SP, adaptado de ISO 6579-1:2017)

3.5.5.3.3. Leitura das placas

- a) A leitura deverá ser realizada, primeiramente, verificando-se a efetividade do controle POSITIVO, que deverá ter crescimento bem-sucedido, e a ausência de crescimento do controle NEGATIVO;
- b) Havendo formação de halo esbranquiçado, a amostra é suspeita de salmonela. (Quadro 3);
- c) Coletar uma alçada do crescimento bacteriano suspeito a partir da borda de cada halo formado no meio MSRV para a etapa de purificação em ágar Rambach ou XLD (item 3.5.5.3.4);
- d) Amostras para as quais não houver formação de halo no meio MSRV deverão permanecer em estufa a 42 °C ± 1 °C por mais 24 horas. Caso não haja formação de halo esbranquiçado, a amostra é negativa para *Salmonella* spp;
- e) Sempre que houver qualquer impedimento à continuação imediata dos procedimentos do método de Isolamento, deve-se inocular as colônias selecionadas em ágar nutriente inclinado, incubar a 37°C ± 1 °C por 18-24 horas e manter em temperatura ambiente, até que seja possível o retorno das atividades.

QUADRO 3. Aspecto das colônias de salmonela típicas em meio MSRV

Meio de cultura	Aspecto das colônias típicas
Meio MSRV	<p>Colônias positivas: formação de halo esbranquiçado</p>  <p>A: crescimento característico (amostra suspeita); B e C: crescimento não característico (amostras negativas)</p>

(Fonte: fotos de LFDA-SP; adaptado de ISO 6579-1:2017)

3.5.5.3.4. Purificação em ágar Rambach ou XLD

- a) As colônias suspeitas obtidas do método de triagem MSRV devem passar pela etapa de purificação a fim de dar continuidade ao método de isolamento;
- b) A purificação é opcional caso seja realizada a técnica de microarranjo de DNA (item 3.7);
- c) Inocular uma alçada da cultura em ágar XLD ou Rambach de modo a obter colônias bem isoladas, estriando o inóculo em três direções diferentes. Utilizar uma alça bacteriológica estéril a cada mudança de direção do estriamento sem recarregá-la com a cultura bacteriana (FIGURA 1);
- d) Ao final do procedimento, inocular uma placa com o controle POSITIVO (cepa de referência de *Salmonella* spp ou de um sorovar de controle do PNSA);
- e) Incubar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas.

3.5.5.3.5. Leitura das placas

- a) A leitura deverá ser realizada, primeiramente, verificando-se a efetividade do controle POSITIVO utilizado, que deverá ter crescimento bem-sucedido;
- b) Colônias típicas de salmonela em ágar Rambach se apresentam com variações da coloração rosa, sendo que alguns sorovares podem se apresentar transparentes e mais amareladas (QUADRO 2.);
- c) Colônias típicas de salmonela em ágar XLD se apresentam com variações da coloração rosa (colônias H₂S NEGATIVO) e avermelhadas com centro negro (colônias H₂S POSITIVO) (QUADRO 2);
- d) Quando não houver crescimento nas primeiras 24 horas, incubar por mais 24 horas em estufa a $37 \pm 1\text{ °C}$;
- e) Caso não haja crescimento de colônias suspeitas após esse procedimento, a amostra pode ser considerada negativa para *Salmonella* spp;
- f) Sempre que houver qualquer impedimento à continuação imediata dos procedimentos do método de Isolamento, deve-se inocular as colônias selecionadas em ágar nutriente inclinado, incubar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas e manter em temperatura ambiente, até que seja possível o retorno das atividades.

3.5.5.4. Série bioquímica preliminar

- a)** As colônias com morfologia suspeita de salmonela devem ser semeadas nos meios de bioquímico preliminar: Ágar TSI, Ágar LIA, Meio SIM e Caldo Ureia. Utilizar colônias isoladas para o teste. Pode ser feita uma só alçada por colônia testada;
- b)** Caso haja diferenças morfológicas entre as colônias suspeitas numa mesma placa, deve-se selecionar uma colônia de cada morfologia;
- c)** Ao final do procedimento, inocular um tubo de cada meio utilizado com o controle POSITIVO (cepa de referência de *Salmonella* spp ou de um sorovar de controle do PNSA);
- d)** As colônias bacterianas que apresentarem reações compatíveis com o gênero *Salmonella* com motilidade negativa (imóveis) ou com características incoerentes na série bioquímica preliminar deverão seguir obrigatoriamente para a etapa do bioquímico complementar;
- e)** O laboratório pode optar por realizar a técnica de microarranjo de DNA para substituir as etapas de bioquímico preliminar e complementar da colônia.

3.5.5.4.1. Ágar TSI e LIA

- a)** Inocular a colônia bacteriana com auxílio de agulha bacteriológica por picada no centro do ágar até a metade da profundidade e estriar a rampa;
- b)** Incubar os tubos inoculados à temperatura de $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas.

3.5.5.4.2. Meio SIM

- a)** Inocular a colônia bacteriana com auxílio de agulha bacteriológica por picada no centro do ágar até a metade da profundidade. Retirar a agulha na mesma direção;
- b)** Incubar os tubos inoculados à temperatura de $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas;
- c)** Após a leitura da motilidade e da produção de H_2S , adicionar três gotas da solução reveladora (reativos de Kovac ou Ehrlich) para a prova do indol.

3.5.5.4.3. Caldo Ureia

- a)** Inocular a colônia bacteriana com auxílio de agulha bacteriológica;
- b)** Incubar os tubos inoculados à temperatura de $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas;
- c)** Em caso de resultado NEGATIVO nas primeiras 24 horas, incubar novamente a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas.

3.5.5.4.4. Leitura do bioquimismo preliminar

a) A identificação bioquímica preliminar no gênero *Salmonella* segue o disposto no QUADRO 4.

QUADRO 4. Identificação bioquímica preliminar do gênero *Salmonella*

Comportamento bioquímico		<i>Salmonella Pullorum</i>	<i>Salmonella Gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> sp sub-espécie I	<i>Salmonella</i> sp sub-espécies IIIa e IIIb
TSI 24 horas	Base	A gás +/-	A gás -	A gás +	A gás +
	Bisel	V	V	V	V ou A
	H ₂ S	+/-	+	+	+
LIA 24 horas	Base	P	P	P	P
	Bisel	P	P	P	P
	H ₂ S	+/-	+	+	+
Urease		-	-	-	-
Motilidade		-	-	+	+

Salmonella sp subespécie I – *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (entre outras);

Salmonella sp subespécie III a e III b - Antigo grupo Arizona;

A – Amarelo (ácido); V – vermelho (alcalino); P – púrpura (alcalino).

(Fonte: adaptado de DUARTE, S. C. et al, 2016.)

3.5.5.5. Série bioquímica complementar

a) Esta etapa é obrigatória para colônias suspeitas de salmonela com motilidade negativa ou com aspectos incoerentes no bioquimismo preliminar;

b) A realização desta etapa não é obrigatória para colônias que se apresentarem com motilidade positiva no meio SIM;

c) Deve ser escolhida pelo menos uma colônia suspeita de cada matriz testada, devendo também ser selecionadas colônias com resultados bioquímicos diferenciados, quando houver;

d) O inóculo a ser utilizado na série complementar deverá ser retirado do ágar TSI do teste anterior (item 3.5.5.4);

e) Ao final do procedimento, inocular um tubo de cada meio utilizado com o controle POSITIVO (cepa de referência de *Salmonella* spp ou de um sorovar de controle do PNSA);

f) O laboratório pode optar por realizar a técnica de microarranjo de DNA para substituir as etapas de bioquimismo preliminar e complementar da colônia.

g) As colônias bacterianas que apresentarem reações compatíveis com o gênero *Salmonella* na caracterização bioquímica deverão ser submetidas à caracterização antigênica (técnica 3.6) ou tipificação por microarranjo de DNA (técnica 3.7) a fim de ser obtida sua identificação

3.5.5.5.1. Série de açúcares

a) Para cada colônia a ser testada, separar seis tubos contendo caldo fermentação, sendo um deles com tubo de Duhran. Identificá-los com os nomes dos açúcares a serem testados na seguinte ordem: Lactose, Sacarose, Dulcitol, Manitol, Maltose e Glicose (caldo contendo o tubo Duhran);

b) Adicionar 500 µL da solução de cada açúcar nos tubos previamente identificados. A solução de Dulcitol deve ser dissolvida em banho-maria antes da adição ao caldo, devido à precipitação de cristais. A adição dos açúcares ao caldo fermentação deve ocorrer no momento da realização do procedimento;

c) Inocular a colônia bacteriana lavando-se a alça sequencialmente nos caldos, na seguinte ordem: Lactose, Sacarose, Dulcitol, Manitol, Maltose e Glicose (tubo contendo o tubo Duhran);

d) Incubar os tubos inoculados à temperatura de 37 ± 1°C por 18-24 horas;

e) Em caso de resultado NEGATIVO nas primeiras 24 horas, incubar novamente a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas.

3.5.5.5.2. Série de aminoácidos

a) Deve-se utilizar um tubo contendo apenas o meio base Moeller, sem adição de aminoácidos, para controle do teste;

b) Inocular a colônia bacteriana lavando-se a alça sequencialmente nos caldos arginina, ornitina e lisina, e no caldo de controle do teste;

c) Ao final do procedimento, vedar a superfície dos caldos com algumas gotas de óleo mineral;

d) Incubar os tubos inoculados à temperatura de $37 \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas;

e) Em caso de resultado NEGATIVO nas primeiras 24 horas, incubar novamente a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas.

3.5.5.5.3. Prova da fenilalanina, utilização do citrato e malonato

a) Inocular a colônia bacteriana por estriamento primeiro na superfície do bisel do:

I. ágar citrato de Simmons;

II. ágar fenilalanina e

III. lavar a alça no caldo malonato.

b) Incubar os tubos inoculados à temperatura de $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas;

c) Em caso de resultado NEGATIVO na leitura do caldo malonato nas primeiras 24 horas, incubar novamente a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas;

d) Antes da leitura do ágar Fenilalanina, adicionar algumas gotas de cloreto férrico a 10% até cobrir o bisel.

3.5.5.5.4. Provas do Vermelho de Metila (VM) e Voges-Proskauer (VP)

a) Inocular a colônia bacteriana em dois tubos de caldo Clark-Lubs (VM-VP);

b) Incubar os tubos inoculados à temperatura de $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 18-24 horas;

c) Para a leitura do teste de VM, adicionar em um dos tubos três gotas de solução de Vermelho de Metila, ou o volume suficiente para formar um anel na superfície, com cuidado para não agitar o tubo;

d) Para a leitura do teste de VP, adicionar ao outro tubo 600 μL de solução de Alfa Naftol a cada 3 mL de caldo e agitar o frasco até ficar leitoso. Em seguida, adicionar 200 μL da solução Hidróxido de Potássio a 40% a cada 3 mL de caldo e agitar novamente. Homogeneizar bem e inclinar o tubo, fazendo a leitura após 1h. Verificar a formação de um anel na superfície durante a leitura.

3.5.5.5.5. Leitura do bioquimismo complementar

a) A identificação Bioquímica complementar do gênero *Salmonella* segue o disposto no QUADRO 5.

QUADRO 5. Identificação bioquímica complementar do gênero *Salmonella*

Comportamento bioquímico	<i>Salmonella</i> sp sub-espécie I	<i>Salmonella</i> Pullorum	<i>Salmonella</i> Gallinarum	<i>Salmonella</i> sp sub-espécies IIIa e IIIb
Lactose	-	-	-	d
Sacarose	-	-	-	-
Dulcitol	+	-	+ (*)	-
Manitol	+	+	+	+
Maltose	+	- (**)	+	+
Glicose produção de ácido	+	+	+	+
Glicose produção de gás	+	d	-	+
Arginina desidrolase	d	d	-	d
Ornitina descarboxilase	+	+ (*)	-	+
Lisina descarboxilase	+	+	+	+
Fenilalanina desaminase	-	-	-	-
Citrato de Simons	+	-	-	+
Malonato	-	-	-	+
VM	+	+	+	+
VP	-	-	-	-

Salmonella sp subespécie I – *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (entre outras);

Salmonella sp subespécie III a e III b - Antigo grupo Arizona;

(+) - 90-100% de cepas são positivas;

(-) - 90-100% de cepas são negativas;

(d) – Diferentes tipos;

(*) – Ocasionalmente negativa;

(**) – ou tardiamente positiva.

(Fonte: adaptado de DUARTE, S. C. et al, 2016.)

3.5.6. Critérios de Aceitação do Ensaio

a) A leitura do controle POSITIVO em todas as etapas do isolamento deve ser satisfatória, apresentando resultados compatíveis com cultura suspeita para salmonela;

b) O controle NEGATIVO deve ser ausente de crescimento em todas as etapas;

c) Em caso de crescimento insatisfatório para qualquer um dos controles, a etapa deverá ser repetida.

3.5.7. Interpretação dos resultados

a) NEGATIVO:

- I. Não apresentarem crescimento de colônias com características morfológicas compatíveis com o gênero *Salmonella*,
- II. Não apresentarem bioquimismo compatível com o gênero *Salmonella*,
- III. Apresentar resultados negativos nas técnicas de triagem molecular ou
- IV. Apresentar resultados negativo no Anti-soro "O"

b) POSITIVO:

- I. Apresentaram resultado Positivo nas técnicas moleculares de triagem ou de identificação gênero *Salmonella*
- II. Apresentar resultado Positivo do no anti-soro "O"

c) AUSÊNCIA DE CRESCIMENTO BACTERIANO:

- I. Amostras de Material Fecal (item 1.2.a), Material Ambiental e suabes (item 1.2.b) ou Ceco com Tonsilas cecais (itens (1.2.c.IV e 1.2.d.III) que não apresentarem crescimento em meios não seletivos ou seletivos, exceto no MSRV,

3.5.8. Emissão dos Resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado "Relatório de Ensaio", e expresso como "POSITIVO", "NEGATIVO" ou "AUSÊNCIA DE CRESCIMENTO BACTERIANO" para cada técnicas de diagnóstico utilizada.

- I. Deve ser indicado o total de alíquotas negativas, positivas e/ou com ausência de crescimento dentre o total de analisadas, identificando a matriz que obteve cada resultado;
- II. No caso de amostras positivas a identificação obtida também deverá ser informada.

3.5.9. Armazenamento de culturas e envio para LFDA-SP

a) Quando houver isolamento e caracterização de cepas de salmonela de qualquer sorovar, essas deverão ser armazenadas em frasco de vidro (tipo penicilina) com ágar Stock em bisel, pelo prazo mínimo de **3 anos**;

b) O laboratório deve seguir orientações da CGAL para enviar um relatório mensal dos sorovares identificados ao LFDA-SP, em via eletrônica. A técnica utilizada para caracterização do sorovar (caracterização antigênica básica, caracterização antigênica ampliada, caracterização antigênica completa ou tipificação por microarranjo de DNA) deve ser informada no documento.

c) O laboratório credenciado deve enviar uma replicata ao LFDA-SP das culturas isoladas:

- I. de granjas de reprodutoras;
- II. de material genético importado;
- III. de qualquer origem cujo sorovar identificado seja um dos controlados pelo PNSA, incluindo-se monofásicas e culturas imóveis *S.* (1,9,12 : - : -);
- IV. de qualquer origem cujo sorovar identificado seja Hadar, Infantis ou Virchow;
- V. de *Salmonella* spp., que tenham sido previamente selecionadas pelo MAPA a partir dos relatórios mensais.

d) A seleção das culturas para envio obrigatório ao LFDA-SP ocorrerá de acordo com o interesse do MAPA;

e) As culturas enviadas ao LFDA-SP devem acompanhar o documento “Envio de Culturas de Salmonela”, planilha do RTA/DIA Relatório Técnico de Atividades disponível em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/> encaminhado obrigatoriamente nas vias impressa e eletrônica, devidamente preenchido e assinado pelo Responsável Técnico do Laboratório;

f) O envio das culturas deve ser feito em embalagens seguindo o padrão IATA de biossegurança.

3.5.10. Descarte das amostras e resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e culturas deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.5.11;

b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;

c) Todo o resíduo biológico utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.5.11. Retenção de itens de ensaio

a) Amostras para isolamento

Imediatamente após a emissão do laudo, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

b) Culturas de salmonela

Após um período mínimo de 03 anos da realização das análises, as culturas poderão ser descartadas, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.6. Identificação do agente - Caracterização antigênica por aglutinação

3.6.1. Materiais

a) Luvas para procedimento;

b) Alças bacteriológicas descartáveis ou flambáveis;

c) Placa de vidro quadriculada ou lâmina para sorologia, limpa e desengordurada;

d) Micropipetas com ponteiras de volumes variados;

e) Pipetas de Pasteur (opcional);

f) Placas de Petri estéreis (opcional);

g) Tiras de papel filtro de 3 cm estéreis;

h) Lâmina ou faca estéril;

i) Pinça estéril;

j) Palitos de madeira ou misturadores de plástico;

k) Papel toalha;

l) Cuba para descarte de materiais com solução desinfetante.

3.6.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de Segurança Biológica classe II A2 (preferencial) ou bancada com bico de Bunsen;
- b) Fluxo laminar com luz UV (opcional);
- c) Estufa;
- d) Banho-maria (opcional);
- e) Esterilizador de alças bacteriológicas (opcional);
- f) Cronômetro;
- g) Fonte luminosa para sorologia;
- h) Autoclave.

3.6.3. Insumos

- a) Ágar TSA;
- b) Ágar nutriente;
- c) Meio swarm ágar ou similar (opcional);
- d) Soro antissomático "O" polivalente de salmonela;
- e) Soro antflagelar "H" polivalente de salmonela;
- f) Soro antissomático "B" (O:4,5) de salmonela;
- g) Soro antissomático "D" (O:9) de salmonela;
- h) Soro antflagelar "H:2" de salmonela;
- i) Soro antflagelar "H:i" de salmonela;
- j) Soro antflagelar "H:m" de salmonela;
- k) Soro antflagelar "H:g" de salmonela;
- l) Soro antflagelar "H:q,s,t,p,u" de salmonela ou conjunto com os soros individuais equivalentes (H:q, H:s, H:t, H:p e H:u);
- m) Cepa de referência de S. Enteritidis;
- n) Cepa de referência de S. Typhimurium;
- o) Cepa de referência de S. Pullorum;
- p) Cepa de referência de S. Gallinarum.

3.6.4. Insumos opcionais (caracterização ampliada)

- a) Soro antissomático "C1" (O:6,7) de salmonela;
- b) Soro antissomático "C2" (O:6,8) de salmonela;
- c) Soro antflagelar "H:r" de salmonela;
- d) Soro antflagelar "H:5" de salmonela;
- e) Soro antflagelar "H:e,n,x" de salmonela;
- f) Soro antflagelar "H:z₁₀" de salmonela;
- g) Soro antflagelar "H:z₁₅" de salmonela;
- h) Cepa de referência de S. Heidelberg;
- i) Cepa de referência de S. Infantis;
- j) Cepa de referência de S. Hadar;
- k) Cepa de referência de S. Virchow.

3.6.5. Soluções

- a) Solução de Cloreto de Sódio 0,85%;
- b) Solução de Cloreto de Sódio 2%.

3.6.6. Realização do ensaio

3.6.6.1. Considerações gerais

- a) Retirar da geladeira os antissoros a serem utilizados com antecedência de 15 minutos ao início dos testes, até que atinjam a temperatura ambiente (18 a 25°C);
- b) Utilizar um controle POSITIVO (cepa de referência) e um NEGATIVO em todas as etapas da caracterização;
- c) As etapas de inoculação das colônias devem ser feitas obrigatoriamente em cabine de segurança biológica classe II A2 ou bancada com bico de Bunsen;
- d) Escolher um dos métodos para repique das culturas (inoculação em ágar sólido inclinado – item 3.6.6.2 ou inoculação em placa – item 3.6.6.3) para fazer a caracterização;
- e) A partir da aglutinação encontrada com os antissoros testados, fazer a interpretação do resultado de acordo com os QUADROS **Erro! Fonte de referência não encontrada.** 6 A 9, de acordo com a opção de caracterização antigênica escolhida. O laboratório pode optar por realizar a caracterização antigênica básica (S. Typhimurium, S. Enteritidis, S. Gallinarum e S. Pullorum) ou a ampliada (S. Typhimurium, S. Enteritidis, S. Gallinarum, S. Pullorum, S. Virchow, S. Hadar e S. Infantis);
- f) Escolher um dos métodos para inversão de fase (técnica da ponte de papel – item 3.6.6.14 ou em swarm ágar – item 3.6.6.15), quando for aplicável;
- g) A caracterização antigênica pode ser realizada em paralelo com a série bioquímica complementar para a finalização do método de Isolamento (técnica 3.5) de culturas imóveis;
- h) O laboratório pode optar por realizar a técnica de microarranjo de DNA para substituir as etapas da caracterização antigênica da colônia.

3.6.6.2. Técnica da caracterização a partir da inoculação em ágar sólido inclinado

- a) Retirar o inóculo do ágar TSI a partir da série bioquímica preliminar (item 3.5.5.4 do Isolamento de Salmonela);
- b) Inocular a colônia a ser testada em ágar nutriente e incubá-la à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas;
- c) Adicionar 0,5 a 1 mL de solução salina na concentração de 0,85% no tubo de ágar nutriente contendo a bactéria a ser testada;
- d) Homogeneizar a massa bacteriana na solução salina até a obtenção de um caldo turvo;
- e) Depositar, separadamente sobre a superfície da placa ou da lâmina de sorologia, uma gota (20 μL ou o recomendado pelo fabricante) do antissoro a ser testado;
- f) Acrescentar uma gota de suspensão bacteriana sobre cada uma delas;
- g) Com o auxílio de um palito ou um misturador de plástico, fazer pequenos movimentos circulares para misturar o antissoro e a solução bacteriana, tomando cuidado para evitar respingos e aerossóis;
- h) Descartar os palitos ou misturadores utilizados;
- i) Agitar suavemente a placa pelo tempo indicado na bula do fabricante, fazendo movimentos circulares e atentando para a ocorrência da formação de grumos;
- j) Realizar a leitura contra a fonte luminosa após o tempo da reação indicado pelo fabricante. O resultado é POSITIVO para o antissoro testado quando houver qualquer grau de formação de grumos.

3.6.6.3. Técnica da caracterização a partir da inoculação em placa

- a) Fundir o meio swarm ágar a 95 °C em banho-maria. Resfriar em seguida, mantendo a 45 °C;
- b) Distribuir entre 10-30 mL do meio em placa de Petri de forma que a altura aproximada do meio seja de 1 cm. Esperar o meio solidificar;
- c) Retirar o inóculo do ágar TSI a partir da série bioquímica preliminar (item 3.5.5.4 do Isolamento de Salmonela);
- d) Inocular a colônia ser testada no centro da placa de Petri, encostando levemente a alça na superfície do ágar, tomando o cuidado para não estriar nem perfurar o meio. Inocular apenas uma colônia por placa;
- e) Incubar à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas, mantendo a superfície voltada para cima em superfície plana;
- f) Inocular cada colônia também em uma placa de Petri com ágar nutriente ou ágar TSA através de estriamento e incubá-la à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas;
- g) Depositar, separadamente sobre a superfície da placa quadriculada ou da lâmina de sorologia, uma gota de cada antissoro a ser testado;
- h) Com o auxílio de um palito, alça ou um misturador de plástico, recolher massa bacteriana de três pontos do ágar nutriente ou TSA e depositá-la ao lado de cada gota;
- i) Fazer pequenos movimentos circulares para misturar o antissoro e a massa bacteriana, tomando cuidado para evitar respingos e aerossóis;
- j) Descartar os palitos ou misturadores;
- k) Agitar suavemente a placa pelo tempo indicado na bula do fabricante, fazendo movimentos circulares e atentando para a ocorrência da formação de grumos;
- l) Realizar a leitura contra a fonte luminosa após o tempo da reação indicado pelo fabricante. O resultado é POSITIVO para o antissoro testado quando houver qualquer grau de formação de grumos.

3.6.6.4. Teste com salina 2%

- a) Realizar a caracterização antigênica (item 3.6.6.2 ou 3.6.6.3) com a solução salina 2%, pelo tempo de dois minutos de reação;
- b) As cepas que apresentarem reação negativa com a salina 2% devem ser testadas para o soro "O" para salmonela (caracterização somática);
- c) Caso a cepa testada apresente reação positiva com a salina 2%, a caracterização antigênica estará inviabilizada, por tratar-se de cepa auto aglutinante. Essa cepa deverá passar por novo processo de purificação, sendo inicialmente enriquecida em caldo Rappaport a $42^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas, em seguida passando para a etapa de purificação em ágar Rambach e bioquimismo (etapas 3.5.5.3 e 3.5.5.4 do Isolamento de Salmonela), até chegar novamente na caracterização;
- d) Na permanência de aglutinação positiva com a salina 2% para a cepa autoaglutinante, o resultado deve ser pré-definido como "Cepa autoaglutinante" e o diagnóstico definitivo do sorovar somente pode ser obtido através da tipificação por microarranjo de DNA (técnica 3.7);
- e) Caso não seja possível realizar a tipificação por microarranjo de DNA, o resultado deve ser emitido como "Cepa autoaglutinante" no laudo final.

3.6.6.5. Caracterização somática

- a) Realizar a caracterização antigênica (item 3.6.6.2 ou 3.6.6.3) com o soro “O” para salmonela;
- b) As cepas que apresentarem reação negativa com o antissoro “O” são negativas para salmonela;
- c) Caso a cepa que apresente reação positiva com o antissoro “O”, realizar o teste com o antissoro “H” para salmonela;
- d) As cepas que apresentarem reação positiva com o antissoro “O” e “H” devem ser testadas antigenicamente com os antissoros monovalentes “B” (O:4) e “D” (O:9) de salmonela para caracterização do grupo antigênico. Opcionalmente o laboratório poderá realizar o teste com os antissoros monovalentes “C1” (O:6,7) e “C2” (O:6,8) além dos anteriores (caracterização ampliada);
- e) As cepas que apresentarem reação negativa com o antissoro “H” são consideradas cepas imóveis e devem ser testadas antigenicamente com o antissoro monovalente “D” (O:9) (item 3.6.6.6).

3.6.6.6. Caracterização de cepas imóveis

- a) Para as cepas imóveis que apresentarem aglutinação positiva para o antissoro “D” (O:9), a caracterização do sorovar deve ser complementada por diferenciação bioquímica, realizada no bioquimismo complementar (item 3.5.5.4), sob suspeita de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*;
- b) Na impossibilidade de diferenciação entre os dois sorovares, o resultado deve ser emitido através da fórmula antigênica “S. imóvel (1,9,12: - : -)” e o diagnóstico definitivo somente pode ser realizado através da tipificação por microarranjo de DNA;
- c) O método de tipificação por Microarranjo de DNA poderá ser realizado pelo próprio laboratório ou por outro laboratório que pertença à rede de credenciados do MAPA para isolamento e caracterização de salmonelose aviária;
- d) Caso não seja possível realizar a tipificação por microarranjo de DNA, o resultado deve ser emitido através da fórmula antigênica “S. imóvel (1,9,12: - : -)” no relatório de ensaio.

3.6.6.7. Caracterização do grupo antigênico

- a) As cepas positivas para os antissoros “O” e “H” que apresentarem resultados “POSITIVOS” para um dos antissoros monovalentes testados (“B”, “D”, “C1” ou “C2”) deverão passar pela caracterização flagelar correspondente ao sorovar suspeito, seguindo-se o critério a seguir:
 - I. Reação positiva para antissoro “B”: suspeitas de *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg*;
 - II. Reação positiva para antissoro “D”: suspeitas de *S. Enteritidis*;
 - III. Reação positiva para antissoro “C1”: suspeitas de *S. Infantis* e *S. Virchow*;
 - IV. Reação positiva para antissoro “C2”: suspeitas de *S. Hadar*;
- b) Caso a caracterização flagelar seja realizada a partir da inoculação em placa, retirar a massa bacteriana a partir do meio swarm ágar. Deve-se escolher pontos na borda da placa para a caracterização, tomando cuidado para não retirar parte do ágar;
- c) As cepas que apresentarem resultados NEGATIVOS para os antissoros “B” e “D” (obrigatórios – caracterização básica), “C1” e “C2” (optativos – caracterização ampliada) terão diagnóstico pré-definido por *Salmonella* spp.

3.6.6.8. Caracterização do sorovar Enteritidis

- a)** Realizar a caracterização flagelar com os antissoros flagelares H:g, H:m e H:q,s,t,p,u e fazer a interpretação do resultado (QUADRO 6);
- b)** A cultura testada é considerada S. Enteritidis caso a aglutinação com os antissoros H:g e H:m seja positiva e com o antissoro H:q,s,t,p,u seja negativa;
- c)** Cepas cuja caracterização flagelar seja discordante do item b) terão diagnóstico pré-definido por *Salmonella* spp.

3.6.6.9. Caracterização do sorovar Typhimurium

- a)** Realizar a caracterização flagelar com os antissoros flagelares H:i, H:2 e H:r e fazer a interpretação do resultado (QUADRO 6);
- b)** A inversão de fase deve ser realizada nos casos em que apenas um dos antissoros testados (H:i, H:2 ou H:r) apresentar reação positiva. Seguir procedimento do item 3.6.6.14 ou 3.6.6.15;
- c)** A cultura testada é considerada S. Typhimurium se apresentar reação negativa para o antissoro H:r e um dos resultados a seguir:
 - I.** Reação positiva para os antissoros H:i e H:2 diretamente;
 - II.** Reação positiva para o antissoro H:i diretamente e positiva com antissoro H:2 após a inversão de fase;
 - III.** Reação positiva para o antissoro H:2 diretamente e positiva com antissoro H:i após a inversão de fase;
- d)** Cepas cuja caracterização flagelar seja discordante do item c) terão diagnóstico pré-definido por *Salmonella* spp.

QUADRO 6. Identificação sorológica dos sorovares de *Salmonella* (obrigatórios)

Sorovares de caracterização obrigatória										
Sal.	Soros somáticos				Soros flagelares					Sorovar
	O	H	B	D	m	q,s,t,p,u	i	1,2	r	
+	+	NA			NA		NA			Cepa autoaglutinante ^a
-	+	+	-	-	NA		NA			S. spp. ^b
-	+	-	-	+	NA		NA			S. Gallinarum ^c
-	+	-	-	+	NA		NA			S. Pullorum ^c
-	+	+	-	+	+	-	NA			S. Enteritidis
-	+	+	-	+	+	+	NA			S. spp. ^b
-	+	+	-	+	-	- / +	NA			S. spp. ^b
-	+	+	+	-	NA		+	+	-	S. Typhimurium
-	+	+	+	-	NA		+	-	-	S. (1,4,[5],12: i : -) ^d
-	+	+	+	-	NA		-	+	-	S. (1,4,[5],12: - : 1,2) ^d
-	+	+	+	-	NA		-	-	-	S. spp. ^b

Legenda:

(Fonte: adaptado de GRIMONT & WEILL, 2007.)

Sal. – Salina 2%; NA – Não aplicável;

^a: :: O diagnóstico somente pode ser definitivo por meio de tipificação molecular por microarranjo de DNA. Na impossibilidade desta análise, providenciar uma nova purificação da cultura e repetir a caracterização ou, em último caso, liberar o resultado como “Cepa autoaglutinante” e, se possível, realizar análise de tipificação por meio de provedor externo credenciado ao MAPA para isolamento e caracterização de salmonelose aviária.

^b: O laboratório pode optar pela realização da caracterização final do sorovar por meio da tipificação por microarranjo de DNA ou caracterização completa realizada em laboratório de referência para *Salmonella*.

^c: Confirmar diagnóstico com o resultado do teste bioquímico complementar.

^d : Seguir para a etapa de inversão de fase (item 3.6.6.14 ou 3.6.6.15) para conclusão da caracterização antigênica.

3.6.6.10. Caracterização do sorovar Heidelberg – Opcional (caracterização ampliada)

a) Realizar a caracterização flagelar com os antissoros flagelares H:i, H:2 e H:r e fazer a interpretação do resultado (QUADRO 7);

b) A inversão de fase deve ser realizada nos casos em que apenas um dos antissoros testados (H:i, H:2 ou H:r) apresentar reação positiva. Seguir procedimento do item 3.6.6.14 ou 3.6.6.15;

c) A cultura testada é considerada *S. Heidelberg* se apresentar reação negativa para o antissoro H:i e um dos resultados a seguir:

- I. Reação positiva para os antissoros H:2 e H:r diretamente;
- II. Reação positiva para o antissoro H:2 diretamente e positiva com antissoro H:r após a inversão de fase;
- III. Reação positiva para o antissoro H:r diretamente e positiva com antissoro H:2 após a inversão de fase.

d) Cepas cuja caracterização flagelar seja discordante do item c) terão diagnóstico pré-definido por *Salmonella* spp.

3.6.6.11. Caracterização do sorovar Hadar – Opcional (caracterização ampliada)

- a)** Realizar a técnica de aglutinação em placa com os antissoros flagelares H:z₁₀, H:e,n,x e H:z₁₅ e fazer a interpretação do resultado (QUADRO 7);
- b)** A inversão de fase deve ser realizada nos casos em que apenas um dos antissoros testados (H:z₁₀ ou H:e,n,x), com exceção do H:z₁₅, apresentar reação positiva. Seguir procedimento do item 3.6.6.14 ou 3.6.6.15;
- c)** A cultura testada é considerada S. Hadar se apresentar reação negativa para o antissoro H:z₁₅ e um dos resultados a seguir:
 - I.** Reação positiva para os antissoros H:z₁₀ e H:e, n, x diretamente;
 - II.** Reação positiva para o antissoro H:z₁₀ diretamente e positiva com antissoro H:e,n,x após a inversão de fase;
 - III.** Reação positiva para o antissoro H:e,n,x diretamente e positiva com antissoro H:z₁₀ após a inversão de fase;
- d)** Cepas cuja caracterização flagelar seja discordante do item c) terão diagnóstico pré-definido por *Salmonella* spp.

3.6.6.12. Caracterização dos sorovares Infantis e Virchow - Opcional (caracterização ampliada)

- a)** Realizar a técnica de aglutinação em placa com os antissoros flagelares H:5, H:2 e H:r e fazer a interpretação do resultado (QUADRO 7);
- b)** A inversão de fase deve ser realizada nos casos em que apenas um dos antissoros testados (H:5, H:2 ou H:r) apresentar reação positiva. Seguir procedimento do item 3.6.6.14 ou 3.6.6.15;
- c)** A cultura testada é considerada S. Infantis se apresentar reação negativa para o antissoro H:2 e um dos resultados a seguir:
 - I.** Reação positiva para os antissoros H: r e H:5 diretamente;
 - II.** Reação positiva para o antissoro H:r diretamente e positiva com antissoro H:5 após a inversão de fase;
 - III.** Reação positiva para o antissoro H:5 diretamente e positiva com antissoro H:r após a inversão de fase;
- d)** A cultura testada é considerada S. Virchow se apresentar reação negativa para o antissoro H:5 e um dos resultados a seguir:
 - I.** Reação positiva para os antissoros H:2 e H:r diretamente;
 - II.** Reação positiva para o antissoro H:2 diretamente e positiva com antissoro H:r após a inversão de fase;
 - III.** Reação positiva para o antissoro H:r diretamente e positiva com antissoro H:2 após a inversão de fase;
- e)** Cepas cuja caracterização flagelar seja discordante dos itens c) e d) terão diagnóstico pré-definido por *Salmonella* spp.

QUADRO 7. Identificação sorológica dos sorovares de *Salmonella* (opcionais) – caracterização ampliada

Sorovares de caracterização opcional															
Sal	Soros somáticos						Soros flagelares							Sorovar	
	O	H	B	C1	C2	D	z ₁₀	z ₁₅	e,n,x	i	1,2	r	1,5		
-	+	+	-	-	-	-								NA	S. spp. ^a
-	+	+	-	+	-	-	+	-	+				NA		S. Hadar
-	+	+	-	+	-	-	+	-	-				NA		S. (6,8: z ₁₀ : -) ^b
-	+	+	-	+	-	-	-	-	+				NA		S. (6,8: - : e,n,x) ^b
-	+	+	-	+	-	-	+/-	+	+/-				NA		S. spp. ^a
-	+	+	-	+	-	-	-	+/-	-				NA		S. spp. ^a
-	+	+	+	-	-	-		NA		-	+	+	NA		S. Heidelberg
-	+	+	+	-	-	-		NA		-	+	-	NA		S. (1,4,[5],12: - : 1,2) ^b
-	+	+	+	-	-	-		NA		-	-	+	NA		S. (1,4,[5],12: r : -) ^b
-	+	+	-	-	+	-		NA			-	+	+		S. Infantis
-	+	+	-	-	+	-		NA			+	+	-		S. Virchow
-	+	+	-	-	+	-		NA			-	-	+		S. (6,7,14: - : 1,5) ^b
-	+	+	-	-	+	-		NA			-	+	-		S. (6,7,14: - : 1,2) ^b
-	+	+	-	-	+	-		NA			+	-	-		S. (6,7,14: r : -) ^b
-	+	+	-	-	+	-		NA			-	-	-		S. spp. ^a

Legenda:

(Fonte: adaptado de GRIMONT & WEILL, 2007)

Sal – Salina 2%; NA – Não aplicável;

^a : O laboratório pode optar pela realização da caracterização final do sorovar através da tipificação por microarranjo de DNA ou caracterização completa realizada em laboratório de referência para salmonela.

^b : Seguir para a etapa de inversão de fase – item 3.6.6.14 ou 3.6.6.15 – para conclusão da caracterização antigênica.

3.6.6.13. Cepas de *Salmonella* spp.

a) O laboratório credenciado pode optar por realizar a identificação final do sorovar com diagnóstico pré-definido como *Salmonella* spp. Nesse caso, somente poderão ser utilizadas as técnicas de tipificação por microarranjo de DNA (técnica 3.7) ou caracterização antigênica completa (realizada por provedor externo), a fim de ser obtido o sorovar definitivo. A técnica deve ser identificada no relatório de ensaio;

b) O método de tipificação por microarranjo de DNA poderá ser realizado pelo próprio laboratório ou por outro laboratório que pertença à rede de credenciados do MAPA para isolamento e caracterização de salmonelose aviária.

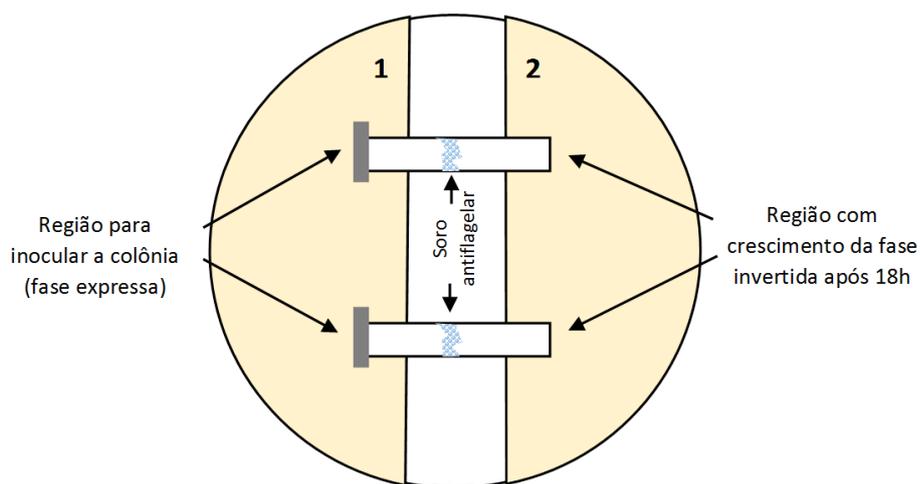
3.6.6.14. Inversão de fase pela técnica da ponte de papel

a) Realizar a inversão de fase em culturas suspeitas de *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar*, *S. Infantis* e *S. Virchow* em que houver somente a expressão de um dos flagelos para o sorovar suspeito;

b) Separar uma placa com ágar TSA para cada três colônias testadas. Traçar duas linhas paralelas de um lado a outro da placa, posicionadas no centro da placa, com 1 cm de distância entre si. Identificar uma das regiões como 1 (Pré-Inversão) e 2 (Pós-Inversão);

- c)** Cortar o ágar nas linhas traçadas, com o auxílio de lâmina ou faca estéril, e remover o ágar do centro, de forma que sobrem duas regiões separadas do meio ao final (FIGURA 3);
- d)** Secar as placas em fluxo laminar ou cabine de segurança biológica, abrindo-as parcialmente com o ágar voltado para cima;
- e)** Inserir três tiras de papel filtro estéril sobre o espaço cortado, equidistantes, de forma que cada extremidade ligue um lado ao outro do ágar. Deve-se manipular as tiras sem que elas dobrem ou encostem na superfície inferior da placa, pressionando bem suas extremidades para aderirem ao ágar (FIGURA 3);
- f)** Depositar sobre a região de cada fita que não faz contato com o ágar (meio), uma gota da solução do soro antiflagelar (aproximadamente 30 µL) a ser utilizado na inversão, de forma a cobrir totalmente a largura das fitas. Deve ser utilizado o antissoro cuja expressão foi positiva durante a caracterização antigênica;
- g)** Caso seja utilizado soro antiflagelar próprio para inversão de fase, utilizar a quantidade indicada pelo fabricante;
- h)** Inocular a colônia a ser testada sobre a extremidade da tira que está em contato com a região de pré-inversão (1), conforme indicado na Figura 3. Podem ser testadas até três colônias diferentes numa mesma placa, uma a cada tira;
- i)** Incubar as placas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16-18 horas, sem exceder o tempo total de incubação;
- j)** Após a incubação, a colônia com a fase invertida deve migrar para a região 2 (pós inversão). Fazer o repique de uma colônia de ambas as regiões em ágar nutriente, incubando a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas, e repetir a caracterização flagelar do sorovar suspeito. Realizar o repique mesmo que não seja perceptível o crescimento da colônia a olho nu;
- k)** Repetir a caracterização flagelar das cepas invertidas e fazer a interpretação a partir dos perfis dispostos no QUADRO 8 e no QUADRO 9.

FIGURA 3. Esquematização da montagem da ponte de papel para inversão de fase



(Fonte: figura de LFDA-SP; adaptado de ISO 6579-3:2014)

3.6.6.15. Inversão de fase em swarm ágar

- a) Realizar a inversão de fase em culturas suspeitas de *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar*, *S. Infantis* e *S. Virchow* em que houver somente a expressão de um dos flagelos para o sorovar suspeito;
- b) Fundir o meio swarm ágar a 95 °C em banho-maria. Resfriar em seguida, mantendo a 45 °C;
- c) Adicionar 100 µL do soro antflagelar a ser utilizado na inversão em uma placa de Petri estéril. Deve ser utilizado o antissoro cuja expressão foi positiva durante a caracterização antigênica;
- d) Caso seja utilizado soro antflagelar próprio para inversão de fase, utilizar a quantidade indicada pelo fabricante;
- e) Distribuir entre 10-30 mL do meio na mesma placa. O volume a ser utilizado depende do tamanho da placa utilizada. Homogeneizar o meio com movimento suave e esperar solidificar;
- f) Inocular a colônia ser testada no centro da placa, encostando levemente a alça na superfície do ágar, tomando o cuidado para não estriar nem perfurar o meio. Inocular apenas uma colônia por placa;
- g) Incubar à temperatura de 37 ± 1°C por 18-24 horas, mantendo a superfície voltada para cima em superfície plana;
- h) Repetir a caracterização flagelar do sorovar suspeito utilizando a massa da cultura localizada nas bordas do crescimento bacteriano e fazer a interpretação a partir dos perfis dispostos no QUADRO 8 e no QUADRO 9;
- i) Caso o crescimento da cultura seja pontual, não se espalhando por toda a superfície, é provável que a cultura em questão seja monofásica. Repetir a caracterização flagelar do sorovar suspeito mesmo neste caso.

QUADRO 8. Identificação sorológica dos sorovares de *Salmonella* após inversão de fase dos sorovares Typhimurium (obrigatório) e Heidelberg (opcional)

Inversão de fase – <i>S. Typhimurium</i> (obrigatório) e <i>S. Heidelberg</i> (opcional)					
Fórmula antigênica	Soro para inversão	Sorologia após inversão de fase ^b			Diagnóstico final
		i	1,2	r	
S. (1,4,[5],12: i : -)	i	-	+	-	<i>S. Typhimurium</i>
S. (1,4,[5],12: i : -)	i	+	-	-	S. (1,4,[5],12: i : *) ^a
S. (1,4,[5],12: - : 1,2)	1,2	+	-	-	<i>S. Typhimurium</i>
S. (1,4,[5],12: - : 1,2)	1,2	-	-	+	<i>S. Heidelberg</i>
S. (1,4,[5],12: - : 1,2)	1,2	-	+	-	S. (1,4,[5],12: * : 1,2) ^a
S. (1,4,[5],12: r : -)	r	-	+	-	<i>S. Heidelberg</i>
S. (1,4,[5],12: r : -)	r	-	-	+	S. (1,4,[5],12: r : *) ^a

Legenda:

^a : O diagnóstico somente pode ser definitivo por meio de tipificação por microarranjo de DNA. Na impossibilidade desta análise pelo laboratório, emitir o resultado com a fórmula antigênica sugerida no quadro, deixando na nota do laudo a frase a seguir: “*: Não foi possível identificar a respectiva fase durante a caracterização”.

^b : Amostras que apresentarem ausência de crescimento após a inversão de fase, inviabilizando a conclusão da caracterização sorológica, somente podem ser caracterizadas por tipificação por microarranjo de DNA. Na impossibilidade desta análise pelo laboratório, emitir o resultado com a fórmula antigênica apresentada no quadro.

(Fonte: adaptado de GRIMONT & WEILL, 2007.)

QUADRO 9. Identificação sorológica dos sorovares Hadar, Virchow e Infantis após inversão de fase (opcionais)

Inversão de fase – S. Hadar, S. Infantis e S. Virchow (opcionais)								
Fórmula antigênica	Soro para inversão	Sorologia após inversão de fase ^b					Diagnóstico final	
		Z ₁₀	Z ₁₅	e,n,x	1,2	r		1,5
S. (6,8: Z ₁₀ : -)	Z ₁₀	-	-	+	NA			S. Hadar
S. (6,8: Z ₁₀ : -)	Z ₁₀	+	-	-	NA			S. (6,8: Z ₁₀ : *) ^a
S. (6,8: - : e,n,x)	e,n,x	+	-	-	NA			S. Hadar
S. (6,8: - : e,n,x)	e,n,x	-	-	+	NA			S. (6,8: * : e,n,x) ^a
S. (6,7,14: - : 1,5)	1,5	NA			-	-	+	S. (6,7,14: * : 1,5) ^a
S. (6,7,14: r : -)	r	NA			-	-	+	S. Infantis
S. (6,7,14: r : -)	r	NA			+	-	-	S. Virchow
S. (6,7,14: r : -)	r	NA			-	+	-	S. (6,7,14: r : *) ^a
S. (6,7,14: - : 1,2)	1,2	NA			-	+	-	S. Virchow
S. (6,7,14: - : 1,2)	1,2	NA			+	-	-	S. (6,7,14: * : 1,2) ^a

Legenda:

(Fonte: adaptado de GRIMONT & WEILL, 2007.)

NA – Não aplicável;

^a : O diagnóstico somente pode ser definitivo por meio de tipificação por microarranjo de DNA. Na impossibilidade desta análise pelo laboratório, emitir o resultado com a fórmula antigênica sugerida no quadro, deixando na nota do laudo a frase a seguir: “*: Não foi possível identificar a respectiva fase durante a caracterização”.

^b : Amostras que apresentarem ausência de crescimento após a inversão de fase, inviabilizando a conclusão da caracterização sorológica, somente podem ser caracterizadas por tipificação por microarranjo de DNA. Na impossibilidade desta análise pelo laboratório, emitir o resultado com a fórmula antigênica apresentada no quadro.

3.6.7. Critérios de Aceitação

a) O crescimento bacteriano das culturas testadas deve ser satisfatório nos ágar inoculados, após o período de incubação. Deve-se repetir o repique de quaisquer culturas com ausência de crescimento;

b) As etapas de caracterização somática e flagelar não podem ser concluídas se a cepa apresentar aglutinação positiva com salina 2% (culturas autoaglutinantes);

c) Os controles POSITIVOS e NEGATIVOS utilizados devem apresentar resultados compatíveis com sua fórmula antigênica, não podendo apresentar reações positivas com antissoros NEGATIVOS e vice-versa;

d) A inversão de fase em ponte de papel somente é válida se houver crescimento a olho nu na fase 1 (pré-inversão), pelo tempo máximo de incubação;

e) A inversão de fase em swarm ágar somente é válida se houver o crescimento da cultura no ágar após o tempo de incubação.

3.6.8. Interpretação dos resultados

a) Repetir a caracterização flagelar das cepas invertidas e fazer a interpretação a partir dos perfis dispostos no QUADROS 8 e no QUADRO 9;

b) Caso a cepa após inversão de fase apresente os mesmos resultados que o encontrado na primeira caracterização, a inversão de fase deve ser repetida;

c) Na ausência de crescimento da cultura incubada em ágar nutriente (no caso da técnica da ponte de papel), ou caso o resultado encontrado na segunda caracterização seja inconclusivo ou discordante com os Quadros 8 e 9, o resultado preliminar deve ser expresso com a fórmula antigênica, de acordo com o disposto nesses quadros (cepa monofásica);

d) O diagnóstico definitivo dessas cepas somente pode ser realizado através da tipificação por microarranjo de DNA (técnica 3.7);

e) O método de tipificação por microarranjo de DNA poderá ser realizado pelo próprio laboratório ou por outro laboratório que pertença à rede de credenciados do MAPA para isolamento e caracterização de salmonelose aviária.

3.6.9. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio”, e expresso como POSITIVO ou “NEGATIVO”, contendo os itens a seguir:

- I.** as matrizes das quais se obteve o resultado POSITIVO, expressando a quantidade de matrizes positivas dentre o total de analisadas;
- II.** o sorovar identificado na etapa de caracterização, identificando as matrizes das quais foi isolado;
- III.** as técnicas utilizadas;

3.6.10. Descarte das amostras e resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.6.11;

b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;

c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

d) Após este período, todo resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

e) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.6.11. Retenção de itens de ensaio

a) Culturas de salmonela

Após um período mínimo de 03 anos da realização das análises, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.7. Identificação do agente - Tipificação molecular por microarranjo de DNA

3.7.1. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Alças bacteriológicas descartáveis ou flambáveis;
- c) Microtubos ou microplacas de volumes variados;
- d) Ponteiras com filtro, estéreis;
- e) Estantes para microtubos;
- f) Caneta para escrita em plástico/vidro.
- g) Algodão, gaze ou papel toalha;
- h) Palitos ou hastes descartáveis;
- i) Cuba para descarte com solução desinfetante (opcional).

3.7.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica classe II B2 ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV;
- b) Esterilizador de alças bacteriológicas (opcional);
- c) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- d) Termobloco;
- e) Termomixer;
- f) Mini centrífuga;
- g) Vórtex;
- h) Leitor de plataforma de microarranjo de DNA;
- i) Microcomputador;
- j) Autoclave.

3.7.3. Insumos

- a) Ágar TSA ou nutriente ou Rambach;
- b) Kit para tipificação molecular por microarranjo de DNA.

3.7.4. Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;
- c) Solução de hipoclorito de sódio 2% (opcional).

3.7.5. Realização do ensaio

3.7.5.1. Considerações gerais

- a) Esta técnica substitui a caracterização antigênica de salmonela;
- b) As etapas de bioquímica do método de Isolamento de Salmonela (técnica 3.5) são facultativas, se for optado pelo uso dessa técnica.

3.7.5.2. Preparo da cultura

- a) A cultura para a realização do ensaio deve ser obtida do ágar XLD, Rambach ou TSI;
- b) No caso de material fecal, materiais ambientais ou suabes, o ensaio poderá ser realizado a partir de culturas retiradas diretamente do MSRV, desde que seja indicado pelo fabricante do kit;
- c) Uma colônia deve ser repicada em ágar Nutriente, TSA ou Rambach e incubada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 h antes da realização do procedimento.

3.7.5.3. Realização da técnica

- a) Realizar o ensaio em salas separadas para cada etapa do procedimento, de acordo com as indicações do fabricante;
 - a) Antes e após a adição das amostras e do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM;
 - b) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.7.6. Critérios de aceitação da prova

- a) O ensaio é considerado válido se a leitura do controle interno do kit apresentar resultado satisfatório.

3.7.7. Interpretação dos resultados

- a) Fazer a leitura através de software, seguindo instruções do fabricante do kit;
- b) Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados;
- c) Qualquer amostra com resultado inconclusivo ou com suspeitas de contaminação deverá ser retestada.

3.7.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio”, e expresso como “POSITIVO” ou “NEGATIVO”, contendo os itens a seguir:
 - I. As matrizes das quais se obteve o resultado POSITIVO, expressando a quantidade de matrizes positivas dentre o total de analisadas;
 - II. O sorovar identificado na etapa de caracterização, identificando as matrizes das quais foi isolado;
 - III. As técnicas utilizadas;

3.7.9. Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.7.10;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do

laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.7.10. Retenção de itens de ensaio

a) Culturas de salmonela

Após um período mínimo de 03 anos da realização das análises, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

b) Produtos de extração

Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.8. Triagem molecular e Identificação do agente - PCR em tempo real para *Salmonella* spp.

3.8.1. Disposições gerais

a) O laboratório pode optar por realizar a técnica de PCR em tempo real com um kit comercial ou protocolo *in house*. Ambos necessitam de comprovação de desempenho.

3.8.2. Materiais

- a)** Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- b)** Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c)** Microplacas ou microtubos para leitura óptica de qPCR;
- d)** Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de qPCR;
- e)** Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f)** Estantes para microtubos;
- g)** Gaze ou papel toalha.

3.8.3. Equipamentos e instrumentos

- a)** Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- b)** Geladeira;
- c)** Freezer;
- d)** Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- e)** Termociclador para PCR em tempo real;
- f)** Centrífuga para microtubos;
- g)** Agitador de microtubos;
- h)** Microcomputador;
- i)** Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional);
- j)** Autoclave.

3.8.4. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Oligonucleotídeos para qPCR (QUADRO 10);
- c) Controle DETECTADO para *Salmonella* spp.;
- d) Kit de qPCR;
- e) Kit para extração de DNA (manual ou automatizado).

QUADRO 10: Sugestão de oligonucleotídeos para detecção molecular de *Salmonella* spp.

Oligonucleotídeo	Sequência	Referência
ttr-6 (forward)	CTCACCAGGAGATTACAACATGG	Malorny, 2004
ttr-4 (reverse)	AGCTCAGACCAAAAGTGACCATC	Malorny, 2004
ttr-5 (probe)	FAM-CACCGACGGCGAGACCGACTTT-Dark Quencher	Malorny, 2004

3.8.5. Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;
- c) Solução de hipoclorito de sódio 0,5%.

3.8.6. Realização do ensaio

3.8.6.1. Extração de ácidos nucleicos

- a) Realizar a extração de ácidos nucleicos das amostras incubadas utilizando kit de extração de DNA específico para o tipo de material a ser analisado, de acordo com as recomendações do fabricante;
- b) O laboratório pode optar pelo uso de outro método de extração que não use kit, desde que apresente verificação de desempenho comprovada pelo próprio laboratório;
- c) A etapa de incubação (enriquecimento em caldos) poderá ser facultativa desde que o laboratório possua um método de PCR validado com limite de detecção tão eficiente quanto o método de Isolamento ou a extração após essa etapa;
- d) Adicionar amostras controle a cada procedimento de extração: controle POSITIVO (*Salmonella* spp.) e controle NEGATIVO (caldo BHI ou água).

3.8.6.2. Reação de amplificação de ácido nucleico

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e amplicons, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70 INPM;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.8.6.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (*Salmonella* spp.) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas;

- b)** Após o preparo do mix, adicionar o DNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;
- c)** A adição de DNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);
- d)** Devem ser incluídos nas análises:
 - I.** Controle POSITIVO (*Salmonella* spp.);
 - II.** Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III.** Branco (água livre de nucleases);
 - IV.** Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.8.6.4. Reação de qPCR

- a)** Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- b)** Iniciar e entrar com os dados no software do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- c)** Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- d)** Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.8.7. Critérios de aceitação do ensaio

- a)** Para a validação do ensaio, o controle POSITIVO do kit e o controle interno devem apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um Ct satisfatório (conforme especificações do fabricante);
- b)** O controle NEGATIVO deve ter Ct indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle NEGATIVO deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.8.8. Interpretação dos resultados

- a)** Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle POSITIVO, controle NEGATIVO, controle da extração, background de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;
- b)** Qualquer amostra questionável deverá ser retestada;
- c)** Qualquer amostra cujo resultado seja POSITIVO na PCR deverá passar pela técnica de Isolamento de Salmonela (técnica 3.5) ou por PCR específico para os sorovares do PNSA, conforme a seguir:
 - I.** Órgãos e tecidos: S. Gallinarum, S. Pullorum, S. Enteritidis e S. Typhimurium;
 - II.** Material fecal e ambiental: S. Enteritidis e S. Typhimurium.
- d)** A realização do PCR específico para os sorovares do PNSA pode ser realizada de forma a complementar o Isolamento (técnica 3.5) em qualquer uma de suas etapas, desde que a verificação de desempenho realizada pelo laboratório tenha contemplado essa possibilidade.

3.8.9. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio”, e expresso como “POSITIVO” ou “NEGATIVO”, contendo os itens a seguir:

- I. As matrizes das quais se obteve o resultado POSITIVO, expressando a quantidade de matrizes positivas dentre o total de analisadas;
- II. O sorovar identificado na etapa de caracterização, identificando as matrizes das quais foi isolado;
- III. As técnicas utilizadas;

3.8.10. Descarte das amostras e resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.8.11;

b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;

c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.8.11. Retenção de itens de ensaio

a) Produtos de extração

Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.9. Triagem molecular - PCR pelo Sistema BAX® para *Salmonella* spp.

3.9.1. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- d) Pinça e tesoura estéreis;
- e) Estantes para microtubos;
- f) Gaze ou papel toalha;
- g) Cuba para descarte com solução desinfetante (opcional).

3.9.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- b) Estufa;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;

- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Provetas ou provetas estéreis (opcional);
- g) Termobloco;
- h) Balança semi-analítica;
- i) Agitador tipo vórtex;
- j) Homogeneizador de amostras (opcional);
- k) Sistema BAX®;
- l) Microcomputador;
- m) Autoclave.

3.9.3. Insumos

- a) Água peptonada;
- b) Caldo BHI;
- c) Solução de hipoclorito de sódio 2% (opcional);
- d) Kit para PCR pelo Sistema BAX.

3.9.4. Soluções

- a) Água peptonada;
- b) Caldo BHI;
- c) Solução de álcool 70° INPM;
- d) Solução descontaminante de DNA e DNAses (opcional);
- e) Solução de hipoclorito de sódio 2% (opcional).

3.9.5. Realização do ensaio

3.9.5.1. Considerações gerais

- a) Este método pode ser utilizado como uma etapa de triagem antes da técnica de Isolamento de Salmonela (técnica 3.5);

3.9.5.2. Preparo da amostra

a) Mecônio, gema e fezes frescas

- I. Adicionar 2 g em 20 mL de água peptonada 1% e incubar em estufa a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas;
- II. Homogeneizar e inocular 10 μL do líquido em 500 μL de caldo BHI e incubar a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 3 horas;
- III. Processar conforme protocolo do equipamento.

b) Suabe de fundo de caixa, papel de fundo de caixa e suabe de cloaca

- I. Adicionar aproximadamente 20-50 mL de água peptonada 1%, na quantidade suficiente para cobrir o material com o líquido, e incubar em estufa a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 18-24 horas;
- II. Homogeneizar e inocular 10 μL do líquido em 500 μL de caldo BHI e incubar a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 3 horas;
- III. Processar conforme protocolo do equipamento.

3.9.5.3. Realização do PCR

- a) Seguir os protocolos para análise conforme descrito no manual de fabricante;
- b) Realizar o ensaio em salas separadas para cada etapa do procedimento, conforme exigências do protocolo específico;
 - b) Antes e após a adição das amostras e do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM;
 - c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades;
 - d) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle POSITIVO para *Salmonella* spp.;
 - II. Controle NEGATIVO para a extração;
 - III. Controles do kit utilizado (se houver).

3.9.6. Critérios de aceitação da prova

- a) O ensaio é considerado válido se a leitura do controle interno do kit apresentar resultado satisfatório.

3.9.7. Interpretação dos resultados

- a) Fazer a leitura através de software, seguindo instruções do fabricante do kit;
- b) Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados;
- c) Qualquer amostra com resultado inconclusivo deverá ser retestada;
- d) Qualquer amostra cujo resultado seja POSITIVO deverá passar pela técnica de Isolamento de Salmonela (técnica 3.5).

3.9.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio”, e expresso como “POSITIVO” ou “NEGATIVO”, contendo os itens a seguir:
 - I. As matrizes das quais se obteve o resultado POSITIVO, expressando a quantidade de matrizes positivas dentre o total de analisadas;
 - II. O sorovar identificado na etapa de caracterização, identificando as matrizes das quais foi isolado;
 - III. As técnicas utilizadas;

3.9.9. Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.9.10;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de esterilização por autoclavação. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

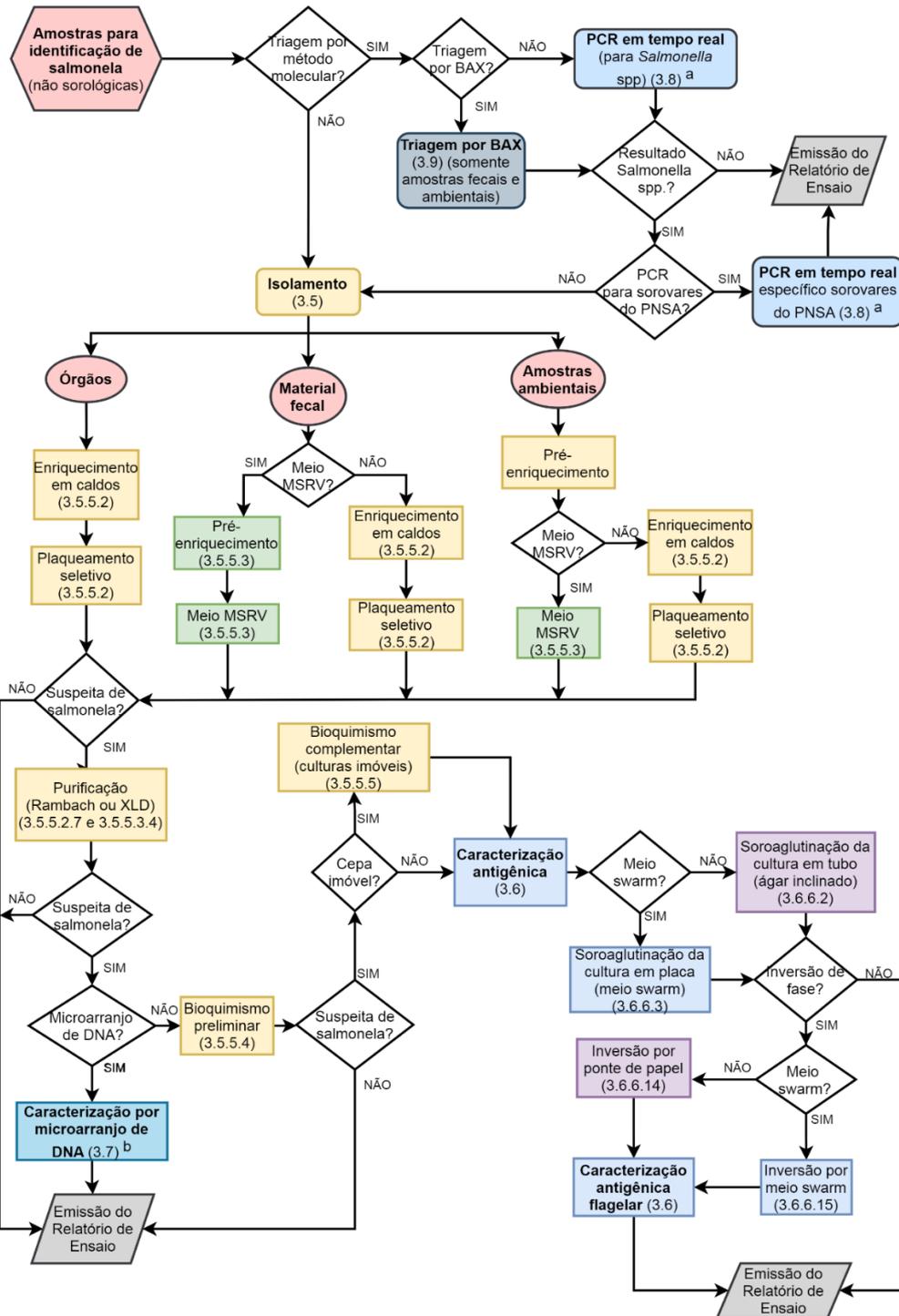
d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.9.10. Retenção de Itens de Ensaio

a) Produtos de extração

Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

4. ANEXO – Fluxograma de processamento de amostras não sorológicas de salmonela



Legenda:

^a A técnica de PCR em tempo real para *Salmonella* spp. e para sorovares específicos do PNSA pode ser realizada após qualquer etapa do início do isolamento, de acordo com a verificação de desempenho realizada pelo laboratório;

^b A técnica de Microarranjo de DNA pode ser realizada após quaisquer etapas do isolamento a partir da purificação da colônia ou da inoculação em ágar MSRV, de acordo com o protocolo do laboratório e orientações do fabricante do kit.

Referências Bibliográficas

DUARTE, S. C. et al. *Guia ilustrado para isolamento de Salmonella spp. de origem avícola*. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2016. 73 p.; 21 cm.

Fowl typhoid and Pullorum disease. Chapter 3.3.11. Version (NB: version adopted in May 2018). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 14 set. 2021.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. *Antigenic formulae of the Salmonella Serovars. 9th ed. Paris: Institut Pasteur, 2007*. WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella. Disponível em: < https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf >. Acesso em: 10 dez. 2020.

International Air Transport Association (IATA). *Dangerous Goods Regulations*. 61st Edition. 2020.

International Standard Organization (ISO). ISO 6579-1:2017. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp.* 2017.

International Standard Organization (ISO). ISO 6579-3:2014. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 3: Guidelines for serotyping of Salmonella spp.* 2014.

LÁZARO, N.S.; REIS, E.M.F.; PEREIRA, C.S.; RODRIGUES, D.P. *Manual Gênero Salmonella: Características Epidemiológicas e Laboratoriais*. Rio de Janeiro: FIO CRUZ, 2008. 67 p.

MALORNY, B; PACCASSONI, E; FACH, P; BUNGE, C; MARTIN, A; HELMUTH, R. “Diagnostic Real-Time PCR for Detection of Salmonella in Food”. *Applied and environmental microbiology*, Dec. 2004, Vol. 70, No. 12, p. 7046-7052.

SZMOLKA A, KASZANYITZKY E, NAGY B. “Improved diagnostic and real-time PCR in rapid screening for Salmonella in the poultry food chain”. *Acta Vet Hung.* 2006 Sep;54 (3):297- 312.

CAPÍTULO 2.1.2 MICOPLASMOSE AVIÁRIA

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da Micoplasmose Aviária:

1.1. Detecção da Resposta Imune

a) Soro sanguíneo.

1.2. Identificação do agente

a) Traqueia;

b) Suabe de traqueia.

c) Ovos bicados, aves mortas e pintos de um dia (órgãos e tecidos)

I. Traqueia.

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento;

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos:

a) Quando essa informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente;

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios de interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

3.2. Detecção da Resposta Imune - Ensaio imunoenzimático (ELISA)

3.2.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Ponteiras descartáveis;
- g) Reservatórios para soluções (cubas);
- h) Papel absorvente;
- i) Selador ou tampa para placas de ELISA;
- j) Caneta para identificação de vidraria;
- k) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.2.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Geladeira;
- b) Estufa;
- c) Termômetros;
- d) Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- e) Pipetador automático ou manual;
- f) Leitora de ELISA;
- g) Cronômetros;
- h) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- i) Agitador de microplacas (opcional);
- j) Lavadora de microplacas (opcional);
- k) Autoclave.

3.2.3. Insumos

a) Kits de ELISA para a detecção de anticorpos para os micoplasmas aviários contemplados no PNSA.

3.2.4. Soluções

a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados;

- b)** Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c)** No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;
- d)** Diluir a soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5. Realização do ensaio

- a)** Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;
- b)** A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;
- c)** Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;
- d)** Utilizar ponteiros distintos para cada controle e amostra de soro;
- e)** Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;
- f)** Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;
- g)** As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;
- h)** Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2.6. Critérios de aceitação do Ensaio

- a)** O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles e os demais parâmetros calculados a partir delas estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos resultados

- a)** De acordo com as DOs obtidas, consideram-se as amostras como POSITIVAS ou NEGATIVAS ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).
- b)** Amostras com DO entre os dois pontos de corte estabelecidos serão consideradas inconclusivas e deverão ser novamente ensaiadas.

3.2.8. Emissão dos resultados

- a)** Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como POSITIVO ou NEGATIVO ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).
- b)** Expressar a quantidade de alíquotas positivas dentre o total de analisadas.

3.2.9. Descarte de Amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.2.10.
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soros

Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.3. Detecção da Resposta Imune - Soroaglutinação rápida em placa (SAR)

3.3.1. Materiais

- a) Luvas descartáveis;
- b) Placa de vidro (ou outro material rígido) quadriculada;
- c) Ponteiras descartáveis;
- d) Bastões de vidro ou misturador múltiplo para homogeneizar;
- e) Recipientes para descarte.

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Micropipeta de volume regulável;
- b) Banho-maria;
- c) Fonte de luz;
- d) Cronômetro;
- e) Microcentrífuga;
- f) Autoclave.

3.3.3. Insumos

- a) Antígeno corado para SAR;
- b) Controle POSITIVO e NEGATIVO para SAR.

3.3.4. Soluções

- a) Solução salina 0,9% ou solução de PBS 0,01M pH 7,0-7,2.

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1. Preparo das amostras

- a) Este ensaio não pode ser realizado com amostras que foram congeladas;
- b) Deixar as amostras atingirem temperatura ambiente ou a temperatura indicada pela bula do fabricante do Antígeno antes de realizar o ensaio;
- c) Em caso de haver traços de hemólise nas amostras de soro, centrifugá-las antes de realizar o ensaio.

3.3.5.2. Preparo dos reagentes SAR

- a) Homogeneizar o frasco contendo o antígeno constantemente durante a realização do ensaio para evitar precipitação. Os antígenos devem estar na temperatura ambiente.

3.3.5.3. Soro Aglutinação Rápida - SAR

- a) Realizar o ensaio à temperatura ambiente ou conforme indicação do fabricante;
- b) Homogeneizar suavemente o frasco contendo o antígeno durante a realização do ensaio para evitar precipitação;
- c) Depositar 20 µL ou o volume indicado pelo fabricante do antígeno no centro de um quadradinho da placa limpa e desprezar a ponteira;
- d) Depositar mesma quantidade do soro a ser testado sobre a gota do antígeno e homogeneizar ambas com auxílio de ponteira, bastão ou homogeneizador múltiplo, formando um círculo de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro;
- e) Agitar suavemente a placa, fazendo movimentos circulares;
- f) Observar a formação de grumos colocando a placa contra a fonte luminosa e fundo branco após transcorrido o tempo especificado pelo fabricante;
- g) As amostras que apresentarem qualquer grau de aglutinação nessa etapa são consideradas reagentes e devem ser testadas na diluição para 1:4. Para isso, inativar as amostras em banho-maria a 56 °C por 30 minutos, em seguida, diluir uma parte da amostra em 3 partes de solução salina 0,9% ou solução de PBS 0,01M pH 7,0-7,2;
- h) Em paralelo às amostras, devem sempre ser incluídos:
 - I. Soro controle POSITIVO;
 - II. Soro controle NEGATIVO.

3.3.6. Critérios de aceitação do ensaio

- a) O ensaio será válido quando:
 - I. O controle POSITIVO apresentar formação de grumos sob as condições especificadas para o ensaio pelo fabricante do insumo;
 - II. O controle NEGATIVO não apresentar nenhuma formação de grumos.

3.3.7. Interpretação dos resultados

- a) Considerar a amostra positiva quando houver qualquer grau de formação de grumos, dentro do tempo preconizados pelo fabricante, ainda que com menor intensidade que o controle POSITIVO, na diluição 1:4;
- b) Considerar a amostra negativa quando não houver qualquer grau de formação de grumos.

3.3.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como “POSITIVO” ou “NEGATIVO”, ou de acordo com o preconizado pelo fabricante;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas dentre o total de analisadas.

3.3.9. Descarte das amostras e Resíduos

- a) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- b) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.3.10;
- c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.3.10. Retenção de itens de ensaio

- a) Soros
Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.4. Preparo de amostras para ensaios moleculares

3.4.1. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de qPCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de qPCR;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.4.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- b) Geladeira;
- c) Freezer;
- d) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- e) Termociclador para PCR em tempo real;
- f) Centrífuga para microtubos;

- g) Agitador de microtubos;
- h) Microcomputador;
- i) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional);
- j) Autoclave.

3.4.3. Insumos

- a) Tubos com Caldo Frey Modificado para Micoplasma;
- b) Controle POSITIVO para MG, MS e MM (antígeno ou cultura de referência);
- c) Água livre de nucleases;
- d) Kit de extração de DNA.

3.4.4. Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;
- c) Hipoclorito de sódio a 0,5%.

3.4.5. Realização do ensaio

3.4.5.1. Extração de DNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de DNA específicos para o tipo de material a ser analisado;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Seguir as instruções para preparo e armazenamento recomendadas pelo fabricante.

3.4.5.2. Pré-enriquecimento das amostras

3.4.5.2.1. Suabes de traqueia

- a) Homogeneizar os tubos contendo suabes de traqueia imersos em Caldo Frey;
- b) Incubar os frascos de Caldo Frey em microaerofilia a 37 ± 1 °C por 72 horas ou até a acidificação do meio (coloração laranja ou amarela), caso ocorra antes desse período.

3.4.5.2.2. Traqueia

- a) Macerar/picotar/homogeneizar e inocular uma fração do pool em Caldo Frey, próximo ao bico de Bunsen ou dentro de cabine de segurança biológica;
- b) Incubar os frascos de Caldo Frey em jarra de anaerobiose em microaerofilia ou em estufa de produção de CO₂ a 37 ± 1 °C por 72 horas ou até a acidificação do meio (coloração laranja ou amarela), caso ocorra antes desse período.

3.4.5.3. Extração de ácidos nucleicos

- a)** Realizar a extração de ácidos nucleicos das amostras incubadas, de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de DNA específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b)** O laboratório pode optar pelo uso de outro método de extração que não use kit, desde que apresente verificação de desempenho comprovada pelo próprio laboratório;
- c)** A etapa de incubação (pré-enriquecimento) poderá ser facultativa caso o laboratório possua um método de PCR validado com limite de detecção tão eficiente quanto o método com a extração após essa etapa;
- d)** Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle POSITIVO (MG, MS e/ou MM) e controle NEGATIVO (caldo Frey ou água).

3.4.6. Descarte das amostras e resíduos

- a)** Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.4.7;
- b)** Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c)** Todo o resíduo biológico deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- d)** O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.4.7. Retenção de itens de ensaio

- a) Produtos de extração**
Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.
- b) Suabes de traqueia e traqueia**
Imediatamente após a emissão do laudo, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.5. PCR convencional para micoplasma

3.5.1. Disposições gerais

a) O laboratório pode optar por realizar a técnica de PCR com um kit comercial ou protocolo *in house*. Ambos necessitam de comprovação de desempenho.

3.5.2. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para PCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.5.3. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- b) Geladeira;
- c) Freezer;
- d) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- e) Termociclador;
- f) Centrífuga para microtubos;
- g) Agitador de microtubos;
- h) Microcomputador;
- i) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional);
- j) Autoclave.

3.5.4. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Solução tampão para PCR;
- c) Solução de cloreto de magnésio para PCR;
- d) Mix de dNTP;
- e) Primers forward e reverse para PCR específicos para MG, MS e MM;
- f) Enzima Taq DNA Polimerase;
- g) Controles "POSITIVOS" para MG, MS e MM (antígeno ou cultura de referência);
- h) Corante para ácidos nucleicos;
- i) Marcador de peso molecular;
- j) Tampão de carregamento ("loading buffer");
- k) Gel de agarose;
- l) Sugestão de oligonucleotídeos apresentados no QUADRO 1.

QUADRO 1: Sugestão de oligonucleotídeos para detecção molecular de Micoplasma

Agente	Oligonucleotídeo	Sequência	Referência
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	MG mgc2 F	5' - GGA TCC CAT CTC GAC CAC GAG AAA A-3'	Nascimento, 1991
	MG mgc2 R	5' - CTT TCA ATC AGT GAG TAA CTG ATG A-3'	Nascimento, 1991
<i>Mycoplasma synoviae</i>	MS 16S-23S F	5' - CGA GCG AAG TTT TTC GGA AC-3'	Lauerman, 1995
	MS 16S-23S R	5' - CAG TCG TCT CCG AAG TTA ACA A-3'	Lauerman, 1995
<i>Mycoplasma meleagridis</i>	MM 16S-23S F	5' - CGA GCG AAG TTT TTC GGA AC-3'	Boyle, Good & Morrow, 1995
	MM 16S-23S R	5' - GGT ACC GTC AGG ATA AAT GC-3'	Boyle, Good & Morrow, 1995

3.5.5. Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;
- c) Solução de hipoclorito de sódio 0,5%.

3.5.6. Realização do ensaio

3.5.6.1. Reação de amplificação de ácido nucleico por PCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e amplicons, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.5.6.2. Preparo do mix de reação

- a)** Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (*Mycoplasma*) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b)** Adicionar o mix de reação a cada poço da microplaca (ou microtubos);
- c)** Devem ser incluídos nas análises:
 - I.** Controle DETECTADO para *Mycoplasma*;
 - II.** Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III.** Branco (água livre de nucleases);
 - IV.** Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.5.6.3. Reação de PCR

- a)** Após o preparo do mix, adicionar o DNA nos poços da placa ou em microtubos identificados com a numeração da amostra a ser testada;
- b)** Realizar a amplificação em termociclador certificado, conforme as especificações de temperatura do protocolo utilizado.

3.5.6.4. Eletroforese

- a)** Preparar o gel de agarose em concentração adequada ao protocolo de PCR utilizado. Adicionar um corante para ácidos nucleicos em proporção suficiente para visualização das bandas;
- b)** Para a corrida das amostras, adicionar tampão de carregamento (loading buffer) ao produto de PCR;
- c)** Aplicar marcador de peso molecular em um dos poços do gel;
- d)** Realizar a corrida em cuba de eletroforese, utilizando o tempo e a voltagem adequados para o volume do gel e o protocolo de PCR utilizado;
- e)** Visualizar o gel sob luz ultravioleta, fotografar com o auxílio de um fotodocumentador e analisar o resultado.

3.5.7. Critérios de aceitação do ensaio

- a)** As amostras de controle POSITIVO para MG, MS e MM devem apresentar bandas de tamanhos correspondentes aos amplicons do protocolo utilizado;
- b)** As amostras de controle NEGATIVO (controle NEGATIVO da extração e branco) não devem apresentar bandas de amplificação.

3.5.8. Interpretação dos resultados

- a)** Comparar os resultados das amostras testadas ao das amostras controle, a fim de classificá-las como positivas ou negativas;
- b)** A leitura das bandas deve ser clara e livre de amplicons inespecíficos para o teste ser considerado satisfatório;
- c)** Qualquer amostra questionável deverá ser retestada.

3.5.9. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como POSITIVO ou “NEGATIVO”, ou de acordo com o preconizado pelo fabricante;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas dentre o total de analisadas.

3.5.10. Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.5.11;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.5.11. Retenção de itens de ensaio

- a) Produtos de extração
Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.
- b) Suabes de traqueia e traqueia
Imediatamente após a emissão do laudo, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.6. PCR em tempo real para micoplasma (qPCR)

3.6.1. Disposições gerais

- a) O laboratório pode optar por realizar a técnica de PCR em tempo real com um kit comercial ou protocolo *in house*.

3.6.2. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de qPCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de qPCR;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.6.3. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- b) Geladeira;
- c) Freezer;
- d) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- e) Termociclador para PCR em tempo real;
- f) Centrífuga para microtubos;
- g) Agitador de microtubos;
- h) Microcomputador;
- i) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional);
- j) Autoclave.

3.6.4. Insumos

- a) Tubos com Caldo Frey Modificado para micoplasma;
- b) Controle POSITIVO para micoplasma específicos para MG, MS e MM;
- c) Água livre de nucleases;
- d) Kit comercial para detecção de micoplasma por qPCR; ou
- e) Oligonucleotídeos (primers) e sondas específicos para detecção dos micoplasmas contemplados no PNSA.

3.6.5. Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;
- c) Solução de hipoclorito de sódio 0,5%.

3.6.6. Realização do ensaio

3.6.6.1. Reação de amplificação de ácido nucleico por qPCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e amplicons, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
 - c) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM;
 - b) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.6.6.2. Preparo do mix de reação

- a)** Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (*Mycoplasma* spp.) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b)** Após o preparo do mix, adicionar o DNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;
- c)** A adição de DNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);
- d)** Devem ser incluídos no ensaio:
 - I.** Controles “POSITIVOS” para MG, MS e/ou MM;
 - II.** Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III.** Branco (água livre de nucleases);
 - IV.** Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.6.6.3. Reação de qPCR

- a)** Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- b)** Iniciar e entrar com os dados no software do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- c)** Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- d)** Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.6.7. Critérios de aceitação do ensaio

- a)** Para a validação do ensaio, o controle POSITIVO do kit e o controle interno devem apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um Ct satisfatório (conforme especificações do fabricante);
- b)** O controle NEGATIVO deve ter Ct indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle NEGATIVO deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.6.8. Interpretação dos resultados

- a)** Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle POSITIVO, controle NEGATIVO, controle da extração, background de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;
- b)** Qualquer amostra questionável deverá ser retestada.

3.6.9. Emissão dos resultados

- a)** Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como POSITIVO ou “NEGATIVO”, ou de acordo com o preconizado pelo fabricante;
- b)** Expressar a quantidade de alíquotas positivas dentre o total de analisadas.

3.6.10. Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.6.11;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.6.11. Retenção de Itens de Ensaio

- a) Produtos de extração
Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.
- b) Suabes de traqueia e traqueia
Imediatamente após a emissão do laudo, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

Referências Bibliográficas

Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). CHAPTER 3.3.5. Version (NB: version adopted in May 2021). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 14 set. 2021.

BOYLE JS, GOOD RT, MORROW CJ. "Detection of the Turkey Pathogens *Mycoplasma meleagridis* and *M. iowae* by Amplification of Genes Coding for rRNA". *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 33, No. 5 (1995), pp. 1335–1338.

LAUERMAN LH, CHILINA AR, CLOSSER, JA AND JOHANSEN D. "Avian *Mycoplasma* Identification Using Polymerase Chain Reaction Amplicon and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis". *Avian Diseases*, Vol. 39, No. 4 (1995), pp. 804-811.

NASCIMENTO ER, YAMAMOTO R, HERRICK KR, TAIT RC. "Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*". *Avian Dis.* 1991 Jan-Mar;35(1):62-9.

CAPÍTULO 2.1.3. INFLUENZA AVIÁRIA - IA

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico de influenza aviária:

1.1. Detecção da Resposta Imune

a) Soro sanguíneo.

1.2. Identificação do Agente

a) Aves Vivas

I. Suabe de Cloaca;

II. Suabe de Traqueia;

III. Suabe de fundo de caixa;

IV. Fezes frescas.

b) Aves Mortas*, Sacrificadas e Ovos com embriões mortos.

I. Pulmão;

II. Traqueia;

III. Cérebro;

IV. Cerebelo;

V. Intestino delgado com pâncreas;

VI. Ceco com tonsilas cecais;

*Somente serão recebidas Aves mortas decorrentes de colheitas realizadas pelo VIGIAGRO

c) Líquido Alantoide

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos:

a) Quando essa informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente;

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

3.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

3.2.1. Material

- a)** Luvas para procedimentos;
- b)** Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c)** Provetas graduadas;
- d)** Béqueres;
- e)** Erlenmeyers;
- f)** Ponteiras descartáveis;
- g)** Descartador de ponteiras;
- h)** Reservatórios para soluções (cubetas);
- i)** Papel absorvente;
- j)** Selador ou tampa para placas de ELISA;
- k)** Caneta para identificação de vidraria;
- l)** Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavagem.

3.2.2. Equipamentos e instrumentos

- a)** Geladeira;
- b)** Freezer -20°C;
- c)** Estufa;
- d)** Termômetros;
- e)** Micropipetas monocal e multicanal de volumes reguláveis;
- f)** Pipetador automático ou manual;
- g)** Leitora de ELISA;
- h)** Cronômetros;
- i)** Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- j)** Agitador de microplacas (opcional);

- k) Lavadora de microplacas (opcional);
- l) Autoclave.

3.2.3. Insumos

- a) Kits de ELISA para a detecção de anticorpos para o vírus influenza A.

3.2.4. Soluções

- a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados;
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;
- d) Diluir a soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5. Realização do ensaio

- a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;
- b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;
- c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;
- d) Utilizar ponteiros distintas para cada controle e amostra de soro;
- e) Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;
- f) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;
- g) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;
- h) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2.6. Critérios de aceitação do ensaio

- a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles e os demais parâmetros calculados a partir delas estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos resultados

- a) De acordo com as DOs obtidas, consideram-se as amostras como POSITIVAS ou NEGATIVAS ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

3.2.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como POSITIVO ou NEGATIVO ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

3.2.9. Descarte de Amostras e resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.2.10;

b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;

c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Amostras positivas ao ELISA para detecção de anticorpos para influenza A deverão ser submetidas a ensaios confirmatórios. Caso o laboratório não realize os ensaios confirmatórios, as amostras positivas deverão ser encaminhadas com a maior brevidade possível ao LFDA indicado pela CGAL para confirmação.

Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.3. Inibição da hemaglutinação para tipificação de anticorpos para o vírus influenza A

3.3.1. Materiais

- a)** Luvas para procedimentos;
- b)** Ponteiras descartáveis;
- c)** Pipetas de 5, 10 e 20 mL;
- d)** Reservatórios para pipetagem de líquidos;
- e)** Ponteiras descartáveis;
- f)** Microtubos;
- g)** Microplacas com fundo em “V” ou em “U”;
- h)** Papel absorvente;
- i)** Filme adesivo ou tampa para microplacas;
- j)** Canetas para escrita em plástico/vidro.

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

- a)** Refrigerador;
- b)** Freezer -20 °C;
- c)** Micropipetas monocal e multicanal de volumes reguláveis;

- d) Pipetador automático ou bulbo de segurança;
- e) Balança analítica ou semi-analítica;
- f) Microcentrífuga;
- g) Autoclave.

3.3.3. Insumos

- a) Soros de referência para os 16 subtipos do vírus influenza A (H1 ao H16);
- b) Antígenos inativados de referência para os 16 subtipos do vírus influenza A (H1 ao H16);
- c) Soro NEGATIVO para influenza A.

3.3.4. Soluções

- a) Suspensão de hemácias de *Gallus gallus*, preferencialmente machos, SPF (Specific Pathogen Free) ou SAN (Specific Antibody Negative) a 1%;
- b) Suspensão de hemácias de *Gallus gallus*, preferencialmente machos, SPF ou SAN a 10%;
- c) Solução de PBS 0,01 M pH 7,0 – 7,2 ou solução salina 0,85% a 0,90%;
- d) Solução de PBS com 0,4% BSA-AS.

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1. Preparo dos antígenos – teste da hemaglutinação

- a) Para realização do ensaio de HI, é necessário que todos os antígenos padrões estejam com o título de quatro unidades hemaglutinantes (UHA) em 25 µL;
- b) Para isso, os antígenos devem ser titulados da seguinte forma:
 - I. Adicione 25 µL de PBS ou solução salina a todos os poços de uma microplaca de fundo V;
 - II. Adicione 25 µL do antígeno no primeiro poço e realize diluições seriadas na base 2, transferindo-se 25 µL do poço inicial ao segundo orifício e assim, sucessivamente, até o último orifício da linha, descartando-se os 25 µL finais;
 - III. Adicione 25 µL de suspensão de hemácias 1%;
 - IV. Agitar levemente a placa, cobrir com adesivo ou tampa para evitar evaporação e incubar por 30 minutos a 22°C ± 2°C ou por 1 hora a 4°C;
 - V. Ao final do período de incubação, realizar a leitura da prova para determinação do título do antígeno em unidades hemaglutinantes (UHA). O título deve ser lido como a maior diluição em que houve hemaglutinação completa;
 - VI. A partir dos resultados obtidos na etapa anterior, os antígenos devem ser diluídos em PBS com 0,4% BSA-AS de forma a se obter uma concentração de 4 UHA/25 µL. Após a diluição, os antígenos devem ser novamente titulados a fim de se verificar se a diluição realizada realmente resulta em 4 UHA/25 µL.

3.3.5.2. Preparo dos soros de referência

- a) Etapa facultativa. Os soros de referência podem ser diluídos a fim de otimizar o uso destes reagentes;
- b) Diluir os soros a um título entre 1:16 e 1:64 com solução PBS ou solução salina;
- c) Utilizar o soro de referência como controle POSITIVO para seu respectivo antígeno no ensaio de HI.

3.3.5.3. Preparo das amostras de soro

- a) Verificar se as amostras de soro não apresentam hemaglutinação inespecífica. Para isso, adicionar a um poço de uma microplaca de fundo V ou U 25 µL de PBS ou solução salina, 25 µL da amostra, e 25 µL da suspensão de hemácia 1%;
- b) Agitar levemente a placa, cobrir com adesivo ou tampa para evitar evaporação e incubar por 30 minutos a 22°C ± 2°C ou por 1 hora a 4°C;
- c) Realizar a leitura da placa inclinando-a. Se houver a presença de “lágrima” escorrendo, indica que não houve auto aglutinação;
- d) Realizar o tratamento prévio das amostras autoaglutinantes conforme protocolo a seguir:
 - I. Adicionar 100 µL de PBS ou solução salina a um microtubo ou a um orifício de uma microplaca;
 - II. Adicionar 50 µL da amostra de soro a ser tratada;
 - III. Adicionar 50 µL de uma suspensão de hemácias a 10%;
 - IV. Homogeneizar a cada 10 minutos, durante 30 minutos, a fim de manter as hemácias em suspensão;
 - V. Centrifugar por 4 minutos a 4000 RPM;
- e) Utilizar o sobrenadante para realização da técnica de HI;
- f) Considerar que a diluição inicial da amostra é 1:4.

3.3.5.4. Técnica da inibição da hemaglutinação

- a) Dispensar 25 µL de PBS ou solução salina em cada orifício da microplaca a ser utilizada, com exceção dos orifícios de controle da hemácia que devem conter 50 µL;
- b) Colocar, com auxílio de micropipeta monocal, 25 µL de cada amostra de soro a ser testada no primeiro orifício de cada linha da placa (FIGURA 1);
- c) Realizar diluições seriadas na base 2 de cada amostra com micropipeta multicanal, sempre homogeneizando várias vezes com a própria pipeta antes de passar para o próximo poço;
- d) Diluir até o sexto poço (p.e. até A6) para amostras de soro sem tratamento prévio ou diluição a 1:4; ou até o terceiro poço (p.e. até A3) para amostras previamente diluídas (1:4);
- e) Dispensar 25 µL de soro referência específico para o antígeno do ensaio (controle POSITIVO) em uma das linhas preenchidas com PBS ou solução salina, e realizar as diluições seriadas na base 2 da mesma forma que foi feito para as amostras. Para amostras pré-diluídas, realizar a mesma diluição para os soros referência;
- f) Dispensar 25 µL de soro controle NEGATIVO em uma das linhas preenchidas com PBS ou solução salina, realizar as diluições seriadas na base 2 da mesma forma que foi feito para as amostras;
- g) Reservar os orifícios da última linha para o controle das hemácias;
- h) Adicionar 25 µL do antígeno com quatro UHA em todos orifícios da microplaca destinados àquele subtipo (exceto nos orifícios do controle das hemácias) e homogeneizar a placa suavemente;

- i) Cobrir a microplaca com adesivo ou tampa para evitar evaporação e incubar por 30 minutos a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ou por 1 hora a 4°C ;
- j) Adicionar, em cada orifício, 25 μL de suspensão de hemácias a 1% e homogeneizar suavemente com leves batidinhas;
- k) Incubar a microplaca por 30 minutos a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ou por 1 hora a 4°C ;
- l) Realizar a leitura da placa inclinando-a e observando a presença ou ausência de "lágrima" escorrendo.

3.3.6. Critérios de aceitação do ensaio

- a) O teste será válido se:
 - I. Os controles das amostras de soro não apresentarem hemaglutinação inespecífica;
 - II. O controle de hemácias apresentar "lágrima" escorrendo;
 - III. O antígeno utilizado possuir quatro UHA (determinado pelo ensaio de hemaglutinação);
 - IV. O controle NEGATIVO apresentar título inferior a 2^2 (1:4);
 - V. O controle POSITIVO apresentar título $\geq 2^4$ (1:16).
- b) Anotar os resultados em formulário próprio;
- c) Para as amostras pré-diluídas (1:4), as diluições na base 2 correspondem à diluição 1:8, 1:16 e 1:32.

3.3.7. Interpretação dos resultados

- a) Registrar os resultados em formulário próprio;
- b) Os poços com inibição completa devem formar uma "lágrima" semelhante àquela observada nos poços de controle POSITIVO. Os poços que apresentam "lágrima" com escoamento retardado em comparação com o controle POSITIVO devem ser interpretados como incompleto;
- c) O título de HI é a maior diluição do soro capaz de inibir completamente a hemaglutinação das 4 UHA do antígeno;
- d) São consideradas **positivas** aquelas amostras que apresentarem título $\geq 1:16$;
- e) São consideradas **negativas** as amostras que apresentarem título $< 1:16$.

FIGURA 1. Exemplo de marcação das placas para realização do teste de HI para subtipificação de anticorpos para o vírus influenza A.

Para amostras e soros pré-diluídos (1:4):

		H1			H2			H3			H4		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMOSTRAS	1	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	2	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	3	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	4	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	5	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	6	C+	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	7	C-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	8	He	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	9	H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Legenda: ● = controle de hemácias, C+= soro controle positivo, C-= soro controle negativo

(Fonte: LFDA-SP)

3.3.8. Emissão dos resultados

- Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como “POSITIVO” ou “NEGATIVO”;
- Expressar a quantidade de soros “POSITIVOS” dentre o total analisado;
- Em caso de positividade, indicar para qual subtipo do vírus influenza A a amostra foi positiva.

3.3.9. Descarte das amostras e resíduos

- Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.3.10;
- Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.3.10. Retenção de itens de ensaio

- Soro sanguíneo

Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.4. Técnica da imunodifusão em gel-ágar (IDGA) para pesquisa de anticorpos para influenza A

3.4.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Balão volumétrico;
- g) Ponteiras descartáveis;
- h) Placa de Petri de poliestireno de 100 mm de diâmetro;
- i) Descartador de ponteiras;
- j) Caneta para identificação de vidraria;
- k) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.4.2. Equipamentos

- a) Geladeira;
- b) Freezer;
- c) Micro-ondas;
- d) Micropipetas monocal de volumes reguláveis;
- e) Pipetador automático ou manual;
- f) Balança analítica;
- g) Medidor de pH;
- h) Destilador ou deionizador de água;
- i) Centrifuga;
- j) Autoclave;
- k) Cortador de gel padrão;
- l) Câmara Úmida;
- m) Fonte de luz;
- n) Bomba de vácuo (opcional);
- o) Autoclave.

3.4.3. Insumos

- a) Antígeno do vírus influenza A para prova de imunodifusão em ágar-gel - IDGA;
- b) Soro controle POSITIVO para vírus influenza A;
- c) Soros controle forte- POSITIVO”, fraco- POSITIVO e NEGATIVO para vírus influenza A.

3.4.4. Soluções

- a) Gel de ágar a 1% em PBS pH 7.2.

3.4.5. Realização do ensaio

3.4.5.1. Preparo dos reagentes

- a) Preparar o gel a 1% p/v de agarose ou ágar tipo II purificado, 8% p/v NaCl em 0,01 M PBS em pH 7.2, ou conforme orientação do fabricante dos insumos utilizado;
- b) Aquecer o gel no micro-ondas por tempo necessário para fusão completa, evitando o borbulhamento e extravasamento. Não efetuar sucessivas fusões do gel;
- c) Verter 16 ml a 17 ml do gel fundido e ainda quente em placa de Petri até uma espessura de, aproximadamente, 3 mm;
- d) Deixar o gel solidificando em superfície plana, em local livre de poeira e em temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por no máximo 30 minutos, para que a concentração eletrolítica não seja alterada;
- e) Após o gel solidificar, utilizando cortador de padrão hexagonal com as dimensões recomendadas pelo fabricante dos insumos, perfurar os poços de aproximadamente 5 mm de diâmetro no gel. As partes cortadas podem ser removidas da placa utilizando uma cânula conectada a uma bomba de vácuo através de uma mangueira;
- f) Identificar os poços de acordo com a amostra de soro que será adicionada a cada um deles utilizando caneta para vidro ou plástico;
- g) Se as placas de Petri contendo ágar não forem utilizadas imediatamente, armazená-las vedadas ou embaladas em plástico em câmara úmida ou geladeira para evitar o ressecamento do gel;
- h) Não utilizar placa que apresente umidade nos poços da roseta. Desprezâ-las ou remover a umidade. Caso apresentem ressecamento devem ser descartadas.

3.4.5.2. Preparo das amostras

- a) Identificar as amostras de soro de aves não-aquáticas a serem analisadas;
- b) Caso seja recomendado pelo fabricante do antígeno, inativar amostras a 56°C .

3.4.5.3. Técnica do IDGA

- a) Preencher o formulário de acompanhamento do ensaio de IDGA;
- b) Distribuir aproximadamente 50 μL de cada amostra de soro em posições alternadas na periferia do hexágono. Nos poços adjacentes, acrescentar soro controle POSITIVO e ao poço central adicionar o antígeno (**Erro! Fonte de referência não encontrada.2**);
- c) O volume adicionado deve ser suficiente para preencher o poço, coincidindo a parte superior do menisco com o nível do gel, tendo o cuidado de não derramar. Caso o fabricante do antígeno especifique o volume a ser utilizado, seguir suas recomendações adequando o tamanho do poço ou profundidade do gel ao volume indicado;
- d) Para cada grupo de amostras a ser testado, deve ser incluída uma roseta contemplando os soros controle fraco - POSITIVO, forte - POSITIVO e NEGATIVO;
- e) Incubar as placas em câmara úmida à temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Recomenda-se colocar um chumaço de algodão ou papel toalha molhado dentro da câmara para manter o ambiente úmido;
- f) Após a incubação, proceder a leitura das placas abertas sobre uma fonte de luz contra um fundo escuro.

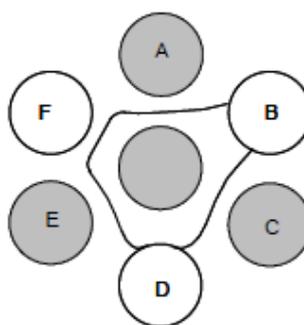
3.4.6. Critérios de aceitação

- a) As linhas de precipitação que indicam a interação antígeno-anticorpo devem se formar entre os poços em que foram adicionados os soros controle sabidamente “POSITIVOS” e o antígeno;
- b) Os soros controles fraco - POSITIVO e forte - POSITIVO devem apresentar linhas de precipitação dentro do esperado;
- c) O soro controle NEGATIVO não deve apresentar linha de precipitação;
- d) Caso as linhas estejam fracas para serem visualizadas, incubar por mais 24 horas e realizar a leitura novamente.

3.4.7. Interpretação dos resultados

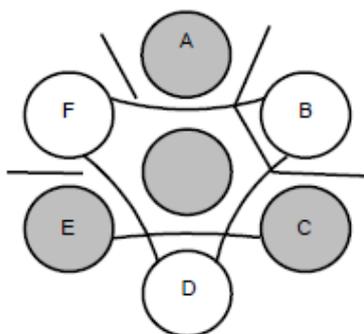
- a) NEGATIVO: as linhas formadas entre o antígeno e o soro controle POSITIVO prolongam-se até a cavidade onde se encontra a amostra testada, sem encurvar-se (FIGURA 2 – Posição B);
- b) POSITIVO: as linhas formadas entre o antígeno e o soro controle POSITIVO se fundem com aquela formada pela amostra testada, formando uma linha contínua de identidade total (FIGURA 2 – Posição F);
- c) Variações de reações positivas: fraco POSITIVO: a linha de precipitação tende a se formar mais próximo à cavidade onde se encontra a amostra testada, visualizando-se somente uma convergência das duas linhas do controle na direção da cavidade onde se encontra a amostra (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** – Posição D);
- d) Reações inespecíficas: caso se formem linhas de precipitação entre o poço do soro analisado e o controle POSITIVO (FIGURA 3 – Posições F e B), essas devem ser desconsideradas, pois são inespecíficas. Caso as linhas de precipitação de um controle POSITIVO e uma amostra se cruzem, indo de encontro ao poço adjacente (FIGURA 3 – Posição D), isso também indica reação inespecífica e deve ser desconsiderada.

FIGURA 2. Padrão de disposição de amostras em placa de imunodifusão. Nas posições A, C e E, foi adicionado soro controle POSITIVO. Na posição F, soro teste POSITIVO. Em B, soro teste NEGATIVO. Em D, soro teste fraco POSITIVO.



(Fonte: LFDA-SP)

FIGURA 3. Placa de imunodifusão com exemplos de linhas de precipitação inespecíficas formadas a partir dos poços contendo soro teste em F, B e D. Elas podem ser desconsideradas, desde que as linhas de precipitação específicas formadas a partir dos controles “POSITIVOS” em A, C e E possam ser visualizadas.



(Fonte: LFDA-SP)

3.4.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como “POSITIVO” ou “NEGATIVO”;
- b) Expressar a quantidade de amostras positivas dentre o total de amostras analisadas.

3.4.9. Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.4.10;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.4.10. Retenção de itens de ensaio

- a) Soro sanguíneo

Após um período mínimo de 90 dias da emissão do relatório de ensaio, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.5. Isolamento viral

3.5.1. Materiais

- a) Luvas de procedimento;
- b) Algodão hidrófilo embebido em álcool 70° INPM;
- c) Micropipetas mono e multicanal de capacidade mínima de 25 µL;
- d) Ponteiras para micropipeta capacidade mínima de 25 µL;
- e) Seringas descartáveis de 1 mL, com precisão de 0,1 mL com agulhas 27 G ½” ou similares;
- f) Filtro descartável de 22 µm de porosidade para seringas;
- g) Microplacas em poliestireno de 96 orifícios com fundo em “V” ou em “U”;
- h) Tubos de centrifuga com tampa rosqueável;
- i) Tesouras e pinças dente-de-rato estéreis;
- j) Frascos de plástico com tampas perfuráveis;
- k) Gaze;
- l) Toalhas absorventes descartáveis;
- m) Filme adesivo para microplacas;
- n) Sacos de autoclave;
- o) Cuba de plástico autoclavável;
- p) Caneta para escrita em plástico/vidro;
- q) Etiquetas autoadesivas.

3.5.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica, classe II A2;
- b) Autoclave de fronteira;
- c) Estufa;
- d) Geladeira;
- e) Freezer;
- f) Ultrafreezer;
- g) Triturador de tecidos com sondas;
- h) Furador de ovos;
- i) Ovoscópio;
- j) Incubadora de ovos;
- k) Centrifuga refrigerada;
- l) Agitador tipo vórtex;
- m) Autoclave.

3.5.3. Insumos

- a) Ovos embrionados SPF com 9 a 11 dias de incubação;
- b) Caldo BHI ou MEM com solução de antibióticos 10X;
- c) Caldo BHI;
- d) Placas de ágar sangue ou ágar BHI.

3.5.4. Soluções

- a) Suspensão de hemácias de *Gallus gallus*, preferencialmente machos, SPF ou SAN a 1%.
- b) Desinfetante hospitalar a base de monopersulfato de potássio concentrado ou hipoclorito de sódio 2-2,5% ou outro produto com ação viricida comprovada;

- c) Solução de álcool 70° INPM.

3.5.5. Realização do ensaio

3.5.5.1. Processamento dos itens de ensaio

- a) As amostras colhidas de aves mortas podem ser coletadas e processadas separadamente ou em “pools” de um mesmo sistema orgânico (respiratório, digestório ou nervoso);
- b) Quando o processamento não for imediatamente possível, estocar as amostras entre 4°C e 8°C por até 4 dias. Para estocagem prolongada, as amostras devem ser mantidas à temperatura de -70°C a -80°C.

3.5.5.2. Processamento de suabes traqueais, cloacais, de fundo de gaiola e fezes

- a) Os suabes colhidos e acondicionados individualmente podem ser agrupados em “pools” de cinco a sete por tipo de suabe e espécie;
- b) Caso não haja volume suficiente de material para inoculação, pode ser preparado um “pool” com suabes de traqueia e cloaca;
- c) Os frascos contendo fezes em meio de transporte devem ser centrifugados a 1000 g por 10 minutos e o sobrenadante recolhido em frasco contendo 1,5 ml de caldo BHI contendo antibióticos;
- d) Os frascos contendo os inóculos devem ser identificados de forma a permitir a rastreabilidade da amostra;
- e) Caso o material não seja utilizado no mesmo dia, os frascos deverão ser armazenados sob refrigeração (2 °C a 8°C) por até 24 horas. Para estocagem prolongada, as amostras devem ser mantidas à temperatura de -70°C a -80°C.

3.5.5.3. Processamento de amostras provenientes de órgãos

- a) Picotar os tecidos finamente, triturá-los e preparar suspensões em caldo BHI ou meio MEM contendo solução de antibióticos 10X em tubos de centrifuga;
- b) Centrifugar as suspensões a 1000 g por 10 minutos, recolher o sobrenadante e armazená-lo em um frasco devidamente identificado de forma a manter a rastreabilidade da amostra;
- c) Aguardar um período \geq quatro horas para a inoculação (para a ação da solução de antibióticos). Caso não seja utilizado no mesmo dia, conservá-lo entre 2°C e 8°C por até 24 horas. Para estocagem prolongada, as amostras devem ser mantidas à temperatura de -70°C a -80°C.

3.5.5.4. Isolamento viral

- a) Antes da inoculação realizar ovoscopia nos ovos embrionados que serão inoculados a fim de se detectar embriões mortos ou fracos para que sejam descartados;
- b) Devem ser feitos os seguintes controles de prova: controle do meio com antibióticos utilizado no preparo dos inóculos, controle dos ovos SPF utilizados para inoculação e controle de esterilidade dos inóculos;
- c) Em cabine de segurança biológica, com auxílio de uma seringa estéril descartável de 1 ou 3 mL com agulha 27 G ½” ou similar, inocular via cavidade alantoide 0,3 mL da amostra em, no mínimo, 4 ovos embrionados SPF com idade entre 9 e 11 dias devidamente identificados de forma a manter a rastreabilidade das amostras;
- d) Selar o orifício de inoculação, aguardar a secagem do selante e borrifar álcool 70° INPM antes da retirada dos ovos inoculados da cabine de segurança biológica;

- e)** Incubar os ovos inoculados a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 4 a 7 dias, realizando-se ovoscopia diariamente. Descartar ovos com embriões mortos nas primeiras 24 horas. Registrar o número de ovos mortos de cada um dos inóculos em formulários próprios e armazená-los à temperatura de 2 a 8°C até o término do teste, identificando-os com a data da ovoscopia;
- f)** Sacrificar os ovos viáveis no final do teste, submetendo-os à temperatura de refrigeração *overnight* ou 1,5 h em ultrafreezer;
- g)** Coletar 1 a 2 mL do líquido alantoide dos ovos de cada inóculo em tubo de centrifugação, centrifugando-se a 1000 g por 10 minutos;
- h)** Verificar a atividade hemaglutinante do “pool” do líquido alantoide por meio da técnica de hemaglutinação (HA) em microplaca;
- i)** Verter aproximadamente 5 mL do “pool” de cada material que apresentar reação negativa na hemaglutinação em frasco estéril contendo 1,5 mL de caldo BHI ou MEM contendo solução de antibióticos 10X e identificar como 1ª passagem;
- j)** Inocular o líquido alantoide referente à 1ª passagem em, no mínimo, 04 ovos embrionados SPF para realização da segunda passagem;
- k)** Ao final da segunda passagem, se os ovos ainda apresentarem-se NEGATIVOS na técnica de HA, preparar um “pool” de cada material e encaminhá-lo para realização de RT-PCR ou RT-qPCR a fim de confirmar a negatividade do mesmo;
- l)** Caso o material seja POSITIVO no RT-PCR ou RT-qPCR, nova passagem pode ser realizada a fim de aumentar o título viral;
- m)** Se o “pool” do material apresentar reação positiva no teste de HA em qualquer uma das passagens, o líquido alantoide dos ovos deve ser coletado, centrifugado à 1000 g por 10 minutos e dividido em duas alíquotas, uma com e outra sem caldo BHI ou MEM contendo solução de antibióticos 10X.
- n)** Utilizar a alíquota sem antibióticos nas provas de identificação viral (HI) e caracterização viral através do Índice de patogenicidade intravenosa (IVPI).

3.5.6. Critérios de aceitação do ensaio

- a)** O teste será válido se:
- I.** Os ovos destinados ao controle do meio não apresentarem mortalidade e atividade hemaglutinante;
 - II.** Os ovos SPF não inoculados, destinados ao controle, não apresentarem mortalidade e atividade hemaglutinante;
 - III.** O controle de esterilidade dos inóculos for NEGATIVO.

3.5.7. Interpretação dos resultados

- a)** O material será considerado POSITIVO no isolamento viral quando houver detecção de atividade hemaglutinante no líquido alantoide dos ovos inoculados;
- b)** O material será considerado NEGATIVO quando, após duas passagens consecutivas em ovos embrionados SPF, não houver detecção de atividade hemaglutinante e detecção do RNA viral por RT-PCR ou RT-qPCR.

3.5.8. Emissão dos resultados

- a)** Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “POSITIVO” ou “NEGATIVO”;

b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.5.9. Descarte de Amostras e resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.5.10;

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavagem apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.5.10. Retenção de itens de ensaio

a) Líquido alantoide

Todas as alíquotas (passagens) das amostras que resultarem positivas no isolamento viral e/ou no RT-PCR ou RT-qPCR deverão ser mantidas pelo laboratório e armazenadas à -80°C ou temperaturas inferiores por tempo indeterminado. As alíquotas armazenadas, assim como suas quantidades, devem ser registradas em formulário próprio para fins de inventário.

Alíquotas negativas podem ser descartadas após a conclusão das análises.

3.6. Inibição da hemaglutinação para identificação viral (HI)

3.6.1. Materiais

- a)** Luvas para procedimentos;
- b)** Algodão hidrófilo;
- c)** Ponteiras descartáveis;
- d)** Pipetas de 5, 10 e 20 mL;
- e)** Microplacas em poliestireno de 96 orifícios com fundo em “V” ou em “U”;
- f)** Tubos de centrifuga com tampa rosqueável;
- g)** Reservatórios para pipetagem de líquidos;
- h)** Papel absorvente;
- i)** Cuba de plástico autoclavável;
- j)** Filme adesivo para microplacas;
- k)** Caneta para escrita em plástico/vidro.

3.6.2. Equipamentos e instrumentos

- a)** Cabine de segurança biológica, classe II A2;
- b)** Refrigerador;
- c)** Micropipetas monocal e multicanal de volumes reguláveis;

- d) Pipetador automático ou bulbo de segurança;
- e) Agitador tipo vórtex;
- f) Autoclave.

3.6.3. Insumos

- a) Líquido alantoide coletado dos ovos referentes ao material com atividade hemaglutinante verificado anteriormente;
- b) Soros controles de referência para os 16 subtipos do vírus influenza A (H1 ao H16);
- c) Antígenos inativados de referência para os 16 subtipos do vírus influenza A (H1 a H16).

3.6.4. Soluções

- a) Suspensão de hemácias de *Gallus gallus*, preferencialmente machos, SPF ou SAN a 1%;
- b) Solução de PBS pH 7,2 ± 0,2 ou solução salina 0,85% a 0,90%;
- c) Solução de PBS com 0,4% BSA-AS;
- d) Solução de álcool 70° INPM;
- e) Desinfetante hospitalar a base de monopersulfato de potássio concentrado, hipoclorito de sódio 2-2,5% ou outro produto com ação virucida.

3.6.5. Realização do ensaio

3.6.5.1. Determinação do título do antígeno em unidades hemaglutinantes (UHA)

- a) Realizar a titulação do líquido alantoide infectado, coletado dos ovos referentes ao material com atividade hemaglutinante;
- b) Para realização da prova de HI para identificação viral, é necessário que o antígeno (líquido alantoide infectado) esteja com quatro unidades hemaglutinantes (UHA) em 25 µL;
- c) Para obtenção dessas quatro UHA, diluir o antígeno em solução de PBS com 0,4% BSA-AS, conforme o exemplo a seguir:
 - I. Título no HA = 2⁸ (256 UHA), sendo que o título é a maior diluição do antígeno capaz de produzir aglutinação completa (“endpoint”) e equivale a uma UHA. Portanto, encontraremos quatro UHA dividindo o valor do “endpoint” por quatro. Exemplo: 256 ÷ 4 = 64;
- d) De acordo com o exemplo acima, diluir o antígeno a 1:64 (1 mL de antígeno para 63 mL de solução de PBS com 0,4% BSA-AS, ou dividir esta proporção por 10, utilizando-se 100 µL de antígeno para 6,3 mL de PBS com 0,4% BSA-AS) para se obter as quatro UHA;
- e) Fazer outras duas diluições do antígeno para se ter uma margem de segurança maior. Nesse caso, preparar duas novas diluições contendo, respectivamente, 50% a mais e 50% a menos do volume inicial de antígeno utilizado no preparo da primeira diluição;
- f) Após o preparo das diluições, realizar uma nova titulação (retrotitulação) a fim de determinar em qual das três diluições encontram-se as quatro UHA. Essa é, então, a diluição a ser empregada como antígeno na prova de HI. Registrar em formulário próprio.

3.6.5.2. Descrição da técnica de HI

- a) O controle da reação de inibição da hemaglutinação será feito pela utilização de antígenos inativados de referência para os 16 subtipos do vírus influenza A (H1 a H16) e seus respectivos antissoros;

- b)** Dispensar 25 µL de PBS pH 7,2 ± 0,2 ou solução salina 0,85% a 0,90% em cada orifício da microplaca a ser utilizada;
- c)** Colocar, com auxílio de micropipeta monocanal, 25 µL de cada antissoro de referência no primeiro orifício de cada fileira da placa, reservando-se as colunas 9, 10 e 11 para o controle POSITIVO e a última coluna para o controle das hemácias (FIGURA 4 e FIGURA 5);
- d)** Realizar diluições seriadas na base 2 com micropipeta multicanal, e para isso:
- I.** Aspirar 25 µL do primeiro orifício da linha (p.e., orifício A1);
 - II.** Dispensar os 25 µL no segundo orifício da mesma linha (p.e., A2);
 - III.** Homogeneizar três vezes com auxílio da micropipeta;
 - IV.** Aspirar 25 µL e dispensar no próximo orifício da mesma linha (p.e., A3);
- e)** Repetir os passos “c” e “d” por quatro vezes (p.e. até A8);
- f)** Dispensar 25 µL de cada antissoro de referência na coluna 9 (p.e. até A9) e realizar a diluição na base 2 até a coluna 11 (p.e. até A11);
- g)** Dispensar 25 µL de antígeno de referência (com 4 UHA) homólogo para cada antissoro de referência nos orifícios das colunas 9, 10 e 11;
- h)** Adicionar 25 µL do antígeno/vírus com quatro UHA em cada orifício da microplaca até a coluna 8 e homogeneizar suavemente;
- i)** Cobrir a microplaca com adesivo para evitar evaporação e incubar por 30 minutos a 22°C ± 2°C ou por 1 hora a 4°C;
- j)** Adicionar, em cada orifício, 25 µL de suspensão de hemácias de galinha a 1% (completamente suspensa) e homogeneizar suavemente;
- k)** Incubar a microplaca por 30 minutos a 22°C ± 2°C ou por 1 hora a 4°C;
- l)** Realizar a leitura da placa inclinando-a e observando a presença ou ausência de “lágrima” escorrendo e registrar os resultados em formulário próprio.

FIGURA 4. Disposição dos antissoros hemaglutinantes para subtipos IA e do controle de hemácias (HE) na microplaca para realização do teste de HI para identificação viral. As colunas 9, 10 e 11 são dedicadas aos controles “POSITIVOS” de cada subtipo viral.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9 C+	10 C+	11 C+	12
A	H1											HE
B	H2											HE
C	H3											HE
D	H4											HE
E	H5											HE
F	H6											HE
G	H7											HE
H	H8											HE

Fonte: LFDA-SP

FIGURA 5. Disposição dos antissoros hemaglutinantes para subtipos IA e do controle de hemácias (HE) na microplaca para realização do teste de HI para identificação viral. As colunas 9, 10 e 11 são dedicadas aos controles "POSITIVOS" de cada subtipo viral.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9 C+	10 C+	11 C+	12
A	H9											HE
B	H10											HE
C	H11											HE
D	H12											HE
E	H13											HE
F	H14											HE
G	H15											HE
H	H16											HE

Fonte: LFDA-SP

3.6.6. Critérios de aceitação do Ensaio

- a) O teste será válido se:
- I. O vírus a ser identificado possuir, pelo menos, 4 UHA (determinado pelo ensaio de hemaglutinação);
 - II. O controle de hemácias não apresentar aglutinação (apresentar "lágrima" escorrendo);
 - III. Os antissoros de referência para cada subtipo do vírus influenza A inibirem a hemaglutinação dos respectivos antígenos.

3.6.7. Interpretação dos resultados

- a) Os poços com presença de "lágrima" são registrados como "+" (POSITIVO para HI); poços com ausência de "lágrima", isso é com completa hemaglutinação, são registrados como "-" (NEGATIVO para HI); poços com formação de "lágrima" incompleta são registrados como "I" (HI incompleto);
- b) Os poços com inibição completa devem formar uma "lágrima" na mesma taxa de velocidade dos poços de controle POSITIVO. Os poços que apresentam "lágrima" com escoamento retardado em comparação com o controle POSITIVO devem ser interpretados como incompleto;
- c) O título de HI é dado como a maior diluição do soro capaz de causar inibição completa das quatro UHA do vírus em teste. Considerar somente as cavidades que apresentarem botão de hemácias igual ao das cavidades controle, anotando no formulário próprio;
- d) O material será considerado POSITIVO quando a sua atividade hemaglutinante for inibida por antissoro específico para um determinado subtipo do vírus influenza A.

3.6.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como POSITIVO para vírus influenza A subtipo (*especificar o subtipo*) ou “NEGATIVO para vírus influenza A”;

b) Indicar a alíquota que apresentou positividade.

3.6.9. Descarte das amostras e resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.6.10.

b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;

c) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

d) Após este período, todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavagem apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

e) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.6.10. Retenção de itens de ensaio

a) Líquido alantoide

Todas as alíquotas (passagens) das amostras que resultarem positivas no isolamento viral e/ou no RT-PCR ou RT-qPCR deverão ser mantidas pelo laboratório e armazenadas à -80°C ou temperaturas inferiores por tempo indeterminado. As alíquotas armazenadas, assim como suas quantidades, devem ser registradas em formulário próprio para fins de inventário.

Alíquotas negativas podem ser descartadas após a conclusão das análises.

3.7. Índice de patogenicidade intravenosa (IVPI)

3.7.1. Materiais

a) Luvas para procedimentos;

b) Seringas descartáveis de 1 mL, com precisão de 0,1 mL com agulhas de 27 G ½” ou similares;

c) Pipetas de 5 mL;

d) Frascos de vidro de 5 mL com tampas perfuráveis;

e) Algodão hidrófilo;

f) Gaze;

g) Papel absorvente;

h) Cubas autoclaváveis.

3.7.2. Equipamentos e instrumentos

a) Cabine de segurança biológica classe II A2;

b) Isolador para aves;

- c) Estufa;
- d) Autoclave.

3.7.3. Insumos

- a) Aves *Gallus gallus* SPF de 6 semanas de idade;
- b) Placas de ágar sangue ou ágar BHI;
- c) Líquido alantoide infectado (antígeno), com título em HA $\geq 2^4$ (16);
- d) Anestésicos (cloridrato de quetamina e de xilasina);
- e) Desinfetante hospitalar a base de monopersulfato de potássio concentrado, hipoclorito de sódio 2-2,5% ou outro produto com ação virucida.

3.7.4. Soluções

- a) Solução de PBS pH $7.2 \pm 0,2$ estéril ou solução salina isotônica;
- b) Solução de álcool 70° INPM.

3.7.5. Realização do ensaio

- a) Diluir o líquido alantoide a 1:10 em solução de PBS pH $7.2 \pm 0,2$, ou solução salina isotônica. Por exemplo: 0,5 em 4,5 mL de PBS;
- b) Inocular por via intravenosa, no interior do isolador, 10 aves de 6 semanas de idade com 0,1 mL do líquido alantoide diluído;
- c) Utilizar mais 4 aves como controle do teste, sendo que duas serão inoculadas por via intravenosa com 0,1 mL de PBS e as outras duas não serão inoculadas;
- d) Semear o inóculo utilizado em caldo BHI e/ou placa de ágar sangue ou ágar BHI e incubar a 37°C por 48 horas (ágar sangue) ou 24 horas (BHI);
- e) Realizar leituras diárias das aves, por um período de 10 dias, registrando-se o número de aves saudáveis, doentes, paralíticas e mortas em formulário próprio;
- f) Caso seja verificada contaminação do inóculo no decorrer do período de teste, o mesmo será invalidado. Filtrar e/ou tratar o antígeno (material POSITIVO para influenza A) com antibióticos e realizar nova inoculação em aves.

3.7.6. Critérios de aceitação do ensaio

- a) O teste será válido se:
 - I. As aves inoculadas com PBS se mantiverem saudáveis;
 - II. As aves não inoculadas se mantiverem saudáveis;
 - III. Não houver crescimento microbiano no caldo ou placa utilizados para o controle de esterilidade do inóculo.

3.7.7. Interpretação dos resultados

- a) Somar, ao final do teste, o número de aves saudáveis, doentes, paralíticas e mortas e multiplicar pela seguinte pontuação:
 - I. 0 = aves saudáveis;
 - II. 1 = aves doentes;
 - III. 2 = aves paralíticas;
 - IV. 3 = aves mortas.

b) A seguir, somar todos os pontos e dividir por 100 (pois são 100 observações: 10 aves observadas por 10 dias) para obtenção do IVPI. Serão considerados de alta patogenicidade aqueles isolados de vírus da influenza aviária com IVPI $\geq 1,2$. Isolados com IVPI $< 1,2$ serão considerados como de baixa patogenicidade.

3.7.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “vírus da influenza aviária de alta patogenicidade” ou “vírus da influenza aviária de baixa patogenicidade”;

b) Indicar o valor do IVPI nos resultados.

3.7.9. Descarte das amostras e resíduos

a) Após a finalização do teste, as aves sobreviventes devem ser eutanasiadas dentro das unidades isoladoras, mediante anestesia prévia;

b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido aos processos de desinfecção e autoclavação apropriados. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.7.10. Retenção de Itens de ensaio

Não se aplica.

3.8. Extração de ácidos nucleicos para ensaios moleculares

3.8.1. Materiais

a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;

b) Micropipetas com volumes variados e ponteiros com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses, para volumes variados;

c) Gaze ou papel toalha.

3.8.2. Equipamentos e instrumentos

a) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;

b) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional);

c) Vórtex;

d) Ultrafreezer;

e) Freezer;

f) Geladeira;

g) Autoclave.

3.8.3. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Controle POSITIVO para Influenza Aviária;
- c) Kit para extração de RNA;
- d) Controle interno de extração.

3.8.4. Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;
- c) Solução de hipoclorito de sódio 0,5%.

3.8.5. Realização do ensaio

3.8.5.1. Extração de ácidos nucleicos

- a) Realizar a extração de ácidos nucleicos das amostras, de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Adicionar a cada procedimento de extração: controle NEGATIVO de extração (meio de cultura MEM ou BHI contendo ou não suabes de aves SPF) e controle interno de extração;
- c) O laboratório pode optar pelo uso de outro método de extração que não use kit, desde que apresente verificação de desempenho comprovada pelo próprio laboratório.

3.8.6. Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.8.7;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) Após este período, todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavagem apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.8.7. Retenção de itens de ensaio

- a) Produtos de Biologia Molecular “POSITIVOS”
 - I. Amostras positivas ao RT-qPCR para detecção de influenza A deverão ser encaminhadas ao LFDA-SP para confirmação dos resultados;
 - II. Amostras negativas poderão ser descartadas 30 dias após a emissão do Relatório de Ensaio.

3.9. Técnica de RT-qPCR para detecção de influenza A

3.9.1. Disposições gerais

a) O laboratório pode optar por realizar a técnica de PCR em tempo real com um kit comercial ou protocolo *in house*. Ambos necessitam de comprovação de desempenho.

3.9.2. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.9.3. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- b) Geladeira;
- c) Freezer;
- d) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- e) Termociclador para PCR em tempo real;
- f) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- g) Agitador de microtubos;
- h) Microcomputador;
- i) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.9.4. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Controle POSITIVO para influenza A;
- c) Kit comercial para detecção de influenza A por RT-qPCR em um único passo; ou
- d) Iniciadores (*primers*) e sondas específicos para a detecção do vírus influenza A (sugestão de iniciadores apresentada no Quadro 1).

QUADRO 1: Sugestão de oligonucleotídeos para detecção do vírus influenza A por PCR em tempo real.

Alvo	Primer forward	Primer reverse	Sondas	Referência
Gene M	M+25 5' AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG 3'	M-124 5' TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG 3'	M+64 5' FAM - TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA - BHQ1 3'	Spackman, 2002

3.9.5. Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;
- c) Solução de hipoclorito de sódio 0,5%.

3.9.6. Realização do ensaio

3.9.6.1. Reação de amplificação de ácido nucleico por RT-qPCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de RNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.9.6.2. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado, em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;
- c) A adição de RNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);
- d) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle POSITIVO para influenza A;
 - II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III. Branco (água livre de nucleases);
 - IV. Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.9.6.3. Reação de RT-qPCR

- a) Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- b) Iniciar e entrar com os dados no *software* do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- c) Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- d) Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.9.7. Critérios de aceitação do ensaio

- a) Para a validação do ensaio, o controle POSITIVO do kit e o controle interno devem apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um Ct satisfatório (conforme especificações do fabricante);
- b) O controle NEGATIVO deve ter Ct indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle NEGATIVO deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.9.8. Interpretação dos resultados

- a) Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle POSITIVO, controle NEGATIVO, controle da extração, *background* de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;
- b) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada.

3.9.9. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como POSITIVO ou “NEGATIVO”, ou de acordo com o preconizado pelo fabricante;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

NOTA: Os RT-qPCR subtipo-específicos serão realizados exclusivamente no laboratório de referência de acordo com os protocolos vigentes.

3.9.10. Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.9.11;
- b) Todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido aos processos de desinfecção e autoclavação apropriados. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- c) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.9.11. Retenção de Itens de ensaio

- a) Produtos de Biologia Molecular “POSITIVOS”:
- I. Amostras positivas ao RT-qPCR para detecção de influenza A deverão ser encaminhadas ao LFDA-SP para confirmação dos resultados;
 - II. Amostras negativas poderão ser descartadas 30 dias após a emissão do Relatório de Ensaio.

Referências Bibliográficas

ANDREATTI, R. L; BERCHIERI, A; SILVA, E. N; BACK, A; FÁBIO, J; ZUANAZE, M. A. F. *Doença das Aves*. 2020. 3ª. Ed. FACTA. ISBN 978-65-991079-0-0.

Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). CHAPTER 3.3.4. Version (NB: version adopted in May 2021). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 14 set. 2021.

BRASIL Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013. “Baixa as Diretrizes da Prática de Eutanasiado Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA”. Publicado no D. O. U. em: 26/09/2013.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. “Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências”. Publicado no D. O. U. em: 09/10/2008.

Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução (CFMV). *Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados*. Brasília, 2012. 1v, 62p.

MASSONE, F. *Anestesiologia Veterinária – Farmacologia e Técnicas*. Guanabara Koogan, 7ª ed. 400p. 2019.

SPACKMAN E, SENNE DA, MYERS TJ, BULAGA LL, GARBER LP, PERDUE ML, LOHMAN K, DAUM LT, SUAREZ DL. 2002. “Development of a real-time reverse transcriptase PCR Assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes”. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (9): 3256-3260.

CAPÍTULO 2.1.4

DOENÇA DE NEWCASTLE - DNC

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da doença de Newcastle:

1.1. Detecção da Resposta Imune

a) Soro sanguíneo.

1.2. Identificação do Agente

a) Aves Vivas

I. Suabe de Cloaca;

II. Suabe de Traqueia;

III. Suabe de fundo de caixa;

IV. Fezes frescas.

b) Aves Mortas*, sacrificadas e ovos com embriões mortos

I. Pulmão;

II. Traqueia;

III. Cérebro;

IV. Cerebelo;

V. Intestino delgado com pâncreas;

VI. Ceco com tonsilas cecais.

*Somente serão recebidas Aves mortas decorrentes de colheitas realizadas pelo VIGIAGRO

c) Líquido Alantoide

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento;

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos:

a) Quando essa informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente;

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

3.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

3.2.1. Materiais

- a)** Luvas para procedimentos;
- b)** Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c)** Provetas graduadas;
- d)** Béqueres;
- e)** Erlenmeyers;
- f)** Ponteiras descartáveis;
- g)** Reservatório para soluções (cubetas);
- h)** Reservatórios para soluções (cubetas);
- i)** Papel absorvente;
- j)** Selador ou tampa para placas de ELISA;
- k)** Caneta para identificação de vidraria;
- l)** Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavagem.

3.2.2. Equipamentos e instrumentos

- a)** Geladeira;
- b)** Freezer -20°C;
- c)** Estufa;
- d)** Termômetros;

- e) Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Leitora de ELISA;
- h) Cronômetros;
- i) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- j) Agitador de microplacas (opcional);
- k) Lavadora de microplacas (opcional);
- l) Autoclave.

3.2.3. Insumos

- a) Kits de ELISA para a detecção de anticorpos para o vírus da doença de Newcastle.

3.2.4. Soluções

- a) No preparo das soluções devem ser utilizados somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados;
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;
- d) Diluir as soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5. Realização do ensaio

- a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;
- b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;
- c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;
- d) Utilizar ponteiras distintas para cada controle e amostra de soro;
- e) Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;
- f) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;
- g) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;
- h) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2.6. Critérios de aceitação do ensaio

- a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles e os demais parâmetros calculados a partir delas estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos resultados

- a) De acordo com as DOs obtidas, consideram-se as amostras como POSITIVAS ou NEGATIVAS ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).
- b) Amostras com DO entre os dois pontos de corte estabelecidos serão consideradas inconclusivas e deverão ser novamente ensaiadas.

3.2.8. Emissão de resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como POSITIVO ou NEGATIVO ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas dentre o total de analisadas.

3.2.9. Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.2.10;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido aos processos de desinfecção e autoclavação apropriados. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

- a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 30 dias após a emissão do Relatório de Ensaio, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.3. Inibição da hemaglutinação para detecção de anticorpos para o vírus da doença de Newcastle

3.3.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Ponteiras descartáveis;
- c) Pipetas de 5, 10 e 20 mL;
- d) Reservatórios para pipetagem de líquidos;
- e) Ponteiras descartáveis;
- f) Microtubos;
- g) Microplacas com fundo em “V” ou em “U”;
- h) Papel absorvente;
- i) Filme adesivo ou tampa para microplacas;
- j) Canetas para escrita em plástico/vidro.

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Refrigerador;
- b) Freezer -20 °C;
- c) Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- d) Pipetador automático ou bulbo de segurança;
- e) Autoclave;
- f) Balança analítica ou semi-analítica;
- g) Microcentrífuga;
- h) Autoclave.

3.3.3. Insumos

- a) Soro de referência para APMV-1;
- b) Antígeno inativado para APMV-1;
- c) Soro NEGATIVO para APMV-1.

3.3.4. Soluções

- a) Suspensão de hemácias de *Gallus gallus* (preferencialmente machos) SPF ou SAN a 1%;
- b) Suspensão de hemácias de *Gallus gallus* (preferencialmente machos) SPF ou SAN a 10%;
- c) Solução de PBS, pH 7,2 ± 0,2 ou solução salina 0,85% a 0,90%;
- d) Solução de PBS com 0,4% BSA-AS;

3.3.5. Realização dos ensaios

3.3.5.1. Preparo do antígeno – teste da hemaglutinação

- a) Para realização do ensaio de HI, é necessário que o antígeno padrão esteja com o título de quatro unidades hemaglutinantes (UHA) em 25 µL;
- b) Para isso, o antígeno deve ser titulado da seguinte forma:
 - I. Adicione 25 µL de PBS ou solução salina a todos os poços de uma microplaca de fundo V;
 - II. Adicione 25 µL do antígeno no primeiro poço e realize diluições seriadas na base 2, transferindo-se 25 µl do poço inicial ao segundo orifício e assim, sucessivamente, até o último orifício da linha, descartando-se os 25 µl finais;
 - III. Adicione 25 µL de suspensão de hemácias a 1%;
 - IV. Agite e placa dando leves batidinhas, cobrir a microplaca e incubar por 30 minutos a 22°C ± 2°C ou por 1 hora a 4°C;
 - V. Ao final do período de incubação, realizar a leitura da prova para determinação do título do antígeno em unidades hemaglutinantes (UHA). O título deve ser lido como a maior diluição em que houve hemaglutinação completa;
 - VI. A partir dos resultados obtidos na etapa anterior, o antígeno deve ser diluído em PBS com 0,4% BSA-AS de forma a se obter uma concentração de 4 UHA/25 µl. Após a diluição, o antígeno deve ser novamente titulado a fim de se verificar se a diluição realizada realmente resulta em 4 UHA/25 µl.

3.3.5.2. Preparo do soro de referência

- a) Etapa facultativa: o antissoro pode ser diluído a fim de otimizar o uso deste reagente;
- b) Diluir o soro a um título entre 1:16 e 1:64 com solução de PBS (solução salina fosfatada tamponada) pH 7.2 ± 0.2 ou solução salina 0,85%;
- c) Determinar o título pelo ensaio de HI (inibição da hemaglutinação) com 4 UHA do antígeno homólogo.

3.3.5.3. Preparo das amostras de soro

- a) Verificar se as amostras de soro não apresentam hemaglutinação inespecífica, e para isso, adicionar a um poço de uma microplaca de fundo V ou U 25 μ L de PBS ou solução salina, 25 μ L da amostra, e 25 μ L da suspensão de hemácia 1%;
- b) Agitar a placa levemente, cobrir a microplaca e incubar por 30 minutos a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ou por 1 hora a 4°C ;
- c) Realizar a leitura da placa inclinando-a. Se houver a presença de “lágrima” escorrendo, indica que não houve autoaglutinação;
- d) Realizar o tratamento prévio das amostras autoaglutinantes conforme protocolo a seguir:
 - I. Adicionar 100 μ L de PBS pH 7.2 ± 0.2 ou solução salina 0,85% a um microtubo ou a um orifício de uma microplaca;
 - II. Adicionar 50 μ L da amostra de soro a ser tratada;
 - III. Adicionar 50 μ L de uma suspensão de hemácias a 10%;
 - IV. Homogeneizar a cada 10 minutos, durante 30 minutos, a fim de manter as hemácias em suspensão;
 - V. Centrifugar por 4 minutos a 4000 RPM;
- e) Utilizar o sobrenadante para realização da técnica de HI;
- f) Considerar que a diluição inicial da amostra é 1:4.

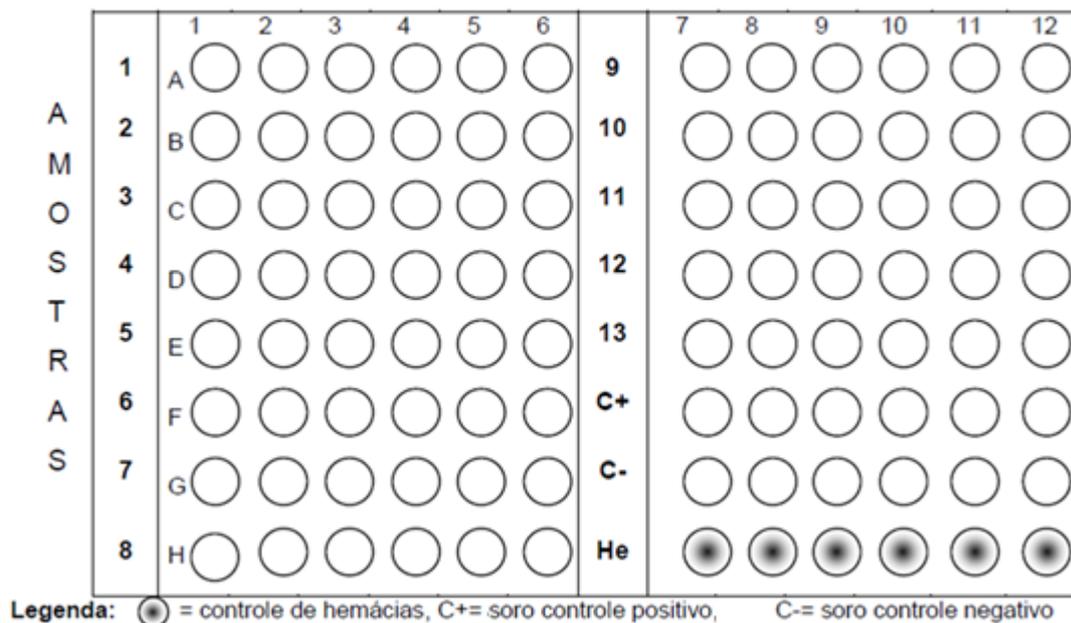
3.3.5.4. Técnica da inibição da hemaglutinação

- a) Dispensar 25 μ L de PBS ou solução salina em cada orifício da microplaca a ser utilizado, com exceção dos orifícios de controle da hemácia que devem conter 50 μ L;
- b) Colocar, com auxílio de micropipeta monocal, 25 μ L de cada amostra de soro a ser testada no primeiro orifício de cada linha da placa (FIGURA 1);
- c) Realizar diluições seriadas na base 2 de cada amostra com micropipeta multicanal, sempre homogeneizando várias vezes com a própria pipeta antes de passar para o próximo poço;
- d) Diluir até o sexto poço (p.e. até A6) para amostras de soro sem tratamento prévio ou diluição a 1:4; ou até o terceiro poço (p.e. até A3) para amostras previamente diluídas (1:4) (FIGURA 2);
- e) Dispensar 25 μ L de soro referência em uma das linhas preenchidas com PBS ou solução salina, e realizar as diluições seriadas na base 2 da mesma forma que foi feito para as amostras. Para amostras pré-diluídas, realizar a mesma diluição para o soro referência;
- f) Dispensar 25 μ L de soro controle NEGATIVO em uma das linhas preenchidas com PBS ou solução salina, realizar as diluições seriadas na base 2 da mesma forma que foi feito para as amostras;
- g) Reservar os orifícios da última linha para o controle das hemácias;
- h) Adicionar 25 μ L do antígeno com quatro UHA em cada orifício da microplaca (exceto nos orifícios do controle das hemácias) e homogeneizar suavemente com leve batidinhas;
- i) Cobrir a microplaca com adesivo ou tampa para evitar evaporação e incubar por 30 minutos a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ou por 1 hora a 4°C ;

- j) Adicionar, em cada orifício, 25 µL de suspensão de hemácias de galinha a 1% e homogeneizar suavemente com leves batidinhas;
- k) Incubar a microplaca por 30 minutos a 22°C ± 2°C ou por 1 hora a 4°C;
- l) Realizar a leitura da placa inclinando-a e observando a presença ou ausência de “lágrima” escorrendo.

FIGURA 1. Exemplo de marcação das placas de amostras não diluídas para realização do teste de HI para detecção de anticorpos para o vírus da doença de Newcastle

Para amostras não diluídas:



Fonte: LFDA-SP

FIGURA 2. Exemplo de marcação das placas para amostras e soros referência pré-diluídos (1:4) para realização do teste de HI para detecção de anticorpos para o vírus da doença de Newcastle

Para amostras e soros pré-diluídos (1:4):

	1	2	3	9	4	5	6	17	7	8	9	25	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
M	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
O	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
S	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
T	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
R	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	C+	○	○
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	C-	○	○
S	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	He	●	●

Legenda: ● = controle de hemácias, C+= soro controle positivo, C-= soro controle negativo

Fonte: LFDA-SP

3.3.6. Critérios de aceitação do ensaio

- a) O teste será válido se:
 - I. Os controles das amostras de soro não apresentarem hemaglutinação inespecífica;
 - II. O controle de hemácias não apresentar aglutinação (apresentar "lágrima" escorrendo);
 - III. O antígeno utilizado possuir quatro UHA (determinado pelo ensaio de hemaglutinação);
 - IV. O controle NEGATIVO apresentar título inferior a 2^2 (1:4);
 - V. O controle POSITIVO apresentar título $\geq 1:16$;
- b) Anotar os resultados em formulário próprio;
- c) Para as amostras pré-diluídas (1:4), as diluições na base 2 correspondem à diluição 1:8, 1:16 e 1:32.

3.3.7. Interpretação dos resultados

- a) Os poços com inibição completa devem formar uma "lágrima" semelhante àquela observada nos poços de controle POSITIVO. Os poços que apresentam "lágrima" com escoamento retardado em comparação com o controle POSITIVO devem ser interpretados como incompleto;
- b) O título de HI é a maior diluição do soro capaz de inibir completamente a hemaglutinação das 4 UHA do antígeno;
- c) São consideradas **POSITIVAS** aquelas amostras que apresentarem título $\geq 2^4$ (1:16);
- d) São consideradas **NEGATIVAS** as amostras que apresentarem título $< 2^4$ (1:16).

3.3.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado "Relatório de Ensaio" e expresso como POSITIVO ou "NEGATIVO";

b) Expressar a quantidade de amostras positivas ou negativas dentre o total de amostras analisadas.

3.3.9. Descarte das amostras e resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.3.10;

b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;

c) Todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.3.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 30 dias após a emissão do Relatório de Ensaio, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.4. Isolamento viral

3.4.1. Materiais

a) Luvas de procedimento;

b) Algodão hidrófilo embebido em álcool 70° INPM;

c) Micropipetas mono e multicanal de capacidade mínima de 25 µL;

d) Ponteiras para micropipeta capacidade mínima de 25 µL;

e) Seringas descartáveis de 1 mL, com precisão de 0,1 mL com agulhas 27 G ½” ou similares;

f) Filtro descartável de 22 µm de porosidade para seringas;

g) Microplacas em poliestireno de 96 orifícios com fundo em “V” ou em “U”;

h) Tubos de centrifuga com tampa rosqueável;

i) Tesouras e pinças dente-de-rato estéreis;

j) Frascos de plástico com tampas perfuráveis;

k) Gaze;

l) Toalhas absorventes descartáveis;

m) Filme adesivo para microplacas;

n) Sacos de autoclave;

o) Cuba de plástico autoclavável;

p) Caneta para escrita em plástico/vidro;

q) Etiquetas autoadesivas.

3.4.2. Equipamentos e instrumentos

a) Cabine de segurança biológica, classe II A2;

b) Autoclave de fronteira;

c) Estufa;

- d) Geladeira;
- e) Freezer;
- f) Ultrafreezer;
- g) Triturador de tecidos com sondas;
- h) Furador de ovos;
- i) Ovoscópio;
- j) Incubadora de ovos;
- k) Centrífuga refrigerada;
- l) Agitador tipo vórtex;
- m) Autoclave.

3.4.3. Insumos

- a) Ovos embrionados SPF com 9 a 11 dias de idade;
- b) Caldo BHI ou MEM com solução de antibióticos 10X;
- c) Caldo BHI;
- d) Placas de ágar sangue ou ágar BHI.

3.4.4. Soluções

- a) Suspensão de hemácias de *Gallus gallus* (preferencialmente machos) SPF ou SAN a 1%;
- b) Desinfetante hospitalar a base de monopersulfato de potássio concentrado, hipoclorito de sódio 2-2,5% ou outro produto com ação virucida;
- c) Solução de álcool 70° INPM.

3.4.5. Realização do ensaio

3.4.5.1. Processamento dos itens de ensaio

- a) As amostras colhidas de aves mortas podem ser processadas separadamente ou em “pools” de um mesmo sistema orgânico (respiratório, digestório e nervoso);
- b) As amostras devem chegar ao laboratório acondicionadas em um dos meios de transporte preconizados pelo MAPA (caldo BHI pH 7,0 - 7,4 contendo antibióticos; meio MEM acrescido de antibióticos e soro fetal bovino/soro bovino ou soroalbumina bovina; caldo TPB acrescido de antibióticos ou meio de transporte universal para vírus);
- c) Quando o processamento não for imediatamente possível, estocar as amostras entre 2°C e 8°C por até 4 dias. Para estocagem prolongada, as amostras devem ser mantidas à temperatura de -70°C a -80°C.

3.4.5.1.1. Processamento de suabes traqueais, cloacais, de fundo de gaiola e fezes

- a) Os suabes colhidos e acondicionados individualmente podem ser agrupados em “pools” de cinco a sete por tipo de suabe e espécie;
- b) Caso não haja volume suficiente de material para inoculação, pode ser preparado um “pool” com suabes de traqueia e cloaca;
- c) Os frascos contendo fezes em meio de transporte devem ser centrifugados a 1000 g por 10 minutos e o sobrenadante recolhido em frasco contendo 1,5 ml de caldo BHI contendo antibióticos;
- d) Caso o material não seja utilizado no mesmo dia, os frascos deverão ser armazenados entre 2°C e 8°C por até 24 horas. Para estocagem prolongada, as amostras devem ser mantidas à temperatura de -70°C a -80°C;

e) Após o processamento destas amostras, será preparado o material para extração de ácidos nucleicos totais para realização de RT-PCR ou RT-qPCR.

3.4.5.1.2. Processamento de amostras provenientes de órgãos

a) Picotar os tecidos finamente triturá-los e preparar suspensões em caldo BHI ou meio MEM contendo solução de antibióticos 10X em tubos de centrifuga;

b) Centrifugar as suspensões a 1000 g por 10 minutos, recolher o sobrenadante e armazená-lo em um frasco devidamente identificado de forma a manter a rastreabilidade da amostra;

c) Aguardar um período \geq quatro horas para a inoculação (para a ação da solução de antibióticos). Caso não seja utilizado no mesmo dia, conservá-lo entre 2°C e 8°C por até 24 horas. Para estocagem prolongada, as amostras devem ser mantidas à temperatura de -70°C a -80°C;

d) Após o processamento destas amostras, o material será preparado para extração de ácidos nucleicos totais para realização de RT-PCR ou RT-qPCR.

3.4.5.2. Isolamento viral

a) Antes da inoculação realizar ovoscopia nos ovos embrionados que serão inoculados a fim de se detectar embriões mortos ou fracos para que sejam descartados;

b) Devem ser feitos os seguintes controles de prova: controle do meio com antibióticos utilizado no preparo dos inóculos, controle dos ovos SPF utilizados para inoculação e controle de esterilidade dos inóculos;

c) Em cabine de segurança biológica, com auxílio de uma seringa estéril descartável de 1 ou 3 mL com agulha 27 G ½" ou similar, inocular via cavidade alantoide 0,3 mL da amostra em, no mínimo, 4 ovos embrionados SPF com idade entre 9 e 11 dias devidamente identificados de forma a manter a rastreabilidade das amostras;

d) Selar o orifício de inoculação, aguardar a secagem do selante e borrifar álcool 70° INPM antes da retirada dos ovos inoculados da cabine de segurança biológica;

e) Incubar os ovos inoculados a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 4 a 7 dias, realizando-se ovoscopia diariamente. Descartar ovos mortos nas primeiras 24 horas. Registrar o número de ovos mortos de cada um dos inóculos em formulários próprios e armazená-los à temperatura de 2 a 8°C até o término do teste, identificando-os com a data da ovoscopia;

f) Sacrificar os ovos viáveis no final do teste, submetendo-os à temperatura de refrigeração *overnight* ou 1,5 h em ultrafreezer;

g) Coletar 1 a 2 mL do líquido alantoide dos ovos de cada inóculo em tubo de centrifugação, centrifugando-se a 1000 g por 10 minutos;

h) Verificar a atividade hemaglutinante do "pool" do líquido alantoide por meio da técnica de hemaglutinação (HA) em microplaca;

i) Verter aproximadamente 5 mL do "pool" de cada material que apresentar reação negativa na hemaglutinação em frasco estéril contendo 1,5 mL de caldo BHI ou MEM contendo solução de antibióticos 10X e identificar como 1ª passagem;

j) Inocular o líquido alantoide referente à 1ª passagem, no mínimo, 04 ovos embrionados SPF para realização da segunda passagem;

k) Ao final da 2ª passagem, se os ovos ainda apresentarem-se NEGATIVOS na técnica de HA, preparar um "pool" de cada material e encaminhá-lo para realização de RT-PCR ou RT-qPCR a fim de confirmar a negatividade do mesmo;

l) Caso o material seja POSITIVO no RT-PCR ou RT-qPCR, nova passagem pode ser realizada a fim de aumentar o título do vírus;

- m)** Se o “pool” do material apresentar reação positiva no teste de HA em qualquer uma das passagens, o líquido alantoide dos ovos deve ser coletado, centrifugado à 1000 g por 10 minutos e dividido em duas alíquotas, uma com e outra sem caldo BHI ou MEM contendo solução de antibióticos 10X;
- n)** Utilizar a alíquota sem antibióticos nas provas de identificação viral (HI) e caracterização viral (ICPI).

3.4.6. Critérios de aceitação do Ensaio

- a)** O teste será válido se:
- I.** Os ovos destinados ao controle do meio não apresentarem mortalidade e atividade hemaglutinante;
 - II.** Os ovos SPF não inoculados, destinados ao controle, não apresentarem mortalidade e atividade hemaglutinante;
 - III.** O controle de esterilidade dos inóculos for NEGATIVO.

3.4.7. Interpretação dos resultados

- a)** O material será considerado POSITIVO no isolamento viral quando houver detecção de atividade hemaglutinante no líquido alantoide dos ovos inoculados;
- b)** O material será considerado NEGATIVO quando, após duas passagens consecutivas em ovos embrionados SPF, não houver detecção de atividade hemaglutinante e detecção do RNA viral por RT-PCR ou RT-qPCR.

3.4.8. Emissão dos resultados

- a)** Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como POSITIVO ou “NEGATIVO”;
- b)** Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.4.9. Descarte das amostras e resíduos

- a)** Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.4.10;
- b)** Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c)** Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- d)** Após este período, todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- e)** O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.4.10. Retenção de itens de ensaio

a) Líquido alantoide

Todas as alíquotas (passagens) das amostras que resultarem positivas no isolamento viral e/ou no RT-PCR ou RT-qPCR deverão ser mantidas pelo laboratório e armazenadas à -80°C ou temperaturas inferiores por tempo indeterminado. As alíquotas armazenadas, assim como suas quantidades, devem ser registradas em formulário próprio para fins de inventário.

3.5. Inibição da hemaglutinação para identificação viral (HI)

3.5.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Algodão hidrófilo;
- c) Ponteiras descartáveis;
- d) Pipetas de 5, 10 e 20 mL;
- e) Microplacas em poliestireno de 96 orifícios com fundo em “V” ou em “U”;
- f) Tubos de centrifuga com tampa rosqueável;
- g) Reservatórios para pipetagem de líquidos;
- h) Papel absorvente;
- i) Cuba de plástico autoclavável
- j) Filme adesivo para microplacas;
- k) Caneta para escrita em plástico/vidro.

3.5.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica, classe II A2;
- b) Refrigerador;
- c) Micropipetas monocal e multicanal de volumes reguláveis;
- d) Pipetador automático ou bulbo de segurança;
- e) Agitador tipo vórtex;
- f) Autoclave.

3.5.3. Insumos

- a) Líquido alantoide coletado dos ovos referentes ao material com atividade hemaglutinante verificado anteriormente;
- b) Soros controles de referência para os oito APMVs hemaglutinantes (APMV-1, APMV-2, APMV-3, APMV-4, APMV-6, APMV-7, APMV-8 e APMV-9);
- c) Anticorpos monoclonais para diferenciação de cepas de APMV-1 (opcional);
- d) Antígenos inativados de referência para os oito APMVs hemaglutinantes (APMV-1, APMV-2, APMV-3, APMV-4, APMV-6, APMV-7, APMV-8 e APMV-9).

3.5.4. Soluções

- a) Solução de hemácias de *Gallus gallus* (preferencialmente machos) SPF ou SAN a 1%;
- b) Solução de PBS com 0,4% BSA-AS;
- c) Solução de PBS pH 7,2 ± 0,2 ou solução salina 0,85% a 0,90%;
- d) Solução de álcool 70° INPM;

e) Desinfetante hospitalar a base de monopersulfato de potássio concentrado, hipoclorito de sódio 2-2,5% ou outro produto com ação virucida.

3.5.5. Realização do ensaio

3.5.5.1. Determinação do título do antígeno em unidades hemaglutinantes (UHA)

a) Realizar a titulação do líquido alantoide coletado dos ovos referentes ao material com atividade hemaglutinante;

b) Para realização da prova de HI para identificação viral, é necessário que o antígeno (líquido alantoide) esteja com quatro unidades hemaglutinantes (UHA) em 25 µL;

c) Para obtenção dessas quatro UHA, diluir o antígeno em solução de PBS com 0,4% BSA-AS, conforme o exemplo a seguir:

i) Título no HA = 2^8 (256 UHA), sendo que o título é a maior diluição do antígeno capaz de produzir aglutinação completa (“*endpoint*”) e equivale a uma UHA. Portanto, encontraremos quatro UHA dividindo o valor do “*endpoint*” por quatro. Exemplo: $256 \div 4 = 64$;

d) De acordo com o exemplo acima, diluir o antígeno a 1:64 (1 mL de antígeno para 63 mL de Solução de PBS com 0,4% BSA-AS, ou dividir esta proporção por 10, utilizando-se 100 µL de antígeno para 6,3 mL de PBS com 0,4% BSA-AS) para se obter as quatro UHA;

e) Fazer outras duas diluições do antígeno para se ter uma margem de segurança maior. Nesse caso, preparar duas novas diluições contendo, respectivamente, 50% a mais e 50% a menos do volume inicial de antígeno utilizado no preparo da primeira diluição;

f) Após o preparo das diluições, realizar uma nova titulação (retrotitulação) a fim de determinar em qual das três diluições encontram-se as quatro UHA. Essa é, então, a diluição a ser empregada como antígeno na prova de HI. Registrar em formulário próprio.

3.5.5.2. Inibição da hemaglutinação para identificação viral (HI)

a) O controle da reação de inibição da hemaglutinação será feito pela utilização de antígenos inativados de referência para os oito APMVs hemaglutinantes (APMV-1, APMV-2, APMV-3, APMV-4, APMV-6, APMV-7, APMV-8 e APMV-9) e seus respectivos antissoros;

b) Dispensar 25 µL de PBS pH 7,2 ± 0,2 ou solução salina 0,85% a 0,90% em cada orifício da microplaca a ser utilizada;

c) Colocar, com auxílio de micropipeta monocanal, 25 µL de cada antissoro de referência no primeiro orifício de cada fileira da placa, reservando-se as colunas 9, 10 e 11 para o controle POSITIVO e a última coluna para o controle das hemácias (FIGURA 3);

d) Realizar diluições seriadas na base 2 com micropipeta multicanal. Para isso:

I. Aspirar 25 µL do primeiro orifício da linha (p.e., orifício A1);

II. Dispensar os 25 µL no segundo orifício da mesma linha (p.e., A2);

III. Homogeneizar três vezes com auxílio da micropipeta;

IV. Aspirar 25 µL e dispensar no próximo orifício da mesma linha (p.e., A3);

e) Repetir os passos “c” e “d” por quatro vezes (p.e. até A8);

f) Dispensar 25 µL de cada antissoro de referência na coluna 9 (p.e. até A9) e realizar a diluição na base 2 até a coluna 11 (p.e. até A11);

g) Dispensar 25 µL de antígeno de referência (com 4 UHA) homólogo para cada antissoro de referência nos orifícios das colunas 9, 10 e 11;

- h)** Adicionar 25 µL do antígeno/vírus com quatro UHA em cada orifício da microplaca até a coluna 8 e homogeneizar suavemente;
- i)** Cobrir a microplaca com adesivo para evitar evaporação e incubar por 30 minutos a 22°C ± 2°C ou por 1 hora a 4°C;
- j)** Adicionar, em cada orifício, 25 µL de suspensão de hemácias de galinha a 1% (completamente suspensa) e homogeneizar suavemente;
- k)** Incubar a microplaca por 30 minutos a 22°C ± 2°C ou por 1 hora a 4°C;
- l)** Realizar a leitura da placa inclinando-a e observando a presença ou ausência de “lágrima” escorrendo e registrar os resultados em formulário próprio.

3.5.6. Critérios de aceitação do ensaio

- a)** O teste será válido se:
 - I.** O vírus a ser identificado possuir, pelo menos, 4 UHA (determinado pelo ensaio de hemaglutinação);
 - II.** O controle de hemácias não apresentar aglutinação (apresentar “lágrima” escorrendo);
 - III.** Os antissoros de referência para cada APMV inibirem a hemaglutinação dos respectivos antígenos.

3.5.7. Interpretação dos resultados

- a)** Os poços com presença de “lágrima” são registrados como “+” (POSITIVO para HI); poços com ausência de “lágrima”, isso é com completa hemaglutinação, são registrados como “-” (NEGATIVO para HI); poços com formação de “lágrima” incompleta são registrados como “I” (HI incompleto);
- b)** Os poços com inibição completa devem formar uma “lágrima” na mesma taxa de velocidade dos poços de controle POSITIVO. Os poços que apresentam “lágrima” com escoamento retardado em comparação com o controle POSITIVO devem ser interpretados como incompleto;
- c)** O título de HI é dado como a maior diluição do soro capaz de causar inibição completa das quatro UHA do vírus em teste. Considerar somente as cavidades que apresentarem botão de hemácias igual ao das cavidades controle, anotando no formulário próprio;
- d)** O material será considerado POSITIVO para vírus de doença de Newcastle quando a sua atividade hemaglutinante for inibida por antissoro específico para APMV-1.

FIGURA 3. Disposição dos antissoros para APMV e do controle de hemácias (HE) na microplaca para realização do teste de HI para identificação viral. As colunas 9, 10 e 11 são dedicadas aos controles “POSITIVOS” de cada APMV.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9 C+	10 C+	11 C+	12
A	APMV-1											HE
B	APMV-2											HE
C	APMV-3											HE
D	APMV-4											HE
E	APMV-6											HE
F	APMV-7											HE
G	APMV-8											HE
H	APMV-9											HE

Fonte: LFDA-SP.

3.5.8. Emissão dos resultados

- Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “POSITIVO para vírus da Doença de Newcastle” ou “POSITIVO para paramyxovírus aviário sorotipo X”;
- Indicar a alíquota que apresentou positividade.

3.5.9. Descarte das amostras e resíduos

- Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.5.10.
- Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- Após este período, todo resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.5.10. Retenção de itens de ensaio

a) Líquido alantoide

Todas as alíquotas (passagens) das amostras que resultarem positivas no isolamento viral e/ou no RT-PCR ou RT-qPCR deverão ser mantidas pelo laboratório e armazenadas à -80°C ou temperaturas inferiores por tempo indeterminado. As alíquotas armazenadas, assim como suas quantidades, devem ser registradas em formulário próprio para fins de inventário.

3.6. Índice de patogenicidade intracerebral (ICPI)

3.6.1. Materiais

- a)** Micropipetas e ponteiros com capacidade mínima de 500 µL;
- b)** Seringas descartáveis de 1 mL, com precisão de 0,1 mL com agulhas 32G;
- c)** Pipetas de 5 mL;
- d)** Cuba de plástico autoclavável;
- e)** Papel absorvente.

3.6.2. Equipamentos e instrumentos

- a)** Cabine de segurança biológica classe II A2;
- b)** Isolador para aves;
- c)** Estufa;
- d)** Autoclave.

3.6.3. Insumos

- a)** Pintos SPF (*Specific Pathogen Free*) de um dia (24 a 40 horas de vida);
- b)** Caldo BHI ou placas de ágar sangue ou ágar BHI;
- c)** Líquido alantoide infectado (antígeno), com título em UHA $\geq 2^4$ (16);
- d)** Anestésicos (cloridrato de quetamina e de xilasina);
- e)** Desinfetante hospitalar a base de monopersulfato de potássio concentrado, hipoclorito de sódio 2-2,5% ou outro produto com ação virucida.

3.6.4. Soluções

- a)** Solução de PBS pH $7,2 \pm 0,2$ ou solução salina isotônica;
- b)** Solução de álcool 70° INPM.

3.6.5. Realização do ensaio

- a)** Diluir o líquido alantoide a 1:10 em solução de PBS pH $7,2 \pm 0,2$, ou solução salina isotônica por exemplo: 0,5 em 4,5 mL de PBS;
- b)** Na cabine de segurança biológica, inocular, por via intracerebral, 10 aves de um dia com 0,05 mL do líquido alantoide diluído, localizando-se a região da fontanela (moleira) utilizando-se agulha descartável de 1mL com agulhas 32G;
- c)** Utilizar mais 4 aves para serem o controle do teste: 2 aves serão inoculadas por via intracerebral somente com 0,05 mL PBS e as outras 2 não serão inoculadas;

- d)** Semear o inóculo utilizado em caldo BHI e/ou placa de ágar sangue ou ágar BHI e incubar a 37°C por 48 horas (ágar sangue) ou 24 horas (BHI);
- e)** Transportar as aves da cabine de segurança biológica até os isoladores em recipientes herméticos;
- f)** Acomodar as aves no interior do isolador;
- g)** Realizar leituras diárias das aves, por um período de 8 dias, registrando-se o número de aves saudáveis, doentes e mortas em formulário próprio;
- h)** Caso seja verificada contaminação do inóculo no decorrer do período de teste, cancelar o teste em andamento, filtrar o antígeno (material POSITIVO para NDV) e realizar nova inoculação em aves.

3.6.6. Critérios de aceitação do ensaio

- a)** O teste será válido se:
 - I.** As aves inoculadas com PBS se mantiverem saudáveis;
 - II.** As aves não inoculadas se mantiverem saudáveis e
 - III.** Não houver crescimento microbiano no caldo ou placa utilizados para o controle de esterilidade do inóculo.

3.6.7. Interpretação dos resultados

- a)** Somar, ao final do teste, o número de aves saudáveis, doentes e mortas e multiplicar pela seguinte pontuação:
 - I.** 0 = pintos saudáveis;
 - II.** 1 = pintos doentes;
 - III.** 2 = pintos mortos.
- b)** A seguir, somar todos os pontos e dividi-los por 80 (pois são 80 observações: 10 aves observadas por 8 dias) a fim de obter o ICPI. São considerados isolados de NDV **patogênicos** (ou virulentos) aqueles que apresentarem $ICPI \geq 0,7$. Os isolados com $ICPI < 0,7$ serão considerados **apatogênicos** (ou avirulentos).

3.6.8. Emissão dos resultados

- a)** Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “vírus da doença de Newcastle patogênico (ou virulento)” ou “apatogênico (não virulento)”;
- b)** Indicar o valor do ICPI nos resultados.

3.6.9. Descarte das amostras e resíduos

- a)** Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- b)** Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- c)** Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em

procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.7. Extração de ácidos nucleicos para ensaios moleculares

3.7.1. Materiais

- a)** Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b)** Micropipetas com volumes variados e ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses, para volumes variados;
- c)** Gaze ou papel toalha.

3.7.2. Equipamentos e instrumentos

- a)** Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- b)** Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional);
- c)** Vórtex;
- d)** Ultrafreezer;
- e)** Freezer;
- f)** Geladeira;
- g)** Autoclave.

3.7.3. Insumos

- a)** Água livre de nucleases;
- b)** Controle POSITIVO para o vírus da doença de Newcastle;
- c)** Kit para extração de RNA;
- d)** Controle interno de extração.

3.7.4. Soluções

- a)** Solução de álcool 70° INPM;
- b)** Solução descontaminante de DNA e DNAses;
- c)** Solução de hipoclorito de sódio 0,5%.

3.7.5. Realização do ensaio

3.7.5.1. Extração de ácidos nucleicos

- a)** Realizar a extração de ácidos nucleicos das amostras, de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b)** Adicionar a cada procedimento de extração: controle NEGATIVO de extração (meio de cultura MEM ou BHI contendo ou não suabes de aves SPF) e controle interno de extração;
- c)** O laboratório pode optar pelo uso de outro método de extração que não use kit, desde que apresente verificação de desempenho comprovada pelo próprio laboratório.

3.8. Técnica de RT-qPCR para detecção do vírus da doença de Newcastle

3.8.1. Disposições gerais

3.8.2. O laboratório pode optar por realizar a técnica de PCR em tempo real com um kit comercial ou protocolo *in house*. Ambos necessitam de comprovação de desempenho.

3.8.3. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.8.4. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- b) Geladeira;
- c) Freezer;
- d) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- e) Termociclador para PCR em tempo real;
- f) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- g) Agitador de microtubos;
- h) Microcomputador;
- i) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.8.5. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Controle POSITIVO para o vírus da doença de Newcastle;
- c) Kit para amplificação por RT-qPCR em um único passo;
- d) Iniciadores (*primers*) e sondas específicos para a detecção do vírus da doença de Newcastle (sugestão de iniciadores apresentada no QUADRO 1).

QUADRO 1. Sugestão de oligonucleotídeos para detecção do vírus da doença de Newcastle por RT-qPCR.

Alvo	Primer forward	Primer reverse	Sondas	Referência
Gene M	M+4100 5'primer 5' AGT GAT GTG CTC GGA CCT TC 3' (20)	M-4220 3'primer 5' CCT GAG GAG AGG CAT TTG CTA 3' (21)	M+4169 probe 5' FAM – TTC TCT AGC AGT GGG ACA GCC TGC – BHQ1 3' (24)	Wise, 2004
Gene F	F+ 4829 5'primer velo-meso 5' GGT GAG TCT ATC CGG ARG ATA CAA G 3' (25)	F- 4939 3'primer 5' AGC TGT TGC AAC CCC AAG 3' (18)	F+ 4894 probe 5' FAM - AAG CGT TTC TGT CTC CTT CCT CCA - BHQ1 3' (24)	Wise, 2004

3.8.6. Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;
- c) Solução de hipoclorito de sódio 0,5%.

3.8.7. Realização do ensaio

3.8.7.1. Reação de amplificação de ácido nucleico por RT-qPCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de RNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou Solução de álcool 70° INPM;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.8.7.2. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado, em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;
- c) A adição de RNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);
- d) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle POSITIVO para o vírus da doença de Newcastle;

- II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
- III. Branco (água livre de nucleases);
- IV. Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.8.7.3. Reação de RT-qPCR

- a) Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- b) Iniciar e entrar com os dados no *software* do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- c) Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- d) Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.8.8. Critérios de aceitação do ensaio

- a) Para a validação do ensaio, o controle POSITIVO do kit e o controle interno devem apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um Ct satisfatório (conforme especificações do fabricante);
- b) O controle NEGATIVO deve ter Ct indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle NEGATIVO deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.8.9. Interpretação dos resultados

- a) Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle POSITIVO, controle NEGATIVO, controle da extração, background de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;
- b) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada.

3.8.10. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como POSITIVO ou “NEGATIVO”, ou de acordo com o preconizado pelo fabricante;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.8.11. Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.8.11;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

d) Após este período, todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

e) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.8.12. Retenção de Itens de Ensaio

a) Produtos de Biologia Molecular “POSITIVOS”

Amostras positivas ao RT-qPCR para detecção do vírus da doença de Newcastle deverão ser encaminhadas ao LFDA-SP para confirmação dos resultados. Amostras negativas poderão ser descartadas 30 dias após a emissão do Relatório de Ensaio, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

Referências Bibliográficas

WISE M.G., SUAREZ D.L., SEAL B.S., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., KING D.J., KAPCZYNSKI D. & SPACKMAN E. (2004). “Development of a real -time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples”. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 329–338

Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus) . CHAPTER 3.3.14. Version (NB: version adopted in May 2021). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 14 set. 2021.

CAPÍTULO 2.1.5

LARINGOTRAQUEÍTE INFECCIOSA DAS AVES - LTI

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da laringotraqueíte infecciosa das aves:

1.1. Detecção da Resposta Imune

- a) Soro sanguíneo

1.2. Identificação do Agente

- a) Pulmão;
- b) Traqueia;
- c) Gânglio trigêmeo;
- d) Sistema nervoso central.

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento;

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos:

- a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente;

- b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

3.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

3.2.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Ponteiras descartáveis;
- g) Descartador de ponteiras;
- h) Reservatórios para soluções (cubetas);
- i) Papel absorvente;
- j) Caneta para identificação de vidraria;
- k) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.2.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Geladeira;
- b) Freezer;
- c) Estufa;
- d) Termômetros;
- e) Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Leitora de ELISA;
- h) Cronômetros;
- i) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- j) Agitador de microplacas (opcional);
- k) Lavadora de microplacas (opcional);
- l) Autoclave.

3.2.3. Insumos

- a) Kits de ELISA de detecção de anticorpos para o vírus da laringotraqueíte infecciosa das aves.

3.2.4. Soluções

- a) No preparo das soluções devem ser utilizados somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados;
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;

d) Diluir a soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5. Realização do ensaio

a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;

b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;

c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;

d) Utilizar ponteiras distintas para cada controle e amostra de soro;

e) Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;

f) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;

g) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;

h) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2.6. Critérios de aceitação do ensaio

a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles e os demais parâmetros calculados a partir delas estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos resultados

a) De acordo com as DOs obtidas, consideram-se as amostras como POSITIVAS ou NEGATIVAS ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

3.2.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “POSITIVO”, “NEGATIVO” ou “SUSPEITO”, ou de acordo com o preconizado pelo fabricante;

b) Expressar a quantidade de amostras de soro positivas ou suspeitas dentre o total de amostras analisadas.

3.2.9. Descarte das amostras e resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.2.10;

b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;

c) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

d) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

e) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soros

Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.3. Técnica da imunodifusão em gel-ágar (IDGA) para pesquisa de anticorpos

3.3.1. Materiais

- a)** Luvas para procedimento;
- b)** Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c)** Provetas graduadas;
- d)** Béqueres;
- e)** Erlenmeyers;
- f)** Balão volumétrico;
- g)** Ponteiras descartáveis;
- h)** Lâmina para microscópio de 25x75mm ou Placa de Petri de 100mm de diâmetro;
- i)** Descartador de ponteiras;
- j)** Caneta para identificação de vidraria;
- k)** Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.3.2. Equipamentos

- a)** Geladeira;
- b)** Freezer;
- c)** Micro-ondas;
- d)** Micropipetas monocanal de volumes reguláveis;
- e)** Pipetador automático ou manual;
- f)** Balança analítica;
- g)** Medidor de pH;
- h)** Centrifuga;
- i)** Cortador Padrão;
- j)** Câmara Úmida;
- k)** Bomba a vácuo (opcional);
- l)** Fonte de luz;
- m)** Autoclave.

3.3.3. Insumos

- a) Antígeno padrão e soro controle POSITIVO;
- b) Controle NEGATIVO.

3.3.4. Soluções

- a) Gel de ágar a 1% em PBS 0,01 M.

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1. Preparo dos reagentes

- a) Preparar o gel a 1% p/v de agarose ou ágar tipo II purificado, 8% p/v NaCl em 0,01 M PBS em pH 7.2, ou conforme orientação do fabricante dos insumos utilizados;
- b) Aquecer o gel no micro-ondas por tempo necessário para fusão completa, evitando o borbulhamento e extravasamento. Não efetuar sucessivas fusões do gel;
- c) Verter o gel fundido e ainda quente em placas de Petri até uma espessura de 2 – 3 mm;
- d) Deixar o gel solidificando em superfície plana, em local livre de poeira e em temperatura ambiente por no máximo 30 minutos, para que a concentração eletrolítica não seja alterada;
- e) Após o gel solidificar, utilizando cortador de padrão hexagonal com as dimensões recomendadas pelo fabricante dos insumos, perfurar os poços de aproximadamente 5 mm de diâmetro no gel. As partes cortadas podem ser removidas da placa utilizando uma cânula conectada a uma bomba de vácuo através de uma mangueira;
- f) Identificar os poços de acordo com a amostra de soro que será adicionada a cada um deles utilizando caneta para vidro ou plástico;
- g) Armazenar as placas de Petri na câmara úmida se não forem utilizadas imediatamente, para evitar o ressecamento do gel;
- h) Não utilizar placa que apresente umidade nos poços da roseta. Desprezê-las ou remover a umidade. Caso apresentem ressecamento devem ser descartadas.

3.3.5.2. Preparo das amostras

- a) Identificar as amostras de soro de aves não-aquáticas a serem analisadas;
- b) Caso seja recomendado pelo fabricante do antígeno, inativar amostras a 56°C.

3.3.5.3. Técnica do IDGA

- a) Preencher o formulário de acompanhamento do ensaio de IDGA;
- b) Distribuir aproximadamente 50 µL de cada amostra de soro em posições alternadas na periferia do hexágono. Nos poços adjacentes, acrescentar soro controle POSITIVO e ao poço central adicionar o antígeno (FIGURA 1);
- c) O volume adicionado deve ser suficiente para preencher o poço, coincidindo a parte superior do menisco com o nível do gel, tendo o cuidado de não derramar. Caso o fabricante do antígeno especifique o volume a ser utilizado, seguir suas recomendações adequando o tamanho do poço ou profundidade do gel ao volume indicado;

- d)** Incubar as placas em câmara úmida à temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Recomenda-se colocar um chumaço de algodão ou papel toalha molhado dentro da câmara para manter o ambiente úmido;
- e)** Após a incubação, proceder a leitura das placas abertas sobre uma fonte de luz contra um fundo escuro.

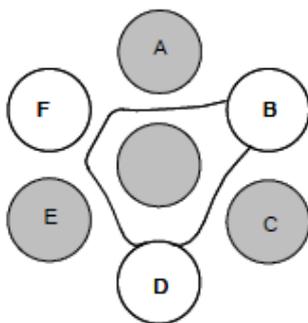
3.3.6. Critérios de aceitação

- a)** As linhas de precipitação que indicam a interação antígeno-anticorpo devem se formar entre os poços em que foram adicionados os soros sabidamente “POSITIVOS” e o antígeno;
- b)** Caso as linhas estejam fracas para serem visualizadas, incubar por mais 24 horas e realizar a leitura novamente.

3.3.7. Interpretação dos resultados

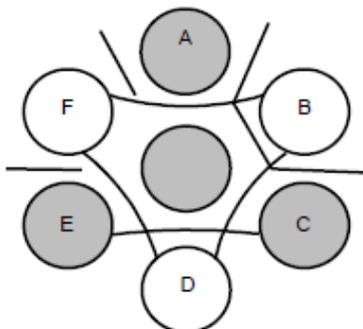
- a)** NEGATIVO: as linhas formadas entre o antígeno e o soro controle POSITIVO prolongam-se até a cavidade onde se encontram a amostra testada, sem encurvar-se (Figura 1 – Posição B);
- b)** POSITIVO: as linhas formadas entre o antígeno e o soro controle POSITIVO se fundem com aquelas formadas com amostra testada, formando uma linha contínua de identidade total (Figura 1 – Posição F);
- c)** Variações de reações positivas: fraco POSITIVO: a linha de precipitação tende a se formar mais próximo à cavidade onde se encontra a amostra testada, visualizando-se somente uma convergência das duas linhas do controle na direção da cavidade onde se encontra a amostra (Figura 1 – Posição D);
- d)** Reações inespecíficas: Caso se formem linhas de precipitação entre o poço da amostra testada e o controle POSITIVO (FIGURA 2 – Posições F e B), essas devem ser desconsideradas, pois são inespecíficas. Caso as linhas de precipitação de um controle POSITIVO e uma amostra testada se cruzem, indo de encontro ao poço adjacente (FIGURA 2 – Posição D), isso também indica reação inespecífica e deve ser desconsiderada.

FIGURA 1. Padrão de disposição de amostras em placa de imunodifusão: Nas posições A, E e C, foi adicionado soro controle POSITIVO. Na posição F, soro teste POSITIVO. Em B, soro teste NEGATIVO. Em D, soro teste fraco POSITIVO.



Fonte: LFDA-SP

FIGURA 2. Placa de imunodifusão com exemplos de linhas de precipitação inespecíficas formadas a partir dos poços contendo soro teste em F, B e D. Elas podem ser desconsideradas desde que as linhas de precipitação específicas formadas a partir dos controles “POSITIVOS” em A, C e E possam ser visualizadas.



Fonte: LFDA-SP

3.3.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como “POSITIVO” ou “NEGATIVO”;
- b) Expressar a quantidade de amostras positivas ou negativas dentre o total de amostras analisadas.

3.3.9. Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.3.10;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- d) Após este período, todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;
- e) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.3.10. Retenção de itens de ensaio

- a) Soros
As amostras de soro poderão ser descartadas após 30 dias da emissão do Relatório de Ensaio, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.4. Isolamento viral

3.4.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Algodão hidrófilo embebido em álcool 70 INPM;
- c) Tubos de centrífuga com tampa rosqueável;
- d) Seringas descartáveis de 1 mL e/ou 3 mL;
- e) Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;
- f) Frascos de plástico com tampas perfuráveis;
- g) Agulhas 27 G ½" ou similares;
- h) Filtro descartável de 22 µm de porosidade para seringas;
- i) Tesouras e pinças dente-de-rato estéreis;
- j) Recipiente plástico contendo solução viricida;
- k) Papel absorvente;
- l) Gaze;
- m) Cuba de plástico autoclavável;
- n) Sacos de autoclave;
- o) Caneta para escrita em plástico/vidro;
- p) Etiquetas autoadesivas.

3.4.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica, classe II;
- b) Autoclave de fronteira;
- c) Estufa;
- d) Geladeira;
- e) Freezer;
- f) Ultrafreezer;
- g) Incubadora de ovos;
- h) Triturador de tecidos com sondas;
- i) Furador de ovos;
- j) Ovoscópio;
- k) Centrífuga refrigerada.

3.4.3. Insumos

- a) Ovos da espécie *Gallus gallus* SPF embrionados com 9 a 12 dias de incubação;
- b) Caldo BHI ou MEM;
- c) Caldo BHI ou MEM com antibióticos com solução de antibióticos 10X.
- d) Placas de Ágar sangue ou Ágar BHI.

3.4.4. Soluções

- a) Desinfetante hospitalar a base de monopersulfato de potássio concentrado ou similar ou hipoclorito de sódio 2-2,5% ou outro produto com ação virucida;
- b) Solução de álcool 70°INPM.

3.4.5. Realização do ensaio

3.4.5.1. Processamento dos itens de ensaio

- a)** Quando o processamento não for imediatamente possível, estocar os itens de ensaio em geladeira por, no máximo, 24 horas. Para períodos maiores de 24h, manter em ultrafreezer;
- b)** Os suabes colhidos e acondicionados individualmente são agrupados em “pools” de cinco a sete;
- c)** Acondicionar em frascos contendo solução de BHI com antibióticos e identificados com o número de registro da amostra, a data do processamento, o número da passagem em ovos (OP), a origem do inóculo (como, por exemplo, T para suabe traqueal) seguida por números sequenciais representativos da quantidade de “pools” (exemplo: T1, T2, T3, etc.);
- d)** No caso de órgãos, picotar finamente, triturá-los e preparar suspensões a 20% (peso/volume) em caldo BHI ou meio MEM contendo antibióticos em tubos de centrifuga;
- e)** Centrifugar a 1000 g por 10 minutos, filtrar o sobrenadante e coletá-lo em frascos contendo solução de BHI com antibióticos;
- f)** Acondicionar o sobrenadante em frascos identificados com o número de registro da amostra, data do processamento, número da passagem em ovos (OP), origem do inóculo;
- g)** Proceder à extração de ácidos nucleicos totais e/ou isolamento viral.

3.4.5.2. Inoculação das amostras e controles

- a)** Preparar 06 ovos SPF de idade entre 9 e 12 dias com câmaras invertidas e identificá-los com o número de registro, identificação da alíquota e com a passagem em que se encontram;
- b)** Inocular, via membrana corioalantoide – MCA, no mínimo, quatro ovos embrionados SPF de câmara invertida, com idade entre 9 e 12 dias, com 0,2 mL do meio utilizado na preparação dos inóculos utilizando-se agulhas 27 G ½” ou similares e seringa de 1 mL e/ou 3 mL;
- c)** Manter, no mínimo, quatro ovos de câmara invertida não inoculados como controle dos ovos SPF que são utilizados nas inoculações;
- d)** Controle de esterilidade dos inóculos: semear 0,2 mL do meio e dos inóculos em ágar sangue, ágar BHI ou em caldo BHI, utilizando-se alças de inoculação estéril descartáveis, ou na ausência das mesmas, a própria agulha usada na inoculação;
- e)** Realizar a leitura das placas com 24 h para ágar sangue e 48 h para ágar BHI;
- f)** Após inoculação, selar o orifício com esmalte;
- d)** Após a secagem do esmalte, borrifar álcool 70° INPM e retirar da cabine de segurança biológica;
- g)** Incubar os ovos inoculados a 37°C ± 2°C por 5 dias, realizando-se ovoscopias diárias;
- h)** Descartar ovos inoculados que apresentarem mortalidade nas primeiras 24 horas;
- i)** Diariamente, registrar o número de ovos mortos em formulário próprio e armazená-los em geladeira até o término do teste;
- j)** Sacrificar os ovos que permaneceram viáveis até o final do teste, submetendo-os à temperatura de refrigeração por 12 horas ou 1h30 em ultrafreezer.

3.4.5.3. Avaliação e colheita da membrana corioalantoide

- a)** Remover a casca dos ovos da região da inoculação com auxílio de uma tesoura e/ou pinça e verificar a existência de lesões na MCA (membrana corioalantoide);

- b)** Coletar as MCAs com auxílio de pinça e/ou tesoura em tubo de centrífuga contendo meio MEM ou caldo BHI com solução de antibióticos e triturar;
- c)** Centrifugar a 1000 g por 10 minutos e coletar o sobrenadante;
- d)** Reinocular em, no mínimo, 04 ovos embrionados SPF para realização da segunda passagem;
- e)** Encaminhar as amostras coletadas da segunda passagem em ovos para realização de PCR ou qPCR.

3.4.6. Critérios de aceitação

a) O teste será válido se:

- I.** Os ovos destinados ao controle do meio não apresentarem mortalidade e atividade hemaglutinante;
- II.** Os ovos SPF não inoculados, destinados ao controle, não apresentarem mortalidade e
- III.** O controle de esterilidade dos inóculos for NEGATIVO.

3.4.7. Interpretação dos resultados

- a)** Controle de esterilidade POSITIVO associado à mortalidade mínima de 50% dos ovos inoculados indicará que o inóculo utilizado na passagem deverá ser filtrado em membrana de 0,22 µm de porosidade e/ou tratado com solução de antibióticos para posterior reinoculação;
- b)** Controle de esterilidade NEGATIVO: prosseguir as passagens;
- c)** Mortalidade acima de 50% nas primeiras 24h pós inoculação, reinocular;
- d)** São consideradas suspeitas de infecção pelo ILTV aquelas membranas que apresentarem lesões tipo “pox” e/ou espessamento; confirmar por PCR ou qPCR;
- e)** Considerar o material POSITIVO quando houver detecção de lesões compatíveis com infecção por ILTV na MCA dos ovos inoculados e resultado de PCR ou qPCR POSITIVO;
- f)** Considerar o material NEGATIVO após duas passagens consecutivas em ovos embrionados SPF sem detecção de lesões na MCA e confirmação da negatividade por PCR.

3.4.8. Emissão dos resultados

- a)** Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como POSITIVO ou “NEGATIVO”;
- b)** Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.4.9. Descarte de Amostras e resíduos

- a)** Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.4.10;
- b)** Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c)** Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- d)** Após este período, todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos

próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

e) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.4.10. Retenção de itens de ensaio

a) Armazenamento de inóculos

As alíquotas positivas devem ser mantidas pelo laboratório e armazenadas a -80°C ou temperaturas inferiores por tempo indeterminado. As alíquotas armazenadas, assim como suas quantidades, devem ser registradas em formulário próprio para fins de inventário. Alíquotas negativas podem ser descartadas após a conclusão das análises.

3.5. Extração de ácidos nucleicos para ensaios moleculares

3.5.1. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Pipetas graduadas;
- c) Micropipetas e ponteiras;
- d) Gaze ou papel toalha.

3.5.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Equipamento para extração automatizada de DNA e
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida.

3.5.3. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Controle POSITIVO para ILTV;
- c) Kit para extração de DNA.

3.5.4. Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;
- c) Solução de hipoclorito de sódio 0,5%.

3.5.5. Realização do ensaio

3.5.5.1. Extração de ácidos nucleicos

- a) Realizar a extração de ácidos nucleicos das amostras incubadas, de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de DNA específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NEGATIVO (líquido alantoide ou água) e controle POSITIVO para ILTV;
- c) O laboratório pode optar pelo uso de outro método de extração que não use kit, desde que apresente verificação de desempenho comprovada pelo próprio laboratório.

3.6. Técnica de PCR convencional para detecção do vírus da laringotraqueíte infecciosa das aves

3.6.1. Disposições gerais

- a) O laboratório pode optar por realizar a técnica de PCR com kit comercial ou protocolo *in house*. Ambos necessitam de comprovação de desempenho.

3.6.2. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.6.3. Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- b) Geladeira;
- c) Freezer;
- d) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- e) Termociclador para PCR em tempo real;
- f) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- g) Agitador de microtubos;
- h) Microcomputador;
- i) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.6.4. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Solução tampão para PCR;
- c) Solução de cloreto de magnésio para PCR;
- d) Mix de dNTP;
- e) Primers forward e reverse específicos para o vírus ILTV;
- f) Enzima Taq DNA Polimerase;

- g) Controle POSITIVO para ILTV;
- h) Corante para ácidos nucleicos;
- i) Marcador de peso molecular;
- j) Tampão de carregamento;
- k) Gel de agarose;
- l) Iniciadores (primers) específicos para detecção de ILTV (sugestão de iniciadores apresentado no QUADRO 1).

QUADRO 1. Sugestão de oligonucleotídeos para detecção do vírus da laringotraqueíte infecciosa das aves por PCR.

Alvo	Primer forward	Primer reverse	Sondas	Referência
Gene gE	(1o round) gE1s: 5'-CGT ATA CCA TCC TAC AGA CGG CA- 3' (2o round) gE3s: 5'-AGT CCT CTT ATA GCC ATC CCC A-3'	(1o round)- gE2AS: 5'-CGT ACA ATG GTT CGG TCT TGG A-3' (2o round)- 5'-CAC CCC CGC GAC GAC GAA GT- 3'	N.A.	Chacón & Ferreira, 2008

3.6.5. Soluções

- a) Solução de álcool 70º INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses.

3.6.6. Realização do ensaio

3.6.6.1. Reação de amplificação de ácido nucleico (PCR)

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR), isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- e) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70º INPM;
- b) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.6.6.2. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (ILTV) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Adicionar o mix de reação a cada poço da microplaca (ou microtubos);
- c) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle POSITIVO para ILTV;
 - II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III. Branco (água livre de nucleases);
 - IV. Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.6.6.3. Reação de PCR

- a) Após o preparo do mix, adicionar o DNA nos poços da placa ou em microtubos identificados com a numeração da amostra a ser testada;
- b) Realizar a amplificação em termociclador certificado, conforme as especificações de temperatura do protocolo utilizado.

3.6.6.4. Eletroforese

- a) Preparar o gel de agarose em concentração adequada ao protocolo de PCR utilizado. Adicionar um corante para ácidos nucleicos em proporção suficiente para visualização das bandas;
- b) Para a corrida das amostras, adicionar tampão de carregamento ao produto de PCR;
- c) Aplicar marcador de peso molecular em um dos poços do gel;
- d) Realizar a corrida em cuba de eletroforese, utilizando o tempo e a voltagem adequados para o volume do gel e o protocolo de PCR utilizado;
- e) Visualizar o gel sob luz ultravioleta, fotografar com o auxílio de um fotodocumentador e analisar o resultado.

3.6.7. Critérios de aceitação do ensaio

- a) As amostras do controle POSITIVO para ILTV devem apresentar bandas de tamanhos correspondentes aos *amplicons* do protocolo utilizado;
- b) As amostras de controle NEGATIVO (controle NEGATIVO da extração, controle heterólogo e branco) não devem apresentar bandas de amplificação.

3.6.8. Interpretação dos resultados

- a) As amostras de controle POSITIVO para ILTV devem apresentar bandas de tamanhos correspondentes aos *amplicons* do protocolo utilizado;
- b) As amostras de controle NEGATIVO (controle NEGATIVO da extração e branco) não devem apresentar bandas de amplificação;
- c) Comparar os resultados das amostras testadas ao das amostras controle, a fim de classificá-las como positivas ou negativas;
- d) A leitura das bandas deve ser clara e livre de *amplicons* inespecíficos para o teste ser considerado satisfatório;
- e) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada.

3.6.9. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “POSITIVO” ou “NEGATIVO”;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.6.10. Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.6.11;

b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;

c) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

d) Após este período, todo o resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

e) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.6.11. Retenção de Itens de Ensaio

a) Amostras negativas poderão ser descartadas imediatamente após a emissão do Relatório de Ensaio;

b) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas a -80°C ou temperaturas inferiores de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo as mesmas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

3.7. Técnica de qPCR para detecção do vírus da laringotraqueíte infecciosa das aves

3.7.1. Disposições gerais

a) O laboratório pode optar por realizar a técnica de PCR em tempo real com kit comercial ou protocolo *in house*. Ambos necessitam de comprovação de desempenho.

3.7.2. Materiais

- a)** Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- b)** Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c)** Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- d)** Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- e)** Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f)** Estantes para microtubos;
- g)** Gaze ou papel toalha.

3.7.3. Equipamentos e instrumentos

- a)** Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- b)** Geladeira;
- c)** Freezer;
- d)** Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- e)** Termociclador para PCR em tempo real;
- f)** Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- g)** Agitador de microtubos;
- h)** Microcomputador;

- i) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.7.4. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
 b) Controle POSITIVO para ILTV;
 c) Kit para amplificação do ILTV por qPCR;
 d) Iniciadores (*primers*) e sondas específicos para a detecção do ILTV por PCR em tempo real (sugestão de iniciadores apresentado no QUADRO 2).

QUADRO 2. Sugestão de oligonucleotídeos para detecção do DNA do vírus da laringotraqueíte infecciosa das aves por qPCR.

Alvo	Primer forward	Primer reverse	Sondas	Referência
Gene gC	gC-f: 5'-CCT TGC GTT TGA ATT TTT CTG-3'	gC-r: 5'-TTC GTG GGT TAG AGG TCT GT-3'	gC-probe: 5'-d FAM-CAG CTC GGT GAC CCC ATT CTA-BHQ-1- 3'	Callison, 2007.

3.7.5. Soluções

- a) Solução de álcool 70º INPM;
 b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;
 c) Solução de hipoclorito de sódio 0,5%.

3.7.6. Realização do ensaio

3.7.6.1. Reação de amplificação de ácido nucleico por qPCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
 b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70º INPM;
 c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.7.6.2. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (ILTV) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
 b) Após o preparo do mix, adicionar o DNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;
 c) A adição de DNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);
 d) Devem ser incluídos nas análises:

- I. Controle POSITIVO para ILTV;
- II. Controle NEGATIVO da extração;
- III. Branco (água livre de nucleases);
- IV. Controle POSITIVO e NEGATIVO do kit utilizado (se houver).

3.7.6.3. Reação de qPCR

- a) Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- b) Iniciar e entrar com os dados no *software* do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- c) Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- d) Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.7.7. Critérios de aceitação do ensaio

- a) Para a validação do ensaio, o controle POSITIVO do kit e o controle interno devem apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um Ct satisfatório (conforme especificações do fabricante);
- b) O controle NEGATIVO deve ter Ct indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle NEGATIVO deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.7.8. Interpretação dos resultados

- a) Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle POSITIVO, controle NEGATIVO, controle da extração, background de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;
- b) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada.

3.7.9. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “POSITIVO” ou “NEGATIVO”, ou de acordo com o preconizado pelo fabricante;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.7.10. Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.7.11;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

d) Após este período, todo resíduo biológico do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

e) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.7.11. Retenção de Itens de Ensaio

a) Amostras negativas poderão ser descartadas imediatamente após a emissão do Relatório de Ensaio;

b) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas a -80°C ou temperaturas inferiores de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo as mesmas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

Referências Bibliográficas

CALLISON, S.A., RIBLET, S.M., OLDONI, I., SUN, S., ZAVALA, G., WILLIAMS, S., RESURRECCION, R.S., SPACKMAN E. E GARCIA, M. "Development and validation of a real-time Taqman® PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry". *Journal of Virological Methods*, 139: 31-38. 2007.

CHACÓN J.L. E FERREIRA A.J.P. "Development and validation of nested-PCR for the diagnosis of clinical and subclinical infectious laryngotracheitis". *Journal of Virology Methods*, 151(2):188-193. 2008.

Avian infectious laryngotracheitis. CHAPTER 3.3.3. Version (NB: Version adopted in May 2021). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 14 set. 2021.

Secção 2.2

Bovinos

CAPÍTULO 2.2.1 ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA – EEB

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da EEB:

1.1. Identificação do Agente

- a) Tronco encefálico incluindo o óbex, + 3,0 cm rostral e caudal.;
- b) Medula espinhal;
- c) Bulbo;
- d) Ponte;
- e) Mesencéfalo;
- f) Tálamo;
- g) Cérebro e
- h) Cerebelo

* O Tronco encefálico incluindo o óbex é o material de eleição.

* Coletar no mínimo 5g de tecido

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

2.1.3. As amostras deverão ser encaminhadas ao laboratório, individualmente e obedecendo a critérios de biossegurança.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA ou segundo legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados, previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos:

a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente.

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente (TA), valores de temperatura entre 18 e 26°C.

3.1.4. Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5. O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório;

3.1.8. Os analistas devem receber treinamento adequado sobre os riscos relacionados à EEB e Scrapie e os procedimentos de biossegurança são seguidos;

3.1.9. Preferencialmente, área de trabalho e equipamentos dedicados;

3.1.10. Substituir vidro por plásticos, sempre que possível.

3.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.2.1 Materiais

- a)** Provetas graduadas;
- b)** Pipetas graduadas;
- c)** Ponteiras descartáveis;
- d)** Placas 96 cavidades;
- e)** Tubos de ruptura de amostra;
- f)** Descartador de ponteiras;
- g)** Reservatórios para soluções (cubetas);
- h)** Papel absorvente;
- i)** Caneta para identificação;
- j)** Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavagem;
- k)** Recipientes para descarte de resíduo químico;
- l)** Coberturas adesivas e coberturas em plástico rígido para placas 96 poços;
- m)** Tubos para diluição de reagentes;
- n)** Microtubos 1.0 a 2.0 mL, compatíveis com bloco de aquecimento seco 70 °C (opcional);
- o)** Instrumentos descartáveis para dissecação de amostra (exemplo: facas plásticas);
- p)** Material descartável para pesagem e acondicionamento (exemplo: saco plástico, placa de Petri, prato)
- q)** Sacos plásticos para autoclave, resistentes a temperatura superior a 134°C;
- r)** Caneta permanente ou similar para identificação dos tubos;
- s)** Equipamentos de proteção, tais como: luvas de nitrila, sapatos e óculos de proteção.

3.2.2 Equipamentos e Instrumentos

- a) Cabina de Segurança Biológica (CSB) II;
- b) Balança;
- c) Micropipetas mono e multicanais
- d) Homogeneizador de amostras;
- e) Leitora de ELISA - placas para 96 cavidades
- f) Computador;
- g) Lavadora de microplacas (opcional);
- h) Agitador de placas tipo thermoshaker;
- i) Bloco de aquecimento seco 70 °C, para tubos de microcentrifuga de 1.0 a 2.0 mL (opcional);
- j) Freezer/Ultrafreezer;
- k) Refrigerador;
- l) Timer de contagem regressiva;
- m) Termômetros.

3.2.3 Insumos

- a) Kit de ELISA para detecção de proteína priônica PrPsc em tecido sistema nervoso de ruminantes;

3.2.4 Soluções

- a) No preparo das soluções devem ser utilizados somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados;
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução concentrada;
- d) Diluir as soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5 Realização do ensaio

3.2.5.1 Preparo das amostras

- a) Realizar a preparação da amostra em Cabine de Segurança Biológica;
- b) Não utilizar solução desinfetante;
- c) Tecido nervoso: Bulbo na altura do óbex (FIGURAS 1 a 3);
- d) A amostra de eleição para o ELISA é o óbex (FIGURA 1), sendo no máximo 1,5 cm rostral ao mesmo;
- e) Posicionar o tronco encefálico com a secção em forma de V para cima;
- f) Retirar uma porção da hemissecção do óbex, na faixa de peso 0,25 a 0,35g com facas descartáveis (FIGURA 2);
- g) Colocar no tubo de disrupção
- h) Uma hemissecção e o restante de amostra permanece disponível para os testes de confirmação, conservada sob congelamento;

FIGURA 1: Localização do óbex

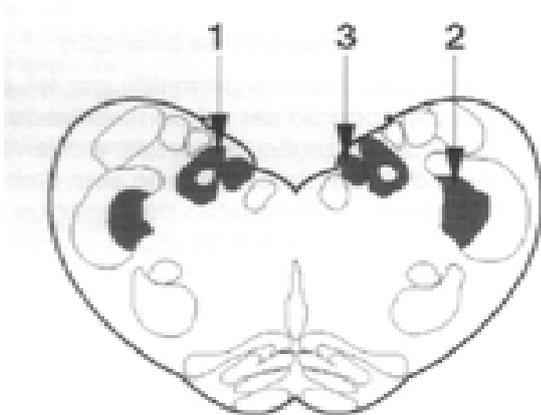


FIGURA 2: Hemissecção do óbex



Fonte: LFDA/PE Fonte: LFDA/PE

FIGURA 3: Corte transversal do óbex indica as principais localizações do príon: 1- tracto solitário, 2- núcleo do nervo trigêmeo, 3- núcleo motor dorsal do vago



Fonte: OIE - Terrestrial Manual 2021

- i) Dispor no homogeneizador os tubos de homogeneização contendo as amostras. Homogeneizar conforme orientação do fabricante do kit.
- j) Caso o fabricante determine procedimentos diferentes dos estipulados nos itens anteriores, estas novas determinações devem ser adotadas.

3.2.5.2 Realização do Ensaio

- a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;
- b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;
- c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;
- d) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;
- e) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (exemplo: papel toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível, não excedendo 5 minutos entre os passos de lavagem e adição de reagentes;
- f) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante do kit.

3.2.6. Critérios de aceitação do ensaio

O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7 Interpretação dos resultados

- a) A interpretação dos resultados se baseia na absorbância da amostra;
- b) Amostras cujas DOs são inferiores ao valor de “cutoff” são consideradas negativas;
- c) Amostras cujas DOs são iguais ou superiores ao valor de “cutoff”, são consideradas como inicialmente reativas para PrPsc e são novamente testadas conforme recomendação do fabricante do kit;
- d) Se as repetições forem inferiores ao “cutoff”, a amostra é considerada negativa. Se um dos valores repetidos for igual ou superior ao valor do “cutoff”, a amostra é considerada reativa e é realizado o ensaio confirmatório.
- e) Toda amostra reativa em teste rápido deve ser direcionada para teste confirmatório.

3.2.8 Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “Detectado” e “Não detectado” ou de acordo com o preconizado pelo fabricante do insumo (kit de diagnóstico);
- b) As amostras com resultados diferentes de Não detectado no ELISA deverão ser encaminhadas para o Laboratório Federal de Defesa Agropecuário (LFDA) designado para realizar a confirmação através do ensaio complementar de IHQ, prevalecendo o resultado deste;

3.2.9 Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e suas alíquotas deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 4. Retenção de Itens de Ensaio;
- b) Realizar a conferência das amostras antes do descarte e registrar em formulário próprio.
- c) Os resíduos devem ser separados antes do descarte e destinados conforme legislação ambiental;
- d) Todo o material biológico utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processamento em autoclave por no mínimo 134°C por 18 minutos e encaminhado para incineração, conforme legislação ambiental. O monitoramento da esterilização deve estar comprovado em procedimentos próprios do laboratório;

e) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.3. Ensaio Imuno-histoquímico – IHQ

3.3.1 Materiais

- a) Cuba de vidro com tampa compatível com o berço para amostras a serem coradas;
- b) Papel absorvente;
- c) Estantes para desparafinização de lâminas;
- d) Tubo de ensaio para diluição do anticorpo;
- e) Papel de filtro qualitativo;
- f) Funil;
- g) Ponteiras compatíveis com as micropipetas utilizadas;
- h) Descartador de ponteiras;
- i) Papel Alumínio;
- j) Pissetas, preferencialmente graduadas;
- k) Provetas graduadas;
- l) Sacos para resíduo infectante;
- m) Sacos plásticos para autoclave, resistentes a temperatura igual ou superior a 134°C;
- n) Lâmina polarizada dimensões 75 mm x 25 mm com borda pintada curta máxima 19 mm x 25mm, compatível com uso em Shandon/Sequenza: semelhante à Super Frost Ultra Plus;
- o) Lamínulas de vidro;
- p) Suporte de lâmina Shandon/Sequenza;
- q) Berço autoclavável, usado como suporte para coloração de lâminas;
- r) Cuba para imersão de lâminas resistente à autoclave 121°C a 123°C/25 minutos.

3.3.2 Equipamentos e Instrumentos

- a) Processador de tecidos para histologia (opcional);
- b) Micrótomo;
- c) CSB Classe II B 2;
- d) Estufa de Incubação Bacteriológica;
- e) Agitador de tubos, tipo vórtex;
- f) Micropipetas Monocanais;
- g) Pipetador automático;
- h) Autoclave programável que realize inclusive ciclo de 134°C por no mínimo 18 minutos;
- i) Microscópio óptico;
- j) Timer de contagem regressiva;
- k) Refrigerador;
- l) Termômetros.

3.3.3 Insumos

- a) Água deionizada;
- b) Xilol grau histológico P.A./ACS;
- c) Álcool etílico absoluto P.A.;
- d) Peróxido de Hidrogênio a 30% P.A.;
- e) Ácido Fórmico 98-99%, P.A.;

- f) Solução Target Retrieval (Dako K8005 50X - *Target Retrieval* solution, pH baixo);
- g) Anticorpo Monoclonal F99/97.6.1 (VMRD);
- h) Soro caprino normal;
- i) EnVision™+ Dual Link System-HRP (Dako K 4061) – kit de detecção;
- j) DAB Líquido 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (Dako 3468);
- k) Hematoxilina de Harrys;
- l) Hidróxido de Amônio em Solução Aquosa (NH₄OH, PM 35,05 g/mol, concentração 28 % - 30 %, aproximadamente 15N);
- m) Meio de montagem não aquoso (ex. Entellan);
- n) TRIS Base (hydroxymethyl) aminomethane (NH₂C(CH₂OH)₃, PM 121,14 g/mol);
- o) Ácido Clorídrico Concentrado (HCl, PA, 36,5%, PM 36,46 g/mol);
- p) Cloreto de sódio (NaCl, PM 58,44 g/mol);
- q) Tween 20 (Monooleato Polioxietileno Sorbitano).

3.3.4 Soluções

- a) Solução de Álcool etílico 95%;
- b) Solução de Álcool etílico 80%;
- c) Solução Tris Tween 20 (50MM TRIS-HCL, 300 MM NACL, 0,1% TWEEN 20, pH7.6);
- d) Solução Tris HCl 0,1 mol/L, pH 7.6;
- e) Solução Aquosa de Amônia 37 mM;
- f) Solução de Peróxido de Hidrogênio a 3% em água;
- g) Solução de Recuperação (*Target Retrieval*) diluída 1:50 em água;
- h) Solução de 5% de soro caprino em Tris Tween 20;
- i) Anticorpo 1:18.000 em solução Tris Tween 20;
- j) Solução de DAB diluído conforme fabricante.

3.3.5 Realização do ensaio

3.3.5.1 Preparo dos reagentes/soluções

- a) Quando não determinado pelo protocolo, diluir a soluções utilizando água ultrapura destilada e homogeneizar bem;
- b) A bateria de reagentes da fase pré-kit é composta por cubas de vidro com tampas e identificações dos reagentes: xilol (cubas 1 e 2); álcool etílico absoluto (cubas 1 e 2); álcool 95% (cubas 1 e 2); álcool 80% (cubas 1 e 2);
- c) A solução de Ácido Fórmico pode ser mantida em cuba e reutilizada em até cinco vezes;
- d) Preparar no momento ou próximo ao uso as soluções: Peróxido de Hidrogênio 3%, Recuperação Antigênica, Anticorpo diluído e Cromógeno DAB;
- e) Filtrar a hematoxilina em papel de filtro qualitativo no dia do uso;
- f) Não permitir que as lâminas sequem em nenhuma das etapas da imuno-histoquímica.

3.3.5.2 Preparo das amostras

- a) Realizar a preparação da amostra em Cabine de Segurança Biológica;
- b) Amostra de eleição a ser testada: constituída por fragmento de bulbo, próximo ao óbex, devidamente fixado em formol a 10% tamponado. Incluir fragmento de cerebelo, sempre que disponível;

c) Etapas iniciais do processamento: as fases pré-analíticas são de técnicas comuns histológicas: Fixação; Clivagem; Processamento Histológico; Inclusão em Parafina e Microtomia.

3.3.5.3 Desparafinização

- a) Realizar preferencialmente no mesmo dia do ensaio;
- b) Incubar a 54 °C a 62 °C por aproximadamente uma hora;
- c) Retirar e deixar em temperatura ambiente até secar por no mínimo 30 minutos.

3.3.5.4 Técnica de Imuno-histoquímica - IHQ

- a) Todas as etapas são executadas a 21°C a 25°C, exceto quando indicado. As soluções/reagentes de coloração são usadas na temperatura ambiente (TA);
- b) Colocar as lâminas no berço de coloração;
- c) Após imergir o berço em cada reagente/solução, escorrer em papel toalha, antes de imergir na próxima cuba.

3.3.5.4.1 Desparafinização/Reidratação dos Tecidos

- a) Imergir em Xilol e incubar por 4 minutos. Duas vezes;
- b) Imergir em Álcool Etílico Absoluto e incubar por 2 minutos. Duas vezes;
- c) Imergir em Álcool Etílico a 95% e incubar por 2 minutos. Duas vezes;
- d) Imergir em Álcool Etílico a 80 % e incubar por 2 minutos. Duas vezes;
- e) Imergir em água deionizada por dez vezes.

3.3.5.4.2 Bloqueio da Peroxidase Endógena

- a) Imergir em Solução de Peróxido de Hidrogênio a 3% em água, recém preparada, incubar por 10 minutos;
- b) Imergir em água deionizada por dez vezes. As lâminas podem permanecer na água por algumas horas, se necessário.

3.3.5.4.3 Ativação do Antígeno

- a) Imergir em Ácido Fórmico 98-99%, incubar por 5 minutos;
- b) Imergir em água deionizada por dez vezes;
- c) Imergir em Solução Tris HCl 0,1M pH 7,6 por 3 trocas (3 minutos, 2 minutos e 2 minutos);
- d) Transferir o suporte com as lâminas para um recipiente resistente ao calor, contendo a Solução de Recuperação (*Target Retrieval*) previamente diluída 1:50, envolver em papel alumínio e processar em autoclave a 121°C a 123°C por 25 minutos;
- e) Resfriar;
- f) Manter as lâminas em Solução Tris Tween 20 até a montagem em Sistema Shandon-Sequenza;
- g) Montar as lâminas no Sistema Shandon-Sequenza (FIGURAS 4 a 9). Pipetar 100 µL de Solução Tris Tween 20 e incubar por 5 minutos.

3.3.5.4.4 Montagem no Sistema Shandon-Sequenza

FIGURA 4: Montagem da rack Sistema Shandon-Sequenza

FIGURA 5: Rack montada do Sistema Shandon-Sequenza



Fonte: LFDA-PE



Fonte: LFDA-PE

FIGURA 8: Lâmina montada no Clip Sistema Shandon-Sequenza

FIGURA 9: Lâmina com reagente, montada no Sistema Shandon-Sequenza. Fonte: LFDA-PE



Fonte: LFDA-PE



Fonte: LFDA-PE

3.3.5.4.5 Imunocoloração

- a) Pipetar 100 μ L de solução de 5 % de soro caprino em Tween 20 e incubar por 15 minutos;
- b) Pipetar 100 μ L de solução de anticorpo diluído 1:18000, incubar TA por uma hora ou incubar a 4°C a 8°C *overnight*;
- c) Adicionar Solução Tris Tween 20 com pisseta e incubar por 5 minutos, duas vezes;
- d) Pipetar 100 μ L do kit de detecção (Envision) e incubar por 30 minutos;
- e) Adicionar Solução Tris Tween 20 com pisseta e incubar por 5 minutos, duas vezes;
- f) Adicionar água deionizada com pisseta e incubar por 2 minutos, duas vezes;

- g)** Pipetar 100 µL de cromógeno DAB incubar de 5 a 30 minutos (média 10 minutos) Opcionalmente monitorar, microscopicamente, o tempo de incubação até que a intensidade de coloração desejada seja obtida;
- h)** Adicionar água deionizada com pisseta e incubar por 2 minutos, duas vezes;
- i)** Retirar as lâminas do Sistema Shandon-Sequenza, colocar no berço;
- j)** Imergir (1 banho) em Solução de Hematoxilina de Harrys;
- k)** Imergir em água destilada, deionizada ou potável, por no mínimo 4 vezes;
- l)** Imergir em Solução de Amônia 37mM por até 10 vezes, ou até que seja perceptível a mudança da coloração do corte histológico para azul;
- m)** Imergir em água deionizada e incubar por 2 a 5 minutos;
- n)** Imergir em Álcool Etílico a 80 % e incubar por 2 minutos. Duas vezes;
- o)** Imergir em Álcool Etílico a 95% e incubar por 2 minutos. Duas vezes;
- p)** Imergir em Álcool Etílico Absoluto e incubar por 2 minutos. Duas vezes;
- q)** Imergir em Xilol e incubar por 4 minutos. Duas vezes;
- r)** Manter no Xilol durante a montagem das lâminas em Entellan.

3.3.5.4.6 Montagem das lâminas

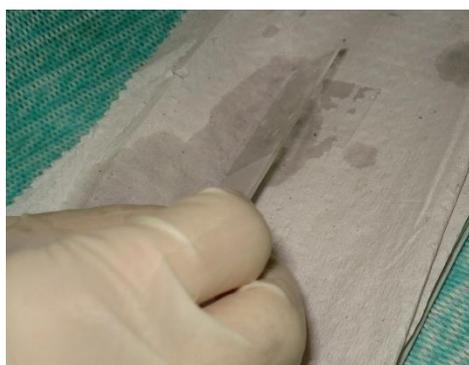
- a)** Dispor a lâmina horizontalmente com o corte voltado para cima, pingar duas gotas de meio de montagem não aquoso sobre o corte histológico. Ajustar a quantidade de gotas conforme o tamanho do corte;
- b)** Colocar a lamínula encostando-a no meio de montagem numa angulação aproximada de 45° (FIGURA 10), soltando-a lentamente em direção ao corte para que não haja formação de bolhas. Esta etapa pode ser feita de forma contrária, posicionando a lâmina em cima da lamínula (FIGURA 11), conforme preferência do executor.

FIGURAs 10 Montagem da lâmina



Fonte LFDA-PE

FIGURA 11 Montagem da lâmina



Fonte LFDA-PE

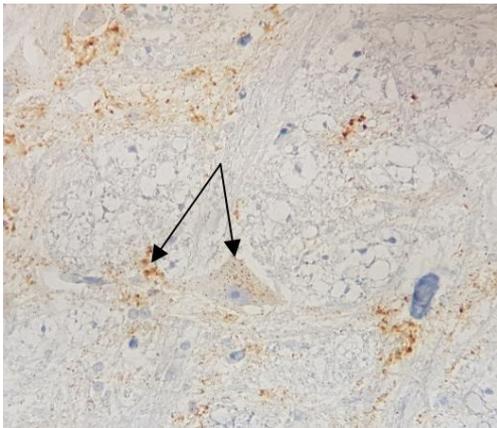
3.3.5.5 Critérios de aceitação

- a)** Para cada rodada são usados controles positivos e negativos, distribuídos preferencialmente no início e final da rodada. A rodada de provas é considerada válida quando os controles-funcionam adequadamente;
- b)** Quando os controles não funcionarem adequadamente, repetir a prova.

3.3.6 Interpretação dos resultados

a) Realizar a leitura em microscópio óptico. São observadas as reações características em marrom nos cortes positivos (FIGURAS 12 e 13) e a coloração totalmente azul nos cortes negativos (FIGURAS 14 e 15).

FIGURA 12: presença de imunomarcação em aumento de 400



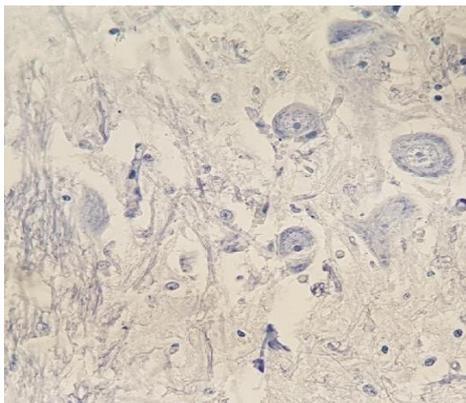
Fonte: LFDA-PE

FIGURA 13: presença de imunomarcação em aumento de 400



Fonte: LFDA-PE

FIGURA 14: ausência de imunomarcação em aumento de 400



Fonte: LFDA-PE

FIGURA 15: ausência de imunomarcação em aumento de 100 vezes



Fonte: LFDA-PE

3.3.6.1 Amostra de Tecido Nervoso

a) Positivo: quando precipitado marrom característico (FIGURAS 12 e 13) é observado nos neurônios e/ou demais células nervosas que compõem o óbex ou segmento do SNC mais próximo (na ausência do óbex). Os tipos de imunomarcações descritas na IHQ para as Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis são as citadas abaixo:

I. Imunomarcação particulada no neurópilo da substância cinzenta (dendritos) é a principal forma de imunomarcação específica para a doença. As áreas mais comumente afetadas na EEB são o tratoespinal do núcleo trigêmeo, o núcleo e o trato solitário, e o núcleo dorsal do vago;

II. Concentrado granular ou particulado margeando neurônios e seus prolongamentos;

III. Imunomarcação granular fina ou particulada intraneuronal nos núcleos alvo;

IV. Depósitos lineares de proteína priônica associados com dendritos;

V. Imunomarcação estrelar (reticular) multifocal, provavelmente associada às células da glia;

VI. Imunomarcação fibrilar, granular ou particulada ao redor de vasos sanguíneos e epêndima;

VII. Intensa imunomarcação em forma de “placas”. Comumente observadas na Doença Crônica Depauperante dos cervídeos, menos comum no *Scrapie* e rara na EEB.

b) Negativo: quando não há precipitado marrom granular característico, estando o corte histológico totalmente corado em azul (FIGURAS 14 e 15).

c) Inconclusivo: quando há imunomarcação inespecífica;

d) Imprópria: amostra sem condições para análise após repetições.

3.3.7 Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “Positivo”, “Negativo”, “Inconclusivo” ou “Imprópria”

3.3.8 Descarte das amostras e resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e suas alíquotas, deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 4. Retenção de Itens de Ensaio;

b) Realizar a conferência das amostras antes do descarte e registrar em formulário próprio.

c) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;

d) Todo o material biológico utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de “esterilização” em autoclave por no mínimo 134°C por 18 minutos e encaminhado para incineração, conforme legislação ambiental. O monitoramento da esterilização deve estar comprovado em procedimentos próprios do laboratório;

e) O resíduo químico (reagentes e/ou amostras fixadas em formol) deve ser identificado e encaminhado para incineração, conforme legislação ambiental;

f) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

4. Retenção de itens de ensaio

a) As amostras negativas são retidas e descartadas após no mínimo 30 dias do envio do resultado.

a) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

Referências Bibliográficas

A Study on the Analytical Sensitivity of 6 BSE Tests Used by the Canadian BSE Reference Laboratory, 2011. Gray JG, Dudas S, Czub S (2011) A Study on the Analytical Sensitivity of 6 BSE Tests Used by the Canadian BSE Reference Laboratory. PLoS ONE 6(3): e17633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017633>.

Advisory Committee on Dangerous Pathogens Spongiform Encephalopathy. Transmissible Spongiform Encephalopathy Agents: Safe working and the prevention of infection. 46p., March, 1998.

Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 6ª Edição, revisado em junho/2020. U.S. Department of Health and Human Service, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health.

Bovine Spongiform Encephalopathy. Chapter 3.4.5. Version (VN: adopted in May 2021 **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 16 de set. de 2021.

Canadian Biosafety Handbook. 2ª Edição, revisado em março/2021. Disponível em <https://www.canada.ca/en/public-health/services/canadian-biosafety-standards-guidelines/handbook-second-edition.html#s25>. Acesso em 30 de agost. de 2021.

Comparative Performance of Three TSE Rapid Tests for Surveillance in Healthy Sheep Affected by Scrapie, Journal of Virological Methods 173 (2011) 161-168.

Czub, S, Graham, C e Pickles, T. Procedimento Padrão CFIA. Immunohistochemical Detection of Prion Protein in Bovine Spongiform Encephalopathy. CFIA, v 1.10, December 2017, 33p.

Deeber, S.O.S, et al. Transmissible Spongiform Encephalopathy Diagnosis Using Prpsc Immunohistochemistry on Fixed but Previously Frozen Brain Samples. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, v. 50, n. 5, p. 611-616, Maio, 2002.

Evaluation of Two Commercial, Rapid, ELISA kits Testing for Scrapie in Retro-Pharyngeal lymph nodes in Sheep, 2014.

Fixation, Tissue Processing, Histology and Immunohistochemistry Procedures for Diagnosis of Animal TSE (BSE, Scrapie, Atypical Scrapie), APHA 2018.

Guidelines Evaluation of Changes to Approved Protocols for TSE Rapid Tests and Details of Information to be Supplied by rapid Test manufacturers to the EUURL. Versão 11.0. Disponível em <https://science.vla.gov.uk/tse-lab-net/documents/tse-guide-test.pdf>.

Guidelines for the for the Submission of Samples for TSE Confirmatory Testing. Animal & Plant Health Agency. Revisado em janeiro 2019.

Instrutivo do Kit Herdchek* Antígeno BSE-Scrapie 06-08519-12. Versão # 12.

Meloni D, Davidse A, Langeveld JPM, Varello K, Casalone C, Corona C, et al. (2012) EU-Approved Rapid Tests for Bovine Spongiform Encephalopathy Detect Atypical Forms: A Study for Their Sensitivities. PLoS ONE 7(9): e43133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043133>.

Neuropathology: Confirmatory diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in cattle and small ruminants. AHVLA. Disponível em [https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/documents/Confirmatory%20\(Histo%20&%20IHC\)%20diagnostic%20criteria_Rev_Jan2019.pdf](https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/documents/Confirmatory%20(Histo%20&%20IHC)%20diagnostic%20criteria_Rev_Jan2019.pdf) . Revisado em janeiro 2019.

O'ROURKE, I. K. et al. Active surveillance for Scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. Clinical Diagnostic Laboratory Immunology, v. 9, n. 5, p. 966-971, Sept. 2002.

O'ROURKE, I. K. et al. Preclinical diagnosis of Scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. Journal of Clinical Microbiology, v. 38, n. 9, p. 3254-3259, Sept. 2000.

Pathogen Safety Data Sheet – Bovine Spongiform Encephalopathy, disponível em <https://inspection.canada.ca/animal-health/terrestrial-animals/diseases/reportable/bovine-spongiform-encephalopathy/eng/1323991831668/1323991912972>. Acesso em 16 de set. de 2021.

Scientific Opinion Analytical Sensitivity of Approved TSE Rapid Tests – EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2009.

Scientific Opinion on Sensitivity of Approved TSE rapid tests – new data for assessment of two rapid tests – European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. EFSA Journal 2010; 8 (4): 1591.

Scientific Opinion on the Evaluation of the New TSE rapid test submitted in the Framework of the Commission Call for Expression of Interest 2007/S204-247339- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2012.

TSE confirmatory and discriminatory testing. Disponível em <https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/confirmatory-diagnosis.html>

WEBSTER, J. D. et al. Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. Journal of Histochemistry & Citochemistry, v. 57, n. 8, p. 753 - 761, 2009.

Secção 2.3

Equinos

CAPÍTULO 2.3.1

ANEMIA INFECCIOSA EQUINA - AIE

1. AMOSTRAS

São consideradas amostras para o diagnóstico da Anemia Infecciosa Equina:

1.1. Detecção da Resposta Imune

- a) Soro sanguíneo de equídeo

2. RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controle Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

2.1.3. A alíquotagem, identificação, manutenção, armazenamento e descarte das amostras são de inteira responsabilidade do laboratório.

3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2. Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos:

a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização em temperatura ambiente;

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 e 25°C.

3.1.4. Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios de interpretação dos resultados;

3.1.5. O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório;

3.1.8. Para realização do ensaio de ELISA e IDGA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;

3.1.9. A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com o fabricante do kit.

3.2. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

3.2.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Ponteiras descartáveis;
- g) Descartador de ponteiras;
- h) Reservatórios para soluções (cubetas);
- i) Papel absorvente;
- j) Selador ou tampa para placas de ELISA;
- k) Caneta para identificação de vidraria;
- l) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.2.2. Equipamentos e Instrumentos

- a) Geladeira;
- b) Estufa;
- c) Termômetros;
- d) Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- e) Pipetador automático ou manual;
- f) Leitora de ELISA;
- g) Cronômetros;
- h) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- i) Agitador de microplacas (opcional);
- j) Autoclave;
- k) Lavadora de microplacas (opcional).

3.2.3. Insumos

- a) Kit de ELISA de detecção de anticorpos para o vírus da Anemia Infeciosa Equina.

3.2.4. Soluções

- a) No preparo das soluções devem ser utilizados somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados;
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução concentrada fornecida no kit;
- d) Diluir as soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5. Realização do Ensaio

- a) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;
- b) Utilizar ponteiros distintos para cada controle e amostra de soro;
- c) Homogeneizar as placas suavemente ou utilizando um agitador de placas;
- d) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos, batendo a placa em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;
- e) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2.6. Critérios de Aceitação do Ensaio

- a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos Resultados

- a) De acordo com as DOs obtidas consideram-se os resultados negativo, positivo ou outro parâmetro indicado na bula do kit;
- b) As amostras positivas no ELISA devem ser testadas em triplicata no ensaio de IDGA na mesma roseta, prevalecendo o resultado deste.

3.2.8. Emissão dos Resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, POSITIVO ou NEGATIVO ou outro parâmetro indicado na bula do kit;
- b) Uma cópia do Relatório de Ensaio deve ser arquivada no laboratório por um período mínimo de 5 anos após sua emissão;
- c) O laboratório credenciado deve anexar a “Requisição para Diagnóstico” de cada animal ao Relatório de Ensaio;

d) Resultado POSITIVO do teste ELISA, deve ser emitido somente após a finalização do teste de IDGA.

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) As amostras devem ser registradas em formulários próprios e conferidas antes do descarte. Serão submetidas ao processo de autoclavação com temperatura de 121°C durante 30 minutos para então serem descartadas.

b) Todo material utilizado na realização do ensaio, que não for autoclavável, deve ser imerso completamente em cuba com solução de ácido cítrico 0,2% ou de hipoclorito de sódio 0,5% durante no mínimo 60 minutos. Após esse período, conforme o material, pode ser descartado ou reutilizado após devida higienização;

c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

a) As amostras devem ser armazenadas congeladas (máxima -10°C) no laboratório durante no mínimo 60 dias após a emissão do relatório de ensaio.

3.3. IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR (IDGA)

3.3.1. Materiais

a) Luvas para procedimentos;

b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;

c) Provetas graduadas;

d) Béqueres;

e) Erlenmeyers;

f) Ponteiras descartáveis;

g) Lâmina para microscópio de 25x75mm ou Placa de Petri de 100mm de diâmetro;

h) Descartador de ponteiras;

i) Caneta para identificação de vidraria;

j) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.3.2. Equipamentos e Instrumentos

a) Geladeira;

b) Freezer;

c) Micro-ondas;

d) Micropipetas monocanal de volumes reguláveis;

e) Pipetador automático ou manual;

f) Balança analítica;

g) Centrífuga refrigerada;

h) Cortador Padrão;

i) Câmara Úmida;

j) Medidor de pH;

k) Autoclave;

- l) Fonte de luz.

3.3.3. Insumos

- a) Kits de Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) de detecção de anticorpos para o vírus da Anemia Infeciosa Equina - AIE.

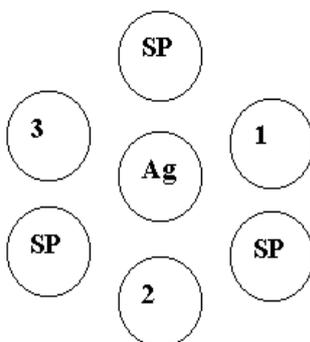
3.3.4. Soluções

- a) Tampão Borato;
- b) Ágar Borato a 1%;
- c) Ácido cítrico 0,2% ou Hipoclorito de sódio 0,5%.

3.3.5. Realização do Ensaio

- a) Identificar as lâminas ou placas de petri conforme o formulário de acompanhamento do ensaio utilizando caneta apropriada;
- b) Aquecer o Ágar Borato a 1%, em microondas, por tempo necessário até a completa fusão, evitando o borbulhamento e extravasamento;
- c) Distribuir o gel na lâmina ou placa de petri e deixá-lo solidificar em temperatura ambiente (20°C a 25°C) ou de refrigeração (2°C a 8°C) durante 30 minutos;
- d) Perfurar o gel com auxílio do cortador padrão, posicionando as rosetas de forma equidistante;
- e) Remover o gel dos poços das rosetas;
- f) Armazenar as lâminas ou placas de petri na câmara úmida se não forem utilizadas imediatamente, para evitar o ressecamento do gel.
- g) Homogeneizar as amostras antes do uso;
- h) Distribuir as amostras a serem testadas, alternadamente, nas posições 1, 2 e 3 (FIGURA 1).
- i) Distribuir o soro controle positivo (SP), alternadamente com as amostras testadas (FIGURA 1).
- j) Distribuir o antígeno (Ag) no poço central (FIGURA 1).
- k) Durante a distribuição evitar o extravasamento de material dos poços. Quando corretamente distribuídos, a superfície fica levemente côncava. Em caso de extravasamento, descartar a lâmina;
- l) Incubar em câmara úmida durante 48 horas;
- m) Registrar a temperatura, no momento inicial da incubação, com 24 horas e 48 horas;
- n) Realizar a leitura após 48 horas de incubação com auxílio de uma fonte de luz;
- o) O resultado final somente será emitido após a leitura com 48 horas.

FIGURA 1 – Roseta com posicionamento do soro controle positivo (SP), antígeno (Ag) e amostras para teste (1, 2 e 3).



Fonte: LFDA -PA

3.3.6. Critérios de Aceitação do Ensaio

a) Será considerado válido somente se ocorrer a formação de uma linha nítida de precipitação entre o Controle Positivo do kit e o antígeno. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.3.7. Interpretação dos Resultados

a) **NEGATIVO:** as linhas formadas entre o Antígeno e o Controle Positivo prolongam-se até a cavidade onde se encontram a amostra testada, sem encurvar-se (FIGURA 2 – reação “Neg” e FIGURA 3-A). Também podem ser visualizadas linhas inespecíficas, reação de não identidade (FIGURA 3-D).

b) **POSITIVO:**

- I. A linha de precipitação formada entre o Antígeno e o Controle Positivo se funde com aquela formada com amostra testada, constituindo uma linha contínua de identidade total (FIGURA 2 – reação 4 e FIGURA 3-B).
- II. **Fraco Positivo:** A linha de precipitação se forma mais próximo à cavidade onde se encontra a amostra testada, visualizando-se somente uma convergência das duas linhas do controle na direção da cavidade onde se encontra a amostra (FIGURA 2 – reação 1, 2 e 3 e FIGURA 3-C);
- III. **Forte Positivo:** a linha de precipitação apresenta-se como faixa difusa entre as duas linhas de controle, podendo haver a inibição da formação desta faixa, visualizando-se apenas as duas linhas de controle, interrompidas, a mesma distância da amostra testada, não se verificando nenhuma precipitação entre estas linhas (FIGURA 2 – reação 5).

c) As amostras positivas no IGDA devem ser reensaiadas em triplicata na mesma roseta, prevalecendo o resultado deste.

I. Caso o ensaio inicial tenha sido realizado utilizando 3 poços o reensaio não é necessário, prevalecendo o resultado deste.

FIGURA 2 – Padrões de reações do ensaio de Imunodifusão em gel de ágar

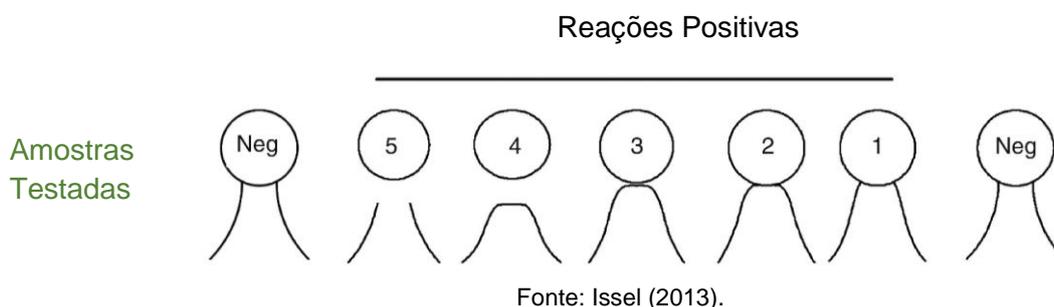
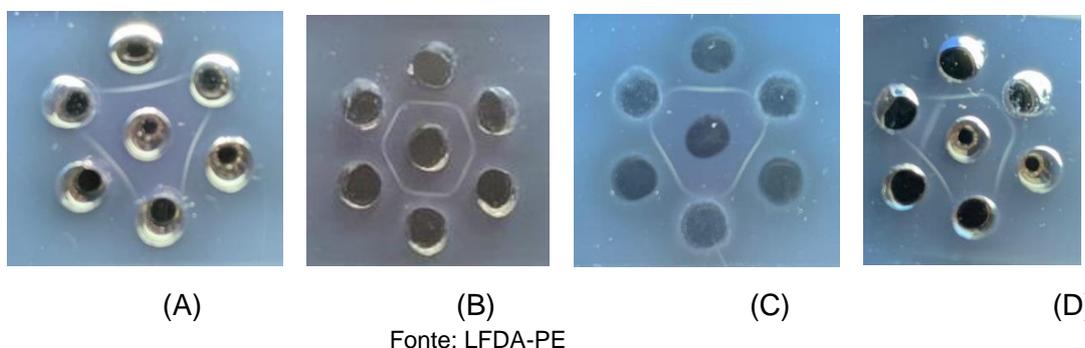


FIGURA 3 – Padrões de reações do ensaio de Imunodifusão em gel de ágar.



3.3.8. Emissão dos Resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como POSITIVO ou NEGATIVO;
- b) Uma cópia do Relatório de Ensaio deve ser arquivada no laboratório por um período mínimo de 5 anos, após sua emissão;
- c) O laboratório credenciado deve anexar a “Requisição para Diagnóstico” de cada animal ao Relatório de Ensaio.

3.3.9. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) As amostras devem ser registradas em formulários próprios e conferidas antes do descarte. Serão submetidas ao processo de autoclavação com temperatura de 121°C durante 30 minutos para então serem descartadas.
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio, que não for autoclavável, deve ser imerso completamente em cuba com solução de ácido cítrico 0,2% ou de hipoclorito de Sódio 0,5% durante no mínimo 60 minutos. Após esse período, conforme o material, pode ser descartado ou reutilizado após devida higienização;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.3.10. Retenção de Itens de Ensaio

- a) As amostras de soros podem ser descartadas após um período mínimo de 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.
- b) Durante o período de armazenamento as amostras devem ser armazenadas congeladas em temperatura de no máximo -10°C

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Equine Infectious Anaemia, CHAPTER 3.6.6. Version (NB: version adopted in May 2019). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2021, versão on line. Disponível em: <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>. Acesso em 15 de ago. de 2021

ISSEL C.J.S., SCICLUNA MT., COOK S.J., COOK R.F., CAPRIOLI A., RICCI I., ROSONE F., CRAIGO J. K., MONTELARO R.C., AUTORINO G.L. CHALLENGES AND PROPOSED SOLUTIONS FOR MORE ACCURATE DIAGNOSIS OF EQUINE INFECTIOUS ANAEMIA. *Veterinary Record*, volume 172-8, fevereiro, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3593188/> .

CAPÍTULO 2.3.2

MORMO

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico do Mormo:

1.1. Detecção da Resposta Imune

- a) Soro sanguíneo de equídeo.

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

- 2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento;
- 2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras;
- 2.1.3. As amostras deverão ser encaminhadas ao laboratório, individualmente separadas por matriz, e obedecendo a critérios de biossegurança.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

- 3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;
- 3.1.2. Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;
- 3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos;
 - a) Quando esta informação não constar na bula, o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização em temperatura ambiente;
 - b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.
- 3.1.4. Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;
- 3.1.5. O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;
- 3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada.

3.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.2.1. Materiais

- a) Béqueres;
- b) Caneta para identificação de vidraria;
- c) Cubas para descarte de materiais resistentes à autoclavação;

- d) Descartador de ponteiros;
- e) Erlenmeyers;
- f) Luvas para procedimentos;
- g) Papel absorvente;
- h) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- i) Placa auxiliar de 96 poços para diluição das amostras;
- j) Ponteiros descartáveis;
- k) Provetas graduadas;
- l) Reservatórios para soluções (cubetas);
- m) Selador ou tampa para placas de ELISA.

3.2.2. Equipamentos e Instrumentos

- a) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- b) Agitador de microplacas (opcional);
- c) Autoclave;
- d) Cronômetro;
- e) Estufa;
- f) Freezer -20°C;
- g) Lavadora de microplacas (opcional);
- h) Leitora de ELISA;
- i) Micropipetas monocal e multicanal de volumes reguláveis;
- j) Pipetador automático ou manual;
- k) Refrigerador;
- l) Termômetros.

3.2.3. Insumos

- a) Kits de ELISA de detecção de anticorpos para *Burkholderia mallei*.

3.2.4. Soluções

- a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados;
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;
- d) Diluir as soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5. Realização do Ensaio

- a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;
- b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;
- c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;
- d) Utilizar ponteiros distintas para cada controle e amostra de soro;
- e) Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;

- f) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;
- g) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2.6. Critérios de Aceitação do Ensaio

- a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos Resultados

- a) De acordo com as DOs obtidas, após realização do cálculo determinado pelo fabricante, consideram-se os resultados Positivo, Negativo ou outra opção indicada na bula do kit;
- b) As amostras com resultados diferentes de negativos no ELISA deverão ser encaminhadas para o Laboratório Federal de Defesa Agropecuário (LFDA) designado para realizar a confirmação através do ensaio complementar de WB, prevalecendo o resultado deste;
- c) Os laboratórios credenciados deverão encaminhar as amostras para realizar a confirmação no prazo máximo de 3 dias úteis.

3.2.8. Emissão dos Resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como Positivo ou Negativo ou de acordo com o preconizado pelo fabricante do insumo (kit de diagnóstico);
- b) Uma cópia do Relatório de Ensaio deve ser arquivada no laboratório por um período mínimo de 5 anos, após sua emissão;
- c) O laboratório credenciado deve anexar a “Requisição para Diagnóstico” de cada animal ao Relatório de Ensaio.

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.2.10 a);
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- c) Após este período o material deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte;
- e) Realizar a conferência das amostras antes do descarte e registrar em formulário próprio.

3.2.10. Retenção de Itens de Ensaio

- a) Amostras de soro poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio.

3.3. Ensaio de Fixação de Complemento (FC)

3.3.1. Materiais

- a) Balão de fundo chato;

- b) Caneta tipo retroprojektor ponta fina;
- c) Cuba para banho de gelo;
- d) Cubetas para reagentes;
- e) Estante para tubos de ensaio e tubos de centrifuga;
- f) Erlenmeyer;
- g) Gaze estéril;
- h) Microplacas com fundo em “U” com 96 poços;
- i) Microtubo plástico;
- j) Papel alumínio;
- k) Papel milimetrado di-Log;
- l) Papel milimetrado;
- m) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- n) Ponteiras descartáveis;
- o) Régua milimetrada;
- p) Tubo de ensaio de vidro;
- q) Tubo plástico de fundo redondo para centrifuga.

3.3.2. Equipamentos e Instrumentos

- a) Agitador de tubos;
- b) Agitador de microplacas;
- c) Autoclave;
- d) Banho-maria ($63^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$);
- e) Banho-maria ($59^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$);
- f) Banho-maria ($37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$);
- g) Centrifuga refrigerada (900x g);
- h) Cronômetro;
- i) Espectrofotômetro digital (540 nm);
- j) Estufa ($37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$);
- k) Freezer -20°C ;
- l) Pipetador automático;
- m) Micropipeta mono e multicanal de volume regulável;
- n) Refrigerador;
- o) Ultrafreezer -70°C ou nitrogênio líquido.

3.3.3. Insumos

- a) Antígeno para teste de FC para mormo;
- b) Complemento (procedência: cobaio);
- c) Controle Positivo Alto (CH);
- d) Controle Positivo Baixo (CL);
- e) Controle Negativo (CN);
- f) Hemácia de Carneiro
- g) Hemolisina (procedência: coelho);
- h) Padrão de Cianometahemoglobina (CMH).

3.3.4. Soluções

- a) Água destilada ou equivalente;
- b) Álcool 70° INPM°;
- c) Alséver;
- d) Drabkin (SD - opcional);

- e) Hipoclorito de sódio 1%;
- f) Trietanolamina de Trabalho (ST);
- g) Trietanolamina Concentrada (Solução Mãe).

3.3.5. Realização do Ensaio

3.3.5.1. Preparo das Amostras e Controles

- a) Diluir as amostras e controles com ST, de acordo com o QUADRO 1 e inativar de acordo com o QUADRO 2;
- b) Remover as amostras do banho-maria após o período de inativação e deixá-las estabilizar com a temperatura ambiente da sala de análise. Armazenar em temperatura entre 2°C e 8°C por no máximo 1 semana;
- c) Amostras inativadas em dia anterior ao ensaio devem ser inativadas novamente sob a mesma temperatura durante 10 min.

QUADRO 1 – Diluição de Amostras e Controles.

ESPÉCIE	SORO (µL)	ST (µL)	DILUIÇÃO
Todas as Espécies	80	320	1:5
Soros Controles	40	160	1:5

Fonte: LFDA-PA

QUADRO 2 – Inativação das Amostras e Controles.

ESPÉCIE	TEMPERATURA (°C)	TEMPO (MIN)
Equino	59 ± 2°C	30
Muar, Asinino e Equino Gestante	63 ± 2°C	30

Fonte: LFDA-PA

3.3.5.2. Preparo dos Reagentes

a) SUSPENSÃO DE HEMÁCIAS A 2%

I. Obtenção das Hemácias

- i. Coletar 30 mL de sangue de carneiro por punção venosa e misturar imediatamente com 30 mL de solução de Alséver estéril;
- ii. Filtrar o sangue em gaze estéril;
- iii. Aliquotar em tubos de vidro com tampa rosca (alíquotas de 10 mL);
- iv. Manter sob refrigeração por 04 dias antes do uso;
- v. Utilizar em até 06 semanas.

II. Lavagem das Hemácias

- i. Desprezar a Solução de Alséver das hemácias;
- ii. Ressuspender as hemácias em Solução de Trabalho (ST), homogeneizar por inversão suavemente e filtrar em gaze estéril;
- iii. Dividir o filtrado em dois tubos de centrífuga de 50 mL, completar o volume com ST e centrifugar a 900xg por 10 minutos em centrífuga refrigerada;
- iv. Remover o sobrenadante por inversão do tubo, completar o volume do tubo com ST, homogeneizar por inversão suavemente e centrifugar a 900xg por 10 minutos. Realizar o

procedimento de lavagem três vezes. Na última lavagem, remover o sobrenadante por sucção com cuidado para não lisar as hemácias;

- v. Ressuspender as hemácias em 40 mL de ST, acrescentando ao tubo alíquotas de 10 mL de ST. Lavar bem o tubo e transferir a suspensão para um balão de fundo chato.

Obs.1: Avaliar a coloração do sobrenadante. Se hemolisado, descartar a hemácia e repetir o procedimento com nova hemácia.

III. Padronização da Suspensão de Hemácias a 2%

- i. Pipetar 100 µL da suspensão de hemácias para um tubo de ensaio contendo 2,5 mL de água destilada ou Solução de Drabkin (SD, Instrução de preparo no Anexo I). Mixar bem invertendo e agitando para lisar as células;
- ii. Medir a Densidade Óptica (DO1) no comprimento de onda de 540 nm, em espectrofotômetro ajustado com SD ou água destilada;
- iii. Calcular o volume de ST a ser adicionado da seguinte forma:

Volume Final da Suspensão de Hemácia (VF1)

Volume de ST a ser adicionado (ST1)

$$VF1 = \frac{DO1 \times (39,9) \text{ mL}}{DO_{\text{alvo}}}$$

$$ST1 = VF1 - 39,9 \text{ mL}$$

Obs.2: O cálculo da DO alvo está demonstrado no Anexo I.

- iv. Adicionar à suspensão de hemácias o volume ST1 calculado e homogeneizar;
- v. Pipetar 400 µL da nova suspensão de Hemácias para um tubo de ensaio contendo 1,6 mL de água destilada. Mixar bem para lisar as células e medir a DO (DO2);
- vi. Calcular o volume de ST a ser adicionado da seguinte forma:

Volume Final da Suspensão de Hemácias (VF2)

ST a ser adicionado (ST2)

$$VF2 = \frac{DO2 \times (VF1 - 0,4) \text{ mL}}{0,75}$$

$$ST2 = VF2 - VF1 \text{ mL}$$

- vii. Adicionar à suspensão de hemácias o volume ST2 calculado e homogeneizar;
- viii. Repetir o procedimento do item “v”, medindo a DO3. Se a DO obtida for diferente de 0,750 (0,740 a 0,760), calcular o volume de Solução de Trabalho (ST3) a ser adicionado
- ix. Repetir os itens “vi” a “vii” até a obtenção da DO = 0,750 (0,740 a 0,760).

b) PADRÃO DE COR

I. Solução de Hemoglobina (Hg):

- i. Adicionar 18,0 mL de água destilada em um erlenmeyer;
- ii. Adicionar 6,0 mL da Suspensão de Hemácia 2%;
- iii. Mixar bem esta solução de hemoglobina para lisar as hemácias;
- iv. Adicionar 6,0 mL de Solução Mãe.

II. Suspensão de Hemácia a 0,4% (Cel)

- i. Adicionar 24,0 mL de Solução de Trabalho em balão de fundo chato;
- ii. Adicionar 6,0 mL da Suspensão de Hemácia a 2%;
- iii. Mixar gentilmente por inversão.

III. Padrão de Cor

- i. Rotular 13 tubos de ensaio com as porcentagens de hemólise e adicionar Hg e Cel, conforme o QUADRO 3;
- ii. Mixar os tubos por inversão e centrifugar a 900xg em centrífuga refrigerada por 10 minutos;
- iii. Realizar a leitura das DOs correspondentes;
- iv. Reservar os tubos correspondentes aos percentuais 0%, 25%, 50%, 75% e 100% para uso no ensaio (conservar sob 2°C a 8°C).

QUADRO 3 – Padrão de Cor.

Solução	0%	10%	20%	25%	30%	40%	50%	60%	70%	75%	80%	90%	100%
Hg (mL)	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
Cel (mL)	4,0	3,6	3,2	3,0	2,8	2,4	2,0	1,6	1,2	1,0	0,8	0,4	0

Fonte: LFDA-PA

c) SISTEMA HEMOLÍTICO (SH)

- I. Calcular o volume de Sistema Hemolítico (SH) a ser preparado, considerando que são necessários 4,8 mL de SH para cada placa e 19,2 mL para a titulação do complemento;
- II. Calcular o volume de Hemolisina (h) a ser adicionado no SH:

$$h = \left[\frac{\text{Volume de He2\%}}{\text{Título Hemolisina}} \right] \times \text{Diluição Hemolisina} \times 1000 \text{ (}\mu\text{L)}$$

Obs.3: O procedimento de titulação da hemolisina está descrito no Anexo V.

- III. Preparar o SH em balão de vidro, de acordo com as proporções abaixo:

$$\text{SH} = 50\% \text{ He2\% (mL)} + 50\% \text{ ST (mL)} + h(\mu\text{L})$$

- IV. Incubar o SH em banho-maria a 37°C±2°C por 10 minutos e armazenar sob 2°C a 8°C até o momento do uso.

d) COMPLEMENTO DE TRABALHO (CT')

- I. Calcular a diluição do Complemento de Trabalho (CT'):

$$C_T' = \left[\frac{\text{Título} \times 0,20}{2,2} \right] \div 10$$

- II. Calcular a quantidade de CT' a ser utilizada no ensaio, considerando que são necessários 2,4 mL de complemento para cada placa;

Obs.4: O procedimento de titulação do Complemento está descrito no Anexo II.

e) ANTÍGENO DE TRABALHO (AgT)

- I. Preparar o Antígeno de Trabalho (AgT) a partir da diluição do antígeno puro em ST, conforme instruções do fabricante;
- II. Calcular a quantidade de AgT a ser utilizada no ensaio, considerando que são necessários 2,4 mL de AgT para cada placa;
- III. Estocar o AgT entre 2°C e 8°C por no máximo 2 dias.

Obs.5: O procedimento de titulação do antígeno está descrito no Anexo IV.

3.3.5.3. Rotulagem das Microplacas

- a) A microplaca com os controles e padrão de cor deve ser identificada conforme FIGURA 1. Nesta placa é possível inserir 7 amostras. Para maior número de amostras identificar outras microplacas sem incluir os controles, sendo possível inserir 12 amostras, conforme FIGURA 2;

FIGURA 1 - Placa com os controles e padrão de cor.

	CH	CL	CN	Amostra	Controles/ Padrão de cor								
A 1:5												1	7
B 1:10												2	8
C 1:20												3	9
D 1:40												4	100%
E 1:80												5	75%
F1:160												6	50%
G1:320													25%
H AC													0%

Fonte: LFDA-PA

FIGURA 2 - Placa com amostras.

	Amostra											
A 1:5												
B 1:10												
C 1:20												
D 1:40												
E 1:80												
F1:160												
G1:320												
H AC												

Fonte: LFDA-PA

3.3.5.4. Execução do Ensaio na Microplaca

- a) Adicionar 25 µL dos controles (CH, CL, CN) nos poços de diluição 1:5, 1:10 e AC nas respectivas colunas, conforme FIGURA 1;
- b) Adicionar 25 µL das amostras nos poços de diluição 1:5, 1:10 e AC nas respectivas colunas, conforme FIGURA 1 e 2;

- c) Adicionar 25 µL da ST nos poços de titulação 1:10 a 1:320 e na linha AC conforme FIGURA 1 e 2;
- d) Transferir 25 µL dos controles e amostras dos poços de diluição 1:10 para 1:20, homogeneizando sempre antes da transferência. Repetir o procedimento até a diluição final (1:320) e, após a homogeneização, desprezar 25 µL;
- e) Adicionar 25 µL do antígeno (AgT) nos poços de diluição 1:5 a 1:320;
- f) Adicionar 25 µL do complemento (CT') nos poços da diluição 1:5 a 1:320 e AC;
- g) Adicionar os Controles dos Reagentes de acordo com o QUADRO 4 e conforme posicionamento na FIGURA 1;
- h) Cobrir a microplaca para minimizar a evaporação e mixar com auxílio do agitador de microplacas por 2 minutos;
- i) Incubar em refrigeração (2°C a 8°C) por 18 ± 2 horas;
- j) Após o período de incubação, adicionar 50µL do SH nos poços das diluições 1:5 a 1:320 e AC;
- k) Adicionar SH e He2% nos poços dos Controles dos Reagentes, de acordo com o QUADRO 4;
- l) Homogeneizar por inversão os tubos com Padrão de Cor reservados (0%, 25%, 50%, 75% e 100% de hemólise) e adicionar 125µL nos seus respectivos poços, conforme FIGURA 1;
- m) Cobrir a microplaca e mixar por 2 minutos com auxílio do agitador de microplacas;
- n) Incubar a microplaca em estufa a 37°C ± 2°C por 20 minutos;
- o) Mixar a microplaca por 2 minutos com auxílio do agitador de microplacas e incubar novamente a 37°C ± 2°C por 25 minutos;
- p) Incubar a microplaca em refrigeração (2°C a 8°C) por no mínimo 2 horas;
- q) Realizar a leitura da placa.

QUADRO 4 – Controle dos Reagentes.

POÇO	ST (µL)	AgT(µL)	CT' (µL)	SH (µL)	He2% (µL)
1	25	25	25	50	-
2	50	25	-	50	-
3	50	-	25	50	-
4	50	-	*25 (1:2)	50	-
5	25	25	*25 (1:2)	50	-
6	75	-	-	50	-
7	100	-	-	-	25
8	75	-	25	-	25
9	75	25	-	-	25

* Realizar a diluição 1:2 do CT' utilizando ST

Fonte: LFDA-PA

3.3.6. Critérios de Aceitação do Ensaio

- a) O resultado de ensaio será considerado válido se os Controles de Referência (CH, CL e CN) reagirem conforme o esperado e o Padrão de Cor e os Controles dos Reagentes de acordo com os QUADRO 5 e 6, caso contrário, deve ser realizado novo ensaio;
- b) Realizar a leitura dos Controles de Referência e Controles dos Reagentes comparando o percentual de hemólise com o Padrão de Cor. Interpretar os resultados baseados no QUADRO 5 e 6.

QUADRO 5 – Interpretação do Padrão de Cor

HEMÓLISE (%)	ESCORE	REAÇÃO NO POÇO
0	4+	Botão grande e sobrenadante límpido
25	3+	Botão menor que 4+ e sobrenadante levemente rosado
50	2+	Botão menor que 3+ e sobrenadante mais rosado que o anterior
75	1+	Botão menor que 2+ e sobrenadante avermelhado

<75 e >100	traços	Botão menor que 1+ e sobrenadante com avermelhado mais intenso
100	0	Botão grande e sobrenadante límpido

Fonte: LFDA-PA

QUADRO 6 – Resultado Padrão dos Controle dos Reagentes.

POÇO	RESULTADO	CONTROLE
1	0	Controle anticomplementar do antígeno
2	4+	Se houver hemólise, as hemácias estão com problema
3	0	C' livre, hemólise total
4	Traços a 3+	Verificar a força do C', 1+ é o ideal
5	Traços a 3+	Controle anticomplementar do antígeno, se houver muito C'
6	4+	Controle de hemolisina
7	4+	Controle de células
8	4+	Controle de células
9	4+	Células na presença do antígeno

Fonte: LFDA-PA

3.3.7 Interpretação dos Resultados

- Realizar a leitura das amostras testadas avaliando o percentual de hemólise do respectivo poço comparando ao Padrão de Cor (QUADRO 5). Esse percentual é baseado na cor do sobrenadante e espessura do botão;
- Determinar o resultado da amostra testada de acordo com o QUADRO 7;
- Amostra com resultado POSITIVO, SUSPEITO ou ANTICOMPLEMENTAR deve ser testada em ensaio complementar de Western Blotting (WB), prevalecendo o resultado deste;

QUADRO 7 – Resultados obtidos na Técnica de FC para Diagnóstico Sorológico de Mormo

RESULTADO	INTERPRETAÇÃO
POSITIVO	Amostra que apresenta reação a partir de 4+ (0% de hemólise) no poço correspondente à diluição 1:5. O título da amostra corresponde à diluição do último poço com reação a partir de 1+.
SUSPEITO	Amostra que apresenta reação entre 1+ a 3+ (25% e 75% de hemólise) no poço correspondente à diluição 1:5.
ANTICOMPLEMENTAR	Amostra que apresenta qualquer reação no poço AC.
NEGATIVO	Amostra com reação inferior a 1+ (75% de hemólise) no poço correspondente à diluição 1:5.

Fonte: LFDA-PA

Obs.6: Pode ocorrer esporadicamente, quando o soro possuir título muito elevado de reação positiva, o efeito “Prozona”, reagindo fortemente nos poços de títulos mais altos e não reagindo nos títulos mais baixo, nestes casos considerar o resultado como Positivo.

3.3.8 Emissão dos Resultados

- Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como NEGATIVO, POSITIVO, SUSPEITO ou ANTICOMPLEMENTAR;
- Uma cópia do Relatório de Ensaio deve ser arquivada no laboratório por um período mínimo de 5 anos, após sua emissão.

3.3.9 Descarte de Amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.3.10 a);
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução similar para descontaminação, por no mínimo de 1 hora;
- c) Após este período o material deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte;
- e) Realizar a conferência das amostras antes do descarte e registrar em formulário próprio.

3.3.10 Retenção de Itens de Ensaio

- a) Amostras de soro poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio.

3.4 Ensaio de Western Blotting (WB)

3.4.1 Materiais

- a) Bandejas com canaletas para tiras de nitrocelulose;
- b) Béqueres;
- c) Caneta para identificação de vidraria;
- d) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;
- e) Descartador de ponteiras;
- f) Erlenmeyers;
- g) Luvas para procedimentos;
- h) Papel absorvente;
- i) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- j) Pisseta;
- k) Ponteiras descartáveis;
- l) Provetas graduadas;
- m) Reservatórios para soluções (cubetas);

3.4.2 Equipamentos e Instrumentos

- a) Agitador de tubos tipo vórtex;
- b) Agitador tipo rocker oscilante;
- c) Balança;
- d) Cronômetros;
- e) Destilador ou Deonizador de água;
- f) Freezer -20°C;
- g) Micropipeta mono e multicanal de volume regulável;
- h) Pipetador automático ou manual;
- i) Refrigerador.

3.4.3 Insumos

- a) Kit de WB de detecção de anticorpos para *Burkholderia mallei*.

3.4.4 Soluções

- a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante ou aqueles por ele indicados;

- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;
- d) Diluir a soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.4.5 Realização do Ensaio

- a) Preencher o formulário de acompanhamento do ensaio, incluindo as amostras e os controles negativo e positivo;
- b) Preparar as soluções e diluições necessárias conforme as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado;
- c) Colocar uma tira em cada uma das canaletas da bandeja de incubação usando uma pinça plástica;
- d) Adicionar o diluente da amostra em cada canaleta;
- e) Distribuir o controle negativo, o controle positivo e as amostras nas canaletas apropriadas, conforme o formulário de acompanhamento do ensaio;
- f) Para permitir que a reação se inicie simultaneamente em todas as canaletas, posicione o agitador durante a adição dos soros de tal forma que as bandejas fiquem inclinadas num ângulo de aproximadamente 30°. Posicione as tiras na parte superior da canaleta para que não tenham contato com o diluente na parte inferior, onde se faz a adição das amostras e dos soros controle;
- g) Verificar em todas as etapas se as tiras ficaram bem submersas e com as respectivas numerações visíveis;
- h) Incubar em temperatura ambiente sob agitação;
- i) Descartar o diluente da amostra e realizar a lavagem das tiras com a solução de lavagem. Repetir 3 vezes o procedimento e secar as bandejas batendo-as emborçadas sobre papel toalha. Evitar que transborde o líquido de uma canaleta à outra durante a eliminação do diluente;
- j) Antes de finalizar a terceira etapa de lavagem, diluir o conjugado e distribuir em todas as canaletas posicionando as bandejas conforme o item “f”;
- k) Incubar em temperatura ambiente sob agitação;
- l) Descartar o Conjugado e realizar a lavagem das tiras;
- m) Antes de finalizar a terceira etapa de lavagem, preparar o Substrato e distribuir em todas as canaletas, posicionando as bandejas conforme o item “f”;
- n) Incubar em temperatura ambiente sob agitação;
- o) Descartar o Substrato e lavar as tiras com abundante água deionizada e/ou destilada para interromper a reação. Por último, secar muito bem as bandejas batendo-as emborçadas sobre papel toalha;
- p) Deixar as tiras secarem em temperatura ambiente dentro das bandejas;

3.4.6 Critérios de Aceitação do Ensaio

- a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se os controles atenderem às especificações do fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.4.7 Interpretação dos Resultados

- a) De acordo com a ausência, presença e intensidade de bandas, consideram-se os resultados NEGATIVO ou POSITIVO, levando em conta o recomendado na bula do kit.

3.4.8 Emissão dos Resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como NEGATIVO ou POSITIVO;

- b) Uma cópia do Relatório de Ensaio deve ser arquivada no laboratório por um período mínimo de 5 anos, após sua emissão.

3.4.9 Descarte de Amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.4.10 a);
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução similar para descontaminação, por no mínimo de 1 hora;
- c) Após este período o material deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte;
- e) Realizar a conferência das amostras antes do descarte e registrar em formulário próprio.

3.4.10 Retenção de Itens de Ensaio

- a) Amostras de soro poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio.

Referências Bibliográficas

Glanders and Melioidosis, CHAPTER 3.6.11. Version (NB: Version adopted in May 2018). **Manual Of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em 18 de agosto de 2021.

National Veterinary Services Laboratories – NVSL. United States Department of Agriculture. **Protocol for Evaluation of Antigen Used in The Complement Fixation Test for Diagnosis of Glanders Caused by Burkholderia mallei – Microtitration Method**. Ames, 1997. 29 p.

ANEXO I

DETERMINAÇÃO DA DO ALVO PARA SUSPENSÃO DE HEMÁCIA DE CARNEIRO

- Solução de Drabkin (SD):** Preparar uma diluição 1:100 do Drabkin em água deionizada. Essa solução é estável por 2 meses em frasco escuro. Descartar se apresentar turvação ou precipitados.
- Padrão de Hemoglobina (HS):** Adicionar 0,1 mL de solução padrão de hemoglobina em 12,5 mL de solução de Drabkin. Mixar bem.
- Procedimento:**
 - Rotular 5 tubos para as concentrações de 80, 60, 40, 20 e 0 mg% de CMH e adicionar SD e HS nos tubos de acordo com o QUADRO 1;

QUADRO 1. Concentração de CMH (mg%)

SOLUÇÃO	CONCENTRAÇÃO CMH (mg%)				
	80	60	40	20	0
HS (mL)	4,0	3,0	2,0	1,0	0,0
SD (mL)	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0

Fonte: LFDA-PA

- Zerar o espectrofotômetro com o tubo 0,0 mg% CMH (solução de Drabkin);
- Fazer 3 leituras de densidade óptica (DO) de cada tubo, zerando aparelho entre as sequências de leituras;
- Calcular a média das leituras das DOs de cada tubo e depois a soma das médias, conforme exemplo do QUADRO 2;

QUADRO 2. Exemplo da Média de Leitura das DOs.

TUBO	CONCENTRAÇÃO CMH (mg%)	MÉDIA DAS DO
1	80	0,492
2	60	0,369
3	40	0,246
4	20	0,128
Soma	200	1,236

Fonte: LFDA-PA

- Calcular o Fator de Instrumento (FI), conforme fórmula a seguir:

$$FI = \frac{\sum CMH \text{ mg\%/DO}}{\sum \bar{X} DO}$$

- Exemplo baseado no QUADRO 2:

$$FI = \frac{200 \text{ mg\%}}{1,236} = 161,81 \text{ mg\%/DO}$$

g) Calcular a Densidade Óptica Alvo (DO_{alvo}), conforme fórmula a seguir e utilizando o QUADRO 3:

$$DO_{alvo} = \frac{\text{Padrão CMH}\%}{FI}$$

QUADRO 3. Padrão CMH mg%

SUSPENSÃO DE HEMÁCIA (%)	PADRÃO CMH (mg%)
2,0	25,03
2,8	35,04
3,0	37,54

Fonte: LFDA-PA

h) Exemplo baseado no QUADRO 2 para Suspensão de Hemácia a 2%:

$$DO_{alvo} = \frac{25,03}{161,83} = 0,15$$

ANEXO II

TITULAÇÃO DO COMPLEMENTO (C')

1. Realizar a diluição 1:10 do complemento puro: adicionar 9,0 mL de Solução de Trabalho e 1,0 mL de complemento no tubo de ensaio devidamente identificado (C'1:10). Homogeneizar a solução por inversão ou com agitador de tubos e deixar estabilizar por 20 minutos em banho de gelo. O C' 1:10 pode ser estocado a -70°C, e, uma vez descongelado a sobra deve ser descartada;

Obs.1: Todo o procedimento de Titulação do Complemento deve ser realizado em banho de gelo.

2. Preparar diluições a partir do C'1:10 de acordo com o QUADRO 1. Realizar no mínimo três diluições indicadas na TABELA e identificar os tubos de ensaio com o título da diluição realizada. Homogeneizar as soluções por inversão ou com agitador de tubos e deixar estabilizar por 20 minutos em banho de gelo;

QUADRO 1 – Diluição do Complemento.

TÍTULO	C' 1:10 (mL)	ST (mL)
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

Fonte: LFDA-PA

3. Para cada diluição realizada, identificar uma série de quatro tubos de ensaio com título e numeração de 3 a 6. Por exemplo: para o título 200 identificar 4 tubos (C'200/3, C'200/4, C'200/5, C'200/6);
4. Distribuir os reagentes nos tubos conforme o QUADRO 2;

QUADRO 2: Titulação do Complemento.

SOLUÇÃO	TUBO 3	TUBO 4	TUBO 5	TUBO 6
ST (mL)	1,2	0,8	0,4	0,0
C' Diluído (mL)	1,2	1,6	2,0	2,4
SH (mL)	1,6	1,6	1,6	1,6

Fonte: LFDA-PA

5. Homogeneizar os tubos por inversão e colocá-los em banho-maria a 37°C±2°C por 15 minutos. Homogeneizar novamente e recolocá-los em banho-maria a 37°C±2°C por mais 15 minutos;
6. Centrifugar os tubos a 900xg por 10 minutos em centrífuga refrigerada;
7. Ler a DO de cada tubo em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm;
8. O título do C' a ser utilizado no ensaio será aquele que apresentar DO inferior ao percentual de hemólise de 50% nas duas primeiras diluições e DO superior a 50% de hemólise nas duas últimas diluições;

Obs.2: Quando o título do complemento estiver entre dois valores do QUADRO 1, utilizar o título intermediário (Exemplo: entre 500 e 600, utilizar o título médio de 550).

9. Construir o gráfico logarítmico da titulação do C' , conforme descrito no ANEXO III (opcional).

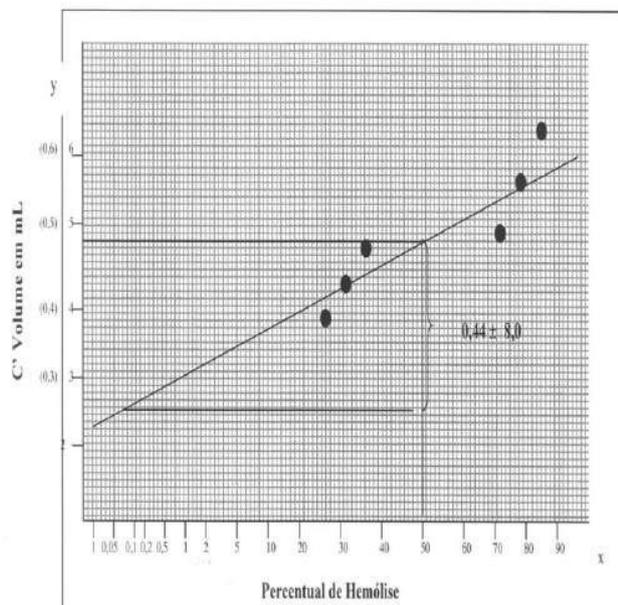
ANEXO III

CONSTRUÇÃO DE GRÁFICO LOGARÍTMICO DA TITULAÇÃO DO COMPLEMENTO (C')

1. Construir o gráfico em papel milimetrado di-log, onde o eixo "Y" corresponde ao volume de C' em mL e o eixo "X" ao percentual de Hemólise;
2. No eixo "Y" marcar os números logarítmicos 3, 4, 5 e 6, correspondentes aos tubos 3, 4, 5 e 6, que equivalem a 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mL de C';
3. Determinar o percentual de hemólise para os tubos 3, 4, 5 e 6 referentes ao Complemento cujo título foi selecionado, através de regra de três simples entre as DOs obtidas de cada tubo e as DOs do percentual de hemólise do Padrão de Cor correspondente. No eixo "X" marcar o valor correspondente ao percentual de hemólise calculado de cada tubo;
4. Marcar no gráfico, o ponto de interseção entre o número logarítmico (eixo "Y") com seu respectivo percentual de hemólise (eixo "X");
5. Traçar uma reta entre os dois primeiros pontos de interseção encontrados e traçar outra reta entre os dois últimos pontos e marcar o ponto médio em cada reta obtida;
6. Traçar uma nova reta entre os pontos médios obtidos;
7. Marcar o ponto médio da diagonal e a partir deste ponto traçar uma reta até o eixo "Y" para determinar a inclinação da reta diagonal. A inclinação aceitável é de $4,4 \pm 20\%$ (0,44mL). Se a inclinação não estiver dentro deste parâmetro, repetir a titulação do C' com novo lote de hemácia preservada;
8. Exemplo de gráfico conforme FIGURA 1.

FIGURA 1 – Gráfico logarítmico.

Fonte: NVSL, 1997.



Obs.1: O gráfico é válido quando os dois primeiros pontos (3 e 4) estão à esquerda e os dois últimos pontos (5 e 6) estão à direita, considerando o ponto 50% de hemólise no eixo "X".

Obs.2: Quando o melhor título do complemento a ser utilizado no ensaio for um título intermediário, não previsto nas titulações realizadas, deverá ser utilizado o título médio, não sendo possível a construção do gráfico.

ANEXO IV

TITULAÇÃO DO ANTÍGENO

1. Preparação do Soro Controle

- a) Diluir 80 µL do soro controle de médio a baixo título em 320 µL de solução de trabalho (ST) e inativá-lo por 30 min. a 59°C ± 2°C. Após este período, estabilizar o soro a temperatura ambiente.

2. Preparação do Antígeno

- a) Diluir 40 µL do antígeno concentrado em 600 µL de ST para obter a diluição de 1:16. A diluição inicial e seriada do antígeno poderá variar de acordo com o fabricante e lote utilizados;
- b) Rotular quatro microtubos de 1,5 mL com as diluições 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256 e adicionar 300 µL de ST em cada um;
- c) Transferir 300 µL do antígeno 1:16 para o tubo 1:32. Homogeneizar e transferir 300 µL para o tubo 1:64. Repetir o procedimento até a diluição final (1:256) e, depois de homogeneizar, desprezar 300 µL;
- d) O antígeno pode ser utilizado até 5 dias após ter sido diluído. Durante este tempo, deve ser mantido refrigerado (2°C a 8°C).

3. Preparação do Complemento

- a) Titular o complemento conforme Anexo II;
- b) Preparar 1,5 mL do complemento com o título encontrado;
- c) Rotular dois microtubos de 1,5 mL com as diluições ½ e ¼ do C' e adicionar 200 µL de ST em cada um;
- d) Transferir 200 µL do complemento C' para o tubo ½ do C', homogeneizar e transferir 200 µL para o tubo ¼ do C'. Depois de homogeneizar, desprezar 200 µL.

4. Preparação dos Reagentes

- a) Preparar Suspensão de Hemácia a 2%, Padrão de Cor e Sistema Hemolítico (SH) conforme itens 3.3.5.2 a), b) e c) do capítulo 2.3.2.

5. Execução da Titulação do Antígeno

5.1 Rotulagem da Microplaca

QUADRO 1 - Placa para titulação do antígeno.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Diluição do Antígeno	Diluição do Soro							Controle AC				
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	C'	1/2C'	1/4C'		
A 1:16												100%
B 1:32												75%
C 1:64												50%
D 1:128												25%
E 1:256												0%
F ST												
G												
H												

Fonte: LFDA-PA

5.2 Adição dos Reagentes na Microplaca

- a) Adicionar 25 µL do soro controle inativado nas colunas 1 e 2 (1:5 e 1:10) nas linhas A até E;
- b) Adicionar 25 µL de ST nas colunas 2 até 7 (1:10 até 1:320) nas linhas A até E;
- c) Transferir 25 µL do soro controle dos poços de diluição 1:10 (coluna 2) para 1:20 (coluna 3), homogeneizando sempre antes da transferência. Repetir o procedimento até a diluição final na coluna 7 (1:320) e, depois de homogeneizar, desprezar 25 µL;
- d) Adicionar 25 µL do soro na diluição 1:5 no primeiro poço da linha F;
- e) Adicionar 25 µL de ST nas colunas 8, 9 e 10 (controle AC);
- f) Adicionar 25 µL de cada diluição do antígeno nas linhas correspondentes (A até E) nas colunas 1 até 10 (QUADRO 1);
- g) Adicionar 25 µL de ST nos poços 1F, 8F, 9F e 10F;
- h) Adicionar 25 µL do complemento C' nas colunas 1 até 8 e linhas de A até E, e nos poços 1F e 8F (QUADRO 1);
- i) Adicionar 25 µL do complemento C' diluído 1/2 na coluna 9 e linhas de A até F, e 25 µL do C' diluído 1/4 na coluna 10, linhas de A até F (QUADRO 1);
- j) Cobrir as placas para minimizar a evaporação e mixar com auxílio do agitador de microplacas por 2 minutos;
- k) Incubar em refrigeração (2°C a 8°C) por 18h ± 2 h;
- l) Após o período de incubação, adicionar 50 µL do SH em todos os poços (QUADRO 1);
- m) Homogeneizar por inversão os tubos com Padrão de Cor reservados (0%, 25%, 50%, 75% e 100% de hemólise) e adicionar 125 µL nos seus respectivos poços, conforme QUADRO 1;
- n) Cobrir a placa e mixar por 2 minutos com auxílio do agitador de microplacas;
- o) Incubar a placa em estufa a 37°C ± 2°C por 20 minutos;
- p) Mixar a placa por 2 minutos para ressuspender as células não lisadas e incubar novamente a 37°C ± 2°C por 25 minutos;
- q) Deixar a placa no mínimo 2 horas em refrigeração (2°C a 8°C).

5.3 Leitura

- a) Realizar a leitura do resultado de cada poço avaliando o percentual de hemólise comparado ao Padrão de Cor, conforme item 3.3.7 a) do capítulo 2.3.2;
- b) A diluição a ser utilizada no teste diagnóstico deve ser o dobro da diluição mais sensível na titulação. A diluição do antígeno escolhida deve mostrar 100% de hemólise (0) com o C' e 1/2C' e pelo menos 50% de hemólise (>2+) com 1/4C'. O soro que apresentar reação anticomplementar no poço 1F, não deve ser utilizado para titulação do antígeno.
- c) A leitura da placa está exemplificada no QUADRO 2. No exemplo do QUADRO 2, a diluição mais sensível do antígeno é 1:64. No teste de diagnóstico, o antígeno é utilizado com o dobro desta concentração (1:32 no exemplo fornecido).

QUADRO 2 – Exemplo de Leitura da microplaca, em percentual de hemólise expressa em cruzes.

Diluição do Antígeno	Diluição do Soro							Controle AC			11	12
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
A 1:16	4+	4+	4+	1+	0	0	0	0	0	2+		0
B 1:32	4+	4+	4+	4+	1+	0	0	0	0	3+		1+
C 1:64	4+	4+	4+	3+	2+	0	0	0	0	3+		2+
D 1:128	4+	4+	4+	4+	1+	0	0	0	0	3+		3+
E 1:256	1+	3+	4+	1+	0	0	0	0	0	3+		4+
F ST	0							0	0	3+		
G												
H												

Fonte: LFDA-PA

ANEXO V

TITULAÇÃO DA HEMOLISINA

1. Diluição do Complemento (C')

- a) Preparar a diluição do Complemento 1:10 e deixar estabilizar por 20 minutos;
- b) Preparar as diluições 1:200, 1:250 e 1:300 e deixar estabilizar por mais 20 minutos de acordo com o item 2 do Anexo II.

2. Diluição da Hemolisina (HL)

- a) Preparar a HL a 1:10: pipetar 100 µL de HL pura em 900 µL de solução salina 0,85% (essa solução pode ser estocada para uso na prova);
- b) Preparar a HL a 1:100: pipetar 200 µL de HL 1:10 em 1800 µL de solução de trabalho (ST);
- c) Preparar a HL a 1:1000: pipetar 2 mL de HL 1:100 em 18 mL de solução de trabalho (ST);
- d) Rotular sete tubos e diluir a hemolisina conforme o QUADRO 1:

QUADRO 1 – Diluição da Hemolisina

DILUIÇÃO	HL 1:1000 (mL)	ST (mL)
1:1500	2,0	1,0
1:2000	2,0	2,0
1:2500	2,0	3,0
1:3000	1,0	2,0
1:4000	1,0	3,0
1:8000	1,0	7,0
1:16000	0,5	7,5

Fonte: LFDA-PA

3. Preparação do Sistema Hemolítico

- a) Rotular oito tubos e pipetar 2,0 mL de cada diluição da HL e 2,0 mL de Hemácia 2%, conforme o QUADRO 2;

QUADRO 2 - Preparo do Sistema Hemolítico para cada Diluição da Hemolisina.

TUBO	HL (mL)	Hemácia 2%(mL)
1:1000	2,0 da HL 1:1000	2,0
1:1500	2,0 da HL 1:1500	2,0
1:2000	2,0 da HL 1:2000	2,0
1:2500	2,0 da HL 1:2500	2,0
1:3000	2,0 da HL 1:3000	2,0
1:4000	2,0 da HL 1:4000	2,0
1:8000	2,0 da HL 1:8000	2,0
1:16000	2,0 da HL 1:16000	2,0

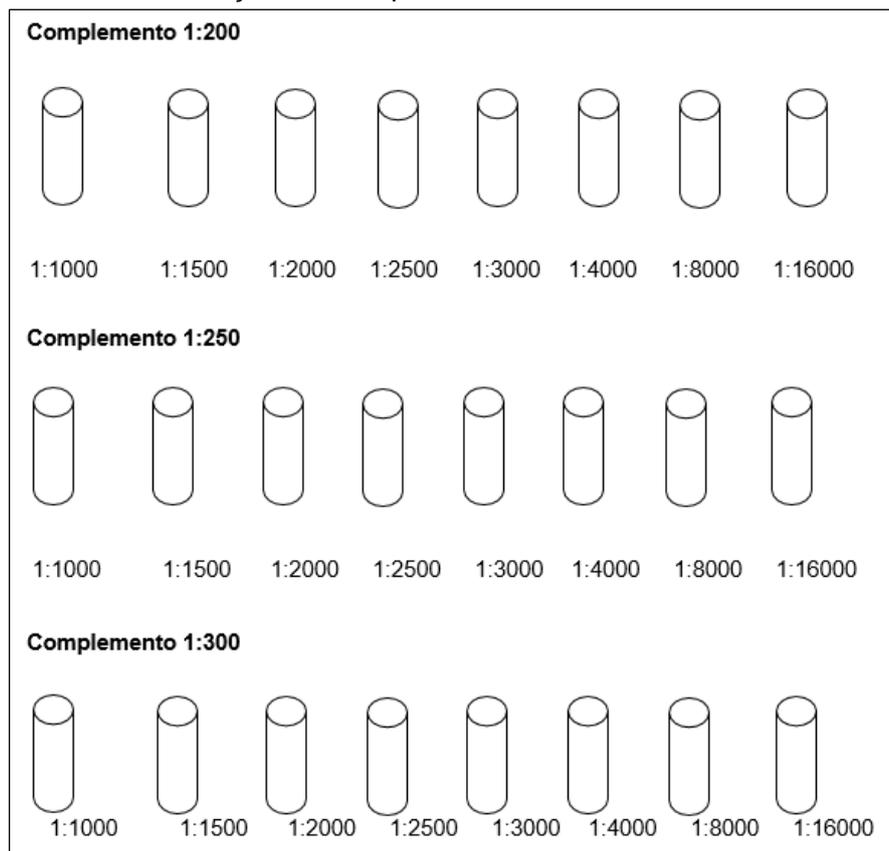
Fonte: LFDA-PA

- b) Homogeneizar em vórtex ou por inversão e incubar em banho-maria a 37 °C por 10 minutos.

4. Titulação da Hemolisina

- a) Preparar uma série de oito tubos para cada diluição do complemento, conforme a FIGURA 1;

FIGURA 1 – Diluição do Complemento



Fonte: LFDA-PA

- b) Adicionar 800 µL de STT em cada tubo;
- c) Adicionar 400 µL de cada diluição do complemento na série correspondente;
- d) Adicionar 800 µL de SH obtido do QUADRO 2 para cada série de diluição de hemolisina correspondente;
- e) Homogeneizar cada tubo em vórtex ou por inversão e incubar em banho-maria a 37°C por 15 minutos;
- f) Retirar os tubos do banho-maria, homogeneizar e incubar no banho-maria a 37°C por mais 15 minutos;
- g) Centrifugar por 900 x g por 10 minutos;
- h) Realizar a leitura das DOs (540 nm) em espectrofotômetro.

5. Construção do Gráfico

- a) Calcular o percentual de hemólise de cada tubo da titulação de HL comparando com o padrão de cor (PC):

$$\% \text{ Hemólise (tubo)} = \frac{\text{DO (tubo)} \times \% \text{ Hemólise (PC)}}{\text{DO (PC)}}$$

- b) Em papel milimetrado, traçar uma reta com uma régua milimetrada a partir do ponto zero, na horizontal (eixo X) para o lado direito, marcar no ponto de 20 cm a diluição 1:1000;
- c) Para calcular os demais pontos do eixo X, dividir 20000 por cada diluição, conforme o QUADRO 3;

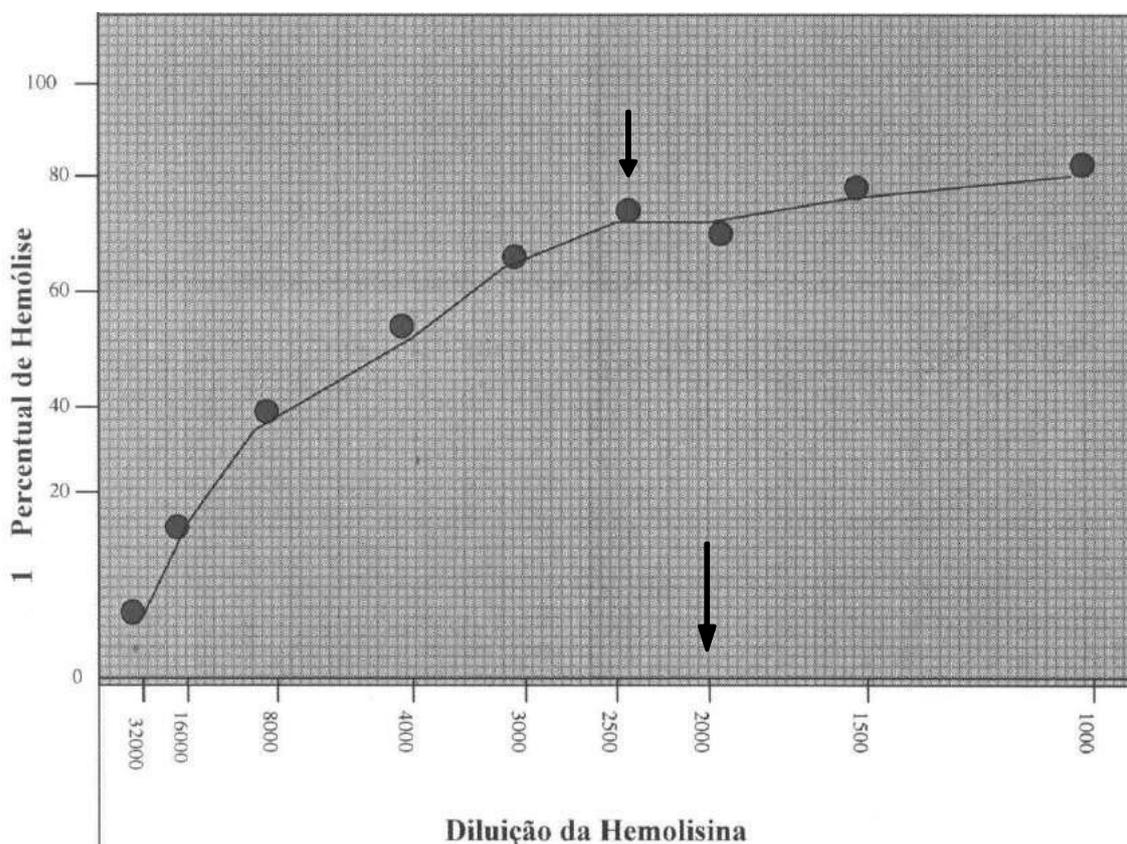
QUADRO 3 – Cálculo dos pontos no eixo X.

DILUIÇÃO HL	1000	1500	2000	2500	3000	4000	8000	16000
cm	20	13,3	10	8	6,7	5	2,5	1,25

Fonte: LFDA-PA

- d) Na reta vertical (eixo Y), marcar os percentuais de hemólise (10% a 100%), com espaço de dois em dois quadrantes (2 cm em 2 cm);
- e) Marcar os pontos e traçar o gráfico;
- f) O ponto ótimo será aquele que mostrar uma estabilidade (FIGURA 2). A titulação final da HL será o ponto seguinte do platô.

FIGURA 2 – Titulação da Hemolisina.



Fonte: NVSL, 1997.

ANEXO VI

PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

1. SOLUÇÃO SALINA (0,85%)

1.1. Materiais e equipamentos

- a) Espátula e recipiente para pesagem;
- b) Béquer 500 mL;
- c) Balão volumétrico 1000 mL;
- d) Bastão de vidro;
- e) Frasco estéril 1000 mL (2X);
- f) Barra magnética;
- g) Agitador magnético;
- h) Balança analítica;
- i) Autoclave ou membrana de filtração 0,22 µm, seringa estéril e cabine de segurança biológica

1.2. Componentes

- a) Cloreto de sódio (NaCl) 8,5 g;
- b) Água deionizada q.s.p. 1000 mL

1.3. Instrução de Preparo

- a) Pesar o NaCl e dissolver em aproximadamente 500 mL de água deionizada;
- b) Completar o volume até 1000 mL;
- c) Esterilizar a 121°C por 15 minutos ou filtrar por membrana com porosidade de 0,22 µm (separar uma alíquota para a medição do pH); Observação: Não é necessário verificar o pH;
- d) Armazenamento: 2°C a 8°C;
- e) Prazo de validade: 03 meses.

2. SOLUÇÃO DE ALSÉVER

2.1. Materiais e equipamentos

- a) Espátula e recipiente para pesagem;
- b) Béquer 200 mL;
- c) Balão volumétrico 200 mL;
- d) Bastão de vidro;
- e) Balão de fundo chato 500 mL (2X);
- f) Barra magnética;
- g) Balança analítica;
- h) Agitador magnético;
- i) Medidor de pH;
- j) Autoclave ou membrana de filtração 0,22 µm e seringa estéril;
- k) Cabine de segurança biológica.

2.2 Componentes

- a) Glicose 3,74 g;
- b) Citrato de sódio anidro ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 1,6 g;
- c) (ou Citrato de sódio diidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1,82 g;
- d) Ácido cítrico monoidratado ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,11 g;
- e) (ou Ácido cítrico anidro ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0,10 g;
- f) Cloreto de sódio (NaCl) 0,84 g;

g) Água deionizada q.s.p. 200 mL.

2.3 Instrução de Preparo

- a) Pesar os componentes e dissolver separadamente os sais em mais ou menos 100 mL de água deionizada (se necessário aquecer para completa dissolução);
- b) Adicionar a glicose e completar o volume com água deionizada até 200 mL;
- c) Autoclavar a 115 °C durante 15 minutos ou filtrar por membrana com porosidade de 0,22 µm (separar uma alíquota para a medição do pH);
- d) O pH após esterilização deve estar entre 6,1 e 6,3;
- e) Armazenamento: 2°C a 8°C;
- f) Prazo de Validade: 07 dias.

3. SOLUÇÃO CONCENTRADA DE TRIETANOLAMINA (SOLUÇÃO MÃE)

3.1 Materiais e equipamentos

- a) Espátula e recipiente para pesagem;
- b) Béquer 600 mL;
- c) Balão volumétrico 100 e 500 mL;
- d) Pipeta graduada 10 mL;
- e) Bastão de vidro;
- f) Frasco com tampa;
- g) Barra magnética;
- h) Balança analítica;
- i) Agitador magnético;
- j) Medidor de pH.

3.2 Componentes

- a) Trietanolamina 14 mL;
- b) Solução de Ácido clorídrico 1 mol/L (HCl) 90 mL;
- c) Cloreto de sódio (NaCl) 37,5 g;
- d) Cloreto de magnésio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) 0,5g (ou Cloreto de magnésio anidro 0,235 g);
- e) Cloreto de cálcio anidro ($CaCl_2$) 0,075 g (ou Cloreto de cálcio diidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 0,10 g);
- f) Água deionizada q.s.p. 500 mL.

3.3 Instrução de Preparo

- a) Preparar a solução de ácido clorídrico 1 mol/L (HCl) adicionando 8,3 mL de HCl (37%, 1,19 g/L) em aproximadamente 70 mL de água deionizada e completando o volume até 100 mL com água deionizada em balão volumétrico;
- b) Pesar os componentes;
- c) Dissolver o cloreto de sódio em aproximadamente 300 mL de água;
- d) Adicionar, sob agitação, na seguinte ordem: cloreto de cálcio, cloreto de magnésio e a solução de ácido clorídrico;
- e) Adicionar a trietanolamina e lavar o frasco que a contém;
- f) Completar o volume com água deionizada até 500 mL;
- g) Medir o pH da solução, que deve estar entre 6,9 e 7,7 (o pH da solução não pode ser corrigido);
- h) Armazenamento: Em frasco com tampa sob temperatura de 2°C a 8°C;
- i) Prazo de Validade: 30 dias.

Obs.1: A Trietanolamina é um líquido muito viscoso e deve ser medido cuidadosamente em proveta.

4. SOLUÇÃO DE TRIETANOLAMINA TRABALHO (SOLUÇÃO DE TRABALHO)

4.1 Materiais e equipamentos

- a) Espátula e recipiente para pesagem;
- b) Béquer 500 mL;
- c) Béquer 1000 mL;
- d) Balão volumétrico 1000 mL;
- e) Bastão de vidro;
- f) Frasco com tampa;
- g) Barra magnética;
- h) Balança analítica;
- i) Agitador magnético;
- j) Medidor de pH;
- k) Micro-ondas.

4.2 Componentes

- a) Solução concentrada de trietanolamina 100 mL;
- b) Gelatina 0,5 g;
- c) Água deionizada q.s.p. 1000 mL.

4.3 Instrução de Preparo

- a) Pesar a gelatina e dissolver a gelatina em aproximadamente 100 mL de água deionizada, aquecendo em micro-ondas por dois minutos em potência média;
- b) Acrescentar aproximadamente 500 mL de água deionizada no balão volumétrico e adicionar a solução concentrada de trietanolamina e a gelatina, lavando o becker;
- c) Completar o volume com água deionizada até o valor de 1000 mL;
- d) Medir o pH da solução, que deve estar entre 7,3 e 7,4;
- e) Se necessário, corrigir o pH com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1 N ou de ácido clorídrico (HCl) 1 N;
- f) Armazenamento: Em frasco com tampa sob temperatura de 2°C a 8°C;
- g) Prazo de validade: 30 dias.

Obs.2: Para preparar a solução de NaOH 1 N, pesar 4 g de NaOH e completar o volume para 100 mL de água deionizada em balão volumétrico. Para preparar a solução de HCl 1 N, seguir as instruções do item 3.3.a).

Secção 2.4
Suínos

CAPÍTULO 2.4.1 PESTE SUÍNA CLÁSSICA - PSC

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da Peste Suína Clássica:

1.1. Detecção da Resposta Imune

- a) Soro sanguíneo;
- b) Plasma fresco.

1.2. Identificação do Agente

- a) Sangue total;
- b) Tonsilas Palatinas;
- c) Baço;
- d) Rins;
- e) Linfonodos;
- f) Íleo;
- g) Pulmão

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais DO mapa os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2. Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos.

a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente;

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

Detecção da Resposta Imune

3.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.2 1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Ponteiras descartáveis;
- g) Descartador de ponteiras;
- h) Reservatórios para soluções (cubetas);
- i) Papel absorvente;
- j) Selador ou tampa para placas de ELISA;
- k) Caneta para identificação de vidraria;
- l) Cubas para descarte de materiais resistentes a autoclavagem.

3.2 2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Geladeira;
- c) Estufa;
- d) Termômetros
- e) Micropipetas monocal e multicanal de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Leitora de ELISA;
- h) Cronômetros;
- i) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- j) Agitador de microplacas (opcional);
- k) Lavadora de microplacas (opcional);

3.2 3. Insumos

- a) Kits de ELISA de detecção de anticorpos para o vírus da PSC.

3.2.4. Soluções

a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados;

- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;
- d) Diluir a soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar.

3.2 5. Realização do ensaio

- f) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;
- g) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;
- h) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;
- i) Utilizar ponteiros distintas para cada controle e amostra de soro;
- j) Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;
- k) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;
- l) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;
- m) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2 6. Critérios de aceitação do Ensaio

- a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos resultados

- a) De acordo com as DOs obtidas consideram-se as amostras como reagentes ou não reagentes. As amostras reagentes devem ser encaminhadas para o Laboratório Federal de Defesa Agropecuário (LFDA) designado para realizar a confirmação por Virusneutralização;
- b) Amostras com DO entre os dois pontos de corte estabelecidos serão consideradas inconclusivas e deverão ser novamente ensaiadas. Se no reensaio o inconclusivo persistir, a amostra deve ser encaminhada ao LFDA para confirmação por teste de Virusneutralização.

3.2.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, reagente, não reagente, ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.2.10. Retenção de Itens de Ensaio;

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

d) O laboratório deve assegurar a biosseguridade dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidos antes do descarte.

b) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

3.3. Teste de Virusneutralização

3.3.1. Materiais

a) Luvas para procedimentos;

b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;

c) Provetas graduadas;

d) Béqueres;

e) Erlenmeyers;

f) Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;

g) Ponteiras descartáveis;

h) Descartador de ponteiras;

i) Reservatórios para soluções (cubetas);

j) Papel absorvente;

k) Microplacas para cultivo celular em poliestireno cristal com 96 cavidades de fundo chato;

l) Caneta para identificação de vidraria;

m) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

a) Autoclave;

b) Cabine de segurança biológica classe II B1 (requisito mínimo);

c) Geladeira;

d) Freezer;

e) Estufa com atmosfera de CO₂;

f) Estufa;

- g) Banho seco ou que empregam água;
- h) Termômetros;
- i) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- j) Pipetador automático ou manual;
- k) Agitador de tubos;
- l) Microscópio invertido;
- m) Microscópio de fluorescência (para ensaios com anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína);
- n) Balança analítica;
- o) Centrífuga refrigerada.

3.3.3. Insumos

- a) Suspensão celular de linhagem sensível (PK-15 ou SK-6);
- b) Meio MEM (Meio Essencial Mínimo, reconstituído de acordo com o fabricante);
- c) Soro fetal bovino (SFB) livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma;
- d) Solução de antibióticos e antifúngicos;
- e) Anticorpo hiperimune para o vírus da PSC;
- f) Anticorpo anti-IgG de suíno marcada com isotiocianato de fluoresceína ou peroxidase;
- g) Anticorpo reagente e não reagente para os vírus da PSC e Diarréia Bovina a Vírus
- h) Cepas do vírus da PSC e da Diarréia Bovina a Vírus;
- i) Ovoalbumina Grau V;
- j) Peróxido de hidrogênio 30 % (V/V);
- k) Tween 80;
- l) Tween 20 (opcional).

3.3.4. Soluções

- a) Meio MEM com piruvato com 5% de soro fetal bovino e antimicrobianos;
- b) Solução de salina 0,15 mol/L %;
- c) Ácido cítrico 0,2 %;
- d) Solução salina 0,85 % fosfatada tamponada (PBS) pH 7,2-7,4;
- e) Solução de estoque de 3-amino-9-etil carbazol (AEC) - 0,4 %;
- f) Acetato de sódio 0,05 mol/L pH 5,0;
- g) Solução de antibióticos e antifúngicos.

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1. Incubação soro teste e vírus

- a) Incubar as amostras de soro em banho seco ou que empregam água a 56 °C por 30 minutos para inativação do complemento;
- b) Os soros deverão ser em uma ou duas colunas para se realizar a titulação da amostra;
- c) Utilizar microplacas para cultivo de células de 96 poços, com 12 colunas identificadas de 1 a 12, e 8 linhas identificadas com a letra A até H;
- d) Acrescentar 80 µL de MEM nos poços das linhas A e B e 50 µL nos demais poços da placa;
- e) Colocar 20 µL de cada amostra de soro a ser testada nos poços das linhas A (controle de toxidez) e B da microplaca. O mesmo procedimento deve ser feito com uma amostra de soro reagente e uma de soro não reagente, com fins de controle de prova;

- f) Homogeneizar e transferir 50 µL da linha B para a linha C e assim sucessivamente até a linha H. Descartar 50 µL ao final;
- g) Manter pelo menos uma coluna da microplaca para controle de células. Adicionar nesta coluna, 100 µL de MEM e 50 µL volume da suspensão celular utilizada na prova, conforme descrito no item l;
- h) Retirar um criotubo do vírus de PSC do ultrafreezer, o qual já deverá ter sido titulado pelo método de Reed-Muenchen. Este método será também empregado na titulação da diluição de trabalho do vírus (retrotitulação);
- i) Diluir o vírus de acordo com o título para que no ensaio sejam utilizados aproximadamente 100 TCID₅₀/50 µL (DT- diluição de trabalho);
- j) Adicionar 50 µL da diluição trabalho do vírus aos poços, com exceção do controle de toxidez e controle de células. Homogeneizar batendo suavemente na lateral da placa;
- k) Incubar as microplacas a 37 ° C ± 1 °C, em estufa com 5% de atmosfera de CO₂ por um período de 1 hora;
- l) Adicionar a todos os poços 50 µL de suspensão celular contendo 2 x 10⁵ células/mL com 10% SFB iniciando-se pela coluna referente ao controle de células;
- m) Incubar as microplacas a 37 ° C ± 1 °C, em estufa com 5% de atmosfera de CO₂ por 72 horas;
- n) Após o término do período de incubação, fixar as microplacas e proceder a imunocoloração.

3.3.5.2. Fixação das microplacas

- a) Descartar o meio em cuba com ácido cítrico 0,2%;
- b) Lavar a microplaca uma vez com PBS utilizando 200 µL por poço;
- c) Secar a microplacas utilizando papel toalha;
- d) Fixar as monocamadas de células incubando as microplacas em estufa com temperatura entre 70 °C a 80 °C por uma hora.

3.3.5.3. Imunocoloração das microplacas

3.3.5.3.1. Imunoperoxidase – direta

- a) Realizar titulação do anticorpo policlonal anti-PSC conjugado com peroxidase (conjugado anti-PSC), frente a um cultivo celular infectado com o vírus da PSC, para se conhecer a diluição ideal a ser utilizada na prova (diluição de trabalho).
- b) Para a diluição do anticorpo utilizar PBS, previamente tratado com 1 % de Tween e 1 % de ovoalbumina GV e para a lavagem das placas utilizar PBS tratado com 1% de Tween 80;
- c) Adicionar 50 µL da diluição de trabalho do conjugado anti-PSC a cada poço da microplaca;
- d) Incubar em estufa a 37 °C ± 1 °C por 60 minutos;
- e) Lavar a microplaca três vezes com 300 µL PBS;
- f) Imediatamente antes do uso, preparar a solução de substrato-cromógeno;
- g) Acrescentar nos poços 50 µL da solução de substrato-cromógeno em cada poço da microplaca;
- h) Manter a microplaca por 15 a 30 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz;
- i) Descartar o substrato-cromógeno e lavar a microplaca uma vez com PBS;
- j) Adicionar 50 µL de água destilada por poço da microplaca;
- k) Fazer leitura da microplaca em microscópio de luz com imagem invertida. para observação de cor vermelho escuro no citoplasma das células infectadas (FIGURA 1).

3.3.5.3.2. Imunoperoxidase – indireta

a) Realizar titulação do anticorpo policlonal anti-PSC (anticorpo primário), e do anticorpo anti-suíno conjugado com peroxidase (conjugado anti-suíno), frente a um cultivo celular infectado com o vírus da PSC, para se conhecer a diluição ideal desses anticorpos a serem utilizadas na prova (diluição de trabalho dos anticorpos).

b) Para a diluição dos anticorpos utilizar PBS, previamente tratado com 1 % de Tween 80 e 1 % de ovoalbumina GV e para a lavagem das placas utilizar PBS tratado com 1% de Tween 80;

c) Adicionar 50 µL da diluição de trabalho do anticorpo primário em cada poço da microplaca;

d) Incubar em estufa a 37 °C ± 1 °C por 60 minutos;

e) Lavar a microplaca três vezes com 300 µL de PBS;

f) Adicionar 50 µL da diluição de trabalho do conjugado anti-suíno em cada poço da microplaca;

g) Incubar novamente em estufa a 37 °C ± 1 °C por 60 minutos;

h) Lavar a microplaca cinco vezes com 300 µL de PBS;

i) Imediatamente antes do uso, preparar a solução de substrato-cromógeno;

j) Acrescentar nos poços 50 µL da solução de substrato-cromógeno em cada poço da microplaca;

k) Manter a microplaca por 15 a 30 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz;

l) Descartar o substrato-cromógeno e lavar a placa uma vez com PBS;

m) Adicionar 50 µL de água destilada por poço da microplaca;

n) Fazer leitura da microplaca em microscópio de luz com imagem invertida.

3.3.5.3.3. Imunofluorescência Direta e Indireta

A realização do ensaio com a utilização de anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína deve ser feito de acordo com o item 3.3.5., de fixação de placas com o item 3.3.5.2, e os procedimentos de imunocoloração direta e indireta realizados de acordo com os itens 3.3.5.3.1 e 3.3.5.3.2., respectivamente. A leitura da prova deve ser realizada em microscópio de fluorescência.

3.3.5.4. Retrotitulação

a) Preparar três diluições do vírus em base 10 a partir da diluição de trabalho (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). Essas três diluições serão utilizadas para a titulação da diluição de trabalho (retrotitulação);

b) Adicionar 50 µL de MEM em três colunas de uma microplaca;

c) Adicionar 50 µL de cada uma das diluições do vírus em uma coluna, começando pelo vírus mais diluído, de forma que possam ser utilizadas as mesmas ponteiros e o mesmo reservatório para todas as diluições do vírus;

d) Incubar as microplacas a 37 °C ± 1 °C, em estufa com 5% de atmosfera de CO₂ por 1 hora;

e) Adicionar a todos os poços 50 µL de suspensão celular contendo 2×10^5 células/mL com 10% SFB iniciando-se pela coluna referente ao controle de células;

f) Incubar as placas em estufa de CO₂ com 5% de atmosfera de CO₂ por 72 horas;

g) Após o término do período de incubação, fixar as placas e proceder a imunocoloração conforme descrito anteriormente nos itens 4.2.4.2 e 4.2.4.3, respectivamente;

h) Cálculo do título deve ser feito pelo método de Reed-Muenchen com base na presença ou ausência de crescimento viral nas colunas inoculadas com as diluições do vírus.

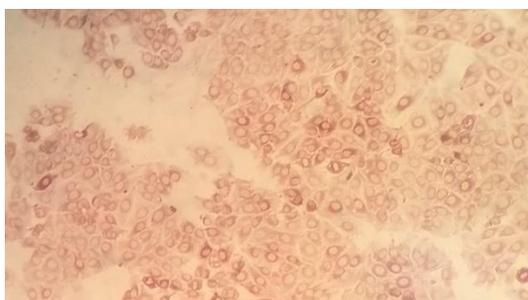
3.3.6. Critérios de aceitação da Prova

a) A prova estará válida quando a retrotitulação do vírus de prova na diluição de trabalho apresentar as doses infectantes dentro da variação $10^{2 \pm 0.5}$, que corresponde a 31 a 316 TCID₅₀/50 µL;

b) Será considerada válida a prova em que os soros controle se apresentarem dentro do comportamento esperado:

- I. Soro controle REAGENTE, caracterizado pela ausência de imunocoloração celular específica;
- II. Soro controle NÃO REAGENTE - Quando se utilizar anticorpos marcados com peroxidase, a imunocoloração celular específica é caracterizada pela presença de citoplasma corado em vermelho-tijolo ou vermelho-carmim, FIGURA 1. Em caso de se utilizar anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína, a imunocoloração celular específica é caracterizada pela presença de citoplasma corado em verde fluorescente.
- III. Controle de células apresentando tapete íntegro em todos os poços isentos de contaminação ou toxidez.

FIGURA 1 – Células PK₁₅ infectadas com o vírus da Peste Suína Clássica coradas por imunoperoxidase



Fonte: LFDA-MG

3.3.7. Interpretação dos resultados

- a) O resultado é expresso pela recíproca da diluição mais alta do soro em que houve inibição da replicação viral em 50% dos poços (QUADRO 1).
- b) A amostra será considerada tóxica quando se observar a ausência de multiplicação celular, ou destruição das células por componentes do soro no poço de controle de toxidez. Geralmente é caracterizada pela sedimentação do cultivo semeado no fundo do poço.
- c) A amostra será considerada contaminada quando se observar o crescimento bacteriano ou fúngico no poço amostra processada.
- d) O título neutralizante se expressa pela recíproca da diluição mais alta do soro em que houve inibição da replicação viral em 50% dos poços. (Quadro 1)

QUADRO 1 - Título neutralizante expresso pela recíproca da diluição mais alta do soro em que houve inibição da replicação viral em 50% dos poços.

DILUIÇÃO	TÍTULO	TÍTULO LOGARÍTMICO	POÇO
1/10	10	1	B

1/20	20	1,3	C
1/40	40	1,6	D
1/80	80	1,9	E
1/160	160	2,2	F
1/320	320	2,5	G
1/640	≥ 640	$\geq 2,8$	H

3.3.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, REAGENTE, NÃO REAGENTE, TÓXICA ou CONTAMINADA. Caso a amostra seja considerada reagente, deve ser descrito o valor do título final, que é expresso como o logaritmo da diluição em que houve 100% de Virusneutralização.

3.3.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio;

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.3.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidos antes do descarte;

b) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo ser registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

Identificação do Agente

3.4. Isolamento viral

3.4.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Placas de Petri;
- g) Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;
- h) Tubo de centrífuga;
- i) Tubos de ensaio;
- j) Ponteiras descartáveis;
- k) Descartador de ponteiras;
- l) Reservatórios para soluções (cubetas);
- m) Papel absorvente;
- n) Microplacas para cultivo celular em poliestireno com 24 cavidades de fundo chato;
- o) Microplacas para cultivo celular em poliestireno com 96 cavidades de fundo chato;
- p) Caneta para identificação de vidraria;
- q) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;
- r) Areia estéril;
- s) Filtro para seringa (0,45 µm);
- t) Gral e Pistilo;
- u) Tesoura cirúrgica e bisturi;
- v) Seringa descartável.

3.4.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica, classe II A (requisito mínimo);
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Estufa com atmosfera de CO₂;
- f) Estufa;
- g) Banho seco ou que empregam água;
- h) Termômetros;
- i) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- j) Pipetador automático ou manual;
- k) Agitador de tubos;
- l) Microscópio invertido;
- m) Microscópio de fluorescência, (para ensaios com anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína);
- n) Cronômetro;
- o) Balança analítica;
- p) Centrífuga refrigerada.

3.4.3. Insumos

- a) Suspensão celular de linhagem sensível (PK-15 ou SK-6);
- b) Meio MEM (Meio Essencial Mínimo, reconstituído de acordo com o fabricante);
- c) Soro fetal bovino (SFB), livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma;
- d) Solução de antibióticos e antifúngicos;
- e) Anticorpo hiperimune para o vírus da PSC;
- f) Anticorpo anti-IgG de suíno marcada com isotiocianato de fluoresceína ou peroxidase;
- g) Cepas do vírus da PSC;
- h) Ovoalbumina Grau V;
- i) Peróxido de hidrogênio 30 % (V/V);
- j) Tween 80 ou Tween 20.

3.4.4. Soluções

- a) Meio MEM com 5% de soro fetal bovino e tratado com solução de antibióticos e antifúngicos;
- b) Solução de salina 0,15 mol/L %;
- c) Ácido cítrico 0,2 %;
- d) Solução salina 0,85 % fosfatada tamponada (PBS) pH 7,2-7,4;
- e) Solução de estoque de 3-amino-9-etil carbazol (AEC) - 0,4 %;
- f) Acetato de sódio 0,05 mol/L pH 5,0;
- g) Solução de antibióticos e antifúngicos.

3.4.5. Realização do ensaio

3.4.5.1. Preparo das amostras

- a) Processar aproximadamente 0,5 cm³ de cada órgão e tecido;
- b) Remover o excesso de tecido conjuntivo;
- c) Recortar e macerar os fragmentos de cada órgão preparando um pool para cada requisição, utilizando gral, pistilo e MEM tratado com solução antimicrobiana até que se forme uma pasta homogênea. Pode ser utilizada areia estéril como abrasivo se necessário. Não incluir amostras de válvula íleo-cecal no isolamento de vírus para minimizar a ocorrência de contaminação;
- d) Completar o volume com MEM resultando em uma suspensão de aproximadamente 20 % (P/V);
- e) Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos;
- f) Colher o sobrenadante, filtrar e colocar em frasco devidamente identificado; descartar o precipitado;
- g) Adicionar 100 µL de solução antimicrobiana;
- h) Encaminhar 400 µL de inóculo ou de fragmentos do tecido tratado com 1,0 mL de Trizol para diagnóstico molecular.

3.4.5.2. Sangue total ou plasma

- a) Caso sejam recebidas mais de uma amostra de sangue na requisição preparar um pool com volume final de 1,0 mL. Por exemplo, para quatro amostras adicionar 250 µL de cada amostra;
- b) Adicionar 10 µL de solução antimicrobiana.

3.4.5.3. Passagens em células (suspensão celular) - imunoperoxidase

- a) Adicionar 100 µL do inóculo de macerado de tecidos e 50 µL do inóculo de sangue total em um poço da microplaca de 24 poços.
- b) Caso seja utilizada uma garrafa de 25 cm² utilizar 0,5 mL de inóculo de macerado de tecidos ou 0,1 mL de sangue total;
- c) Acrescentar 1 mL de suspensão celular com 10 % de soro fetal bovino na concentração de 300.000 células/mL;
- d) Incubar a microplaca por 48 a 72 horas em estufa de CO₂.
- e) Fazer a leitura e registrar os resultados. Os materiais em que for observada contaminação não deverão ser submetidos à segunda passagem.
- f) Congelar a microplaca e descongelar;
- g) Inocular o material da primeira passagem em microplaca de 96 poços sendo que para cada poço da microplaca de 24 poços ou garrafa deverá ser utilizada uma coluna da microplaca de 96 poços;
- h) Inocular 10 µL do inóculo nos poços A1, B1, C1 e D1;
- i) Inocular 5 µL do inóculo nos poços E1, F1, G1 e H1;
- j) Adicionar 100 µL de células em todos os poços reservando uma coluna para o controle de células e uma para o controle de vírus;
- k) Para o controle de vírus utilizar o vírus da PSC. Utilizar amostras já diluídas como controle.

3.4.5.4. Fixação das microplacas

- a) Descartar o meio em cuba com ácido cítrico;
- b) Lavar a microplaca uma vez com PBS utilizando 200 µL por poço;
- c) Secar a placa utilizando papel toalha;
- d) Fixar as monocamadas de células incubando as microplacas entre 70 °C a 80 °C por uma a três horas.

3.4.5.5. Imunocoloração das microplacas – método indireto peroxidase

- a) Adicionar 50 µL da diluição de trabalho pré-determinada do anticorpo policlonal anti-PSC aos poços utilizados diluído em PBS com 1 % de Tween e 1 % de ovoalbumina GV;
- b) Incubar em estufa sem CO₂ por 60 minutos;
- c) Lavar três vezes com PBS com 1 % de Tween 80 e uma vez com água destilada;
- d) Adicionar 50 µL da diluição pré-determinada do conjugado anti-suíno com peroxidase diluído com 1 % de tween e 1 % de ovoalbumina GV;
- e) Incubar em estufa sem CO₂ por 60 minutos;
- f) Lavar a placa cinco vezes com PBS com 1 % de Tween;
- g) Imediatamente antes do uso preparar o substrato: 0,5 mL da solução de estoque de AEC (cromógeno), 9,5 mL de acetato de sódio. Filtrar utilizado filtro de 0,45 µm e adicionar 5 µL de peróxido de hidrogênio;
- h) Acrescentar nos poços 50 µL da solução de substrato;
- i) Manter a microplaca por 15 a 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro;
- j) Descartar o substrato-cromógeno e lavar a placa uma vez com água destilada;
- k) Levar a microplaca ao microscópio de luz com imagem invertida, para observação de cor vermelho escuro no citoplasma das células infectadas (FIGURA 1).

3.4.5.6 Passagens em células (suspensão celular) - imunofluorescência

A realização do ensaio com a utilização de anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína deve ser feita de acordo com o item 3.4.5.3, 3.4.5.4 e os procedimentos de imunocoloração indireta realizados de acordo com os 3.4.5.5. A leitura da prova deve ser realizada em microscópio de fluorescência.

3.4.6. Critérios de aceitação das provas

a) As provas de identificação do agente serão consideradas válidas quando os cultivos celulares sabidamente infectados (controles DETECTADOS) apresentam imunocoloração específica e ausência de imunocoloração nos cultivos que não foram infectados (controles NÃO DETECTADOS ou de células).

3.4.7. Interpretação dos resultados

- a) Detectado - Quando se utilizar anticorpos marcados com peroxidase, a imunocoloração celular específica é caracterizada pela presença de citoplasma corado em vermelho-tijolo ou vermelho-carmim, FIGURA 1. Em caso de se utilizar anticorpos marcados com isotiocianato de fluoresceína, a imunocoloração celular específica é caracterizada pela presença de citoplasma corado em verde fluorescente.
- b) Não detectado - ausência de imunocoloração citoplasmática;
- c) A amostra será considerada contaminada quando se observar o crescimento bacteriano ou fúngico no poço amostra processada.

3.4.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, DETECTADO, NÃO DETECTADO, TÓXICA ou CONTAMINADO no isolamento viral do vírus para PSC.

3.4.9. Descarte de Amostras e Resíduo

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio;
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.4.10. Retenção de itens de ensaio

a) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

3.5. Técnica de RT-qPCR para o vírus da PSC

3.5.1 Materiais

- h) Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- i) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- j) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- k) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- l) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNases e RNases;
- m) Estantes para microtubos;
- n) Gaze ou papel toalha.

3.5.2 Equipamentos e instrumentos

- A. Autoclave;
- B. Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- C. Geladeira;
- D. Freezer;
- E. Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- F. Termociclador para PCR em tempo real;
- G. Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- H. Agitador de microtubos;
- I. Microcomputador;
- J. Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.5.3 Insumos

- f) Água livre de nucleases;
- g) Oligonucleotídeos para RT-qPCR (QUADRO 2);
- h) Controle DETECTADO para o vírus da PSC (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);
- i) Kit de RT-qPCR;
- j) Kit de extração de RNA (automática);
- k) Trizol (manual);
- l) Recomenda-se o uso de reações de passo único (*one step*) para síntese e amplificação de cDNA no mesmo tubo.

QUADRO 2: Sugestão de oligonucleotídeos para RT-qPCR para detecção molecular do vírus da PSC (VCSF)

Oligonucleotídeo	Tipo de PCR	Sequência	Referência
------------------	-------------	-----------	------------

VCSF.Hoffman.92.F	RT-qPCR	ATGCCCAYAGTAGGACTAGCA	Hoffman, 2005
VCSF.Hoffman.92.R		CTACTGACGACTGTCCTGTAC	
VCSF.Hoffman.92.P		FAM- TGGCGAGCTCCCTGGGTGGTCTAAGT- BHQ	
VCFV.Eberling.92.F	RT-qPCR	TGCCCAAGACACACCTTAACC	Eberling, 2011
VCSF.Eberling.92.R		GGCCTCTGCAGCGCCCTAT	
VCSF.Eberling.92.P		FAM-TGATGGGAGTACGACCTG-MGB/NFQ	
VCSF.Risatti.93.F	RT-qPCR	CCCTGGGTGGTCTAAG	Risatti, 2003
VCSF.Risatti.93.R		CATGCCCTCGTCCAC	
VCSF.Risatti.93.P		FAM- CTGAGTACAGGACAGTCGTCAGTA gtt-NFQ	

3.5.4 Soluções

- a) Solução de Álcool 70%;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses.

3.5.5. Realização do ensaio

3.5.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NÃO DETECTADO (água ou tecido bovino ou suíno).

3.5.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico por RT-qPCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);

- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou Álcool 70° INPM;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.5.5.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (vírus da PSC) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;
- c) A adição de DNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);
- d) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle DETECTADO para vírus da PSC;
 - II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III. Branco (água livre de nucleases);
 - IV. Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.5.5.4. Reação de RT-qPCR

- a) Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- b) Iniciar e entrar com os dados no *software* do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- c) Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- d) Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.5.6 Critérios de aceitação da prova

- a) Para a validação do ensaio, o controle DETECTADO deve apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um C_q satisfatório;
- b) O controle NÃO DETECTADO deve ter C_q indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle NÃO DETECTADO deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.5.7 Interpretação dos resultados

- a) Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle DETECTADO, controle NÃO DETECTADO, controle da extração, background de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;
- b) O limiar de C_q a ser considerado DETECTADO deve ser avaliado conforme definido na verificação desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;

- c) Amostra com resultado inconclusivo: aquelas com valor de Cq intermediário entre o valor para detectado e não detectado.
- d) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada;
- e) Amostras positivas devem ser submetidas a sequenciamento para genotipagem viral.

3.5.8 Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO”, “NÃO DETECTADO” ou “INCONCLUSIVO”
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.5.9 Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

Referências Bibliográficas

Eberling AJ, Bieker-Stefanelli J, Reising MM, Siev D, Martin BM, McIntosh MT, Beckham TR. Development, optimization, and validation of a Classical swine fever virus real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J Vet Diagn Invest.* 2011 Sep;23(5):994-8.

Hoffmann B, Beer M, Schelp C, Schirrneier H, Depner K. Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever. *J Virol Methods.* 2005 Dec;130(1-2):36-44.

Risatti GR, Callahan JD, Nelson WM, Borca MV. Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2003 Jan;41(1):500-5.

Classical Swine Fever (Infection with a Classical Swine Virus). CHAPTER 2.8.3. Version (NB: Version adopted in May 2019). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 12 de jun. de 2021

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg.* 1938; 27:493–497.

CAPÍTULO 2.4.2

PESTE SUÍNA AFRICANA - PSA

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da Peste Suína Africana:

1.1. Detecção da Resposta Imune

- a) Soro sanguíneo;
- b) Plasma fresco.

1.2. Identificação do Agente

- a) Sangue total;
- b) Tonsilas palatinas;
- c) Baço;
- d) Rins;
- e) Linfonodos;
- f) Íleo;
- g) Pulmão;

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2. Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos.

- a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente;
- b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

Detecção da Resposta Imune

3.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.2 1. Materiais

- m)** Luvas para procedimentos;
- n)** Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- o)** Provetas graduadas;
- p)** Béqueres;
- q)** Erlenmeyers;
- r)** Ponteiras descartáveis;
- s)** Descartador de ponteiras;
- t)** Reservatórios para soluções (cubetas);
- u)** Papel absorvente;
- v)** Selador ou tampa para placas de ELISA;
- w)** Caneta para identificação de vidraria;
- x)** Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.2 2. Equipamentos e instrumentos

- a)** Autoclave;
- b)** Geladeira;
- c)** Estufa;
- d)** Termômetros
- e)** Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- f)** Pipetador automático ou manual;
- g)** Leitora de ELISA;
- h)** Cronômetros;
- i)** Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- j)** Agitador de microplacas (opcional);
- k)** Lavadora de microplacas (opcional);

3.2 3. Insumos

- a)** Kits de ELISA de detecção de anticorpos para o vírus da PSA (ASFV).

3.2.4. Soluções

- a)** No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados;
- b)** Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;

- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;
- d) Diluir a soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar.

3.2 5. Realização do ensaio

- a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;
- b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;
- c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;
- d) Utilizar ponteiras distintas para cada controle e amostra de soro;
- e) Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;
- f) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;
- g) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;
- h) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2 6. Critérios de aceitação do Ensaio

- a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos resultados

- a) De acordo com as DOs obtidas consideram-se as amostras como reagentes ou não reagentes. As amostras reagentes devem ser confirmadas pela técnica de Imunoperoxidase em cultivo celular;
- b) Amostras com DO entre os dois pontos de corte estabelecidos serão consideradas inconclusivas e deverão ser novamente ensaiadas. Se no reensaio o inconclusivo persistir, a amostra deve ser testada pela técnica de Imunoperoxidase em cultivo celular;

3.2.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, reagente, não reagente, ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio;
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidos antes do descarte.

- b) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

3.3. Teste de Imunoperoxidase em cultivo celular

3.3.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;
- g) Ponteiras estéreis descartáveis;
- h) Descartador de ponteiras;
- i) Reservatórios para soluções (cubetas);
- j) Papel absorvente;
- k) Microplacas para cultivo celular em poliestireno cristal com 96 cavidades de fundo chato;
- l) Caneta para identificação de vidraria;
- m) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica classe II B1 (requisito mínimo);
- c) Geladeira;
- d) Freezer <-70 °C.;
- e) Estufa com atmosfera de CO₂;

- f) Estufa;
- g) Banho seco ou que empregam água;
- h) Termômetros;
- i) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- j) Pipetador automático ou manual;
- k) Agitador de tubos;
- l) Microscópio invertido;
- m) Balança analítica;
- n) Centrífuga refrigerada.

3.3.3. Insumos

- a) Soros controle reagente e não reagente;
- b) Linhagem celular VERO (3 x 10⁵ células/mL) com isolados adaptados de ASFV.

3.3.4. Soluções

- a) Meio MEM (Meio Essencial Mínimo, reconstituído de acordo com o fabricante);
- b) Soro fetal bovino (SFB) livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma;
- c) Solução de antibióticos e antifúngicos;
- d) Solução Salina 0,8 % Fosfatada Tamponada (PBS) pH 7,0 - 7,4;
- e) Tampão de acetato;
- f) Solução estoque de AEC - 3-aminoethyl-carbazol;
- g) Água destilada;
- h) Proteína A conjugada com peroxidase;
- i) Leite em pó desnatado;
- j) Soro Fetal Bovino (SFB);
- k) Tween-20;
- l) Peróxido de hidrogênio (H₂O₂).
- m) Solução fria de 30 % de acetona com 70 % de metanol. Estocar a <-10°C.
- n) Solução de bloqueio (PBS com 0,05 % Tween 20 e 5 % de leite em pó);
- o) Solução de substrato (Misturar 300 µL de solução estoque em 5 mL de tampão acetato e 5 µL de H₂O₂;

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1 Preparo das placas ASFV-IPT

Titular o ASFV

- a) Fazer uma suspensão de VERO com 150.000 céls/mL semeando em placas de 96 poços com 100 µL para cada poço.
- b) Incubar as células por 24 a 48 h (até obter 80 a 90 % de confluência);
- c) Descartar o sobrenadante;
- d) Diluir o vírus para inocular em uma multiplicidade de infecção (moi) de 0,025 a 0,5 conforme abaixo:

$$\frac{\text{Fator de diluição: } 0,7 \times \text{título viral} \times \text{volume de vírus por poço}}{\text{Número de células por poço} \times \text{moi}}$$

- e) Utilizar o resultado obtido acima para dividir pelo volume total de vírus necessário. Exemplo, se o resultado obtido acima for 100 e forem necessários 1000 µL de vírus, será necessário adicionar 10 µL do vírus concentrado à 990 µL de meio;
- f) Adicionar 100 µL de vírus e incubar a 37 ± 3 °C em 5 % de CO₂ por 18 ± 1 h.
- g) Retirar cuidadosamente o MEM das placas de 96 poços por aspiração ou pipetagem.
- h) Adicionar 50 µL de solução fixadora por poço;
- i) Incubar entre 8 ± 2 minutos à temperatura ambiente.
- j) Lavar as placas fixadas por 20 minutos com PBS em agitação contínua.
- k) Secar as placas à temperatura ambiente.
- l) Estocar as placas em freezer em temperatura < -10 °C (válidas por até 6 meses).

3.3.5.2 Bloqueio das placas

- a) Mantenha as placas ASFV-IPT em temperatura ambiente (18-25°C) por 30 minutos após a retirada do freezer;
- b) Bloqueie as placas adicionando 100 µL por poço de solução de bloqueio.
- c) Incubar 1 hora a 37 ± 2 °C em agitação contínua;
- d) Durante a etapa de bloqueio, pré-incube por 1 h a 37 ± 2 °C em agitação contínua as amostras e os soros de referência de ASF (controles) em duplicata em placas separadas de microtitulação de 96 poços com fundo em U, conforme o esquema a seguir:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+S											CC
B	+S											CC
C	LS											CC
D	LS											CC
E	-S											CC
F	-S											CC
G												CC
H												CC

+S: soro positivo; LS: soro limite (+S diluído); -S: soro negativo;
 CC: controle de células não infectadas pelo ASFV

- e) Preparar uma diluição de 1/40 das amostras e controles de referência ASF na solução de bloqueio com 2 % de SFB (100 µL / poço – 2,5 µL amostra + 97,5 µL);

3.3.5.3 Transferência de placas e adição conjugado

- a) Após 1 h, elimine a solução de bloqueio das placas ASFV-IPT e transfira para a placa com a pipeta multicanal as amostras pré-incubadas e os soros de referência.
- b) Incubar 45 minutos a 37 ± 2 °C em agitação contínua.
- c) Lavar três vezes adicionando 100 µL por poço de PBS 1x por 5 minutos a 37 ± 2 °C em agitação contínua. Entre as lavagens descartar o PBS e substituir por solução nova;
- d) Adicionar 100 µL por poço de conjugado diluído a 1/5000 em solução de bloqueio.

- e) Incubar 45 minutos a 37 ± 2 °C em agitação contínua.
- f) Lavar três vezes adicionando 100 µL por poço de PBS 1x por 5 minutos a 37 ± 2 °C em agitação contínua. Entre as lavagens descartar o PBS e substituir por solução nova.

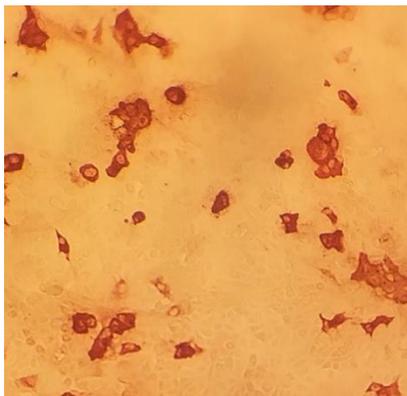
3.3.5.4. Imunocoloração das microplacas

- a) Adicionar 50 µL da solução de substrato por poço e incube 5-10 minutos à temperatura ambiente (18-25°C) ou até observar que as cavidades, principalmente se o controle positivo apresentar cor.
- b) Adicionar 100 µL por poço de PBS 1x para interromper a reação. Recomenda-se executar este passo duas vezes para evitar reações inespecíficas.
- c) Realizar a leitura no microscópio.

3.3.6. Critérios de aceitação da Prova

- a) O teste é validado quando há uma coloração citoplasmática vermelha intensa em poços de controle positivo e ausência no caso de controles negativos. Os poços de controle de limite devem ter menos coloração vermelha do que o controle positivo.

FIGURA 1 – Células Vero infectadas e adaptadas com o vírus da Peste Suína Africana coradas por imunoperoxidase



Fonte: LFDA-MG

3.3.7. Interpretação dos resultados

- a) Nos poços com amostras positivas de soro contra a ASF, o anticorpo (Ac) estará ligado ao cultivo celular infectado pelo ASFV formando o complexo Ac-Ag que é revelado através da ação da peroxidase com o substrato. Uma intensa coloração citoplasmática vermelha será observada nas células infectadas.
- b) A coloração citoplasmática vermelha intensiva é interpretada como um resultado positivo para PSA (REAGENTE) e a ausência como resultado negativo (NÃO REAGENTE).

3.3.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, reagente, não reagente.

3.3.9. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio;
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.3.10. Retenção de itens de ensaio

- a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidos antes do descarte.

- b) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

Identificação do Agente

3.4. Técnicas moleculares para o vírus da PSA

3.4.1. Materiais

- a) Microtubos de 0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL
- b) Placas de 96 poços para PCR em tempo real (sempre averiguar o equipamento disponível e a compatibilidade da placa)
- c) Selante adesivo para placas
- d) Caneta de retroprojeter
- e) Descartador
- f) Luvas descartáveis para procedimento
- g) Ponteiras com filtro
- h) Raque refrigerada

3.4.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Micropipetas;
- c) Termociclador em tempo real;
- d) Termociclador convencional;
- e) Cuba para eletroforese;
- f) Fonte para eletroforese;
- g) Transiluminador UV;

- h)** Alternativamente, os resultados de PCR convencional podem ser avaliados por outras metodologias disponíveis como equipamento automatizado;
- i)** Agitador de tubos;
- j)** Cabine de segurança biológica classe II (requisito mínimo);
- k)** Centrífuga para microtubos.

3.4.3. Insumos

3.4.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real - qPCR

- a)** Água livre de nucleases
- b)** Iniciadores e sondas descritos no QUADRO 1
- c)** Master mix para PCR em tempo real

3.4.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase PCR

- a)** Água livre de nucleases
- b)** Iniciadores e sondas descritos no QUADRO 1
- c)** Cloreto de magnésio
- d)** Tampão específico para DNA polimerase
- e)** DNA polimerase
- f)** DNTP

QUADRO 1: Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs

Oligonucleotídeo	Sequência	Referência
ASFV.OIE.F	CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA	King, 2003
ASFV.OIE.R	GATACCACAAGATCRGCCGT	
ASFV.OIE.S	FAM-CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-lowaBlack	
ASFV.EUA.63.F	GGAAACTCATTACCAAATCCTT	Zsak, 2005
ASFV.EUA.63.R	CCTCGGCGAGCGCTTTATCAC	
ASFV.EUA.S	FAM- CgATgCAAgCTTTAT-MGB/NFQ	
ASFV.Tignon2011.114.F	CCACTGGGTTGGTATTCTC	Tignon, 2011
ASFV.Tignon2011.114.R	TGCTCATGGTATTCAATCTTATCG	
ASFV.Tignon2011.114.S	FAM-TTCCATCAAAGTTCTGCAGCTCTT-lowaBlack	
ASFV.68.F	CCCAGGRGATAAAATGACTG	Fernández-Pinero., 2013
ASFV.68.R	CACTRGTTCCCTCCACCGATA	
ASFV.68.S	FAM-TCC-TGG-CCR-ACC-AAG-TGC-TT-BHQ*	
ASFV.p72.478.F	GGCACAAGTTCGGACATGT	Bastos, 2003
ASFV.p72.478.R	GTAAGTTCGGACATGT	
ASFV.CD2V.816.F	TCTGTTGATTCCCAACTATTAC	Sanna, 2017
ASFV.CD2V.816.R	ATGGCGGGATATTGGGTAGT	

*Sonda atualizada após publicação do artigo

Todas as soluções estoques de oligonucleotídeos devem ser mantidas a uma concentração de 500 μM a não ser que já venham previamente diluídas. Recomenda-se que as soluções de trabalho sejam diluídas a 10 μM ;

3.4.4. Soluções

- Solução de Álcool 70° INPM;
- Solução descontaminante de DNA e DNAses.

3.4.5. Realização do ensaio

3.4.5.1. Extração de DNA

- A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de DNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante. Os métodos manuais utilizando kits com coluna de sílica são alternativas para poucas amostras ou em caso de impossibilidade do uso dos equipamentos automáticos;
- Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;

- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NÃO DETECTADO (água ou tecido suíno).

3.4.5.2. PCR para detecção de ASFV

3.4.5.2.1. PCR em tempo real

- a) Descongelar e homogeneizar todos os reagentes
- b) Identificar os tubos ou placas
- c) Preparar o volume necessário para todas as reações em um único tubo para posteriormente dividir os volumes por reação individualmente. Seguir as instruções descritas nos QUADROS 2, 3 ou 4 e registrar todos os reagentes utilizados.
- d) Ao distribuir o volume das reações individuais, descontar o volume dos ácidos nucleicos extraídos das amostras e dos controles.
- e) Adicionar a solução de ácidos nucleicos extraídos conforme volume indicado no QUADRO 3 em local determinado no laboratório diferente daquele em que o mix de PCR foi preparado.
- f) Selar as placas ou fechar os tubos. É recomendável realizar um spin no caso de uso de placas de qPCR.
- g) Programar o termociclador conforme dados do QUADRO 5.

3.4.5.2.2. PCR Convencional

- a) Descongelar e homogeneizar todos os reagentes
- b) Identificar os tubos ou placas
- c) Preparar o volume necessário para todas as reações em um único tubo para posteriormente dividir os volumes por reação individualmente. Seguir as instruções descritas nos QUADROS 6 a 8 e registrar todos os reagentes utilizados.
- d) Ao distribuir o volume das reações individuais, descontar o volume dos ácidos nucleicos extraídos das amostras e dos controles.
- e) Adicionar a solução de ácidos nucleicos extraídos conforme volume indicado no QUADRO 3 em local determinado no laboratório diferente daquele em que o mix de PCR foi preparado.
- f) Selar as placas ou fechar os tubos. É recomendável realizar um spin no caso de uso de placas de PCR.
- g) Programar o termociclador conforme os QUADROS 9 a 11.

3.4.6. Interpretação dos resultados

3.4.6.1 qPCR

- a) Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle DETECTADO, controle NÃO DETECTADO, controle da extração, background de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;
- b) O limiar de C_q a ser considerado DETECTADO deve ser avaliado conforme definido na verificação desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;
- c) Amostra com resultado inconclusivo: aquelas com valor de C_q intermediário entre o valor para detectado e não detectado.
- d) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada;

- e) Amostras positivas devem ser submetidas a sequenciamento para genotipagem viral.

3.4.6.2 PCR convencional - PCR

- a) Os controles positivos devem apresentar bandas de acordo com o padrão esperado definido pela metodologia. Os tamanhos dos produtos de PCR para as técnicas ASFV.OIE, ASFV.p72.478, ASFV.CD2V.816 são 250, 478 e 816 pares de base.
- b) Os controles negativos não devem apresentar bandas em padrão semelhante ao dos controles positivos.
- c) Amostras com padrão de eletroforese semelhantes ao do controle positivo serão consideradas positivas, podendo ser submetidas ao sequenciamento para confirmação de acordo com critério do analista e responsável técnico.

3.4.7. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO”, “NÃO DETECTADO” ou “INCONCLUSIVO”
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.4.8. Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

3.4.9. Retenção de itens de ensaio

- a) Soro sanguíneo
- b) Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidos antes do descarte;
- c) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

Referências Bibliográficas

African Swine Fever (Infection with a African Swine Virus). CHAPTER 2.9.1. Version (NB: Version adopted in May 2019). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 12 de jun. de 2021

Bastos AD, Penrith ML, Crucièrè C, Edrich JL, Hutchings G, Roger F, Couacy-Hymann E, R Thomson G. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. Arch Virol. 2003 Apr;148(4):693-706.

CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA) - Indirect Immunoperoxidase Technique for ASF Antibody Detection, SOP/CISA/ASF/IPT/1, 7p., rev. 2018.

CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL (CISA – INIA) - Indirect Immunoperoxidase Technique for ASF Antibody Detection, SOP/CISA/ASF/IPT-plates/1, 6p, rev. 2018.

Fernández-Pinero J, Gallardo C, Elizalde M, Robles A, Gómez C, Bishop R, Heath L, Couacy-Hymann E, Fasina FO, Pelayo V, Soler A, Arias M. Molecular diagnosis of African Swine Fever by a new real-time PCR using universal probe library. Transbound Emerg Dis. 2013 Feb;60(1):48-58. doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01317.x.

Gallardo, C.; Reis, A.L.; Kalema-Zikusoka, G. Malta, J.; Soler, A.; Blanco, E.; Parkhouse, R. M. E.; Leitão, A. Recombinant Antigen Targets for Serodiagnosis of African Swine Fever. American Society for Microbiology. Vol. 16, nº 7, 2009.

King DP, Reid SM, Hutchings GH, Grierson SS, Wilkinson PJ, Dixon LK, Bastos AD, Drew TW. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. J Virol Methods. 2003 Jan;107(1):53-61.

Ribeiro EL, Oliveira AGG, Laguardia-Nascimento M, Mata CPSM, Reis JKP, Fonseca Júnior AA. Estudo comparativo e validação de três técnicas de PCR em tempo real (qPCR) para diagnóstico de Peste Suína Africana. Pesquisa Veterinária Brasileira, 2016, 36(6), 473-478.

Sanna G, Dei Giudici S, Bacciu D, Angioi PP, Giammarioli M, De Mia GM, Oggiano A. Improved Strategy for Molecular Characterization of African Swine Fever Viruses from Sardinia, Based on Analysis of p30, CD2V and I73R/I329L Variable Regions. Transbound Emerg Dis. 2017 Aug;64(4):1280-1286.

Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, Hutet E, Van der Stede Y, Kolbasov D, De Mia GM, Le Potier MF, Bishop RP, Arias M, Koenen F. Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. J Virol Methods. 2011 Dec;178(1-2):161-70.

Zsak L, Borca MV, Risatti GR, Zsak A, French RA, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Callahan JD, Nelson WM, Rock DL. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan;43(1):112-9.

CAPÍTULO 2.4.3

SÍNDROME REPRODUTIVA E RESPIRATÓRIA DOS SUÍNOS - PRRS

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico de PRRS:

1.1. Detecção da Resposta Imune

- a) Soro sanguíneo

1.2. Identificação do Agente

- a) Soro Sanguineo
- b) Sangue total;
- c) Tonsilas Palatinas;
- d) Baço;
- e) Linfonodos;
- f) Pulmão;
- g) Íleo
- h) ; Lavado bronco-alveolar
- i) Fluido Oral;

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos

a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

Detecção da Resposta Imune

3.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.2.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Ponteiras descartáveis;
- g) Descartador de ponteiras;
- h) Reservatórios para soluções (cubetas);
- i) Papel absorvente;
- j) Selador ou tampa para placas de ELISA;
- k) Caneta para identificação de vidraria;
- l) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavagem.

3.2.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Geladeira;
- c) Estufa;
- d) Termômetros
- e) Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Leitora de ELISA;
- h) Cronômetros;
- i) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- j) Agitador de microplacas (opcional);
- k) Lavadora de microplacas (opcional);

3.2.2. Equipamentos e instrumentos

- l) Autoclave;
- m) Geladeira;

- n) Estufa;
- o) Termômetros
- p) Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- q) Pipetador automático ou manual;
- r) Leitora de ELISA;
- s) Cronômetros;
- t) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- u) Agitador de microplacas (opcional);
- v) Lavadora de microplacas (opcional);

3.2.5. Realização do ensaio

- a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;
- b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;
- c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;
- d) Utilizar ponteiras distintas para cada controle e amostra de soro;
- e) Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;
- f) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;
- g) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;
- h) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2.6. Critérios de aceitação do Ensaio

- a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos resultados

- a) De acordo com as DOs obtidas consideram-se os resultados como não reagente ou reagente.

3.2.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, reagente, não reagente, ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidos antes do descarte.

b) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo as mesmas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

Identificação do Agente

3.3. Técnica de PCR convencional com transcrição reversa RT-PCR para detecção de PRRSV (sequenciamento genético)

3.3.1. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Pipetas graduadas;
- c) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- d) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- e) Estantes para microtubos;
- f) Gaze ou papel toalha.

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Termociclador;
- h) Balança de precisão;
- i) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;

- j) Agitador de microtubos;
- k) Micro-ondas;
- l) Cuba e fonte para eletroforese;
- m) Microcomputador;
- n) Sistema de fotodocumentação;
- o) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional);

3.3.3. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Oligonucleotídeos para RT-PCR (QUADRO 2);
- c) Controle DETECTADO para o vírus da PRRS (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);
- d) Kit de RT-PCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);
- g) Recomenda-se o uso de reações de passo único (one step) para síntese e amplificação de cDNA no mesmo tubo.

QUADRO 1: Sugestão de Oligonucleotídeos para PCR convencional com transcrição reversa RT-PCR para sequenciamento genético de PRRSV

Oligonucleotídeo	Tipo PCR	Sequência	Referência
PRRS.ORF7.484.USA.F	RT-PCR	tcgtgttggtggcagaaaagc	Kim, 2008
PRRS.ORF7.484.USA.R		gccattcaccacacattcttcc	
PRRS.ORF7.457.EU.F		aaacgagctgttaaacgaggagtgg	
PRRS.ORF7.457.EU.R		ccaatcgcggccattcacctgactg	
PRRS.Chung2002.255.F	RT-PCR	cctcctgatgaactgc	Chung, 2002
PRRS.Chung2002.255.R		aggtcctcgaactgagctg	
PRRS.255.F2		cctcytrtatgaactgc	
PRRS.255.R2		agrtcctcgaayttragctg	
PRRS.Chung2002.186.F		gtatgaactgcaggatg	
PRRS.Chung2002.186.R		gccgacaataccatgtgctg	
PRRS.Chung2002.107.F		ggcgcagtgactaagaga	
PRRS.Chung2002.107.R		gtaactgaacacatgatgctg	
PRRS.Chung2002.255.F		cctcctgatgaactgc	

3.3.4. Soluções

- a) Solução de Álcool 70%;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NÃO DETECTADO (água ou tecido bovino ou suíno).

3.3.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico (RT-PCR)

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR), isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou Álcool 70%;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.3.5.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Adicionar o mix de reação a cada poço da microplaca (ou microtubos);
- c) Devem ser incluídos nas análises:
 - i) Controle DETECTADO para PRRS;
 - ii) Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - iii) Branco (água livre de nucleases).

3.3.5.4. Reação de PCR

- a) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos identificados com a numeração da amostra a ser testada;
- b) Realizar a amplificação em termociclador certificado, conforme as especificações de temperatura do protocolo utilizado.

3.3.5.5. Eletroforese

- a) Preparar o gel de agarose em concentração adequada ao protocolo de PCR utilizado. Adicionar um corante para ácidos nucleicos em proporção suficiente para visualização das bandas;
- b) Para a corrida das amostras, adicionar tampão de carregamento (*loading buffer*) ao produto de PCR;
- c) Aplicar marcador de peso molecular em um dos poços do gel;
- d) Realizar a corrida em cuba de eletroforese, utilizando o tempo e a voltagem adequados para o volume do gel e o protocolo de PCR utilizado;
- e) Visualizar o gel sob luz ultravioleta, fotografar com o auxílio de um fotodocumentador e analisar o resultado.

3.3.6. Critérios de aceitação da prova

- a) As amostras de controle DETECTADO para PRRS devem apresentar bandas de tamanhos correspondentes aos *amplicons* do protocolo utilizado;
- b) As amostras de controle NÃO DETECTADO (controle NÃO DETECTADO da extração e branco) não devem apresentar bandas de amplificação.

3.3.7. Interpretação dos resultados

- a) Comparar os resultados das amostras testadas ao das amostras controle, a fim de classificá-las como positivas ou negativas;
- b) A leitura das bandas deve ser clara e livre de *amplicons* inespecíficos para o teste ser considerado satisfatório;
- c) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada.

3.3.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.3.9 Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

3.4. Técnica de RT-qPCR para detecção do PRRSV

3.4.1 Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;

- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.4.2 Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Termociclador para PCR em tempo real;
- g) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- h) Agitador de microtubos;
- i) Microcomputador;
- j) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.4.3 Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Kit específico de RT-qPCR para detecção de PRRS;
- c) Controle DETECTADO para PRRS (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);
- d) Kit de extração de RNA (automática);
- e) Trizol (manual);
- f) Recomenda-se o uso de kits com reações de passo único (*one step*) para síntese e amplificação de cDNA no mesmo tubo.

3.4.4 Soluções

- a) Solução de Álcool 70%;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;

3.4.5. Realização do ensaio

3.5.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NÃO DETECTADO (água ou tecido bovino ou suíno).

3.5.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico por RT-qPCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);

- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.5.5.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (TGEV) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;
- c) A adição de DNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);
- d) Devem ser incluídos nas análises:
 - i) Controle DETECTADO para PRSS;
 - ii) Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - iii) Branco (água livre de nucleases);
 - iv) Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.5.5.4. Reação de RT-qPCR

- a) Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- b) Iniciar e entrar com os dados no *software* do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- c) Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- d) Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.5.6 Critérios de aceitação da prova

- a) Para a validação do ensaio, o controle DETECTADO deve apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um Cq satisfatório;
- b) O controle NÃO DETECTADO deve ter Cq indeterminado ou maior que o limite definido pelo fabricante do kit. O gráfico do controle NÃO DETECTADO deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.5.7. Interpretação dos resultados

- a) Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle DETECTADO, controle NÃO DETECTADO, controle da extração, background de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;

- b) O limiar de Cq a ser considerado DETECTADO deve ser avaliado conforme definido na verificação desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;
- c) O limiar de Cq a ser considerado DETECTADO deve ser avaliado conforme definido na verificação desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;
- d) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada;
- e) Amostras positivas devem ser submetidas a sequenciamento para genotipagem viral.

3.5.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO”, “NÃO DETECTADO” ou “INCONCLUSIVO”
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.5.9. Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biosseguridade dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

Referências Bibliográficas

Chung HK, Choi C, Kim J, Chae C. Detection and differentiation of North American and European genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by multiplex reverse transcription-nested polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 2002. Jan;14(1):56-60.

Kim WI, Kim JJ, Cha SH, Yoon KJ. Different biological characteristics of wild-type porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and vaccine viruses and identification of the corresponding genetic determinants. *J Clin Microbiol.* 2008;46(5):1758–1768. doi:10.1128/JCM.01927-07

Porcine reproductive and respiratory syndrome. CHAPTER 3.8.6. (NB: Version adopted in May 2015). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 12 de jun. de 2021

CAPÍTULO 2.4.5.

GASTROENTERITE TRANSMISSÍVEL DOS SUÍNOS - TGE

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico de TGE:

1.1. Detecção da Resposta Imune

- a) Soro sanguíneo;

1.2 Detecção do Agente

- a) Fezes;
- b) Intestino delgado.

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos

a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

Detecção da Resposta Imune

3.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.2.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Ponteiras descartáveis;
- g) Descartador de ponteiras;
- h) Reservatórios para soluções (cubetas);
- i) Papel absorvente;
- j) Selador ou tampa para placas de ELISA;
- k) Caneta para identificação de vidraria;
- l) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavagem.

3.2.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Geladeira;
- c) Estufa;
- d) Termômetros
- e) Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Leitora de ELISA;
- h) Cronômetros;
- i) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- j) Agitador de microplacas (opcional);
- k) Lavadora de microplacas (opcional);

3.2.3. Insumos

- a) Kits de ELISA de detecção de anticorpos para o vírus da TGE

3.2.4. Soluções

- a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados.
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;
- d) Diluir a soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5. Realização do ensaio

- a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;
- b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;
- c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;
- d) Utilizar ponteiros distintas para cada controle e amostra de soro;
- e) Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;
- f) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;
- g) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;
- h) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2.6. Critérios de aceitação do Ensaio

- a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos resultados

- a) De acordo com as DOs obtidas consideram-se os resultados como não reagente ou reagente.

3.2.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, reagente, não reagente, ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.2.10. Retenção de Itens de Ensaio
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

- a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferindo antes do descarte.

Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo as mesmas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

3.3 Virusneutralização para detecção de anticorpos para o TGEV

3.3.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;
- g) Ponteiras descartáveis;
- h) Descartador de ponteiras;
- i) Reservatórios para soluções (cubetas);
- j) Papel absorvente;
- k) Microplacas para cultivo celular em poliestireno cristal com 96 cavidades de fundo chato;
- l) Caneta para identificação de vidraria;
- m) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica, classe II B1 (requisito mínimo);
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Estufa com atmosfera de CO₂;
- f) Estufa;
- g) Banho seco ou que empregam água;
- h) Termômetros;
- i) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- j) Pipetador automático ou manual;
- k) Agitador de tubos;
- l) Microscópio invertido;
- m) Balança analítica;
- n) Centrífuga refrigerada.

3.3.3. Insumos

- a) Suspensão da linhagem celular SK6 contendo 300.000 células/mL e 10% de soro fetal bovino.
- b) Meio MEM (Meio Essencial Mínimo, reconstituído de acordo com o fabricante);

- c) Soro fetal bovino (SFB) livre de pestivírus (BVDV) e micoplasma;
- d) Solução de antibióticos e antifúngicos;
- e) Anticorpo reagente e não reagente para o TGEV;
- f) Suspensão do vírus da Gastroenterite Transmissível Suína (TGEV).

3.3.4. Soluções

- a) Meio MEM com adição de antimicrobianos;
- b) Solução de salina 0,15 mol/L %;
- c) Ácido cítrico 0,2 %;
- d) Solução salina 0,85 % fosfatada tamponada (PBS) pH 7,2-7,4;
- e) Solução de antibióticos e antifúngicos.

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1. Método quantitativo

- a) Adicionar 25 µL de MEM na linha A (controle de toxidez, caso não tenha sido ainda avaliado).
- b) Adicionar 25 µL de MEM nas linhas C a H.
- c) Distribuir as amostras e controles como descrito no QUADRO abaixo.
- d) Adicionar 25 µL de soro na linha A (controle de toxidez).
- e) Adicionar 50 µL de soro puro na linha B.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Log	
A	1	2	3	4	5	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	-----	TX
B	1	2	3	4	5	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	0,3	½
C	1	2	3	4	5	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	0,6	¼
D	1	2	3	4	5	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	0,9	1/8
E	1	2	3	4	5	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	1,2	1/16
F	1	2	3	4	5	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	1,5	1/32
G	1	2	3	4	5	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	1,8	1/64
H	1	2	3	4	5	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	2,1	1/128
								RT						

- f) Transferir 25 µL do soro puro da linha B para C, e assim sucessivamente até a linha H. Ao final descartar 25 µL (a diluição inicial na linha B será ½ após adição do vírus).
- g) Preparar as colunas referentes aos controles conforme o item 3.3.6.

3.3.6. Controles

- a) Utilizar uma coluna para o soro controle negativo (CN) e uma coluna para o soro controle positivo (CP). Adicionar o MEM e os soros controle em cada uma das colunas conforme descrito no item 6.1, sem avaliação da toxidez;
- b) Para o controle de retrotitulação viral (RT), adicionar 25 µL de MEM nas três colunas destinadas à retrotitulação;
- c) Para o controle de células (CC), adicionar 50 µL de MEM. Reservar, pelo menos, uma coluna como controle de células. Nessa coluna não deve ser adicionado vírus ou soro.

3.3.7 Diluição de trabalho (DT) do vírus, incubação e adição da suspensão celular

- a) Retirar um criotubo do vírus do ultrafreezer. Diluir o vírus de acordo com o título para que no ensaio sejam utilizados aproximadamente 100 TCID₅₀/25 µL.
- b) Utilizar um vírus de título conhecido. A partir do título, obter a diluição de trabalho (DT) diminuindo-se 10² do título. Exemplo: vírus com título de 10⁶ deve ser diluído a 10⁴ (ou seja, 10.000 vezes). Preparar diluições em base 10 do vírus (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, etc.) até o obter a diluição de trabalho desejada, utilizando para o cálculo a fórmula $C_i.V_i = C_f.V_f$, onde:
 - c) C_i = concentração inicial 10⁻¹;
 - d) V_i = volume inicial (volume de vírus a ser utilizado);
 - e) C_f = concentração final = DT;
 - f) V_f = volume final (volume necessário de vírus, para uma placa utilizar 5 mL);
 - g) Exemplo: vírus com título de 10^{4,5}. $DT = 10^{2,5} = 1/316$. Para 4 placas. Foram feitas duas diluições em base 10 (10⁻¹ e 10⁻²);
 - h) $C_i.V_i = C_f.V_f$;
 - i) $1/100.V_i = 1/316.20$
 - j) $V_i = 20.100/316 = 6,3$ mL da diluição 1/100 (10⁻²) e 13,7 mL de MEM;
 - k) Registrar os cálculos da diluição;
 - l) A partir da diluição de trabalho, preparar diluições 1/10 (10⁻¹), 1/100 (10⁻²) e 1/1.000 (10⁻³) utilizando MEM. Essas três diluições serão chamadas de retrotitulação (10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³)
 - m) Adicionar 50 µL da suspensão viral diluída (1/10, 1/100 e 1/1.000) em cada um dos poços das colunas destinadas à retrotitulação (uma coluna por diluição), começando pela suspensão mais diluída, desta maneira pode-se utilizar o mesmo reservatório e as mesmas ponteiros;
 - n) Adicionar 25 µL da DT em todos os poços da placa, exceto nos destinados ao controle de toxidez, retrotitulação e controle de células.
 - o) Incubar as placas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ durante uma hora.
 - p) Distribuir 100 µL de suspensão celular a 300.000 células/mL com 10% SFB em todos os poços da placa, inclusive em todos os controles, iniciando-se pela coluna referente ao controle de células.
 - q) Incubar as placas por 48 a 72 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂;
 - r) Realizar a leitura em microscópio invertido e registrar, utilizando:
 - + para indicar presença de efeito citopático (ECP);
 - (-) para indicar ausência de ECP;
 - TX para indicar toxidez do soro;
 - C para indicar contaminação.

3.3.8. Critérios de aceitação da Prova

- a) Avaliar os resultados dos controles para considerar o ensaio válido.
- b) Se os soros controle se apresentarem dentro do comportamento esperado: REAGENTE com ausência de efeito citopático de acordo com o título conhecido e NÃO REAGENTE apresentando efeito citopático, o ensaio é considerado válido.
- c) A prova estará válida quando a retrotitulação do vírus de prova na diluição de trabalho apresentar dose infectante de 100 TCID₅₀/50 µL, aceitando-se a variação de 31 a 316 TCID₅₀/50 µL.
- d) Controle de células apresentando tapete íntegro em todos os poços isentos de contaminação ou toxidez.

3.3.9. Interpretação dos resultados

- a) Deve-se considerar como título o inverso da diluição em que foi observado 50% de neutralização. Esses valores devem ser convertidos em log base 10.

- b) Para ser considerado negativo, o soro não deve gerar nenhuma neutralização na menor diluição testada (ou seja, soro puro, equivalente a uma diluição de 1/2 na etapa de neutralização). Ocorrendo neutralização em pelo menos uma diluição, o soro é considerado positivo.
- c) A amostra será considerada tóxica quando se observar a ausência de multiplicação celular, ou destruição das células por componentes do soro no poço de controle de toxidez. Geralmente é caracterizada pela sedimentação do cultivo semeado no fundo do poço.
- d) Soros contaminados: soros em que houve presença de contaminação bacteriana ou por fungos impedindo a interpretação do resultado.
- e) O título neutralizante se expressa pela recíproca da diluição mais alta do soro em que houve inibição da replicação viral em 50% dos poços. (QUADRO 1)

QUADRO 1 - Título neutralizante expresso pela recíproca da diluição mais alta do soro em que houve inibição da replicação viral em 50% dos poços.

Diluição	Título	Transformação logarítmica	Poço
1/2	2	0,3	B
1/4	4	0,6	C
1/8	8	0,9	D
1/16	16	1,2	E
1/32	32	1,5	F
1/64	64	1,8	G
1/128	>=128	2,1	H

3.3.10. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, REAGENTE, NÃO REAGENTE, TÓXICO ou CONTAMINADO. Caso a amostra seja considerada reagente, deve ser descrito o valor do título final, que é expresso como o logaritmo da diluição em que houve 100% de Virusneutralização.

3.3.11. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

O laboratório deve assegurar a biosseguridade dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.3.1.1.2. Retenção de itens de ensaio

- b) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferindo antes do descarte.

c) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

3.3. Técnica de PCR convencional com transcrição reversa RT-PCR detecção de TGEV

3.3.1. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Pipetas graduadas;
- c) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- d) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- e) Estantes para microtubos;
- f) Gaze ou papel toalha.

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Termociclador;
- h) Balança de precisão;
- i) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- j) Agitador de microtubos;
- k) Micro-ondas;
- l) Cuba e fonte para eletroforese;
- m) Microcomputador;
- n) Sistema de fotodocumentação;
- o) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional);

3.3.4. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Oligonucleotídeos para RT-qPCR (QUADRO 2);
- c) Controle DETECTADO para o vírus da TGEV (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);
- d) Kit de RT-qPCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);
- g) Recomenda-se o uso de reações de passo único (one step) para síntese e amplificação de cDNA no mesmo tubo.

QUADRO 1: Sugestão de oligonucleotídeos para RT-qPCR E RT-PCR para detecção e sequenciamento genético de TGEV.

Oligonucleotídeo	Tipo de PCR	Sequência	Referência
TGEV.ISU.SP.143.F	RT-qPCR	AACCATAAGTCCCTATATGTCCTT	Hartman, 1997
TGEV.ISU.SP.143.R		CCAGACCATTGATTTTCAAACCTAATAC	
TGEV.ISU.SP.143.S		TET-CACCATGTAAATAAGCAACAA-MGB/NFQ	
TGEV.ISU.NP.93.F	RT-qPCR	TTGTCTGGGTTGCCAAGGAT	Hartman, 1997
TGEV.ISU.NP.93.R		CATCGAATTTCAAAGCTTTGGATT	
TGEV.ISU.NP.93.S		FAM-CCACGACTACCAAGCGT-MGB/NFQ	
TGEV.ISU.600.F	RT-PCR	GCAACAATCCAATAACAAGAAGG	Hartman, 1997
TGEV.ISU.600.R		ACCTCATCAATCATCTCAACCTG	
TGEV.ISU.200/800.F		GTAAAAACATTAGCCACATA	
TGEV.ISU.200/800.R		AGGGTAAGTTGCTCATTAG	

3.3.4. Soluções

- a) Solução de Álcool 70%;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NÃO DETECTADO (água ou tecido bovino ou suíno).

3.3.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico (RT-PCR)

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR), isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou Álcool 70%
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.3.5.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Adicionar o mix de reação a cada poço da microplaca (ou microtubos);
- c) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle DETECTADO para TGEV;
 - II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III. Branco (água livre de nucleases).

3.3.5.4. Reação de RT-PCR

- a) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos identificados com a numeração da amostra a ser testada;
- b) Realizar a amplificação em termociclador certificado, conforme as especificações de temperatura do protocolo utilizado.

3.3.5.5. Eletroforese

- a) Preparar o gel de agarose em concentração adequada ao protocolo de PCR utilizado. Adicionar um corante para ácidos nucleicos em proporção suficiente para visualização das bandas;
- b) Para a corrida das amostras, adicionar tampão de carregamento (*loading buffer*) ao produto de PCR;
- c) Aplicar marcador de peso molecular em um dos poços do gel;
- d) Realizar a corrida em cuba de eletroforese, utilizando o tempo e a voltagem adequados para o volume do gel e o protocolo de PCR utilizado;
- e) Visualizar o gel sob luz ultravioleta, fotografar com o auxílio de um fotodocumentador e analisar o resultado.

3.3.6. Critérios de aceitação da prova

- a) As amostras de controle DETECTADO para TGEV devem apresentar bandas de tamanhos correspondentes aos *amplicons* do protocolo utilizado;
- b) As amostras de controle NÃO DETECTADO (controle NÃO DETECTADO da extração e branco) não devem apresentar bandas de amplificação.

3.3.7. Interpretação dos resultados

- a) Comparar os resultados das amostras testadas ao das amostras controle, a fim de classificá-las como positivas ou negativas;
- b) O limiar de C_q a ser considerado DETECTADO deve ser avaliado conforme definido na verificação desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;
- c) A leitura das bandas deve ser clara e livre de *amplicons* inespecíficos para o teste ser considerado satisfatório;
- d) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada.

3.3.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO”, “NÃO DETECTADO” ou “INCONCLUSIVO”
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.3.9 Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

3.4. Técnica de RT-qPCR para detecção do TGEV

3.4.1 Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.4.2 Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Termociclador para PCR em tempo real;
- g) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- h) Agitador de microtubos;
- i) Microcomputador;

- j) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.4.3 Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Kit específico de RT-qPCR para detecção de TGEV;
- c) Controle DETECTADO para TGEV (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);
- d) Kit de extração de RNA (automática);
- e) Trizol (manual);
- f) Recomenda-se o uso de kits com reações de passo único (*one step*) para síntese e amplificação de cDNA no mesmo tubo.

3.4.4 Soluções

- a) Solução de Álcool 70%;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;

3.4.5. Realização do ensaio

3.5.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NÃO DETECTADO (água ou tecido bovino ou suíno).

3.5.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico por RT-qPCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.5.5.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (TGEV) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;
- c) A adição de DNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);

d) Devem ser incluídos nas análises:

- I. Controle DETECTADO para PRRS;
- II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
- III. Branco (água livre de nucleases);
- IV. Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.5.5.4. Reação de RT-qPCR

- a)** Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- b)** Iniciar e entrar com os dados no *software* do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- c)** Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- d)** Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.5.6 Critérios de aceitação da prova

- a)** Para a validação do ensaio, o controle DETECTADO deve apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um Cq satisfatório;
- b)** O controle NÃO DETECTADO deve ter Cq indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle NÃO DETECTADO deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.5.7. Interpretação dos resultados

- a)** Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle DETECTADO, controle NÃO DETECTADO, controle da extração, background de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;
- b)** Os resultados devem ser positivos para TGEV.ISU.NP e TGEV.ISU.SP para ser positivo para TGEV. Positivo apenas para FAM é sugestivo de PRCV;
- c)** O limiar de Cq a ser considerado DETECTADO deve ser avaliado conforme definido na verificação desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;
- d)** Qualquer amostra questionável deverá ser retestada;
- e)** Amostras positivas devem ser submetidas a sequenciamento para genotipagem viral.

3.5.8. Emissão dos resultados

- a)** Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”;
- b)** Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.5.9. Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

Referências Bibliográficas

Hartman SJ, Paul PS, Halbur PG, Lester MK, Yoon K-J, Harmon K. 1997. Application of a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection and differentiation of transmissible gastroenteritis virus in feces. 78th Conference of Research Workers in Animal Diseases, abstract #84.

Hartman SJ, Paul PS, Halbur PG, Lester MK, Yoon K-J, Harmon K. 1997. Application of a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection and differentiation of transmissible gastroenteritis virus in feces. 78th Conference of Research Workers in Animal Diseases, abstract #84.

Transmissible gastroenteritis. CHAPTER 3.9.10. Version (NB: Version adopted in **May 2021**). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>

CAPITULO 2.4.6.

DIARREIA EPIDÊMICA DOS SUÍNOS – PED

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico do *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV).

1.1. Identificação do Agente

- a) Fezes;
- b) Intestino delgado.

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos

- a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente
- b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos

- a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente
- b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

3.2.2 Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Termociclador para PCR em tempo real;

- g) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- h) Agitador de microtubos;
- i) Microcomputador;
- j) Equipamento para extração automatizada de DNA (opcional).

3.2.3 Insumos

- a) Água livre de nucleases
- b) Iniciadores e sondas descritos no QUADRO 1
- c) Master mix para PCR em tempo real
- d) Controle DETECTADO para o vírus da PED (Material genético extraído do alvo ou controle sintético);

QUADRO 1: Sugestão de Oligonucleotídeos para reação de RT-qPCR para detecção do Virus da PED

Oligonucleotídeo	Sequência	Referência
PEDV.Lowe2014.198.F	CGCAAAGACTGAACCCACTAACCT	Lowe J., 2014
PEDV.Lowe2014.198.R	TTGCCTCTGTTGTTACTTGGAGAT	Lowe J., 2014
PEDV.Lowe2014.198.S	FAM-TGTTGCCATTACACCGACTCCTGC-ZEN/IowaBlack	Lowe J., 2014

3.2.3 Soluções

- a) Solução de álcool 70%;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;

3.2.4. Realização do ensaio

3.2.4.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NÃO DETECTADO (água ou tecido suíno).

3.2.4.2. Reação de amplificação de ácido nucleico (PCR)

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR), isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.2.4.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (PEDV) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais, de acordo com o QUADRO 2;
- b) Adicionar o mix de reação a cada poço da microplaca (ou microtubos);
- c) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle DETECTADO para PED;
 - II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III. Branco (água livre de nucleases).

3.2.4.4. Reação de PCR

- a) Após o preparo do mix, adicionar o DNA nos poços da placa ou em microtubos identificados com a numeração da amostra a ser testada;

3.2.5. Critérios de aceitação da prova

- a) Para a validação do ensaio, o controle DETECTADO deve apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um Cq satisfatório;
- b) O controle NÃO DETECTADO deve ter Cq indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle NÃO DETECTADO deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.2.6 Interpretação dos resultados

- a) Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle DETECTADO, controle NÃO DETECTADO, controle da extração, background de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;
- b) O limiar de Cq a ser considerado DETECTADO deve ser avaliado conforme definido na verificação desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;
- c) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada;
- d) Amostras positivas devem ser submetidas a sequenciamento para genotipagem viral.

3.2.7. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.2.8. Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte;

- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

Referências Bibliográficas

Kim SH, Kim IJ, Pyo HM, Tark DS, Song JY, Hyun BH. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. *J VirolMethods*. 2007 Dec;146(1-2):172-7.

Lowe J, Gauger P, Harmon K. Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(5):872–874. doi:10.3201/eid2005.131628

CAPITULO 2.4.6.
SENECAVIRUS A - SVA

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico do *Senecavirus A*

1.1. Detecção da Resposta Imune

a) Soro sanguíneo

1.2. Identificação do Agente

- a) Epitélio;
- b) Vesículas;
- c) Suabe de vesículas rompidas

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos

- a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente
- b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

Detecção da Resposta Imune

3.2. Teste de neutralização viral

3.2.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;
- g) Ponteiras descartáveis;
- h) Descartador de ponteiras;
- i) Reservatórios para soluções (cubetas);
- j) Algodão hidrófilo;
- k) Microplacas para cultivo celular em poliestireno cristal com 96 cavidades de fundo chato;
- l) Caneta para identificação de vidraria;
- m) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.2.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica classe II B1 (requisito mínimo);
- c) Geladeira;
- d) Ultrafreezer;
- e) Estufa com atmosfera de CO₂;
- f) Banho seco ou que empregam água;
- g) Termômetros;
- h) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- i) Pipetador automático ou manual;
- j) Agitador de tubos;
- k) Microscópio invertido;
- l) Centrífuga refrigerada.

3.2.3. Insumos

- a) Suspensão celular de linhagem sensível (NCI-H1299);
- b) Meio MEM (Meio Essencial Mínimo, reconstituído de acordo com o fabricante);
- c) Soro fetal bovino (SFB) livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma;
- d) Solução de antibióticos e antifúngicos;
- e) Cepa de SVA.

3.2.4. Soluções

- a) Meio MEM com piruvato com 5% de soro fetal bovino e antimicrobianos (anexo 008);
- b) Solução de salina 0,15 mol/L % (anexo 008);
- c) Soros controles reagente e não reagente do SVA;

3.2.5. Realização do ensaio

3.2.5.1 Método quantitativo

- a) Avaliar a toxidez apenas se o soro não tiver sido testado em outro ensaio de neutralização viral.
- b) Antes de pipetar as amostras de soro, homogeneizar com auxílio de agitador de tubos ou fazer movimentos de inverter os microtubos;
- c) Adicionar 93,75 µL de MEM e 6,25 µL de soro na linha A (controle de toxidez).
- d) Adicionar 87,5 µL de MEM e 12,5 µL de soro na linha B (diluição inicial 1/8 e final 1/16). Cada amostra de soro deve ser adicionada à uma coluna da placa;
- e) Adicionar 50 µL de MEM nas linhas C a H;
- f) Distribuir as amostras, controles e retrotitulação conforme o QUADRO 1.
- g) Homogeneizar as amostras e transferir 50 µL MEM/soro da linha B para C, e assim sucessivamente até a linha H. Ao final descartar 50 µL.
- h) Em caso de a toxidez já ter sido avaliada, iniciar o ensaio na linha A conforme descrito acima (Adicionar 87,5 µL de MEM e 12,5 µL de soro);
- i) Preparar as colunas referentes aos controles conforme o item 5.1.1.;
- j) Retirar um criotubo do SVA do ultrafreezer, o qual já deverá ter sido titulado pelo método de Reed-Muenchen. Este método será também empregado na titulação da diluição de trabalho do vírus (retrotitulação);
- k) Diluir o vírus de acordo com o título para que no ensaio sejam utilizados aproximadamente 100 TCID₅₀/50 µL (DT- diluição de trabalho);
- l) A partir da diluição de trabalho, preparar diluições da retrotitulação (RT) conforme descrito no item 5.2, e distribuir 50 µL das diluições nas colunas indicadas no QUADRO 1;
- m) Utilizar uma coluna para o soro controle NÃO DETECTADO (CN) e uma coluna para o soro controle DETECTADO (CP). Adicionar o MEM e os soros controle em cada uma das colunas conforme descrito no item 5.1, item “d”, sem avaliação da toxidez;
- n) Para o controle de células (CC), adicionar 100 µL de MEM. Reservar, pelo menos, uma coluna como controle de células. Nessa coluna não deve ser adicionado vírus ou soro;
- o) Adicionar 50 µL da DT em todos os poços da placa, exceto nos destinados ao controle de toxidez, controle de células e retrotitulação;
- p) Incubar as placas em estufa a 37 °C durante uma hora;
- q) Distribuir 100 µL de suspensão celular a 225.000 células/mL em todos os poços da placa, inclusive em todos os controles;
- r) Incubar as placas por aproximadamente 48 a 72 horas a 37 °C;
- s) Realizar a leitura em microscópios invertido e registrar os resultados.

QUADRO 1 – Localização das amostras, controles e retrotitulação na placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Log	Diluição
A	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	TX	TX
B	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	1,2	1/16
C	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	1,5	1/32
D	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	1,8	1/64
E	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,1	1/128
F	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,4	1/256
G	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,7	1/512
H	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	3,0	1/1.028
RT														

3.2.5.2. Retrotitulação

- a) A retrotitulação deve ser feita em uma das placas do ensaio. O QUADRO 1 apresenta o modelo de distribuição das diluições obtidas a partir da diluição de trabalho;
- b) Preparar três diluições do vírus em base 10 a partir da diluição de trabalho (DT) realizar diluições em base 10 (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3});
- c) Adicionar 50 μ L de MEM em três colunas de uma microplaca, conforme indicado no QUADRO 1;
- d) Adicionar 50 μ L de cada uma das diluições do vírus em uma coluna, começando pelo vírus mais diluído, de forma que possam ser utilizadas as mesmas ponteiras e o mesmo reservatório para todas as diluições do vírus;
- e) Ao final do ensaio calcular o título pelo método de Reed-Muenchen com base na presença ou ausência de crescimento viral nas colunas inoculadas com as diluições do vírus

3.2.6. Critérios de aceitação da Prova

- a) O título do soro controle DETECTADO deve ser superior a 64 (1,8);
- b) O soro controle NÃO DETECTADO deve apresentar título inferior a 64 (1,8);
- c) soros contaminados: soros em que houve presença de contaminação bacteriana ou por fungos deverão ser retestados;
- d) A prova estará válida quando a retrotitulação do vírus de prova na diluição de trabalho apresentar as doses infectantes dentro da variação $10^{2\pm 0,5}$, que corresponde a 31 a 316 TCID₅₀/50 μ L;
- e) Quando a retrotitulação do vírus de prova na diluição de trabalho apresentar título inferior a $10^{1,5}$ poderão ser validados os resultados das amostras não reagentes, e do mesmo, retrotitulação com título superior a $10^{2,5}$ poderão ser validados as amostras reagentes;
- f) Será considerada válida a prova em que os soros controle se apresentarem dentro do comportamento esperado;
- g) Soro controle REAGENTE, com ausência de efeito citopático (ECP) (Fig. 1 A);
- h) Soro controle NÃO REAGENTE, com presença de ECP (Fig. 1B);
- i) Controle de toxicidade: na presença de toxicidade as amostras devem ser reanalisadas por ELISA ou pelo método quantitativo;
- j) Controle de células apresentando tapete íntegro e todos os poços isentos de contaminação ou toxidez;

Se o resultado de um ou mais controles não atender aos critérios estabelecidos, os ensaios deverão

ser repetidos. Estando em conformidade, avaliar o resultado das amostras

3.2.7. Interpretação dos resultados

a) O título de um soro é expresso pelo denominador da mais alta diluição em que houve neutralização completa dos ECP do vírus em 50% dos poços, no caso do ensaio realizado em duas colunas, ou no poço que não houve ECP no caso de ensaio realizado com uma coluna. Se houver neutralização apenas na amostra não diluída solicitar nova colheita, pelo menos, oito dias após a primeira colheita.

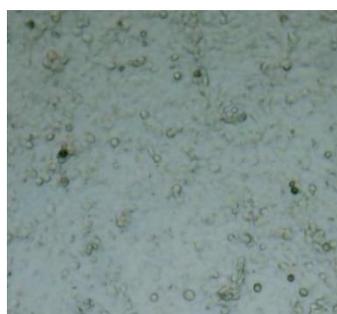
b) Soro controle REAGENTE – amostra em que houve de neutralização viral traduzida pela ausência de efeito citopático (ECP) a partir do título 64 (1,8);

c) Soro controle não REAGENTE – amostra em que não houve de neutralização viral traduzida pela presença de efeito citopático (ECP) no título inferior a 64 (1,8);

d) Amostra tóxica: A amostra será considerada tóxica quando se observar a ausência de multiplicação celular, ou destruição das células por componentes do soro no poço de controle de toxidez. Geralmente é caracterizada pela sedimentação do cultivo semeado no fundo do poço. Na presença de toxicidade as amostras devem ser reanalisadas por ELISA ou pelo método quantitativo.

e) Amostra contaminada - a amostra será considerada contaminada quando se observar o crescimento bacteriano ou fúngico no poço amostra processada

FIGURA 1 – Cultivo de células NCI 1299 sem ECP (1A) e com a presença de ECP (1B) causado pelo SVA.



(1A)

Fonte – LFDA-MG



(1B)

Fonte – LFDA-MG

3.2.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, reagente, não reagente. Caso a amostra seja considerada reagente, deve ser descrito a valor do título final, que é expresso como o logaritmo da diluição em que houve 100% de neutralização viral (QUADRO 2).

QUADRO 2. Título neutralizante expresso pela recíproca da diluição mais alta do soro em que houve inibição da replicação viral em 50% dos poços.

Diluição	Título	Título Logarítmico
1/16	16	1,2
1/32	32	1,5
1/64	64	1,8
1/128	128	2,1
1/256	256	2,4
1/512	512	2,7
1/1024	1024	3,0
1/2048	2048	$\geq 3,3$

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

- a)** Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio
- b)** Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- c)** Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
- d)** O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.2.10 Retenção de itens de ensaio

- a)** Soro sanguíneo
Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.
- b)** Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo as mesmas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

Identificação do Agente

3.3. Isolamento viral

3.3.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Placas de Petri;
- g) Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;
- h) Tubo de centrifuga;
- i) Tubos de ensaio;
- j) Ponteiras descartáveis;
- k) Descartador de ponteiras;
- l) Reservatórios para soluções (cubetas);
- m) Papel absorvente;
- n) Microplacas para cultivo celular em poliestireno com 24 cavidades de fundo chato;
- o) Microplacas para cultivo celular em poliestireno com 96 cavidades de fundo chato;
- p) Caneta para identificação de vidraria;
- q) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;
- r) Areia estéril;
- s) Filtro para seringa (0,45 µm);
- t) Gral e Pistilo;
- u) Tesoura cirúrgica e bisturi
- v) Seringa descartável;

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica classe II A (requisito mínimo);
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Estufa com atmosfera de CO₂;
- f) Estufa;
- g) Banho seco ou que empregam água;
- h) Termômetros;
- i) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- j) Pipetador automático ou manual;
- k) Agitador de tubos;
- l) Microscópio invertido.
- m) Cronômetro
- n) Balança analítica;
- o) Centrífuga refrigerada.

3.3.3. Insumos

- a) Suspensão celular de linhagem sensível (NCI-H1299);
- b) Meio MEM (Meio Essencial Mínimo, reconstituído de acordo com o fabricante);
- c) Soro fetal bovino (SFB), livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma;
- d) Solução de antibióticos e antifúngicos – (anexo 0020);
- e) Cepas do SVA;

3.3.4. Soluções

- a) Meio MEM tratado com solução de antibióticos e antifúngicos;
- b) Ácido cítrico 0,2 %;
- c) Solução de antibióticos e antifúngicos.

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1 Preparo das amostras

- a) Escolher os órgãos encaminhados, que serão submetidos à prova. Os órgãos de eleição para este ensaio são líquidos de vesículas, epitélio lingual. Utilizar aproximadamente 0,5 cm³ de cada tecido;
- b) Remover o excesso de tecido conjuntivo;
- c) Recortar e macerar os fragmentos de cada órgão preparando um pool para cada requisição, utilizando gral, pistilo e MEM tratado com solução antimicrobiana até que se forme uma pasta homogênea. Pode ser utilizada areia estéril como abrasivo se necessário.
- d) Completar o volume com MEM resultando em uma suspensão de aproximadamente 20 % (P/V);
- e) Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos;
- f) Colher o sobrenadante, filtrar e colocar em frasco devidamente identificado; descartar o precipitado;
- g) Adicionar 100 µL de solução antimicrobiana;
- h) Encaminhar 400 µL de inóculo ou de fragmentos do tecido tratado com 1,0 mL de Trizol para diagnóstico molecular.

3.3.5.2. Passagens em células (suspensão celular)

- a) Adicionar 100 µL do inóculo de macerado de tecidos e 50 µL do inóculo de sangue total em um poço da microplaca de 24 poços. Caso seja utilizada uma garrafa de 25 cm² utilizar 0,5 mL de inóculo de macerado de tecidos ou 0,1 mL de sangue total;
- b) Acrescentar 1 mL de suspensão celular com 5 % de soro fetal bovino na concentração de 300.000 células/mL;
- c) Incubar a microplaca por 48 a 72 horas em estufa de CO₂.
- d) Fazer a leitura e registrar os resultados. Os materiais em que for observada contaminação não deverão ser submetidos à segunda passagem.
- e) Congelar a microplaca e descongelar;
- f) Inocular o material da primeira passagem em microplaca de 96 poços sendo que para cada poço da microplaca de 24 poços ou garrafa deverá ser utilizada uma coluna da microplaca de 96 poços;
- g) Inocular 10 µL do inóculo nos poços A1, B1, C1 e D1;
- h) Inocular 5 µL do inóculo nos poços E1, F1, G1 e H1;
- i) Adicionar 100 µL de células em todos os poços reservando uma coluna para o controle de células e uma para o controle de vírus;

- j) Para o controle de vírus utilizar uma amostra da cepa de SVA;
- k) Realizar a leitura dos cultivos por 72 horas em microscópio óptico. Amostras que apresentarem características de efeito citopático deverão ser encaminhadas para a confirmação por biologia molecular.

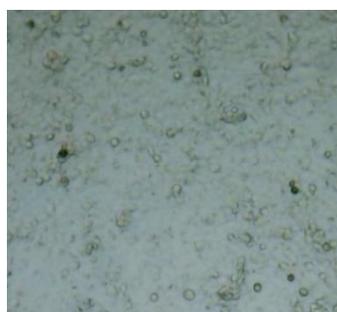
3.3.6. Critérios de aceitação das provas

- a) As provas de identificação do agente serão consideradas válidas quando os cultivos celulares sabidamente infectados (controles DETECTADOS) apresentam efeito citopático caracterizado pelo destacamento do cultivo celular e formação de células sinciciais e ausências de ECP nos cultivos que não foram infectados (controles NÃO DETECTADOS ou de células).
- b) Controle de células apresentando tapete íntegro e todos os poços isentos de contaminação ou toxidez;
- c) Se o resultado de um ou mais controles não atender aos critérios estabelecidos, os ensaios deverão ser repetidos. Estando em conformidade, avaliar o resultado das amostras
- d) Na presença de ECP deverá ser realizada a confirmação do isolamento por método molecular.

3.3.7. Interpretação dos resultados

- a) DETECTADO - presença de ECP nos cultivos infectados pelo SVA, Fig. (2A).
- b) NÃO DETECTADO – ausência de ECP nos cultivos celulares Fig. (2B).

FIGURA 2 – Cultivo de células NCI-H1299 sem ECP (2A) causado pelo SVA e com a presença de ECP (2B).



(2A)

Fonte – LFDA-MG



(2B)

Fonte – LFDA-MG

3.3.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO” no isolamento viral do SVA.

3.3.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

d) O laboratório deve assegurar a biosseguridade dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.3.10. Retenção de itens de ensaio

a) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo as mesmas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

3.4 Técnica de PCR convencional para detecção do SVA

3.4.1 Materiais

- a)** Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- b)** Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c)** Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- d)** Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- e)** Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f)** Estantes para microtubos;
- g)** Gaze ou papel toalha.

3.4.2 Equipamentos e instrumentos

- a)** Autoclave;
- b)** Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c)** Geladeira;
- d)** Freezer;
- e)** Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f)** Termociclador para PCR em tempo real;
- g)** Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- h)** Agitador de microtubos;
- i)** Microcomputador;
- j)** Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.4.3 Insumos

- a)** Água livre de nucleases;

- b) Oligonucleotídeos para RT-qPCR (QUADRO 2);
- c) Controle DETECTADO para o vírus da SVA (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);
- d) Kit de RT-qPCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);
- g) Recomenda-se o uso de reações de passo único (*one step*) para síntese e amplificação de cDNA no mesmo tubo.

3.4.4 Soluções

- a) Solução de álcool 70%;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;

3.4.5. Realização do ensaio

3.4.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NÃO DETECTADO (água ou tecido bovino ou suíno).

3.4.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico (PCR)

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR), isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.4.5.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (SVA) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Adicionar o mix de reação a cada poço da microplaca (ou microtubos);
- c) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle DETECTADO para SVA;
 - II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III. Branco (água livre de nucleases);
 - IV. Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.4.5.4. Reação de PCR

- a) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos identificados com a numeração da amostra a ser testada;
- b) Realizar a amplificação em termociclador certificado, conforme as especificações de temperatura do protocolo utilizado.

3.4.5 Eletroforese

- a) Preparar o gel de agarose em concentração adequada ao protocolo de PCR utilizado. Adicionar um corante para ácidos nucleicos em proporção suficiente para visualização das bandas;
- b) Para a corrida das amostras, adicionar tampão de carregamento (*loading buffer*) ao produto de PCR;
- c) Aplicar marcador de peso molecular em um dos poços do gel;
- d) Realizar a corrida em cuba de eletroforese, utilizando o tempo e a voltagem adequados para o volume do gel e o protocolo de PCR utilizado;
- e) Visualizar o gel sob luz ultravioleta, fotografar com o auxílio de um fotodocumentador e analisar o resultado.

3.4.6 Critérios de aceitação da prova

- a) As amostras de controle DETECTADO para SVA devem apresentar bandas de tamanhos correspondentes aos *amplicons* do protocolo utilizado;
- b) As amostras de controle NÃO DETECTADO (controle NÃO DETECTADO da extração e branco) não devem apresentar bandas de amplificação.

3.4.7 Interpretação dos resultados

- a) Comparar os resultados das amostras testadas ao das amostras controle, a fim de classificá-las como positivas ou negativas;
- b) A leitura das bandas deve ser clara e livre de *amplicons* inespecíficos para o teste ser considerado satisfatório;
- c) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada

3.4.8 Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.4.9 Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

3.5. Técnica de RT-qPCR para SVA

3.5.1 Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.5.2 Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Termociclador para PCR em tempo real;
- g) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- h) Agitador de microtubos;
- i) Microcomputador;
- j) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.5.3 Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Oligonucleotídeos para RT-qPCR (QUADRO 3);
- c) Controle DETECTADO para SVA (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);
- d) Kit de RT-qPCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);
- g) Recomenda-se o uso de reações de passo único (*one step*) para síntese e amplificação de cDNA no mesmo tubo.

3.5.4 Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;

3.5.5. Realização do ensaio

3.5.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;

- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NÃO DETECTADO (água ou tecido bovino ou suíno).

3.5.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico por RT-qPCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.5.5.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (SVA) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;
- c) A adição de DNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);
- d) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle DETECTADO para SVA;
 - II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III. Branco (água livre de nucleases);
 - IV. Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

QUADRO 3: Sugestão de oligonucleotídeos para RT-PCR e RT-qPCR para detecção molecular do SVA

Oligonucleotídeo	Tipo de PCR	Sequência	Referência
SV-A.3D.464.F	RT-PCR	tgcccttgactcttcacacg	Laguardia-Nascimento, 2016
SV-A.3D.464.R		ataagccrctrtgttttgg	
SV-A.3D.78.F	RT-qPCR	tagattgatgcacccccttcg	Laguardia-Nascimento, 2016
SV-A.3D.78.R		aacaaggccctccatcttg	
SV-A.3D.78.S		FAM ccgtaccgagtcacgagtacctgca -lowaBlack	
SV-A.VP1.599.	Sequenciamento	taacacccccgccaacag	Laguardia-Nascimento, 2016
SV-A.VP1.599.		agggccaggggtgtctc	

3.5.5.4. Reação de RT-qPCR

- Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- Iniciar e entrar com os dados no *software* do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.5.6. Critérios de aceitação da prova

- Para a validação do ensaio, o controle DETECTADO deve apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um Cq satisfatório;
- O controle NÃO DETECTADO deve ter Cq indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle NÃO DETECTADO deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.5.7 Interpretação dos resultados

- Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle DETECTADO, controle NÃO DETECTADO, controle da extração, background de fluorescência e

gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;

- f) O limiar de Cq a ser considerado DETECTADO deve ser avaliado conforme definido na verificação de desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;
- g) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada;
- h) Amostras positivas devem ser submetidas a sequenciamento para genotipagem viral.

3.5.8 Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.5.9 Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas por dois analistas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

Referências Bibliográficas

Laguardia-Nascimento M, Gasparini MR, Sales ÉB, Rivetti AV Jr, Sousa NM, Oliveira AM, Camargos MF, Pinheiro de Oliveira TF, Gonçalves JP, Madureira MC, Ribeiro DP, Marcondes IV, Barbosa-Stancioli EF, Fonseca AA Jr. Molecular epidemiology of senecavirus A associated with vesicular disease in pigs in Brazil. Vet J. 2016 Oct;216:207-9.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg. 1938; 27:493–497.

Secção 2.5
Pequenos Ruminantes

CAPÍTULO 2.5.1

SCRAPIE

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico de Scrapie:

1.1. Identificação do Agente

- a) Tronco encefálico incluindo o óbex (\pm 3,0 cm rostral e caudal).
- b) Cerebelo;
- c) Tálamo;
- d) Gânglios basais;
- e) Tecido linforreticular;
- f) Terceira Pálpebra;
- g) Mucosa Retal

* O Tronco encefálico incluindo o óbex é o material de eleição.

*Coletar 5g de tecido.

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

2.1.3. As amostras deverão ser encaminhadas ao laboratório, individualmente separadas por matriz, e obedecendo a critérios de biossegurança.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA ou segundo legislação em vigor.

3.1.2. Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados, previamente testados e aprovados.

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos.

c) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente.

d) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente (TA), valores de temperatura entre 18 e 26°C.

3.1.4. Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5. O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório;

3.1.8. Os analistas devem receber treinamento adequado sobre os riscos relacionados à EEB e Scrapie e os procedimentos de biossegurança devem ser seguidos;

3.1.9. Preferencialmente, área de trabalho e equipamentos dedicados;

3.1.10. Substituir vidro por plásticos, sempre que possível.

3.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.2.1 Materiais

- a) Provetas graduadas;
- b) Pipetas graduadas;
- c) Ponteiras descartáveis;
- d) Placas 96 cavidades;
- e) Tubos de ruptura de amostra;
- f) Descartador de ponteiras;
- g) Reservatórios para soluções (cubetas);
- h) Papel absorvente;
- i) Caneta para identificação;
- j) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;
- k) Recipientes para descarte de resíduo químico;
- l) Coberturas adesivas e coberturas em plástico rígido para placas 96 poços;
- m) Tubos para diluição de reagentes;
- n) Instrumentos descartáveis para dissecação de amostra (exemplo: facas plásticas descartáveis);
- o) Material descartável para pesagem e acondicionamento (exemplo: saco plástico, placa de Pedtri, prato)
- p) Sacos plásticos para autoclave, resistentes a temperatura superior a 134°C;
- q) Caneta permanente ou similar para identificação dos tubos;
- r) Equipamentos de proteção, tais como: calça, jaleco, luvas de nitrila, sapatos e óculos de proteção.

3.2.2 Equipamentos e Instrumentos

- a) Cabine de Segurança Biológica (CSB) II;
- b) Balança;
- c) Micropipetas mono e multicanais;
- d) Homogeneizador de amostras;
- e) Leitora de ELISA - placas para 96 cavidades

- f) Computador;
- g) Lavadora de microplacas (opcional);
- h) Agitador de placas tipo thermoshaker;
- i) Freezer/Ultrafreezer;
- j) Refrigerador;
- k) Timer de contagem regressiva;
- l) Termômetros.

3.2.3 Insumos

- a) Kit de ELISA para detecção de proteína priônica PrPsc em tecido sistema nervoso de ruminante

3.2.4 Soluções

- a) No preparo das soluções devem ser utilizados somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados;
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução concentrada;
- d) Diluir as soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5 Realização do ensaio

3.2.5.1 Preparo das amostras

- a) Realizar a preparação da amostra em Cabine de Segurança Biológica;
- b) Tecido nervoso: Bulbo na altura do óbex (FIGURAS 1 a 3);
- c) A amostra de eleição para o ELISA é o óbex (FIGURA 1), sendo no máximo 1,5 cm rostral ao mesmo;
- d) Posicionar o tronco encefálico com a secção em forma de V para cima;
- e) Retirar uma porção da hemissecção do óbex, na faixa de peso 0,25 a 0,35g com facas descartáveis (FIGURA 2);
- f) Colocar no tubo de disrupção;
- g) Uma hemissecção e o restante de amostra permanece continua disponível para os testes de confirmação, conservada sob congelamento;

FIGURA 1: Localização do óbex.



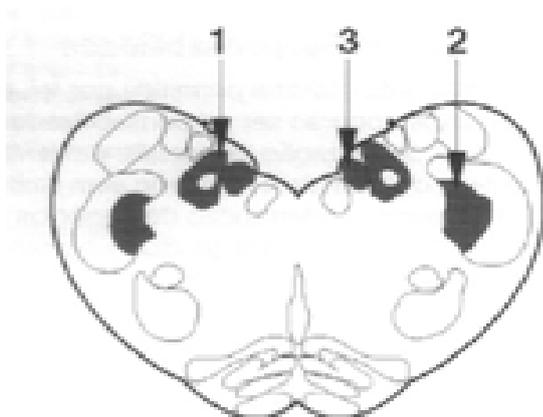
Fonte: LFDA/PE

FIGURA 2: Hemissecção do óbex



Fonte: LFDA/PE

FIGURA 3: Corte transversal do óbex indica as principais localizações do príon: 1- tracto solitário, 2- núcleo do nervo trigêmeo, 3- núcleo motor dorsal do vago



Fonte: OIE - Terrestrial Manual 2021

h) Dispor no homogeneizador os tubos de homogeneização contendo as amostras. Homogeneizar conforme orientação do fabricante do kit.

i) Caso o fabricante determine procedimentos diferentes dos estipulados nos itens anteriores, estas novas determinações devem ser adotadas.

3.2.5.2 Realização do Ensaio

a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;

- b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;
- c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;
- d) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;
- e) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (exemplo: papel toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível, não excedendo 5 minutos entre os passos de lavagem e adição de reagentes;
- f) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante do kit.

3.2.6. Critérios de aceitação do ensaio

O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7 Interpretação dos resultados

- a) A interpretação dos resultados se baseia na absorbância da amostra;
- b) Amostras cujas DO são inferiores ao valor de “cutoff” são consideradas negativas;
- c) Amostras cujas DO são iguais ou superiores ao valor de “cutoff”, são consideradas como inicialmente reativas para PrPsc e são novamente testadas conforme recomendação do fabricante do kit;
- d) Se as repetições forem inferiores ao “cutoff”, a amostra é considerada negativa. Se um dos valores repetidos for igual ou superior ao valor do “cutoff”, a amostra é considerada reativa e é realizado o ensaio confirmatório.
- e) Toda amostra reativa em teste rápido deve ser direcionada para teste confirmatório.

3.2.8 Emissão dos resultados

Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como “DETECTADO” e “NÃO DETECTADO” ou de acordo com o preconizado pelo fabricante do insumo (kit de diagnóstico);

3.2.9 Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e suas alíquotas deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 4. Retenção de Itens de Ensaio;
- b) Os resíduos são separados antes do descarte e destinados conforme legislação ambiental;
- c) Todo o material biológico utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processamento em autoclave por no mínimo 134°C por 18 minutos e encaminhado para incineração, conforme legislação ambiental. O monitoramento da esterilização deve estar comprovado em procedimentos próprios do laboratório.

3.3. Ensaio Imuno-histoquímico ELISA

3.3.1 Materiais

- a) Cuba de vidro com tampa compatível com o berço para amostras a serem coradas;
- b) Papel absorvente;

- c) Estantes para desparafinização de lâminas;
- d) Tubo de ensaio para diluição do anticorpo;
- e) Papel de filtro qualitativo;
- f) Funil;
- g) Ponteiras compatíveis com as micropipetas utilizadas;
- h) Descartador de ponteiras;
- i) Papel Alumínio;
- j) Pissetas, preferencialmente graduadas;
- k) Provetas graduadas;
- l) Sacos para resíduo infectante;
- m) Sacos plásticos para autoclave, resistentes a temperatura igual ou superior a 134°C;
- n) Lâmina polarizada dimensões 75 mm x 25 mm com borda pintada curta máxima 19 mm x 25mm, compatível com uso em Shandon/Sequenza: semelhante à Super Frost Ultra Plus;
- o) Lamínulas de vidro;
- p) Suporte de lâmina Shandon/Sequenza;
- q) Berço autoclavável, usado como suporte para coloração de lâminas;
- r) Cuba para imersão de lâminas resistente à autoclave 121°C a 123°C/25 minutos.

3.3.2 Equipamentos e Instrumentos

- a) Processador de tecidos para histologia;
- b) Micrótomo;
- c) CSB Classe II B 2;
- d) Estufa de Incubação Bacteriológica;
- e) Agitador de tubos, tipo vórtex;
- f) Micropipetas Monocanais;
- g) Pipetador automático;
- h) Autoclave programável que realize inclusive ciclo de 134°C por no mínimo 18 minutos;
- i) Microscópio óptico;
- j) Timer de contagem regressiva;
- k) Refrigerador;
- l) Termômetros.

3.3.3 Insumos

- a) Água deionizada;
- b) Xilol grau histológico P.A./ACS;
- c) Álcool etílico absoluto P.A.;
- d) Peróxido de Hidrogênio a 30% P.A.;
- e) Ácido Fórmico 98-99%, P.A.;
- f) Solução Target Retrieval (Dako K8005 50X - *Target Retrieval* solution, pH baixo);
- g) Anticorpo Monoclonal F99/97.6.1 (VMRD);
- h) Soro caprino normal;
- i) EnVision™+ Dual Link System-HRP (Dako K 4061) – kit de detecção;
- j) DAB Líquido 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (Dako 3468);
- k) Hematoxilina de Harrys;
- l) Hidróxido de Amônio em Solução Aquosa (NH₄OH, PM 35,05 g/mol, concentração 28 % - 30 %, aproximadamente 15N);
- m) Meio de montagem não aquoso (ex. Entellan);
- n) TRIS Base (hydroxymethyl) aminomethane (NH₂C(CH₂OH)₃, PM 121,14 g/mol);
- o) Ácido Clorídrico Concentrado (HCl, PA, 36,5%, PM 36,46 g/mol);
- p) Cloreto de sódio (NaCl, PM 58,44 g/mol);
- q) Tween 20 (Monooleato Polioxietileno Sorbitano).

3.3.4 Soluções

- a) Solução de Álcool etílico 95%;
- b) Solução de Álcool etílico 80%;
- c) Solução Tris Tween 20 (50MM TRIS-HCL, 300 MM NAACL, 0,1% TWEEN 20, pH7.6);
- d) Solução Tris HCl 0,1 mol/L, pH 7.6;
- e) Solução Aquosa de Amônia 37 mM;
- f) Solução de Peróxido de Hidrogênio a 3% em água;
- g) Solução de Recuperação (*Target Retrieval*) diluída 1:50 em água;
- h) Solução de 5% de soro caprino em Tris Tween 20;
- i) Anticorpo 1:18.000 em solução Tris Tween 20;
- j) Solução de DAB diluído conforme fabricante.

3.3.5 Realização do ensaio

3.3.5.1 Preparo dos reagentes/soluções

- a) Quando não determinado pelo protocolo, diluir a soluções utilizando água ultrapura destilada e homogeneizar bem;
- b) A bateria de reagentes da fase pré-kit é composta por cubas de vidro com tampas e identificações dos reagentes: xilol (cubas 1 e 2); álcool etílico absoluto (cubas 1 e 2); álcool 95% (cubas 1 e 2); álcool 80% (cubas 1 e 2);
- c) A solução de Ácido Fórmico pode ser mantida em cuba e reutilizada em até cinco vezes;
- d) Preparar no momento ou próximo ao uso as soluções: Peróxido de Hidrogênio 3%, Recuperação Antigênica, Anticorpo diluído e Cromógeno DAB;
- e) Filtrar a hematoxilina em papel de filtro qualitativo no dia do uso;
- f) Não permitir que as lâminas sequem em nenhuma das etapas da imuno-histoquímica.

3.3.5.2 Preparo das amostras

- a) Realizar a preparação da amostra em Cabine de Segurança Biológica;
- b) Amostra de eleição a ser testada: constituída por fragmento de bulbo, próximo ao óbex devidamente fixado em formol a 10% tamponado;
- c) Incluir fragmento de cerebelo, tálamo, gânglios basais e tecido linforreticular, quando disponível;
- d) Etapas iniciais do processamento: as fases pré-analíticas são de técnicas comuns histológicas: Fixação; Clivagem; Processamento Histológico; Inclusão em Parafina e Microtomia.

3.3.5.3 Desparafinização

- a) Realizar preferencialmente no mesmo dia do ensaio;
- b) Incubar a 54 °C a 62 °C por aproximadamente uma hora;
- c) Retirar e deixar em temperatura ambiente até secar por no mínimo 30 minutos.

3.3.5.4 Técnica de Imuno-histoquímica

- a) Todas as etapas são executadas a 21°C a 25°C, exceto quando indicado. As soluções/reagentes de coloração são usadas na temperatura ambiente (TA);
- b) Colocar as lâminas no berço de coloração;
- c) Após imergir o berço em cada reagente/solução, escorrer em papel toalha, antes de imergir na próxima cuba.

3.3.5.4.1 Desparafinização/Reidratação dos Tecidos

- a) Imergir em Xilol e incubar por 4 minutos. Duas vezes;
- b) Imergir em Álcool Etílico Absoluto e incubar por 2 minutos. Duas vezes;
- c) Imergir em Álcool Etílico a 95% e incubar por 2 minutos. Duas vezes;
- d) Imergir em Álcool Etílico a 80 % e incubar por 2 minutos. Duas vezes;
- e) Imergir em água deionizada por dez vezes.

3.3.5.4.2 Bloqueio da Peroxidase Endógena

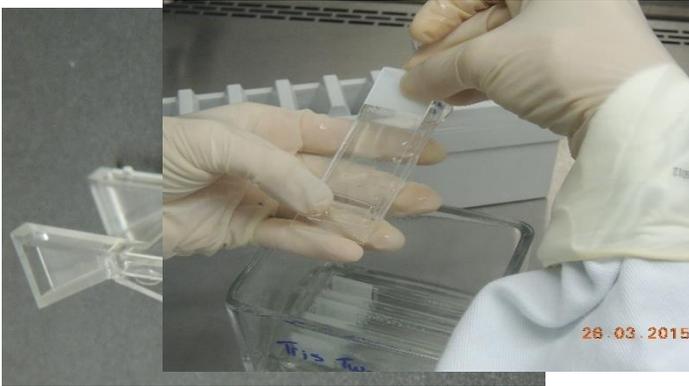
- a) Imergir em Solução de Peróxido de Hidrogênio a 3% em água, recém preparada, incubar por 10 minutos;
- b) Imergir em água deionizada por dez vezes. As lâminas podem permanecer na água por algumas horas, se necessário.

3.3.5.4.3 Ativação do Antígeno

- a) Imergir em Ácido Fórmico 98-99%, incubar por 5 minutos;
- b) Imergir em água deionizada por dez vezes;
- c) Imergir em Solução Tris HCl 0,1M pH 7,6 por 3 trocas (3 minutos, 2 minutos e 2 minutos);
- d) Transferir o suporte com as lâminas para um recipiente resistente ao calor, contendo a Solução de Recuperação (*Target Retrieval*) previamente diluída 1:50, envolver em papel alumínio e processar em autoclave a 121°C a 123°C por 25 minutos;
- e) Resfriar;
- f) Manter as lâminas em Solução Tris Tween 20 até a montagem em Sistema Shandon-Sequenza;
- g) Montar as lâminas no Sistema Shandon-Sequenza (FIGURAS 4 a 9). Pipetar 100 µL de Solução Tris Tween 20 e incubar por 5 minutos.

3.3.5.4.4 Montagem no Sistema Shandon-Sequenza

FIGURA 6: Clip do Sistema Shandon-



Fonte: LFDA-PE

FIGURA 7: Encaixe da Lâmina no Clip Sistema Shandon-Sequenza

Fonte: LFDA-PE

FIGURA 8: Lâmina montada no Clip Sistema Shandon-Sequenza



Fonte: LFDA-PE

FIGURA 9: Lâmina com reagente, montada no Sistema Shandon-Sequenza. Fonte: LFDA-PE



Fonte: LFDA-PE

3.3.5.4.5 Imunocoloração

- Pipetar 100 μ L de solução de 5 % de soro caprino em Tween 20 e incubar por 15 minutos;
- Pipetar 100 μ L de solução de anticorpo diluído 1:18000, incubar TA por uma hora ou incubar a 4°C a 8°C *overnight*;
- Adicionar Solução Tris Tween 20 com pisseta e incubar por 5 minutos, duas vezes;
- Pipetar 100 μ L do kit de detecção (Envision) e incubar por 30 minutos;
- Adicionar Solução Tris Tween 20 com pisseta e incubar por 5 minutos, duas vezes;
- Adicionar água deionizada com pisseta e incubar por 2 minutos, duas vezes;

- g) Pipetar 100 µL de cromógeno DAB incubar de 5 a 30 minutos (média 10 minutos). Opcionalmente monitorar, microscopicamente, o tempo de incubação até que a intensidade de coloração desejada seja obtida;
- h) Adicionar água deionizada com pisseta e incubar por 2 minutos, duas vezes;
- i) Retirar as lâminas do Sistema Shandon-Sequenza, colocar no berço;
- j) Imergir (1 banho) em Solução de Hematoxilina de Harrys;
- k) Imergir em água destilada, deionizada ou potável, por no mínimo 4 vezes;
- l) Imergir em Solução de Amônia 37mM por até 10 vezes, ou até que seja perceptível a mudança da coloração do corte histológico para azul;
- m) Imergir em água deionizada e incubar por 2 a 5 minutos;
- n) Imergir em Álcool Etílico a 80 % e incubar por 2 minutos. Duas vezes;
- o) Imergir em Álcool Etílico a 95% e incubar por 2 minutos. Duas vezes;
- p) Imergir em Álcool Etílico Absoluto e incubar por 2 minutos. Duas vezes;
- q) Imergir em Xilol e incubar por 4 minutos. Duas vezes;
- r) Manter no Xilol durante a montagem das lâminas em Entellan.

3.3.5.4.6 Montagem das lâminas

a) Dispor a lâmina horizontalmente com o corte voltado para cima, pingar duas gotas de meio de montagem não aquoso sobre o corte histológico. Ajustar a quantidade de gotas conforme o tamanho do corte;

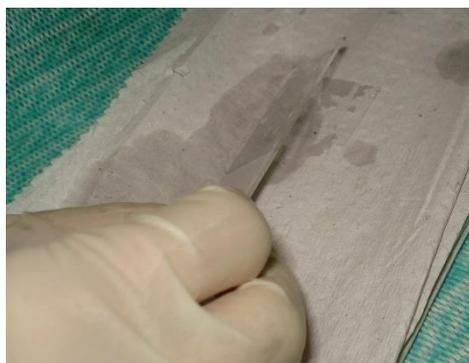
b) Colocar a lamínula encostando-a no meio de montagem numa angulação aproximada de 45° (FIGURA 10), soltando-a lentamente em direção ao corte para que não haja formação de bolhas. Esta etapa pode ser feita de forma contrária, posicionando a lâmina em cima da lamínula (FIGURA 11), conforme preferência do executor.

FIGURA 10 Montagem da lâmina



Fonte LFDA-PE

FIGURA 11 Montagem da lâmina



Fonte LFDA-PE

3.3.5.5 Critérios de aceitação

a) Para cada rodada são usados controles positivos e negativos, distribuídos preferencialmente no início e final da rodada. A rodada de provas é considerada válida quando os controles funcionam adequadamente;

b) Quando os controles não funcionarem adequadamente, repetir a prova.

3.3.6 Interpretação dos resultados

- a) Realizar a leitura em microscópio óptico. São observadas as reações características em marrom nos cortes positivos (FIGURAS 12 e 13) e a coloração totalmente azul nos cortes negativos (FIGURAS 14 e 15).

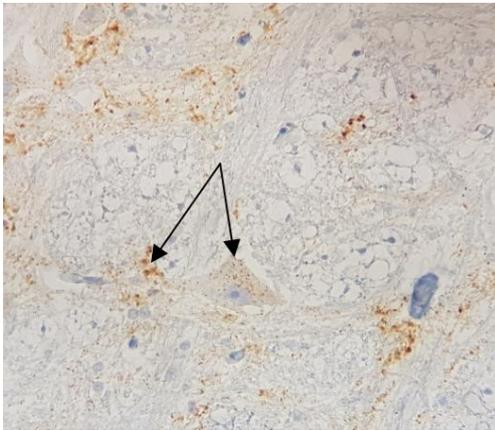


FIGURA 12: presença de imunomarcção em aumento de 400

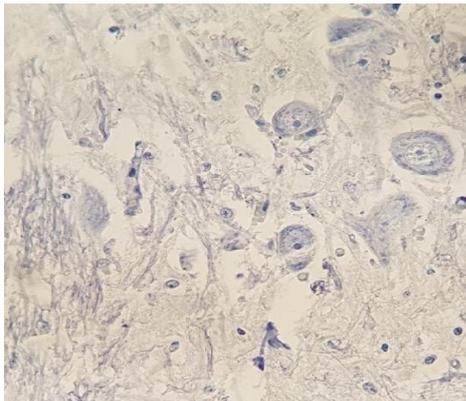
Fonte: LFDA-PE



FIGURA 13: presença de imunomarcção em aumento de 400

Fonte: LFDA-PE

FIGURA 14: ausência de imunomarcção em aumento de 400



Fonte: LFDA-PE

FIGURA 15: ausência de imunomarcção em aumento de 100 vezes



Fonte: LFDA-PE

3.3.6.1 Amostra de Tecido Nervoso

a) Positivo: quando precipitado marrom característico (FIGURAS 12 e 13) é observado nos neurônios e/ou demais células nervosas que compõem o óbex ou segmento do SNC mais próximo (na ausência do óbex). Os tipos de imunomarcações descritas na IHQ para as Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis são as citadas abaixo:

- I. Imunomarcação particulada no neurópilo da substância cinzenta (dendritos) é a principal forma de imunomarcação específica para a doença. As áreas mais comumente afetadas na EEB são o trato espinhal do núcleo trigêmio, o núcleo e o trato solitário, e o núcleo dorsal do vago;
- II. Concentrado granular ou particulado margeando neurônios e seus prolongamentos;
- III. Imunomarcação granular fina ou particulada intraneuronal nos núcleos alvo;
- IV. Depósitos lineares de proteína priônica associados com dendritos;
- V. Imunomarcação estrelar (reticular) multifocal, provavelmente associada às células da glia;
- VI. Imunomarcação fibrilar, granular ou particulada ao redor de vasos sanguíneos e epêndima;
- VII. Intensa imunomarcação em forma de “placas”. Comumente observadas na Doença Crônica Depauperante dos cervídeos, menos comum no *Scrapie* e rara na EEB.

b) Negativo: quando não há precipitado marrom granular característico, estando o corte histológico totalmente corado em azul (FIGURAS 14 e 15).

c) Inconclusivo: quando há imunomarcação inespecífica;

d) Imprópria: amostra sem condições para análise após repetições.

3.3.7 Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como “Positivo”, “Negativo”, “Inconclusivo” ou “Imprópria”.

3.3.8 Descarte das amostras e resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e suas alíquotas, deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 4. Retenção de Itens de Ensaio;

b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;

c) Todo o material biológico utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de “esterilização” em autoclave por no mínimo 134°C por 18 minutos e encaminhado para incineração, conforme legislação ambiental. O monitoramento da esterilização deve estar comprovado em procedimentos próprios do laboratório;

d) O resíduo químico (reagentes e/ou amostras fixadas em formol) deve ser identificado e encaminhado para incineração, conforme legislação ambiental;

e) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

4. Retenção de itens de ensaio

a) As amostras negativas são retidas e descartadas após no mínimo 30 dias do envio do resultado.

b) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

Referências Bibliográficas

Advisory Committee on Dangerous Pathogens Spongiform Encephalopathy. Transmissible Spongiform Encephalopathy Agents: Safe working and the prevention of infection. 46p., March, 1998.

Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5ª Edição, revisado em set/2009, U.S. Department of Health and Human Service, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health.

Canadian Biosafety Handbook. 2ª Edição, revisado em março/2021. Disponível em <https://www.canada.ca/en/public-health/services/canadian-biosafety-standards-guidelines/handbook-second-edition.html#s25>. Acesso em 30 de agost. de 2021.

Comparative Performance of Three TSE Rapid Tests for Surveillance in Healthy Sheep Affected by Scrapie, *Journal of Virological Methods* 173 (2011) 161-168.

Czub, S, Graham, C e Pickles, T. Procedimento Padrão CFIA. Immunohistochemical Detection of Prion Protein in Bovine Spongiform Encephalopathy. CFIA, v 1.10, December 2017, 33p.

Deeber, S.O.S, et al. Transmissible Spongiform Encephalopathy Diagnosis Using Prpsc Immunohistochemistry on Fixed but Previously Frozen Brain Samples. *Journal of Histochemistry & Citochemistry*, v. 50, n. 5, p. 611-616, Maio, 2002.

Fixation, Tissue Processing, Histology and Immunohistochemistry Procedures for Diagnosis of Animal TSE (BSE, Scrapie, Atypical Scrapie), Animal & Plant Health Agency, 2018.

Gray JG, Dudas S, Czub S (2011) A Study on the Analytical Sensitivity of 6 BSE Tests Used by the Canadian BSE Reference Laboratory. *PLoS ONE* 6(3): e17633. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017633>.

Guidelines for Evaluation of Changes to Approved Protocols for TSE Rapid Tests and Details of Information to be Supplied by rapid Test manufacturers to the EURL. Version 11, January 2018. Disponível em <https://science.vla.gov.uk/tse-lab-net/documents/tse-guide-test.pdf>.

Guidelines Sample requirements for TSE testing and confirmation. Animal & Plant Health Agency. Sampling Guidance Document v2 September 2013 Page 1 of 11 Reviewed January 2019

Instrutivo do Kit Herdchek* Antígeno BSE-*Scrapie* 06-08519-12. Versão # 12.

Kittelberger R, et al. Evaluation of two commercial, rapid, ELISA kits testing for scrapie in retro-pharyngeal lymph nodes in sheep. *N Z Vet J* 2014;62:343–350.

Meloni D, Davidse A, Langeveld JPM, Varello K, Casalone C, Corona C, et al. (2012) EU-Approved Rapid Tests for Bovine Spongiform Encephalopathy Detect Atypical Forms: A Study for Their Sensitivities. *PLoS ONE* 7(9): e43133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043133>

Neuropathology: Confirmatory diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) in cattle and small ruminants. Confirmatory Diagnostic Criteria v3 November 2016 Reviewed January 2019 Dezembro de 2013.

O'ROURKE, I. K. et al. Active surveillance for Scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 5, p. 966-971, Sept. 2002.

O'ROURKE, I. K. et al. Preclinical diagnosis of Scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 9, p. 3254-3259, Sept. 2000.

Pathogen Safety Data Sheet – Bovine Spongiform Encephalopathy, disponível em <https://inspection.canada.ca/animal-health/terrestrial-animals/diseases/reportable/bovine-spongiform-encephalopathy/eng/1323991831668/1323991912972>. Acesso em 16 de set. de 2021.

Scientific Opinion Analytical Sensitivity of Approved TSE Rapid Tests – EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2009.

Scientific Opinion on Sensitivity of Approved TSE rapid tests – new data for assessment of two rapid tests – European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. EFSA Journal 2010; 8 (4): 1591.

Scientific Opinion on the Evaluation of the New TSE rapid test submitted in the Framework of the Commission Call for Expression of Interest 2007/S204-247339- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2012.

Scrapie. CHAPTER 3.8.11 Version (NB: Version adopted in May 2016). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso 16 de set. de 2021.

TSE confirmatory and discriminatory testing. Disponível em <https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/confirmatory-diagnosis.html>

WEBSTER, J. D. et al. Effects of prolonged formalin fixation on diagnostic immunohistochemistry in domestic animals. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, v. 57, n. 8, p. 753 - 761, 2009.

Secção 2.6
Multiespécies

CAPÍTULO 2.6.1 FEBRE AFTOSA - FA

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da Febre Aftosa:

1.1. Detecção da Resposta Imune

- a) Soro sanguíneo

1.2. Identificação do Agente

- a) Epitélio;
- b) Líquido de vesículas;
- c) Líquido esofágico faríngeo (LEF);
- d) Suabe de vesículas rompidas

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controle Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

2.1.3. As amostras deverão ser encaminhadas ao laboratório, individualmente separadas por matriz, e obedecendo a critérios de biossegurança.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos

a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

Detecção da Resposta Imune

3.2. ELISA para proteínas não estruturais ELISA 3ABC

3.2.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Ponteiras descartáveis;
- g) Descartador de ponteiras;
- h) Reservatórios para soluções (cubetas);
- i) Papel absorvente;
- j) Caneta para identificação de vidraria;
- k) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;

3.2.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Geladeira;
- c) Estufa;
- d) Termômetros
- e) Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Leitora de ELISA;
- h) Cronômetros;
- i) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- j) Agitador de microplacas (opcional);
- k) Lavadora de microplacas (opcional).

3.2.3. Insumos

a) Kits de ELISA para a detecção de anticorpos para proteínas não estruturais do vírus da Febre Aftosa.

3.2.4. Soluções

a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados.

b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;

c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;

d) Diluir a soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5. Realização do ensaio

a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;

b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;

c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;

d) Utilizar ponteiros distintas para cada controle e amostra de soro;

e) Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;

f) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;

g) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;

h) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2.6. Critérios de aceitação do Ensaio

a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos resultados

a) De acordo com as DOs obtidas considera-se as amostras como reagentes e não reagentes;

b) No caso de uso de kits em que as amostras com DO entre os dois pontos de corte estabelecidos são consideradas inconclusivas, essas amostras deverão ser novamente ensaiadas. Se no reensaio o inconclusivo persistir, as amostras de bovinos e bubalinos devem ser submetidas ao ensaio de EITB - Ensaio Imunoenzimático de Eletrotransferência.

c) Amostras reagentes de rebanhos vacinados de bovinos e bubalinos devem ser submetidos ao ensaio de EITB.

d) Amostras reagentes de outras espécies ou de rebanhos de bovinos e bubalinos não vacinados devem ser encaminhadas ao LFDA-MG para ensaio de Virusneutralização.

3.2.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, reagente, não reagente, ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.2.10. Retenção de Itens de Ensaio

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

d) O laboratório deve assegurar a biosseguridade dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidos antes do descarte.

3.3. ELISA de competição em fase líquida (CFL) para detecção de anticorpos contra o vírus da Febre Aftosa (teste de triagem)

3.3.1. Materiais

a) Luvas para procedimentos;

b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;

c) Provetas graduadas;

d) Béqueres;

e) Erlenmeyers;

f) Ponteiras descartáveis;

g) Descartador de ponteiras;

h) Reservatórios para soluções (cubetas);

i) Papel absorvente;

j) Caneta para identificação de vidraria;

k) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;

l) Microplacas de fundo em “U”;

m) Microplacas NUNC MaxSorb, ou similar.

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

a) Autoclave;

b) Geladeira;

c) Estufa;

d) Micropipetas monocal e multicanal de volumes reguláveis;

e) Pipetador automático ou manual;

f) Leitora de ELISA;

g) Cronômetros;

h) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);

i) Agitador de microplacas;

- j) Lavadora de microplacas (opcional).

3.3.3. Insumos

- a) Set de ensaio de ELISA de competição em fase líquida (CFL) para a detecção de anticorpos contra a proteínas estruturais do vírus da Febre Aftosa (VFA), produzidos pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa contendo soros captura, detector, controle negativo, fraco positivo e forte positivo, soros bloqueadores de bovino e coelho e antígeno;
- b) IgG de cabra anti-IgG de cobaio conjugado com peroxidase (Sigma nº catálogo A7289);
- c) Pastilhas de OPD (ortofenildiamina) de 2 ou 10mg;
- d) Albumina Bovina Grau II;
- e) Albumina Bovina Grau V;
- f) Fosfato de sódio;
- g) Ácido cítrico;
- h) Carbonato de sódio grau P.A.;
- i) Bicarbonato de sódio grau P.A.;
- j) Peróxido de hidrogênio a 30%;
- k) Tween 20 (Sigma cat. Nº P-1379);

3.3.4. Soluções

- a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados.
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;
- d) PBST (Tampão salina fosfatada pH 7,4 com 1% de ovoalbumina Grau II e 0,05% de Tween 20)
- e) Tampão PBST (anexo 010);
- f) Solução salina fisiológica 0,85% pH 7,2 – 7,4;
- g) Tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6;
- h) Peróxido de hidrogênio a 30%;
- i) Solução de ácido sulfúrico 1,5 mol/L.

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1. Sensibilização das placas com anticorpos captura – microplacas NUNC MaxSorb

- a) Identificar as placas em ordem sequencial.
- b) Descongelar os soros captura à temperatura ambiente.
- c) Preparar as diluições de uso de cada soro captura em tampão carbonato-bicarbonato, conforme recomendações do fabricante. Homogeneizar em agitador magnético.
- d) Colocar em cada poço da placa 100 µL de soro de captura diluído em tampão carbonato, distribuído como indicado a seguir;
- e) Empilhar as placas em grupos de 10, no máximo, e selar a placa superior.
- f) Incubar por 16 a 20 horas entre 4 °C e 8 °C.
- g) Retirar da geladeira e mantê-las à temperatura ambiente por 1h.

- h) Descartar o conteúdo das placas e lavá-las uma vez com 200 µL de solução salina fisiológica por poço.
- i) Descartar o conteúdo das placas e batê-las sobre papel absorvente ou toalha.
- j) Adicionar 100 µL por poço de PBS com 1% de ovoalbumina Grau V.
- k) Incubar por 1h à temperatura ambiente.
- l) Descartar o conteúdo das placas e lavá-las uma vez com 200 µL de solução salina fisiológica por poço.
- m) Descartar o conteúdo das placas e batê-las sobre papel ou toalha absorvente.
- n) As placas podem ser utilizadas imediatamente ou podem ser armazenadas. Para isto, cobri-las com filme plástico e armazená-las a – 20°C em posição invertida.

3.3.5.2 Preparo do tampão bloqueador (PBSTB)

- a) Descongelar o PBST à temperatura ambiente;
- b) Adicionar 2 mL de soro de coelho e 2 mL de soro de bovino para 100 mL do tampão PBST e homogeneizar antes do uso.

3.3.5.3. Diluições dos soros testes - fase líquida em microplacas fundo “U”

3.3.5.3.1. Sorotipos “O”, “A” e “C” – Triagem

- a) Em uma placa auxiliar preparar a diluição dos soros:
- b) Numerar as microplacas de fundo em U em ordem sequencial. A diluição final dos soros será de 1:126 (título 2,1);
- c) Adicionar 248 µL da solução PBSTB em todos os poços da placa, com exceção dos poços das colunas 5, 6, 11 e 12 (linhas D a H);
- d) Adicionar 4 µL dos soros de A até H (soro 1: A1, soro 2: B1, e assim sucessivamente até linha H, com exceção dos poços D a H das colunas 5, 6, 11 e 12);
- e) Homogeneizar o conteúdo da coluna 1 da placa de pré-diluição pelo menos 3 vezes e transferir 40 µL para as colunas 1 e 2 de outra placa de fase líquida correspondente;
- f) Homogeneizar o conteúdo da coluna 2 pelo menos 3 vezes e transferir 40 µL para as colunas 3 e 4 de outra placa de fase líquida correspondente. Repetir esse procedimento, trocando-se as ponteiros, até a transferência de todos os soros, em duplicata, para a placa de fase líquida correspondente, isto é, coluna 3 para as colunas 5 e 6, coluna 4 para as colunas 7 e 8, coluna 5 para as colunas 9 e 10 e coluna 6 para as colunas 11 e 12.
- g) A partir da coluna 7, inicia-se o mesmo procedimento para outra placa de fase líquida correspondente, transferindo-se os soros desta coluna para as colunas 1 e 2 da próxima placa, e assim sucessivamente.

3.3.5.3.2. Diluições dos soros testes Sorotipos “O”, “A” e “C” – pequenos ruminantes (ovinos e caprinos)

- a) Em uma placa auxiliar preparar a diluição dos soros:
- b) Numerar as microplacas de fundo em U em ordem sequencial. A diluição final dos soros será de 1:10 (título 1);
- c) Adicionar 200 µL da solução PBSTB em todos os poços da placa, com exceção dos poços das colunas 5, 6, 11 e 12 (linhas D a H);
- d) Adicionar 50 µL dos soros de A até H (soro 1: A1, soro 2: B1, e assim sucessivamente até linha H com exceção dos poços D a H das colunas 5, 6, 11 e 12);

- e) Transferir os soros da placa de pré-diluição para a placa de fase líquida como descrito nos itens “e”, “f”, e “g” do item 5.3.1;
- f) Diluir os soros controle e prosseguir conforme item “Desenvolvimento”.

3.3.5.3.3. Diluição dos soros para seleção de bovinos para controle de vacinas

- a) Para os vírus O e C adicionar 121 µL de PBSTB em todos os poços da placa, com exceção dos poços das colunas 5, 6, 11 e 12 (linhas D a H). Para o vírus A adicionar 95 µL de PBSTB;
- b) Adicionar 11 µL de soro por poço para os vírus O e C e para o vírus A 5 µL Soro 1: A 1; soro 2: B 1 e assim sucessivamente até linha H, com exceção dos poços D a H das colunas 5, 6, 11 e 12;
- c) Transferir os soros da placa de pré-diluição para a placa de fase líquida como descrito nos itens “e”, “f”, e “g” do item 5.3.1;
- d) Diluir os soros controle e prosseguir conforme item “Desenvolvimento”

3.3.5.4 Distribuição dos controles

- a) Distribuir 40 µL de tampão PBSTB nos poços D10 a D12, E10 a E12 e F10 a F12;
- b) Distribuir 40 µL do tampão de diluição nos poços G9 a G12 (Controle do antígeno);
- c) Distribuir 80 µL do tampão de diluição nos poços H9 a H12 (Branco).

3.3.5.5. Execução

- a) Diluir o antígeno à metade da concentração recomendada pelo fabricante;
- b) Acrescentar 40 µL do antígeno diluído em todos os poços, com exceção dos poços da linha H (9 a 12);
- c) Incubar as placas por 60 minutos a 37°C ± 1 °C, sendo os primeiros 20 minutos sob agitação;
- d) Descongelar as placas de fase sólida previamente sensibilizada 20 minutos na geladeira, 20 minutos à temperatura ambiente e 20 minutos na estufa a 37 ° C ± 1 °C (deixá-las sempre invertidas sobre papel toalha);
- e) Identificar as placas de fase sólida;
- f) Transferir 50 µL de cada poço da fase líquida para a placa de fase sólida seguindo-se a mesma ordem. Trocar as ponteiros a cada transferência. Para os soros controle, a transferência deve ser iniciada do soro mais diluído (coluna 12) para o soro mais concentrado (coluna 9). Nesse caso não é necessário trocar as ponteiros. Cada placa de fase sólida irá conter 38 soros em teste e os controles;
- g) Incubar por 30 ± 2 minutos, 37 °C ± 1 °C, sob agitação;
- h) Preparar a diluição do soro detector conforme recomendação do fabricante. Incubar a 37°C ± 1 °C até o momento do uso;
- i) Lavar a placa três vezes com salina fisiológica com Tween 20 a 0,05% (1 mL de Tween para 2 litros de salina);
- j) Distribuir 50 µL do soro detector em todos os poços da placa;
- k) Incubar a 37 °C ± 1 °C por 30 ± 2 minutos, sob agitação. Preparar a diluição do conjugado e incubá-lo a 37 °C ± 1 °C até o momento do uso;
- l) Lavar a placa três vezes com salina fisiológica com Tween 20 a 0,05%;
- m) Distribuir 50 µL do conjugado em todos os poços da placa;
- n) Incubar a 37°C ± 1°C por 30 ± 2 minutos, sob agitação;
- o) Preparar a solução de substrato-cromógeno como descritas no (anexo 009);
- p) Lavar a placa quatro vezes com salina fisiológica com Tween 20 a 0,05%;
- q) Adicionar o OPD ao tampão ácido e, em seguida, o peróxido de hidrogênio. Homogeneizar;
- r) Distribuir 50 µL do substrato em todos os poços da placa;
- s) Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos, sob proteção da luz;

- t) Adicionar 50 µL da solução de ácido sulfúrico 1,5 mol/L em todos os poços da placa.

3.3.6. Critérios de aceitação do Ensaio

a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.3.7. Interpretação dos resultados

- a) O percentual de inibição (PI) dos soros em teste deve ser calculado pela fórmula abaixo:
b) $PI = (\text{média da DO dos soros em teste} / \text{média da DO do controle de antígeno}) \times 100$;
c) Amostra positiva (PI inferiores a 49%);
d) Amostra negativa (PI superiores a 49%);
e) Amostra inconclusivo ($49\% \leq PI \leq 51\%$). Soros com PI dentro desta faixa deverão ser submetidos à prova de titulação.
f) Para a triagem de bovinos para o controle de vacinas serão considerados selecionados os animais com valor de PI superior a 51 %. No dia zero pós vacinação (0 dpv), animais reagentes ou inconclusivos deverão ser titulados. Caso os animais apresentem título inferior a 1,4 para os vírus C e O, e menor que 1,6 para o vírus A poderão ser utilizados. Até três, dos 18 bovinos utilizados no teste poderão ser eliminados em caso de reatividade no 0 dia pós vacinação (dpv).

3.3.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como reagente, não reagente e inconclusivo.

3.3.9. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.3.10. Retenção de Itens de Ensaio
b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.3.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo
Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.4. ELISA de competição em fase líquida (CFL) para detecção de anticorpos contra o vírus da Febre Aftosa (titulação)

3.4.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Ponteiras descartáveis;
- g) Descartador de ponteiras;
- h) Reservatórios para soluções (cubetas);
- i) Papel absorvente;
- j) Caneta para identificação de vidraria;
- k) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavagem;
- l) Microplacas de fundo em “U”;
- m) Microplacas NUNC maxsorb.

3.4.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Geladeira;
- c) Estufa;
- d) Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- e) Pipetador automático ou manual;
- f) Leitora de ELISA;
- g) Cronômetros;
- h) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- i) Agitador de microplacas;
- j) Lavadora de microplacas (opcional).

3.4.3. Insumos

- a) Set de ensaio de ELISA de competição em fase líquida (CFL) para a detecção de anticorpos contra a proteínas estruturais do vírus da Febre Aftosa (VFA), produzidos pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa contendo soros captura, detector, controle negativo, fraco positivo e forte positivo, soros bloqueadores de bovino e coelho e antígeno;
- b) IgG de cabra anti-IgG de cobaio conjugado com peroxidase (Sigma nº catálogo A7289);
- c) Pastilhas de OPD (ortofenildiamina) de 2 ou 10mg;
- d) Albumina Bovina Grau II;
- e) Albumina Bovina Grau V;
- f) Fosfato de sódio;
- g) Ácido cítrico;
- h) Carbonato de sódio grau P.A.;
- i) Bicarbonato de sódio grau P.A.;
- j) Peróxido de hidrogênio a 30%;
- k) Tween 20 (Sigma cat. Nº P-1379);
- l) Microplacas de fundo em “U”;

- m) Microplacas NUNC maxsorb.

3.4.4. Soluções

- a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados.
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;
- d) PBST (Tampão salina fosfatada pH 7,4 com 1% de ovoalbumina Grau II e 0,05% de Tween 20)
- e) Tampão PBST;
- f) Solução salina fisiológica 0,85% pH 7,2 – 7,4;
- g) Tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6;
- h) Peróxido de hidrogênio a 30%
- i) Solução de ácido sulfúrico 1,5 mol/L

3.4.5. Realização do ensaio

3.4.5.1 Sensibilização das placas com anticorpos captura – microplacas NUNC MaxSorb

- a) Identificar as placas em ordem sequencial.
- b) Descongelar os soros captura à temperatura ambiente.
- c) Preparar as diluições de uso de cada soro captura em tampão carbonato-bicarbonato, conforme recomendações do fabricante. Homogeneizar em agitador magnético.
- d) Colocar em cada poço da placa 100 µL de soro de captura diluído em tampão carbonato, distribuído como indicado a seguir;
- e) Empilhar as placas em grupos de 10, no máximo, e selar a placa superior;
- f) Incubar por 16 a 20 horas entre 4 °C e 8 °C;
- g) Retirar da geladeira e mantê-las à temperatura ambiente por 1h.
- h) Descartar o conteúdo das placas e lavá-las uma vez com 200 µL de solução salina fisiológica por poço.
- i) Descartar o conteúdo das placas e batê-las sobre papel absorvente ou toalha.
- j) Adicionar 100 µL por poço de PBS com 1% de ovoalbumina Grau V.
- k) Incubar por 1h à temperatura ambiente.
- l) Descartar o conteúdo das placas e lavá-las uma vez com 200 µL de solução salina fisiológica por poço.
- m) Descartar o conteúdo das placas e batê-las sobre papel ou toalha absorvente.
- n) As placas podem ser utilizadas imediatamente ou podem ser armazenadas. Para isto, cobri-las com filme plástico e armazená-las a – 20°C em posição invertida.

3.4.5.2 Preparo do tampão bloqueador (PBSTB)

- a) Descongelar o PBST à temperatura ambiente;
- b) Adicionar 2 mL de soro de coelho e 2 mL de soro de bovino para 100 mL do tampão PBST e homogeneizar antes do uso

3.4.5.3. Protocolo de titulação de 6 soros

- a) Em uma placa auxiliar (fase líquida), preparar a diluição dos soros conforme QUADRO 1.
- b) Adicionar 40 µL de PBSTB nas colunas 2 a 6 e 8 a 12. Na linha H, colunas 7 a 12 (branco), adicionar 80 µL de PBSTB;
- c) Adicionar 50 µL de cada soro nos seguintes poços: soro 01 (A1 e B1), soro 02 (C1 e D1), soro 03 (E1 e F1), soro 04 (G1 e H1), soro 05 (A7 e B7), soro 06 (C7 e D7). Trocar as ponteiros a cada amostra ou soro controle. Utilizar ponteiros novas;
- d) Adicionar 50 µL de soro controle negativo (C-) puro no poço E7, 50µL do soro fraco positivo (C+) diluído 1:5 em F7 e 50µL do soro forte positivo (C++) diluído 1:100 em G7;
- e) Diluir os soros controles homogeneizando três vezes e transferindo sucessivamente 10 µL da coluna E7 até E10 (soro negativo), da coluna F7 até F10 (soro fraco positivo) e da G7 até G10 (forte positivo). Ao final descartar 10 µL da última diluição;
- f) Diluir os soros teste transferindo 10 µL da coluna 1 para a coluna 2. Homogeneizar três vezes e transferir 10 µL da coluna 2 para a coluna 3, e assim até a coluna 6 (soros de 1 a 4) e do mesmo modo da coluna 7 a 12 (soros 5 e "6). Descartar os 10 µL da última diluição.
- g) Prosseguir conforme item "Execução".

QUADRO 1 Distribuição das amostras (6 soros) e controles na placa auxiliar (fase líquida).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S5	S5	S5	S5	S5	S5
B	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S5	S5	S5	S5	S5	S5
C	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S6	S6	S6	S6	S6	S6
D	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S6	S6	S6	S6	S6	S6
E	S3	S3	S3	S3	S3	S3	C-	C-	C-	C-	CA	CA
F	S3	S3	S3	S3	S3	S3	C+	C+	C+	C+	CA	CA
G	S4	S4	S4	S4	S4	S4	C++	C++	C++	C++	CA	CA
H	S4	S4	S4	S4	S4	S4	B	B	B	B	B	B

3.4.5.4. Execução

- a) Diluir o antígeno à metade da concentração recomendada pelo fabricante;
- b) Acrescentar 40 µL do antígeno diluído em todos os poços, com exceção dos poços destinados aos brancos (H7 a H12);
- c) Incubar as placas por 60 minutos a 37 °C ± 1 °C, sendo os primeiros 20 minutos sob agitação;
- d) Descongelar as placas de fase sólida previamente sensibilizada 20 minutos na geladeira, 20 minutos à temperatura ambiente e 20 minutos na estufa a 37 °C ± 1 °C (em cada etapa, deixá-las invertidas sobre papel toalha);
- e) Identificar as placas de fase sólida;
- f) Transferir 50 µL de cada poço da fase líquida para a placa de fase sólida;
- g) Incubar por 30 minutos a 37 °C ± 1 °C, sob agitação;

- h) Preparar a diluição do soro detector conforme recomendação do fabricante. Incubar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ até o momento do uso;
- i) Lavar a placa três vezes com salina fisiológica com Tween 20 a 0,05 % (1 mL de Tween para 2 litros de salina);
- j) Distribuir 50 μL do soro detector em todos os poços da placa;
- k) Incubar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 30 minutos, sob agitação. Preparar a diluição do conjugado e incubá-lo a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ até o momento do uso;
- l) Lavar a placa três vezes com salina fisiológica com Tween 20 a 0,05 %;
- m) Distribuir 50 μL do conjugado em todos os poços da placa;
- n) Incubar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 30 minutos, sob agitação;
- o) Preparar a solução de substrato-cromógeno nas seguintes proporções (quantidade suficiente para cinco placas);
- p) Lavar a placa quatro vezes com salina fisiológica com Tween 20 a 0,05 %;
- q) Adicionar o OPD ao substrato e, em seguida, a água oxigenada. Homogeneizar;
- r) Distribuir 50 μL do substrato-cromógeno em todos os poços da placa;
- s) Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos, sob proteção da luz;
- t) Adicionar 50 μL da solução de ácido sulfúrico 1,5 mol/L em todos os poços da placa.

3.4.6. Critérios de aceitação do Ensaio

- a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.4.7. Interpretação dos resultados

- a) Para cálculo do título 50% dos soros, seguir os seguintes passos;
- b) Calcular a Densidade Ótica (DO) média do controle do antígeno (X);
- c) Obter 50% deste valor médio $X/2 = Y$;
- d) A partir do valor médio obtido anteriormente (Y), eleger a leitura imediatamente superior (A);
- e) Da mesma forma, eleger a leitura imediatamente inferior (B);
- f) Subtrair a leitura inferior da superior $(A-B) = (Z)$;
- g) Subtrair do valor médio (Y), a leitura inferior (B): $(Y-B)$;
- h) Multiplicar o logaritmo do fator de diluição (C) por $(Y-B)$;
- i) Dividir o valor obtido no item 7 pelo valor de Z;
- j) Somar o valor obtido no item 8 com o logaritmo da diluição da leitura inferior B (D).
- k) Fórmula da interpolação linear: $\text{Título } 50\% = \frac{(Y-B) C}{Z} + D$
- l) O resultado final será emitido como o valor do título alcançado no cálculo anterior.

3.4.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como o título final do soro.

3.4.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.4.10. Retenção de Itens de Ensaio

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.4.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.5. EITB - Ensaio Imunoenzimático de Eletrotransferência

3.5.1. Materiais

- a)** Luvas para procedimentos;
- b)** Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c)** Provetas graduadas;
- d)** Béqueres;
- e)** Erlenmeyers;
- f)** Ponteiras descartáveis;
- g)** Descartador de ponteiras;
- h)** Reservatórios para soluções (cubetas);
- i)** Papel absorvente;
- j)** Caneta para identificação de vidraria;
- k)** Bandejas com canaletas para tiras de nitrocelulose;
- l)** Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;

3.5.2. Equipamentos e instrumentos

- a)** Autoclave;
- b)** Geladeira;
- c)** Micropipetas monocanal de volumes reguláveis ajustável (4 µL, 500 µL, 600 µL, 800 µL, 1 mL);
- d)** Pipetador automático ou manual;
- e)** Cronômetros;
- f)** Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- g)** Agitador de tipo rocker;
- h)** Balança com capacidade de pesar 2,5 gramas.

3.5.3. Insumos

a) O kit denominado NCPanaftosa – Prova Confirmatória – Bovino é composto pelo conjunto de reagentes necessários para realização do ensaio Imunoenzimático que permite a detecção *in vitro* de anticorpos contra as proteínas não-capsidiais (PNC) 3ABC, 3D, 2C, 3B, e 3A do Vírus da Febre Aftosa (VFA) no soro de bovídeos (bovinos e bubalinos) através de uma prova de EITB, utilizando como prova inicial o kit NCPanaftosa – Prova Triagem.

b) Tiras de nitrocelulose previamente sensibilizadas com as proteínas 3A, 3B, 2C, 3D e 3ABC (NC);

c) Solução de lavagem concentrada 10 X (BL);

d) Lisado de *Escherichia coli* (EC);

e) Soro Controle negativo (CN);

f) Soro Controle positivo Padrão 1 (CP1);

g) Soro Controle positivo Padrão 2 (CP2);

h) Leite em pó desnatado (LP);

i) Conjugado 100X Concentrado (CJ);

j) Diluente de Substrato (DS);

k) NBT - Nitro Blue Tetrazolium (para substrato cromógeno) (NB);

l) BCIP - 4-5 Bromo 4-Chloro- 3-Indolyl Phosphate (para substrato cromógeno) (BC);

m) Controle laboratório (CL);

n) Soro sabidamente positivo (controle interno).

3.5.4. Soluções

a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados.

b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;

c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;

d) Tampão de lavagem (BL) 1x em água destilada;

e) Tampão de saturação (anexo 012);

f) Substrato – cromógeno (NBT/BCIP) (Anexo 013).

3.5.5. Realização do ensaio

3.5.5.1 Preparo dos reagentes

a) Aproximadamente uma hora antes de começar a prova retire da geladeira as tiras sensibilizadas, buffer de lavagem 10x e diluente de substrato para permitir que estabilizem a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C);

b) Prepare o buffer de lavagem 1x e o buffer de saturação, permitindo que também se estabilizem a temperatura ambiente.

c) Retire os outros reagentes, soros padrão, *E. coli*, conjugado 100X, NBT, BCIP, na hora de usá-los.

d) Prepare o protocolo de reação da prova, levando em consideração que devem ser reservadas quatro tiras de cada gel para os soros controle (CN, CP1, CP2 e CL). Os controles devem ser sempre repetidos em cada gel e para cada prova, já que os resultados devem ser sempre interpretados por comparação a reatividade do soro problema com o do controle CP1, processado no mesmo gel e na mesma prova.

- e) É recomendada a homogeneização dos reagentes antes de usá-los.
- f) A diluição do conjugado e do substrato deve ser realizada entre 5 a 10 minutos antes do seu uso.

3.5.5.2. Saturação das tiras

- a) Coloque uma tira em cada uma das canaletas das bandejas usando pinça plástica. Adicione 800 µL de buffer de saturação em cada canaleta, verifique que as tiras tenham ficado bem submersas e com as respectivas numerações visíveis.
- b) Coloque as bandejas sobre o agitador e deixe incubando durante 30 minutos à temperatura ambiente.
- c) A velocidade do agitador deve ser de 6 ciclos oscilatórios (ida e volta) /minuto, sendo a mesma mantida durante toda a prova.

3.5.5.3. Incubação das amostras

- a) Adicione aos 800 µL de buffer de saturação 4µL da amostra ou soro controle (diluição final 1:200) de acordo com a ordem estabelecida no protocolo de prova.
- b) Para permitir que a reação se inicie simultaneamente em todas as canaletas, posicione o agitador durante a adição dos soros de tal forma que as bandejas fiquem inclinadas num ângulo de aproximadamente 30°. Posicione as tiras na parte superior da canaleta para que não tenham contato com o buffer na parte inferior, onde se faz a adição das amostras e dos soros controle.
- c) Incube com agitação durante 60 minutos a temperatura ambiente. Verifique que as tiras tenham ficado bem submersas e com as respectivas numerações visíveis ao operador.

3.5.5.4. Lavagem

- a) Concluída a etapa de incubação elimine o buffer de saturação inclinando a bandeja, evitando que o líquido transborde de uma canaleta para outra;
- b) Embrorque a bandeja e deixe secar muito bem sobre papel toalha;
- c) Lave abundantemente as canaletas e tiras com buffer de lavagem 1x usando uma pisseta;
- d) Descarte este buffer de lavagem e volte a lavar da mesma maneira pelo menos outras 2 vezes.
- e) Seque as bandejas com papel toalha;
- f) Adicione aproximadamente 1 mL de buffer de lavagem 1x por canaleta e deixe agitando durante 5 minutos. Repetir esta etapa mais duas vezes;
- g) Após a última lavagem seque bem as bandejas batendo sobre o papel toalha.

3.5.5.5. Incubação do conjugado

- a) Dilua o conjugado e aplique 600 µL por canaleta, posicionando as bandejas de acordo como indicado em “Incubação das amostras” e verifique novamente que as tiras fiquem bem submersas e o lado numerado das tiras esteja visível.
- b) Incube com agitação durante 60 minutos à temperatura ambiente;
- c) Ao final proceda da lavagem das tiras conforme item 5.4.

3.5.5.6. Incubação do substrato cromógeno

- a) Prepare o substrato cromógeno e aplique 500 µL por canaleta posicionando as bandejas de acordo com o indicado em “Incubação de amostras”.

- b) Verifique que as tiras fiquem bem submersas e o lado numerado das tiras esteja para cima, visível ao operador.
- c) Incube com agitação até que a tira do CP1 desenvolva cinco bandas visíveis (aproximadamente 15 minutos);
- d) Após, descarte ou aspire o substrato – cromógeno e lave as tiras abundantemente com água destilada;
- e) Por último seque bem as bandejas batendo sobre as mesmas emborçadas sobre papel toalha.
- f) Deixe as tiras secar por aproximadamente duas horas à temperatura ambiente dentro das bandejas ou então com ajuda de uma pinça coloque-as sobre papel de filtro. Alternativamente pode-se colocar as tiras em estufa a 56°C durante aproximadamente 30 minutos dentro das bandejas.
- g) Uma vez secas é recomendado colar com fita adesiva transparente em um formulário específico, posicionando-as de tal maneira que as bandas fiquem ordenadas para a análise da esquerda para a direita na seguinte disposição: 3A, 3B, 2C, 3D e 3ABC.

3.5.6. Critérios de aceitação do Ensaio

- a) Para considerar uma prova válida e proceder à interpretação dos resultados, os soros controle devem satisfazer os seguintes critérios:
- b) **Soro controle positivo (CL):** deve apresentar reatividade intensa para os antígenos 3A, 3B, 3D e 3ABC podendo ter menor reatividade (intensidade) para o antígeno 2C. É acrescentado ao ensaio como Controle do Laboratório (CL), que não é fornecido no KIT.
- c) **Soro controle positivo (CP2):** Deve apresentar superior à do CP1 para os cinco (5) antígenos com bandas bem visíveis.
- d) **Soro controle limite (CP1):** Deve apresentar fraca reatividade para os cinco (5) antígenos tal que torne as bandas apenas visíveis.
- e) **Soro controle negativo (CN):** Não deve apresentar banda de reação para nenhuma das cinco proteínas.

3.5.7. Interpretação do resultado

- a) Comparar a intensidade da reação do(s) soro(s) testado(s) com a do soro controle limite (CP1). De acordo com o número de proteínas reagentes e sua intensidade de cor, o resultado pode ser
- b) **Resultado reativo:**
 - i) Soro reativo que apresenta reatividade igual ou maior que a do soro controle limite (CP1) para as proteínas 3A, 3B, 3D e 3ABC, sendo que a proteína 2C pode ou não aparecer reativa na amostra de teste.
- c) **Resultado negativo:**
 - i) Ausência total de reatividade para as cinco proteínas;
 - ii) Reatividade com intensidade menor da banda correspondente do CP1 para cada uma das cinco proteínas;
 - iii) Reatividade igual ou maior a da banda correspondente do CP1 para um máximo de duas proteínas.
- d) **Resultado indeterminado:**

i) Soro que apresenta reatividade igual ou maior que CP1 em 3 ou 4 proteínas (incluindo a 2C), não se ajustando aos parâmetros definidos para amostras reagentes e não reagentes.

ii) Em casos de resultados reagentes e indeterminados digitalizar o formulário de controle para consultas futuras.

e) Repetição do ensaio:

i) Será realizada nos seguintes casos:

ii) Quando a prova for invalidada pelos controles, ou quando as tiras se apresentarem manchadas, de forma que prejudique a leitura. Neste caso, deverá ser repetida toda a prova.

iii) Quando houver discordância entre as leituras dos dois analistas em algum soro. Neste caso deverá ser repetido somente o soro em questão em triplicata.

3.5.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como reativo, não reativo e indeterminado

3.5.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.5.10. Retenção de Itens de Ensaio

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

d) O laboratório deve assegurar a biosseguridade dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.5.10. Retenção de itens de ensaio

3.5.10.1. Amostras

a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.6. Teste de Virusneutralização

3.6.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;

- f) Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;
- g) Ponteiras descartáveis;
- h) Descartador de ponteiras;
- i) Reservatórios para soluções (cubetas);
- j) Papel absorvente;
- k) Microplacas para cultivo celular em poliestireno cristal com 96 cavidades de fundo chato;
- l) Caneta para identificação de vidraria;
- m) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.6.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica classe II B1 (requisito mínimo);
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Estufa com atmosfera de CO₂;
- f) Estufa;
- g) Banho seco ou que empregam água;
- h) Termômetros;
- i) Micropipetas mono e multicanaís de volumes reguláveis;
- j) Pipetador automático ou manual;
- k) Agitador de tubos;
- l) Microscópio invertido;
- m) Balança analítica;
- n) Centrífuga refrigerada.

3.6.3. Insumos

- a) Suspensão celular de linhagem sensível (BHK-21);
- b) Meio MEM (Meio Essencial Mínimo, reconstituído de acordo com o fabricante);
- c) Soro fetal bovino (SFB) livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma;
- d) Solução de antibióticos e antifúngicos;
- e) Amostra controle reagente e não reagente para os vírus da Febre Aftosa;
- f) Cepas do vírus da Febre Aftosa.

3.6.4. Soluções

- a) Meio MEM com adição de antimicrobianos;
- b) Solução de salina 0,15 mol/L %;
- c) Ácido cítrico 0,2 %;
- d) Solução salina 0,85 % fosfatada tamponada (PBS) pH 7,2-7,4;
- e) Solução de antibióticos e antifúngicos.

3.6.5. Realização do ensaio

3.6.5.1. Método quantitativo

- a) Observação: avaliar a toxidez para apenas um sorotipo.
- b) Adicionar 91,3 µL de MEM na linha A (controle de toxidez) e linha B.
- c) Adicionar 50 µL de MEM nas demais linhas da placa;
- d) Distribuir as amostras (exemplo, soros 1 a 4) e controles como descrito no QUADRO 1 abaixo. Cada amostra deve ser adicionada em uma coluna.
- e) Adicionar 8,7 µL de soro (por poço) nas linhas A e B;
- f) Transferir 50 µL da mistura MEM / soro da linha B para C, e assim sucessivamente até a linha H. Ao final descartar 50 µL.
- g) Preparar as colunas referentes aos controles conforme o item 6.2.
- h) Para amostras que já tiveram a toxidez avaliada (para o sorotipo A) proceder como descrito abaixo para o sorotipo O:
 - I. Adicionar 91,3 µL de MEM na linha A;
 - II. Adicionar 50 µL de MEM nas demais linhas da placa;
 - III. Distribuir as amostras (exemplo, soros 1 a 4) e controles como descrito no QUADRO 2 abaixo. Cada amostra deve ser adicionada em duas colunas.
 - IV. Adicionar 8,7 µL de soro (por poço) na linha A;
 - V. Transferir 50 µL da mistura MEM / soro da linha A para B, e assim sucessivamente até a linha H. Ao final descartar 50 µL.
 - VI. Transferir 50 µL da mistura MEM / soro da linha A para B, e assim sucessivamente até a linha H. Ao final descartar 50 µL.

QUADRO 1 Distribuição das amostras pelo método quantitativo com avaliação de toxidez – sorotipo A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Log	TX
A	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC		
B	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	1,4	1/23
C	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	1,7	1/46
D	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,0	1/92
E	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,3	1/184
F	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,6	1/368
G	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,9	1/736
H	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	>=3,2	1/1.472
							RT							

QUADRO 2 Distribuição das amostras pelo método quantitativo sem avaliação de toxidez – sorotipo A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Log	TX	
A	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	1,4	1/23	
B	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	1,7	1/46	
C	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,0	1/92	
D	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,3	1/184	
E	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,6	1/368	
F	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	2,9	1/736	
G	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	3,2	1/1.472	
H	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	CC	CC	CC	$\geq 3,5$	1/2.944	
							RT								

3.6.6. Controles

- a)** Utilizar uma coluna para o soro controle negativo (CN) e uma coluna para o soro controle positivo (CP).
- b)** Adicionar o MEM e os soros controle em cada uma das colunas conforme descrito no item 6.1, sem avaliação da toxidez;
- c)** Para o controle de retrotitulação viral (RT), adicionar 50 μ L de MEM nas três colunas destinadas à retrotitulação;
- d)** Para o controle de células (CC), adicionar 100 μ L de MEM. Reservar, pelo menos, uma coluna como controle de células. Nessa coluna não deve ser adicionado vírus ou soro.
- e) Diluição de trabalho (DT) do vírus, incubação e adição da suspensão celular**

I. Utilizar um vírus de título conhecido titulado. A partir do título, obter a diluição de trabalho (DT) diminuindo-se 10² do título. Exemplo: vírus com título de 10⁶ deve ser diluído a 10⁴ (ou seja, 10.000 vezes). Preparar diluições em base 10 do vírus (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, etc.) até o obter a diluição de trabalho desejada, utilizando para o cálculo a fórmula $C_i.V_i = C_f.V_f$, em que:

C_i = concentração inicial 10⁻¹;

V_i = volume inicial (volume de vírus a ser utilizado);

C_f = concentração final = DT;

V_f = volume final (volume necessário de vírus, para uma placa utilizar 5 mL);

Exemplo: vírus com título de 10^{4,5}. DT = 10^{2,5} = 1/316. Para 4 placas. Foram feitas duas diluições em base 10 (10⁻¹ e 10⁻²);

$C_i.V_i = C_f.V_f$;

1/100. V_i = 1/316.20

$V_i = 20.100/316 = 6,3$ mL da diluição 1/100 (10⁻²) e 13,7 mL de MEM;

- f)** A partir da diluição de trabalho, preparar diluições 1/10 (10-1), 1/100 (10-2) e 1/1.000 (10-3) utilizando MEM;
- g)** Adicionar 50 µL da suspensão viral diluída (1/10, 1/100 e 1/1.000) em cada um dos poços das colunas destinadas à retrotitulação (uma coluna por diluição), começando pela suspensão mais diluída, desta maneira pode-se utilizar o mesmo reservatório e as mesmas ponteiras;
- h)** Adicionar 50 µL da DT em todos os poços da placa, exceto nos destinados ao controle de toxidez, controle de células e retrotitulação.
- i)** Incubar as placas em estufa a 37 °C durante uma hora.
- j)** Distribuir 50 µL de suspensão celular a 300.000 células/mL em todos os poços da placa, inclusive em todos os controles;
- k)** Incubar as placas por 48 a 72 horas a 37 °C;
- l)** Realizar a leitura em microscópio invertido e promover registros:

P - para indicar presença de efeito citopático (ECP);

N - para indicar ausência de ECP;

TX - para indicar toxidez do soro;

C - para indicar contaminação.

3.6.8. Vaccine Matching

a) Ou avaliação da combinação antigênica determina a eficiência da vacina contra o vírus circulante, a partir da verificação da correspondência do vírus utilizado na produção da vacina e um vírus isolado no campo. Serão utilizados soros de animais vacinados, as etapas da obtenção do título desses soros são as mesmas descritas nos itens 6.1, 6.2 e 6.3, exceto pelo número de repetições das amostras avaliadas e conseqüentemente cálculo do título. São realizadas no mínimo quatro repetições de cada amostra. Os soros pós-vacinação devem ser derivados de pelo menos cinco animais 21-30 dias após a vacinação primária e/ou 21-30 dias após vacinação de reforço.

b) Os testes de combinação de vacinas baseados em valores de EPP são amplamente realizados na América do Sul pelo PANAFTOSA. Os títulos de anticorpos dos soros de animais vacinados obtidos utilizando o isolado de campo, são correlacionados nas tabelas que foram solicitadas ao PANAFTOSA. Valores de EPP médio de 75% conferem proteção aos animais vacinados.

3.6.9. Critérios de aceitação da Prova

- a)** Avaliar os resultados dos controles para considerar o ensaio válido;
- b)** O soro controle positivo deve apresentar variação compatível com a carta controle com coeficiente de variação máximo de 30%;
- c)** A quantidade de vírus deve estar entre 31,6 a 316 TCID₅₀.
- d)** Controle de células apresentando tapete íntegro em todos os poços isentos de contaminação ou toxidez.

3.6.10. Interpretação dos resultados

- a) Deve-se considerar como título, o inverso da diluição em que foi observado 50 % de neutralização. Esses valores devem ser convertidos em log base 10;
- b) São considerados positivos os soros em que houve 50 % de neutralização a partir da diluição 1/46;
- c) Nas exceções abaixo, podem ser considerados válidos os seguintes resultados:
- d) Soros reagente (título maior ou igual a 1,7) em placas com mais de 316 TCID50;
- e) Soros não reagentes (título inferior a 1,7) em placas com menos de 31,6 TCID50;
- f) Soros tóxicos: a amostra será considerada tóxica quando se observar a ausência de multiplicação celular, ou destruição das células por componentes do soro no poço de controle de toxidez. Geralmente é caracterizada pela sedimentação do cultivo semeado no fundo do poço.
- g) Soros contaminados: soros em que houve presença de contaminação bacteriana ou por fungos impedindo a interpretação do resultado.
- h) Para o cálculo do título de anticorpos do *vaccine matching* aplicar a fórmula a seguir:
- i) Número de cavidades protegidas x 0,25 (peso de cada cavidade por diluição, neste caso 0,25 pois foram realizadas quatro repetições) – 0,5 (constante título 50%) x 0,3 (log de 2 - intervalo da diluição base 2) + 1,4 (log da menor diluição do soro que entrou na prova (neste caso, iniciou diluição 1:23 portanto $\log 23 = 1,4$).
- j) Determinar o anti-log do resultado para saber o título de anticorpos
Exemplo:
Número de cavidades protegidas = 15
 $15 \times 0,25 = 3,75 - 0,5 = 3,25 \times 0,3 = 0,975 + 1,4 = 2,4$
AntiLog 2,4 = 251,2
Portanto o título de anticorpos expresso em número aritmético será 251,2 ou expresso em $\log_{10} 2,4$.
A relação entre o título obtido com o isolado de campo e o vírus vacinal é então expressa como um valor "r" como:

$r_1 = \underline{\text{Média do título aritmético recíproco do soro de referência contra o vírus de campo}}$

Média do título aritmético recíproco do soro de referência contra o vírus da vacina

- k) Na interpretação dos resultados dos testes de reatividade cruzada, geralmente é aceito que, no caso da Virusneutralização, valores de r_1 maiores que 0,3 indicam que o isolado de campo é suficientemente semelhante ao vírus da vacina. Assim sendo, o uso de uma vacina com base nessa amostra de vírus, provavelmente irá conferir proteção contra desafio, com o isolado de campo.

3.6.11. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado "Relatório de Ensaio" e expresso como, reagente, não reagente. Caso a amostra seja considerada reagente, deve ser descrito a valor do título final, que é expresso como o logaritmo da diluição em que houve 100% de Virusneutralização.

3.6.12. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio

- b)** Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- c)** Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
- d)** O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.6.13. Retenção de itens de ensaio

- a)** Soro sanguíneo
Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.
- b)** Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

Identificação do Agente

3.7. Isolamento viral Febre Aftosa

3.7.1. Materiais

- a)** Luvas para procedimentos;
- b)** Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c)** Provetas graduadas;
- d)** Béqueres;
- e)** Erlenmeyers;
- f)** Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;
- g)** Tubo de centrífuga;
- h)** Ponteiras descartáveis;
- i)** Descartador de ponteiras;
- j)** Reservatórios para soluções (cubetas);
- k)** Papel absorvente;
- l)** Microplacas para cultivo celular em poliestireno com 24 cavidades de fundo chato;
- m)** Microplacas para cultivo celular em poliestireno com 96 cavidades de fundo chato;
- n)** Caneta para identificação de vidraria;
- o)** Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;
- p)** Areia estéril;
- q)** Filtro para seringa (0,45 µm);
- r)** Gral e Pistilo;
- s)** Tesoura cirúrgica e bisturi
- t)** Seringa descartável.

3.7.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica classe II A (requisito mínimo);
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Ultrafreezer;
- f) Estufa com atmosfera de CO₂;
- g) Estufa;
- h) Banho que empregam água;
- i) Termômetros;
- j) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- k) Pipetador automático ou manual;
- l) Agitador de tubos tipo vortex;
- m) Microscópio invertido.
- n) Cronômetro
- o) Balança dois pratos;
- p) Centrífuga refrigerada com rotor para tubos de 50 mL;
- q) Homogeneizador (Omni-mixer);

3.7.3. Insumos

- a) Suspensão celular de linhagem sensível (ZZR, BHK 21, IB-RS2);
- b) Meio MEM (Meio Essencial Mínimo, reconstituído de acordo com o fabricante);
- c) Soro fetal bovino (SFB), livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma;
- d) Solução de antibióticos e antifúngicos;
- e) Cepas do vírus da Febre Aftosa;
- f) Clorofórmio;
- g) Tri-cloro-tri-fluoretano (TTE);

3.7.4. Soluções

- a) Meio MEM adicionado de 2% de soro fetal bovino para BHK 21 e 5% para as demais linhagens, e tratado com solução de antibióticos e antifúngicos;
- b) Solução de salina 0,15 mol/L %;
- c) Ácido cítrico 0,2 %;
- d) Solução de antibióticos e antifúngicos.

3.7.5. Realização do ensaio

3.7.5.1. Processamento do epitélio e crostas

- a) Um fragmento de epitélio deve ser colocado no gral. Estocar o restante conservando o frasco de origem em freezer. Este deve ser identificado pelo número da requisição e sigla do estado;
- b) Picotar o epitélio com auxílio de tesoura;
- c) Um fragmento de aproximadamente 100 mg deve ser adicionado a um microtubo contendo 1,0 mL de Trizol e ser encaminhado ao diagnóstico molecular;
- d) No caso do recebimento de amostras de epitélio de mais de um animal da propriedade pode ser realizado um pool respeitando as proporções de tecido e MEM. Para biologia molecular devem ser enviadas amostras individuais.

- e) Adicionar 1 a 2 mL de MEM e, opcionalmente areia estéril, e macerar com auxílio de pistilo até o material ficar com aspecto de pasta.
- f) Adicionar o volume de MEM suficiente para que a suspensão tenha uma proporção aproximada de 1/5;
- g) Transferir a suspensão do gral para um tubo de centrifuga previamente identificado;
- h) Centrifugar a 3.000 rpm sob refrigeração (2 °C a 8 °C) por 10 minutos;
- i) Filtrar o sobrenadante e acondicionar em tubo de penicilina identificado. Manter em freezer.

3.7.5.2. Processamento de LEF

- a) Amostras de LEF serão submetidas ao isolamento de vírus apenas em caso de positividade na RT-qPCR.
- b) Identificar o copo do homogeneizador e um tubo de centrifuga de 50 mL;
- c) Retirar uma alíquota de 400 microlitros e acrescentar 1,0 mL de trizol que será destinada aos testes moleculares.

3.7.5.3. Processamento com clorofórmio

- a) Colocar 8 mL de clorofórmio no copo do homogeneizador, transferir 10 mL de amostra e emulsificar a amostra em banho de gelo durante 1 a 2 minutos a 10.000 rpm dentro da cabine de segurança biológica;
- b) Para verificar se houve homogeneização completa da amostra, observar o aspecto “cremoso”, sem separação de fases, entre o clorofórmio e a amostra;
- c) Caso tenha ocorrido separação, adicionar um volume de 0,5 mL de soro equino e emulsificar novamente. Repetir o processo quantas vezes forem necessárias até a amostra apresentar o aspecto desejado;
- d) Após a homogeneização, transferir a amostra do copo para um tubo de centrifuga previamente identificado;
- e) Centrifugar sob refrigeração (10°C) a 2.000 rpm durante 30 minutos;
- f) Avaliar se houve separação do sobrenadante e a formação de um sedimento gelatinoso (que comprova a adequada emulsificação da amostra);
- g) Retirar uma alíquota de 400 µL e acrescentar 1,2 mL de Trizol que será destinada ao diagnóstico molecular;
- h) Aspirar o sobrenadante e armazenar em um tubo sob refrigeração (2° a 8°C) até o momento da inoculação. Caso este procedimento não ocorra no mesmo dia conservar o material congelado até o dia da inoculação celular;
- i) Após o término do processo, realizar a descontaminação da CSB com álcool iodado e ligar a lâmpada germicida por 10 minutos.

3.7.5.4. Processamento com TTE

- a) Medir o volume da amostra utilizando o tubo de centrifuga graduado;
- b) Transferir para o copo do Omni-Mixer;
- c) Adicionar TTE ao copo na proporção de 80% do volume da amostra;
- d) Manter as amostras refrigeradas até a homogeneização;
- e) Emulsificar a amostra em banho de gelo durante 1 a 2 minutos a 10.000 rpm dentro da CSB;
- f) Para verificar se houve homogeneização completa da amostra, observar o aspecto “cremoso”, sem separação de fases entre o TTE e a amostra;

- g)** Caso tenha ocorrido separação adicionar um volume de 0,5 mL de soro equino e emulsificar novamente no homogeneizador. Repetir o processo quantas vezes forem necessárias até a amostra apresentar o aspecto desejado;
- h)** Após a homogeneização transferir a amostra do copo para um tubo de centrífuga previamente identificado;
- i)** Centrifugar sob refrigeração (10°C) a 2.000 rpm durante 30 minutos;
- j)** Avaliar se houve separação do sobrenadante e a formação de um sedimento gelatinoso (que comprova a adequada emulsificação da amostra);
- k)** Retirar uma alíquota de 400 µL e acrescentar 1,2 mL de Trizol que será destinada à biologia molecular.

3.7.5.5. Suabes

- a)** Amostras de suabes serão submetidas ao isolamento de vírus apenas no caso detecção molecular de algum agente;
- b)** Com auxílio de pinça e tesoura retirar um pequeno fragmento do suabe e adicionar a um microtubo contendo 1,0 mL de Trizol que será destinado diagnóstico molecular;
- c)** No caso de se realizar a tentativa de isolamento retirar os fragmentos de suabe e macerar com 1 a 2 mL de MEM. Adicionar MEM para atingir a proporção 1/5 e centrifugar e filtrar como descrito em 6.1.

3.7.5.6. Execução

- a)** Os procedimentos podem ser realizados com células em suspensão ou em monocamada;
- b)** No caso do uso de células em suspensão, apenas acrescentar o inóculo e incubar as células em estufa;
- c)** Para a microplaca de 24 poços utilizar 1 mL de células por poço e para a garrafa de 25 cm² utilizar 5 mL de células;
- d)** Inocular 100 µL de inóculo para microplacas de 24 poços ou 0,5 mL para garrafas de 25 cm²;
- e)** Incubar a microplaca ou garrafa por 48 a 72 horas em estufa de CO₂;
- f)** Ao final do período registrar os resultados;
- g)** Deve ser observada presença/ausência de efeito citopático (ECP) ou contaminação;

3.7.5.7. Segunda passagem

- a)** Amostras em que foi observada contaminação na primeira passagem não devem ser submetidas à segunda passagem.
- b)** Congelar as microplacas ou garrafas.
- c)** Descongelar.
- d)** Visualizar ao microscópio óptico o descolamento da monocamada celular. Em caso de necessidade repetir o processo de congelamento/descongelamento e/ou realizar a raspagem com o auxílio de uma ponteira.
- e)** Inocular o material da 1^a. passagem conforme descrito no item 4.6.5.6.
- f)** Congelar a garrafa ou microplaca com o restante do material da 1^a. passagem. Certificar que a placa está identificada com o número da requisição e a passagem da inoculação.
- g)** Incubar a microplaca ou garrafa por 48 a 72 horas em estufa de CO₂.
- h)** Ao final do período registrar os resultados.

- i) Deve ser observada presença (Fig.1A), ausência de efeito citopático (Fig.1B), ou contaminação.

3.7.5.8. Processamento das suspensões das passagens em células para diagnóstico confirmatório

Em caso de se observar ECP na linhagem BHK, na ausência de resultado DETECTADO para os demais agentes testados nos métodos moleculares, é necessário submeter o material da segunda passagem para a RT-qPCR para Febre Aftosa;

- a) Em caso de dúvida quanto ao resultado do isolamento de vírus em células realizar a confirmação final pelo uso do RT-qPCR para Febre Aftosa;
- b) Para a RT-qPCR, congelar e descongelar a garrafa ou microplaca, retirar uma alíquota de 400 µL da suspensão e acrescentar 1,0 mL de Trizol;
- c) Em caso de resultado DETECTADO na PCR para Febre Aftosa executar o ELISA para tipificação (item 3.8) ou método molecular;
- d) Em caso de resultado DETECTADO nos ensaios moleculares para qualquer agente, exceto Febre Aftosa, inocular o material em células sensíveis ao agente detectado. Confirmar com o isolamento viral por meio da realização de novo diagnóstico molecular.

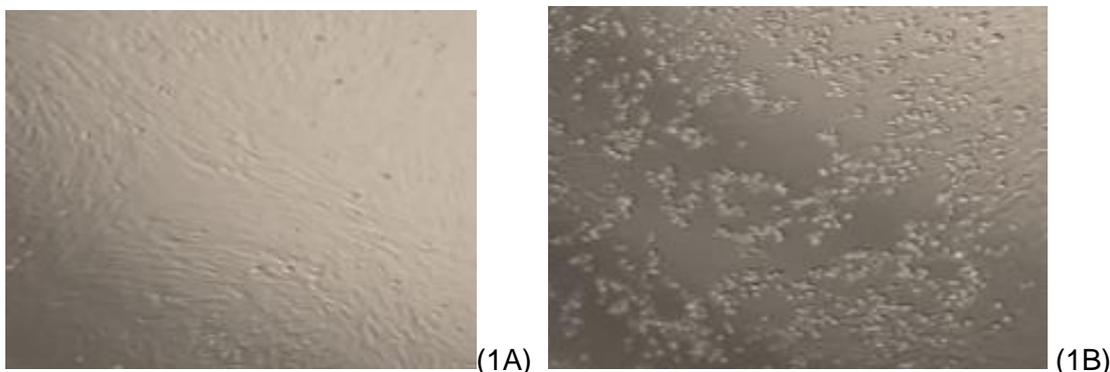
3.7.6. Critérios de aceitação das provas

- a) As provas de identificação do agente serão consideradas válidas quando os cultivos celulares sabidamente infectados (controles DETECTADOS) apresentam efeito citopático caracterizado pelo destacamento do cultivo celular e formação de células sinciciais e ausências de ECP nos cultivos que não foram infectados (controles NÃO DETECTADOS ou de células).
- b) Na presença de ECP deverá ser realizada a confirmação do isolamento por método imunológico conforme descrito no item 3.8 ou por método molecular.
- c) Controle de células apresentando tapete íntegro em todos os poços isentos de contaminação ou toxidez.

3.7.7. Interpretação dos resultados

- a) O material será considerado NÃO DETECTADO quando não apresentar ECP após as duas passagens em cultivo de células (Fig. 1A);
- b) O material será considerado DETECTADO quando apresentar ECP durante as passagens em cultivo celular, nesse caso sendo necessária realização de testes de tipificação (ELISA ou RT-PCR) para confirmação do isolado viral.

FIGURA 1 – Monocamada celular de células BHK-21 sem ECP (A) e com presença de ECP para o sorotipo O do VFA.



Fonte – LFDA-MG

3.7.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, detectado ou não detectado isolamento viral do vírus da Febre Aftosa.

3.7.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.6.10. Retenção de Itens de Ensaio

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.7.10. Retenção de itens de ensaio

a) Amostras de tecido e produtos de isolamento viral
Sugere-se o armazenamento permanente de soros reagentes, tecidos infectados ou isolados do vírus.

3.8. ELISA SW para tipificação de antígenos do vírus da Febre Aftosa e Estomatite Vesicular

3.8.1. Materiais

- a)** Luvas para procedimentos;
- b)** Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;

- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Ponteiras descartáveis;
- g) Descartador de ponteiras;
- h) Reservatórios para soluções (cubetas);
- i) Papel absorvente;
- j) Caneta para identificação de vidraria;
- k) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;
- l) Microplacas de fundo em “U”;
- m) Microplacas NUNC MaxSorb.

3.8.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Geladeira;
- c) Estufa;
- d) Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- e) Pipetador automático ou manual;
- f) Leitora de ELISA;
- g) Cronômetros;
- h) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- i) Agitador de microplacas;
- j) Lavadora de microplacas (opcional).

3.8.3. Insumos

- a) Set de ensaio de ELISA de competição em fase líquida (CFL) para a detecção de anticorpos contra a proteínas estruturais do vírus da Febre Aftosa (VFA) e Estomatite Vesicular produzidos pelo Centro Panamericano de Febre Aftosa contendo soros capturas e detectores específicos, soros bloqueadores de bovino e coelho e antígeno;
- b) IgG de cabra anti-IgG de cobaio conjugado com peroxidase (Sigma nº catálogo A7289);
- c) Pastilhas de OPD (ortofenildiamina) de 2 ou 10mg;
- d) Albumina Bovina Grau II;
- e) Albumina Bovina Grau V;
- f) Fosfato de sódio;
- g) Ácido cítrico;
- h) Carbonato de sódio grau P.A.;
- i) Bicarbonato de sódio grau P.A.;
- j) Peróxido de hidrogênio a 30%
- k) Tween 20 (Sigma cat. Nº P-1379);
- l) Microplacas de fundo em “U”;
- m) Microplacas NUNC MaxSorb.

3.8.4. Soluções

- a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados.

- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;
- d) PBST (Tampão salina fosfatada pH 7,4 com 1% de ovoalbumina Grau II e 0,05% de Tween 20)
- e) Tampão PBST;
- f) Solução salina fisiológica 0,85% pH 7,2 – 7,4;
- g) Tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6;
- h) Peróxido de hidrogênio a 30%
- i) Solução de ácido sulfúrico 1,5 mol/L

3.8.5. Realização do ensaio

3.8.5.1 Sensibilização das placas com anticorpos captura – microplacas NUNC MaxSorb

- a) Identificar as placas em ordem sequencial.
- b) Descongelar os soros captura à temperatura ambiente.
- c) Preparar as diluições de uso de cada soro captura em tampão carbonato-bicarbonato, conforme recomendações do fabricante. Homogeneizar em agitador magnético.
- d) Distribuir 100 µL dos soros capturas da seguinte maneira:
- e) Colocar em cada poço da placa 100 µL de soro de captura diluído em tampão carbonato, distribuído como indicado a seguir: Soro de captura “O” (colunas 1 e 7), Soro de captura “A” (colunas 2 e 8), Soro de captura “C” (colunas 3 e 9), Soro de captura “NJ” (colunas 4 e 10), Soro de captura “IND” (colunas 5 e 7), e Soro de captura “negativo” (colunas 6 e 12),
- f) Empilhar as placas em grupos de 10, no máximo, e selar a placa superior.
- g) Incubar por 16 a 20 horas entre 4 °C e 8 °C.
- h) Retirar da geladeira e mantê-las à temperatura ambiente por 1h.
- i) Descartar o conteúdo das placas e lavá-las uma vez com 200 µL de solução salina fisiológica por poço.
- j) Descartar o conteúdo das placas e batê-las sobre papel absorvente ou toalha.
- k) Adicionar 100 µL por poço de PBS com 1% de ovoalbumina Grau V.
- l) Incubar por 1h à temperatura ambiente.
- m) Descartar o conteúdo das placas e lavá-las uma vez com 200 µL de solução salina fisiológica por poço.
- n) Descartar o conteúdo das placas e batê-las sobre papel ou toalha absorvente.
- o) As placas podem ser utilizadas imediatamente ou podem ser armazenadas. Para isto, cobri-las com filme plástico e armazená-las a – 20°C em posição invertida.

3.8.5.2. Preparo do tampão bloqueador (PBSTB)

- a) Descongelar o PBST à temperatura ambiente;
- b) Adicionar 2 mL de soro de coelho e 2 mL de soro de bovino para 100 mL do tampão PBST e homogeneizar antes do uso.

3.8.5.3. Execução

- a) Descongelar as placas de fase sólida previamente sensibilizada 20 minutos na geladeira, 20 minutos à temperatura ambiente e 20 minutos na estufa a 37 °C ± 1 °C (deixá-las sempre invertidas sobre papel toalha);

- b)** Diluir os antígenos em PBSTB de acordo como recomendado pelo fabricante. Distribuir 50 µL dos antígenos, “O” na coluna 7G e 7H, “A” na coluna 8G e 8H, “C” na coluna 9G e 9H, “NJ” na coluna 10G e 10H, “IND” na coluna 11G e 11H, e “NEG” na coluna 12G e 12H;
- c)** Distribuir 50 µL da amostra não diluída, nos poços: amostra 1, (A1 a A6 e B1 a B6), amostra 2, (C1 a C6 e D1 a D6), amostra 3, (E1 a E6 e F1 a F6), amostra 4, (G1 a G6 e H1 a H6), amostra 5, (A7 a A12 e B7 a B12), amostra 6, (C7 a C12 e D7 a D12) e amostra 7 (E7 a E12 e F7 a F12);
- d)** Incubar por 30 ± 2 minutos, 37 °C ± 1 °C, sob agitação;
- e)** Preparar a diluição dos soros detectores conforme recomendação do fabricante. Incubar a 37°C ± 1 °C até o momento do uso;
- f)** Lavar a placa três vezes com salina fisiológica com Tween 20 a 0,05% (1 mL de Tween para 2 litros de salina) e em seguida secá-la em papel toalha;
- g)** Distribuir 50 µL de cada soro detector nas respectivas colunas, de acordo com protocolo de sensibilização (item 5.1);
- h)** Incubar por 30 ± 2 minutos, 37 °C ± 1 °C, sob agitação. Preparar a diluição do conjugado e incubá-lo a 37 °C ± 1 °C até o momento do uso;
- i)** Lavar a placa três vezes com salina fisiológica com Tween 20 a 0,05% e secar a placa em papel toalha;
- j)** Distribuir 50 µL do conjugado em todos os poços da placa;
- k)** Incubar por 30 ± 2 minutos, 37 °C ± 1 °C, sob agitação;
- l)** Preparar a solução de substrato-cromógeno como descritas no (anexo 009);
- m)** Lavar a placa três vezes com salina fisiológica com Tween 20 a 0,05% e secar a placa em papel toalha;
- n)** Adicionar o OPD ao tampão ácido e, em seguida, o peróxido de hidrogênio. Homogeneizar;
- o)** Distribuir 50 µL do substrato em todos os poços da placa;
- p)** Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos, sob proteção da luz;
- q)** Adicionar 50 µL da solução de ácido sulfúrico 1,5 mol/L em todos os poços da placa
- r)** Proceder à leitura das placas em leitor de ELISA com filtro de 492nm.

QUADRO 1 Esquema de distribuição dos soros e controles

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S5	S5	S4	S4	S4	S4
B	S1	S1	S1	S1	S1	S1	S5	S5	S4	S4	S4	S4
C	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S6	S6	S6	S6	S6	S6
D	S2	S2	S2	S2	S2	S2	S6	S6	S6	S6	S6	S6
E	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S7	S7	S6	S6	S6	S6
F	S3	S3	S3	S3	S3	S3	S7	S7	S6	S6	S6	S6
G	S4	S4	S4	S4	S4	S4	O	A	C	NJ	IND	NEG
H	S4	S4	S4	S4	S4	S4	O	A	C	NJ	IND	NEG

3.8.6. Critérios de aceitação do Ensaio

- a) Calcular a média dos valores de densidade ótica (DO) para cada amostra testada/sorotipo, somando os dois poços correspondentes em cada coluna e dividindo por 2 (no caso do teste em duplicata);
- b) A DO do controle negativo deve ser $< 0,1$;
- c) A DO dos controles de antígeno deve ser $> 0,5$.

3.8.7. Interpretação dos resultados

- a) Calcular a média dos valores de densidade ótica (DO) para cada amostra testada/sorotipo, somando os dois poços correspondentes em cada coluna e dividindo por 2 (no caso do teste em duplicata);
- b) Detectado, amostras com valor de DO $> 0,3$;
- c) Não detectado, amostras com DO $< 0,2$;
- d) Inconclusivas, amostras com valor de DO entre 0,2 e 0,3, e aquelas que todos os outros sorotipos apresentarem DO $< 0,1$.
- e) Amostras concentradas podem apresentar valores de DO $> 0,3$ para mais de um sorotipo. Neste caso, essas amostras devem ser diluídas 1:5 ou 1:10 para confirmação do sorotipo

3.8.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como o valor da D.O da amostra, como DETECTADO, NÃO DETECTADO, INCONCLUSIVO.

3.8.9. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.7.10. Retenção de Itens de Ensaio
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.8.10. Retenção de itens de ensaio

a) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo as mesmas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

3.9. Técnica de PCR convencional para detecção do vírus da Febre Aftosa (VFA)

3.9.1. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.9.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Termociclador;
- h) Balança de precisão;
- i) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- j) Agitador de microtubos;
- k) Micro-ondas;
- l) Cuba e fonte para eletroforese;
- m) Microcomputador;
- n) Sistema de fotodocumentação;
- o) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.9.3. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Mix de dNTP;
- c) Oligonucleotídeos para RT-PCR (QUADRO 1);
- d) Kit de RT-PCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);
- g) Corante para ácidos nucleicos;
- h) Marcador de peso molecular;
- i) Tampão de carregamento (“*loading buffer*”);
- j) Gel de agarose;
- k) Controle positivo para VFA (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);

3.9.4. Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;

3.9.5. Realização do ensaio

3.9.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle negativo (água ou tecido bovino ou suíno).

3.9.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico (PCR)

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR), isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70%;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.9.5.3. Preparo do mix de reação

- a) **Preparar** o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (VFA) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Adicionar o mix de reação a cada poço da microplaca (ou microtubos);
- c) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle positivo para VFA;
 - II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III. Branco (água livre de nucleases);
 - IV. Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.9.5.4. Reação de PCR

- a) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos identificados com a numeração da amostra a ser testada;
- b) Realizar a amplificação em termociclador certificado, conforme as especificações de temperatura do protocolo utilizado.

3.9.5.5. Eletroforese

- a) Preparar o gel de agarose em concentração adequada ao protocolo de PCR utilizado. Adicionar um corante para ácidos nucleicos em proporção suficiente para visualização das bandas;
- b) Para a corrida das amostras, adicionar tampão de carregamento (*loading buffer*) ao produto de PCR;
- c) Aplicar marcador de peso molecular em um dos poços do gel;
- d) Realizar a corrida em cuba de eletroforese, utilizando o tempo e a voltagem adequados para o volume do gel e o protocolo de PCR utilizado;
- e) Visualizar o gel sob luz ultravioleta, fotografar com o auxílio de um fotodocumentador e analisar o resultado.

3.9.6. Critérios de aceitação da prova

- a) As amostras de controle positivo para VFA devem apresentar bandas de tamanhos correspondentes aos *amplicons* do protocolo utilizado;
- b) As amostras de controle negativo (controle negativo da extração e branco) não devem apresentar bandas de amplificação.

3.9.7. Interpretação dos resultados

- a) Comparar os resultados das amostras testadas ao das amostras controle, a fim de classificá-las como positivas ou negativas;
- b) A leitura das bandas deve ser clara e livre de *amplicons* inespecíficos para o teste ser considerado satisfatório;
- c) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada.

3.9.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.9.9. Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas por dois analistas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biosseguridade dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

3.10. Técnica de RT-qPCR para VFA

3.10.1. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;

- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.10.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Termociclador para PCR em tempo real;
- g) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- h) Agitador de microtubos;
- i) Microcomputador;
- j) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.10.3. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Oligonucleotídeos para RT-qPCR (QUADRO 1);
- c) Controle positivo para FA (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);
- d) Kit de RT-qPCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);
- g) Recomenda-se o uso de reações de passo único (*one step*) para síntese e amplificação de cDNA no mesmo tubo.

3.10.4. Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;

3.10.5. Realização do ensaio

3.10.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle negativo (água ou tecido bovino ou suíno).

3.10.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico por RT-qPCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.10.5.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (VFA) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;
- c) A adição de DNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);
- d) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle positivo para VFA;
 - II. Controle negativo da extração;
 - III. Branco (água livre de nucleases);
 - IV. Controle positivo e negativo do kit utilizado (se houver).

3.10.5.4. Reação de RT-qPCR

- a) Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- b) Iniciar e entrar com os dados no *software* do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- c) Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- d) Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.10.6. Critérios de aceitação da prova

- a) Para a validação do ensaio, o controle positivo deve apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um Cq satisfatório;
- b) O controle negativo deve ter Cq indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle negativo deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.10.7. Interpretação dos resultados

- a) Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle positivo, controle negativo, controle da extração, background de fluorescência e

gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;

- b) O limiar de Cq a ser considerado positivo deve ser avaliado conforme definido na verificação de desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;
- c) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada;
- d) Amostras positivas devem ser submetidas a sequenciamento para genotipagem viral.

3.10.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.10.9. Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

QUADRO 1: Sugestão de oligonucleotídeos para RT-PCR e RT-qPCR para detecção molecular do VFA

Oligonucleotídeo	Tipo de PCR	Sequência	Referência
FMDV.3D.107.F	RT-qPCR	ACTGGGTTTTACAAACCTGTGA	Calahan, 2002
FMDV.3D.107.R		GCGAGTCCTGCCACGGA	
FMDV.3D.107.S		FAM-TCCTT TGCAC GCCGT GGGAC-BHQ1	
FMDV.5UTR.F	RT-qPCR	CACYT YAAGR TGACA YTGRT ACTGG TAC	Reid, 2001
FMDV.5UTR.R		CAGAT YCCRA GTGWC ICITG TTA	
FMDV.5UTR.S		FAM-CCTCG GGGTA CCTGA AGGGCATCC-Iowa Black	
FMDV.3D.88.F	RT-qPCR	ACTGGGTTTTAWAAACCTGTGATG	Moniwa, 2007
FMDV.3D.88.R		TCAACTTCTCCTGKATGGTCCCA	
FMDV.3D.88.S		FAM-ATCCTCTCCTTTGCACGC- Iowa Black	
FMDV.IRES.145.F	RT-qPCR	TAA CAW GGA CCC RCS GGG CC	Wernike, 2013
FMDV.IRES.145.R		TGA AGG GCA TCC TTA GCC TG	
FMDV.IRES.145.S		FAM - CAT GTG TGC AAY CCC AGC ACR G - BHQ	
FMDV.UTR.328.F	RT-PCR	GCCTGGTCTTTCCAGGTCT	Reid, 2000
FMDV.UTR.328.R		CCAGTCCCCTTCTCAGATC	

Referências Bibliográficas

Callahan JD, Brown F, Osorio FA, Sur JH, Kramer E, Long GW, Lubroth J, Ellis SJ, Shoulars KS, Gaffney KL, Rock DL, Nelson WM. **Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus.** J Am Vet Med Assoc. 2002 Jun 1;220(11):1636-42

Moniwa M, Clavijo A, Li M, Collignon B, Kitching PR. **Performance of a foot-and-mouth disease virus reverse transcription-polymerase chain reaction with amplification controls between three real-time instruments.** J Vet Diagn Invest. 2007 Jan;19(1):9-20.

Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus), CHAPTER 3.1.8 Version (NB: Version adopted in May 2021). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 12 de jun. de 2021

Reed LJ, Muench H. **A simple method of estimating fifty per cent endpoints.** Am J Hyg. 1938; 27:493–497.

Reid SM, Ferris NP, Hutchings GH, Samuel AR, Knowles NJ. **Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction.** J Virol Methods. 2000 Sep;89(1-2):167-76.

Reid SM, Ferris NP, Hutchings GH, Zhang Z, Belsham GJ, Alexandersen S. **Diagnosis of foot-and-mouth disease by real-time fluorogenic PCR assay.** Vet Rec. 2001 Nov 17;149(20):621-3.

Wernike K, Hoffmann B, Beer M. **Single-tube multiplexed molecular detection of endemic porcine viruses in combination with background screening for transboundary diseases.** J Clin Microbiol. 2013 Mar;51(3):938-44.

CAPÍTULO 2.6.2. ESTOMATITE VESICULAR - EV

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da Estomatite Vesicular.

1.1. Detecção da Resposta Imune

- a) Soro sanguíneo

1.2. Identificação do Agente

- a) Epitélio;
- b) Líquido de Vesículas;
- c) Suabe de vesículas rompidas

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controle Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2 Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos

a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

Detecção da Resposta Imune

3.2. Teste de Virusneutralização

3.2.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;
- g) Ponteiras descartáveis;
- h) Descartador de ponteiras;
- i) Reservatórios para soluções (cubetas);
- j) Papel absorvente;
- k) Microplacas para cultivo celular em poliestireno cristal com 96 cavidades de fundo chato;
- l) Caneta para identificação de vidraria;
- m) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.2.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica classe II B1 (requisito mínimo);
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Estufa com atmosfera de CO₂;
- f) Estufa;
- g) Banho seco ou que empregam água;
- h) Termômetros;
- i) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- j) Pipetador automático ou manual;
- k) Agitador de tubos;
- l) Microscópio invertido;
- m) Balança analítica;
- n) Centrífuga refrigerada.

3.2.3. Insumos

- a) Suspensão celular de linhagem sensível (VERO, MDBK);
- b) Meio MEM (Meio Essencial Mínimo, reconstituído de acordo com o fabricante);
- c) Soro fetal bovino (SFB) livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma;
- d) Solução de antibióticos e antifúngicos;
- e) Vírus da Estomatite Vesicular.

3.2.4. Soluções

- a) Meio MEM com piruvato com 5% de soro fetal bovino e antimicrobianos;
- b) Solução de salina 0,15 mol/L %;

- c) Ácido cítrico 0,2 %;
- d) Solução salina 0,85 % fosfatada tamponada (PBS) pH 7,2-7,4;
- e) Solução de antibióticos e antifúngicos.

3.2.5. Realização do ensaio

3.2.5.1 Método de Triagem

- a) Inativar as amostras em banho Maria ou banho seco a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.
- b) Apenas os soros em teste e controle são diluídos na placa;
- c) Adicionar 25,0 μL de MEM em toda a placa (QUADRO 1);
- d) Adicionar 25 μL de soro nas linhas A (soro 1 à12) e E (soro 13 à 24).
- e) Homogeneizar e transferir 25 μL da linha A para B, e da B para C, e da C para D e ao final descartar 25 μL ;
- f) Da mesma forma do item anterior, homogeneizar e transferir da linha E até a H e descartar 25 μL ;
- g) Distribuir os controles, controle celular e a retrotitulação de acordo com apresentado no Método quantitativo (QUADRO 2);
- h) Proceder ao ensaio como indicado no **Método quantitativo** do item “i” ao item “o”;
- i) Soros reagentes na triagem com título igual ou maior do que 32 podem ser avaliados para se chegar ao título final pelo método de quantificação.

3.2.5.2 Método quantitativo

- a) Apenas os soros em teste e controle são diluídos na placa;
- b) Para amostras que não foram avaliadas quanto à toxidez proceder como descrito abaixo;
- c) Adicionar 37,5 μL de MEM na linha A (controle de toxidez, deve ser realizado apenas nos soros em análise, não é realizado nos soros controle, retrotitulação e controle de células).
- d) Adicionar 25 μL de MEM nas demais linhas da placa;
- e) Distribuir as amostras (exemplo, soros 1 e 2) e controles como descrito no QUADRO abaixo.
- f) Adicionar 12,5 μL de soro (por poço) na linha A e 25 μL de soro (por poço) na linha B;
- g) Homogeneizar e transferir 25 μL da linha B para C, e assim sucessivamente até a linha H. Ao final descartar 25 μL .
- h) Para o controle de células (CC), adicionar 50 μL de MEM. Reservar pelo menos uma coluna como controle de células (CC). Nessa coluna não deve ser adicionado vírus ou soro;
- i) Retirar um criotubo do vírus da Estomatite Vesicular do ultrafreezer, o qual já deverá ter sido titulado pelo método de Reed-Muenchen. Este método será também empregado na titulação da diluição de trabalho do vírus (retrotitulação);
- j) Diluir o vírus de acordo com o título para que no ensaio sejam utilizados aproximadamente 1000 TCID₅₀/25 μL (DT- diluição de trabalho);
- k) Adicionar 25 μL da diluição trabalho do vírus aos poços, com exceção do controle de toxidez dos soros, da coluna de controle de células e da retrotitulação;
- l) Incubar as microplacas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, em estufa com 5% de atmosfera de CO₂ por um período de 1 hora;
- m) Adicionar a todos os poços 150 μL de suspensão celular contendo 300×10^5 células/mL com 5 % SFB iniciando-se pela coluna referente ao controle de células;
- n) Incubar as microplacas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, em estufa com 5% de atmosfera de CO₂ por 72 horas;

o) Após o término do período de incubação realizar a leitura da microplaca em microscópio de luz com imagem invertida.

3.2.5.3. Retrotitulação

a) A retrotitulação deve ser feita em uma das placas do ensaio. O QUADRO 1 apresenta o modelo de distribuição das diluições obtidas a partir da diluição de trabalho;

b) Preparar três diluições do vírus em base 10 a partir da diluição de trabalho (DT) realizar diluições em base 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4});

c) Adicionar 25 µL de MEM em quatro colunas de uma microplaca, conforme indicado no QUADRO 1;

d) Adicionar 25 µL de cada uma das diluições do vírus em uma coluna, começando pelo vírus mais diluído, de forma que possam ser utilizadas as mesmas ponteiros e o mesmo reservatório para todas as diluições do vírus.

e) Após o término do período de incubação realizar a leitura da microplaca em microscópio de luz com imagem invertida;

f) Cálculo do título deve ser feito pelo método de Reed-Muenchen com base na presença ou ausência de crescimento viral nas colunas inoculadas com as diluições do vírus.

QUADRO 1. Distribuição das amostras pelo método de Triagem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1/4
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1/8
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1/16
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1/32
E	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1/4
F	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1/8
G	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1/16
H	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	1/32

QUADRO 2. Distribuição das amostras pelo Método Quantitativo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	-4	CC	CC	TX	Log
B	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	-4	CC	CC	1/4	0,6
C	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	-4	CC	CC	1/8	0,9
D	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	-4	CC	CC	1/16	1,2
E	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	-4	CC	CC	1/32	1,5
F	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	-4	CC	CC	1/62	1,8
G	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	-4	CC	CC	1/128	2,1
H	1	2	3	4	CN	CP	-1	-2	-3	-4	CC	CC	1/256	2,4
					RT									

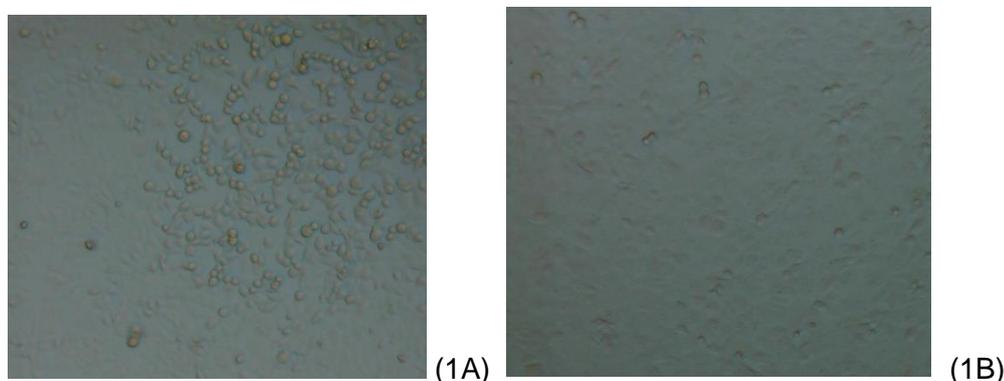
3.2.6 Critérios de aceitação da Prova

- a) A prova estará válida quando a retrotitulação do vírus de prova na diluição de trabalho apresentar as doses infectantes dentro da variação $10^{2\pm 0,5}$, que corresponde a 750 a 1330 TCID₅₀/50 µL
- b) O soro reagente deve apresentar título superior a 32;
- c) O soro não reagente deve apresentar título inferior a 32;
- d) Controle de células apresentando tapete íntegro em todos os poços isentos de contaminação ou toxidez.

3.2.7. Interpretação dos resultados

- a) Soro REAGENTE, com 50 % de neutralização traduzida por ausência de efeito citopático (ECP) nas diluições a partir de 1:32 (título 1,5);
- b) Soro não REAGENTE, com ausência de neutralização traduzida por presença de efeito citopático (ECP) nas diluições a inferiores a 1:32 (título 1,5);
- c) A amostra será considerada tóxica quando se observar a ausência de multiplicação celular, ou destruição das células por componentes do soro no poço de controle de toxidez. Geralmente é caracterizada pela sedimentação do cultivo semeado no fundo do poço.
- d) Amostra contaminada - a amostra será considerada contaminada quando se observar o crescimento bacteriano ou fúngico no poço amostra processada.

FIGURA 1 – Cultivo de células VERO sem ECP (1A) e com a presença de ECP (1B) causado pelo vírus da Estomatite vesicular.



Fonte – LFDA-MG

3.2.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, “REAGENTE” ou “NÃO REAGENTE”. Caso a amostra seja considerada reagente, deve ser descrito a valor do título final, que é expresso como o logaritmo da diluição em que houve 100% de Virusneutralização.

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

d) O laboratório deve assegurar a biosseguridade dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.2.10 Retenção de itens de ensaio

a) Amostras de soro poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidos antes do descarte.

Identificação do Agente

3.3. Isolamento viral

3.3.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Placas de Petri;
- g) Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;
- h) Tubo de centrífuga;
- i) Tubos de ensaio;
- j) Ponteiras descartáveis;
- k) Descartador de ponteiras;
- l) Reservatórios para soluções (cubetas);
- m) Papel absorvente;
- n) Microplacas para cultivo celular em poliestireno com 24 cavidades de fundo chato;
- o) Microplacas para cultivo celular em poliestireno com 96 cavidades de fundo chato;
- p) Caneta para identificação de vidraria;
- q) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;
- r) Areia estéril;
- s) Filtro para seringa (0,45 µm);
- t) Gral e Pistilo;
- u) Tesoura cirúrgica e bisturi
- v) Seringa descartável;

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica classe II A (requisito mínimo);
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Estufa com atmosfera de CO₂;
- f) Estufa;
- g) Banho seco ou que empregam água;
- h) Termômetros;
- i) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- j) Pipetador automático ou manual;
- k) Agitador de tubos;
- l) Microscópio invertido.
- m) Cronômetro
- n) Balança analítica;
- o) Centrífuga refrigerada.

3.3.3. Insumos

- a) Suspensão celular de linhagem sensível (VERO, MDBK);
- b) Meio MEM (Meio Essencial Mínimo, reconstituído de acordo com o fabricante);
- c) Soro fetal bovino (SFB), livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma;
- d) Solução de antibióticos e antifúngicos;
- e) Cepas do vírus da Estomatite Vesicular;

3.3.4. Soluções

- a) Meio MEM com 5% de soro fetal bovino e tratado com solução de antibióticos e antifúngicos;
- b) Solução de salina 0,15 mol/L %;
- c) Ácido cítrico 0,2 %;
- d) Solução salina 0,85 % fosfatada tamponada (PBS) pH 7,2-7,4;
- e) Solução de antibióticos e antifúngicos.

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1 Preparo das amostras

- a) Escolher os órgãos encaminhados, que serão submetidos à prova. Os órgãos de eleição para este ensaio são líquidos de vesículas, epitélio lingual. Utilizar aproximadamente 0,5 cm³ de cada tecido;
- b) Remover o excesso de tecido conjuntivo;
- c) Recortar e macerar os fragmentos de cada órgão preparando um pool para cada requisição, utilizando gral, pistilo e MEM tratado com solução antimicrobiana até que se forme uma pasta homogênea. Pode ser utilizada areia estéril como abrasivo se necessário.
- d) Completar o volume com MEM resultando em uma suspensão de aproximadamente 20 % (P/V);
- e) Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos;
- f) Colher o sobrenadante, filtrar e colocar em frasco devidamente identificado; descartar o precipitado;
- g) Adicionar 100 µL de solução antimicrobiana;
- h) Encaminhar 400 µL de inóculo ou de fragmentos do tecido tratado com 1,0 mL de Trizol para diagnóstico molecular.

3.3.5.2 Sangue total ou plasma

- a) Caso sejam recebidas mais de uma amostra de sangue na requisição preparar um pool com volume final de 1,0 mL. Para quatro amostras adicionar 250 µL de cada amostra;
- b) Adicionar 10 µL de solução antimicrobiana.

3.3.5.3. Passagens em células (suspensão celular)

- a) Adicionar 100 µL do inóculo de macerado de tecidos e 50 µL do inóculo de sangue total em um poço da microplaca de 24 poços. Caso seja utilizada uma garrafa de 25 cm² utilizar 0,5 mL de inóculo de macerado de tecidos ou 0,1 mL de sangue total;
- b) Acrescentar 1 mL de suspensão celular com 10 % de soro fetal bovino na concentração de 300.000 células/mL;
- c) Incubar a microplaca por 48 a 72 horas em estufa de CO₂.
- d) Fazer a leitura e registrar os resultados. Os materiais em que for observada contaminação não deverão ser submetidos à segunda passagem.
- e) Congelar a microplaca e descongelar;
- f) Inocular o material da primeira passagem em microplaca de 96 poços sendo que para cada poço da microplaca de 24 poços ou garrafa deverá ser utilizada uma coluna da microplaca de 96 poços;
- g) Inocular 10 µL do inóculo nos poços A1, B1, C1 e D1;
- h) Inocular 5 µL do inóculo nos poços E1, F1, G1 e H1;
- i) Adicionar 100 µL de células em todos os poços reservando uma coluna para o controle de células e uma para o controle de vírus;
- j) Para o controle de vírus utilizar uma amostra da cepa Shope;
- k) Realizar a leitura dos cultivos por 72 horas em microscópio óptico. Amostras que apresentarem características de efeito citopático deverão ser encaminhadas para a confirmação por biologia molecular.

3.3.6 Critérios de aceitação das provas

- a) As provas de identificação do agente serão consideradas válidas quando os cultivos celulares sabidamente infectados (controles positivos) apresentam efeito citopático caracterizado pelo destacamento do cultivo celular e formação de células sinciciais e ausências de ECP nos cultivos que não foram infectados (controles negativos ou de células).
- b) Na presença de ECP deverá ser realizada a confirmação do isolamento por método imunológico conforme descrito no item ou por método molecular.
- c) Controle de células apresentando tapete íntegro em todos os poços isentos de contaminação ou toxidez.

3.3.7. Interpretação dos resultados

- a) O material será considerado NÃO DETECTADO quando não apresentar ECP após as duas passagens em cultivo de células;
- b) O material será considerado DETECTADO quando apresentar ECP durante as passagens em cultivo celular, nesse caso sendo necessária realização de testes de tipificação (ELISA ou RT-PCR)

para confirmação do isolado viral. No caso de detecção deve ser incluído no campo de resultado o nome da espécie do vírus detectado.

3.3.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, DETECTADO ou NÃO DETECTADO no isolamento viral do vírus da Estomatite Vesicular.

3.3.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.3.10 Retenção de itens de ensaio

a) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo as mesmas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

3.4 Técnica de PCR convencional para detecção do vírus da estomatite vesicular (VEV)

3.4.1 Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Pipetas graduadas;
- c) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- d) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- e) Estantes para microtubos;
- f) Gaze ou papel toalha.

3.4.2 Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;

- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Termociclador;
- h) Balança de precisão;
- i) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- j) Agitador de microtubos;
- k) Micro-ondas;
- l) Cuba e fonte para eletroforese;
- m) Microcomputador;
- n) Sistema de fotodocumentação;
- o) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.4.3 Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Mix de dNTP;
- c) Oligonucleotídeos para RT-PCR (QUADRO 3);
- d) Kit de RT-PCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);
- g) Corante para ácidos nucleicos;
- h) Marcador de peso molecular;
- i) Tampão de carregamento (“*loading buffer*”);
- j) Gel de agarose;
- k) Controle positivo para VEV (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa).

3.4.4 Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;

3.4.5. Realização do ensaio

3.4.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle negativo (água ou tecido bovino ou suíno).

3.5.4.2. Reação de amplificação de ácido nucleico (PCR)

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR), isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);

- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.5.4.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (VEV) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Adicionar o mix de reação a cada poço da microplaca (ou microtubos);
- c) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle positivo para VEV;
 - II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III. Branco (água livre de nucleases);
 - IV. Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.5.4.4. Reação de PCR

- a) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos identificados com a numeração da amostra a ser testada;
- b) Realizar a amplificação em termociclador certificado, conforme as especificações de temperatura do protocolo utilizado.

3.5.4.5 Eletroforese

- a) Preparar o gel de agarose em concentração adequada ao protocolo de PCR utilizado. Adicionar um corante para ácidos nucleicos em proporção suficiente para visualização das bandas;
- b) Para a corrida das amostras, adicionar tampão de carregamento (*loading buffer*) ao produto de PCR;
- c) Aplicar marcador de peso molecular em um dos poços do gel;
- d) Realizar a corrida em cuba de eletroforese, utilizando o tempo e a voltagem adequados para o volume do gel e o protocolo de PCR utilizado;
- e) Visualizar o gel sob luz ultravioleta, fotografar com o auxílio de um fotodocumentador e analisar o resultado.

3.5.5 Critérios de aceitação da prova

- a) As amostras de controle positivo para VEV devem apresentar bandas de tamanhos correspondentes aos *amplicons* do protocolo utilizado;
- b) As amostras de controle negativo (controle negativo da extração e branco) não devem apresentar bandas de amplificação.

3.5.6 Interpretação dos resultados

- a) Comparar os resultados das amostras testadas ao das amostras controle, a fim de classificá-las como positivas ou negativas;

- b) A leitura das bandas deve ser clara e livre de *amplicons* inespecíficos para o teste ser considerado satisfatório;
- c) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada.

3.5.7 Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.5.8 Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas por dois analistas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

3.5.9 Retenção dos Itns de Ensaio

- d) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas por dois analistas antes do descarte;
- e) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- f) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

3.6. Técnica de RT-qPCR para VEV

3.6.1. Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.6.2 Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;

- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Termociclador para PCR em tempo real;
- g) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- h) Agitador de microtubos;
- i) Microcomputador;
- j) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.6.3 Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Oligonucleotídeos para RT-qPCR (QUADRO 3);
- c) Controle positivo para VEV (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);
- d) Kit de RT-qPCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);
- g) Recomenda-se o uso de reações de passo único (*one step*) para síntese e amplificação de cDNA no mesmo tubo.

3.6.4 Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;

3.6.5. Realização do ensaio

3.6.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle negativo (água ou tecido bovino ou suíno).

3.6.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico por qPCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.6.5.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (VEV) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;
- c) A adição de DNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);
- d) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle positivo para VEV;
 - II. Controle negativo da extração;
 - III. Branco (água livre de nucleases);
 - IV. Controle positivo e negativo do kit utilizado (se houver).

3.6.5.4. Reação de qPCR

- a) Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- b) Iniciar e entrar com os dados no *software* do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- c) Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- d) Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.6.6. Critérios de aceitação da prova

- a) Para a validação do ensaio, o controle positivo deve apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um Cq satisfatório;
- b) O controle não negativo deve ter Cq indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle negativo deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.6.7 Interpretação dos resultados

- a) Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle positivo, controle negativo, controle da extração, background de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;
- b) O limiar de Cq a ser considerado positivo deve ser avaliado conforme definido na verificação desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;
- c) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada;
- d) Amostras positivas devem ser submetidas a sequenciamento para genotipagem viral.

3.6.8 Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”;

- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.6.9 Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

QUADRO 3: Sugestão de oligonucleotídeos para RT-PCR e RT-qPCR para detecção molecular de VEV

Oligonucleotídeo	Tipo de PCR	Sequência	Referência
VSNJV.P-102	RT-PCR	5'gagaggataaataatctcc3'	Centro Panamericano de Febre Aftosa
VSNJV.P-744		5'gggcataactgaagaata3'	
VSIV.P-179	RT-PCR	5'gcagatgattctgacac3'	Centro Panamericano de Febre Aftosa
VSIV.P-793		5'gactctcgctgattgta3'	
VSAV.PPP.722.F	RT-PCR	ggggccattcaagagataga	LFDA
VSAV.PPP.722.R		tgatatctcactctggcctgattat	
COCV.PPP.666.F	RT-PCR	tggagtcaactgaacaagggtga	LFDA
COCV.PPP.666.R		aaagctcctccagggtgact	
VSIV-2.GP.81.F	RT-qPCR	cgttgctgtgattgtyca	LFDA
VSIV-2.GP.81.R		gggaactgggagtcaatc	
VSIV-2.GP.81.S		FAM-ctc+Atc+Cac+Caa+Cacat - NFQ	
VSIV-3.GP.95.F	RT-qPCR	gggtwaacatccgtgcta	de Oliveira (2018)
VSIV-3.GP.95.R		gtcacaagtggtgatcca	
VSIV-3.GP.95.S		FAM-ac+Atc+Cat+Cca+Tcagc- NFQ	
VSAV.LP.78.F	RT-qPCR	gtccatcaaccattgtcc	de Oliveira (2018)
VSAV.LP.78.R		atcaatccatctgcgactcc	
VSAV.LP.78.S		FAM-cgcgattcttaagtgagtcaaacagga- NFQ	
VSAV.GP.87.F	RT-qPCR	gagtgtggatcaaccag	de Oliveira (2018)
VSAV.GP.87.R		ctgtggcttgaacratca	
VSAV.GP.87.S		FAM-ctgc+ggttatg+cc+tcca-lowa Black	

Referências Bibliográficas

de Oliveira AM, Fonseca AA Júnior, Camargos MF, OrzuL LM, Laguardia-Nascimento M, Oliveira AGG, Rodrigues JG, Sales ML, de Oliveira TFP, de Melo CB. **Development and validation of rt-qPCR for vesicular stomatitis virus detection (Alagoas vesiculovirus).** J Virol Methods. 2018 Jul;257:7-11.

Reed LJ, Muench H. **A simple method of estimating fifty per cent endpoints.** Am J Hyg. 1938; 27:493–497.

Vesicular Stomatites, CHAPTER 3.1.23. Version (NB: Version adopted in May 2021). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-onlin/>. Acesso em: 15 de jun. de 2021

CAPÍTULO 2.6.3 RAIVA

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da Raiva:

1.1. Isolamento e identificação do Agente

- a) Tronco encefálico;
- b) Hipocampo;
- c) Tálamo;
- d) Córtex cerebral;
- e) Medula oblonga (Bulbo);
- f) Cerebelo;
- g) Quirópteros

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor; ou caso o conjugado não seja comercial ou importado, o mesmo deve passar por prova de validação interna.

3.1.2. Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados.

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo às temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos.

a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização à temperatura ambiente.

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 e 25°C.

3.1.4. Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios de interpretação dos resultados.

3.1.5. O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios.

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada.

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

3.1.8. Todo procedimento que envolva manipulação de amostra e/ou suspensões de tecido deve ser realizado no interior de CSB.

3.1.9. É obrigatória a utilização de EPIs durante todos os procedimentos descritos: luvas, máscara, touca, óculos, jaleco de mangas compridas, sapato fechado.

3.1.10. Todos os colaboradores que trabalham no laboratório de Diagnóstico de Raiva incluindo os funcionários de serviços gerais e estagiários, deverão realizar o esquema profilático de pré-exposição com vacina antirrábica, titulação de anticorpos circulantes e, se necessário, receber reforço vacinal. A avaliação sorológica deve ser repetida semestralmente para os profissionais que manipulam o vírus ou amostras suspeitas ou materiais com resíduos e anualmente para os funcionários que realizam a limpeza do laboratório. Somente títulos iguais ou acima de 0,5 UI/mL de anticorpos neutralizantes são satisfatórios para liberação do colaborador para execução dos trabalhos no laboratório.

3.2. Identificação do Agente por imunofluorescência direta (IFD)

3.2.1. Materiais

- a) Câmara úmida;
- b) Caneta de tinta indelével;
- c) Caixa Porta Lâminas;
- d) Cuba de Coplin;
- e) Descartador de ponteiros;
- f) Estantes para tubos;
- g) Gral e Pistilo;
- h) Lâmina para microscopia de extremidade fosca ou própria para IFD;
- i) Lamínulas;
- j) Papel de filtro;
- k) Pinças e tesouras de inox;
- l) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- m) Ponteiros descartáveis;
- n) Recipiente para descarte de material;
- o) Reservatórios para soluções (cubetas);

- p) Vidrarias.

3.2.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Balança semi-analítica;
- c) Cabine de segurança biológica classe II;
- d) Centrífuga refrigerada com copos de segurança;
- e) Cronômetro;
- f) Destilador de água ou Deionizador;
- g) Estufa 37°C;
- h) Freezer - 20°C;
- i) Freezer -70°C;
- j) Medidor de pH;
- k) Micropipeta monocal de volume regulável ou pipeta pasteur descartável;
- l) Microscópio de fluorescência;
- m) Pipetador automático ou manual;
- n) Refrigerador.

3.2.3 Insumos

- a) Acetona PA;
- b) Conjugado antirrábico marcado com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou
- c) Glicerina PA.

3.2.4 Soluções

- a) Acetona a 80%;
- b) Ácido Cítrico 0,2% ou Hipoclorito de Sódio 0,5%;
- c) Solução de álcool 70° GL
- d) Conjugado de trabalho;
- e) Glicerina a 50%;
- f) Solução Salina a 0,85%
- g) Solução Salina Tamponada com Fosfatos (PBS).

3.2.5. Realização do ensaio

a) Preencher o formulário de acompanhamento do ensaio. Identificar as lâminas de microscópio: duas lâminas de controle (um positivo e um negativo) e outras lâminas para testes das regiões cerebrais apropriadas. Preparar, no mínimo, 03 lâminas para cada amostra a ser testada a partir de fragmentos de regiões anatômicas diferentes; fazer duas impressões do mesmo fragmento.

b) Para herbívoros e animais silvestres realizar preferencialmente impressões de fragmentos de hipocampo, cerebelo e córtex cerebral. Para equídeos, incluir medula espinhal e para quirópteros utilizar tecido cerebral e glândulas salivares, quando possível.

c) Dentro da Cabine de segurança biológica, classe II A, prepare a impressão do tecido cerebral (controles e amostras) na lâmina para microscópio.

d) Retire o excesso de tecido da lâmina pressionando contra papel absorvente.

e) Trabalhe com uma amostra de cada vez e processe o controle positivo por último ou prepare essas lâminas Controles antecipadamente e armazenar a -20°C durante 01 mês ou a -70°C durante 6 meses.

f) Deixe as lâminas secarem; em temperatura ambiente em torno de 30 minutos;

g) coloque todas as lâminas em um frasco tipo Coplin contendo acetona fria (-20 ° C) por pelo menos 20 minutos; (mantida permanentemente no congelador).

h) Remova as lâminas do Coplin e deixe secar em temperatura ambiente.

i) Prepare o conjugado antirrábico usando o diluente indicado pelo fabricante.

j) Adicione o conjugado na diluição de trabalho (titulado previamente) nas impressões de controle positivo e negativo e amostras de teste, em quantidade suficiente para cobrir a totalidade das impressões. Certifique-se que o reagente cobriu toda a impressão.

k) Caso não use lâminas próprias para IFD, deve-se delimitar a área onde vai ser colocado o conjugado, com esmalte, usando como molde a borda larga.

l) Coloque as lâminas em câmara úmida e em seguida incubar em estufa 37 °C ± 1 °C por 45 minutos.

m) Remover as lâminas e lavar com PBS pH 7,4 em dois enxágues de 5 minutos cada, em um Coplin. Após, lavar em água destilada.

n) Deixe as lâminas secarem.

o) Instilar uma gota de Glicerina 50% sobre cada impressão e cobrir com uma lamínula

p) Resultados: Sempre leia primeiro os controles positivos e negativos. As lâminas são lidas em um microscópio de fluorescência. A impressão é observada para a fluorescência específica da raiva em uma ampliação de 200 X ou maior. A fluorescência específica é denotada por fluorescência verde "maçã" brilhante geralmente na área perinuclear das células, ou neurônios. Grânulos opacos verde ou vermelho/verde auto-fluorescente não devem ser contados como antígeno positivo. Examine cuidadosamente as amostras de tecido, se necessário, continue retornando ao controle positivo para comparação.

q) Se necessário, um segundo operador deve examinar todos os slides e os diagnósticos de ambos os operadores devem ser os mesmos.

3.2.6. Critérios de aceitação das provas

a) As provas de IFD serão consideradas válidas quando as impressões sabidamente infectadas (controles positivos) apresentam fluorescência específica e as sabidamente negativas (controle negativo) não apresentam fluorescência.

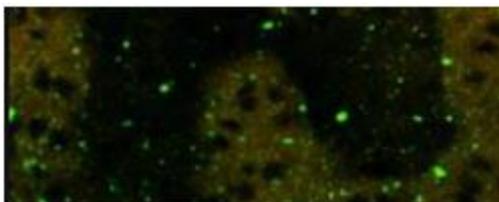
b) Em caso de resultados negativos do teste de diagnóstico por IFD, outros testes confirmatórios (cultura celular, provas de PCR ou inoculação em camundongos) devem ser realizados. Sempre que possível, o isolamento do vírus na cultura de células deve substituir os testes de inoculação em camundongo.

c) Em caso de resultados inconclusivos na IFD, o teste deve ser repetido a partir do material original. Persistindo esse resultado, deve-se esperar o término dos testes de inoculação em células, PCR ou camundongo, para resultado conclusivo.

3.2.7. Interpretação dos resultados

- a) POSITIVO - presença de fluorescência específica nas impressões FIGURA (1A).
- b) NEGATIVO – ausência de fluorescência específica nas impressões FIGURA (1B).

FIGURA. (1A).



Fonte: Instituto Pasteur-São Paulo

FIGURA. (1B).



Fonte: Instituto Pasteur-São Paulo

3.2.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como positivo ou negativo.

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) As amostras devem ser registradas em formulários próprios e conferidas antes do descarte. Serão submetidas ao processo de autoclavagem com temperatura de 121°C durante 30 minutos para então serem descartadas.
- b) Todo material, não autoclavável, utilizado na realização do ensaio, que não for autoclavável, deve ser imerso completamente em cuba com solução de ácido cítrico 0,2% ou de hipoclorito de Sódio 0,5% durante no mínimo 60 minutos. Após esse período, conforme o material, pode ser descartado ou reutilizado após devida higienização;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.2.10. Retenção de Itens de Ensaio

- b) Amostras negativas para detecção do agente da raiva e oriundas de bovinos com idade igual ou maior que 24 meses, bem como ovinos e caprinos com idade igual ou maior que 12 meses deverão ser submetidas a ensaios para Encefalopatia Espongiforme Transmissíveis (EETs). Caso o laboratório não realize os ensaios, as amostras deverão ser encaminhadas com a maior brevidade possível ao LFDA indicado pela CGAL, enviando preferencialmente amostras contendo o tronco encefálico e óbex.
- c) As demais amostras, podem ser descartadas após um período mínimo de 6 meses após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.
- d) Durante o período de armazenamento as amostras devem ser armazenadas congeladas em temperatura de no máximo -65°C.

3.3 Isolamento e identificação do agente por inoculação em cultivo celular:

3.3.1 Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Placas de Petri;
- g) Tubo de centrífuga;
- h) Tubos de ensaio;
- i) Ponteiras descartáveis;
- j) Descartador de ponteiras;
- k) Reservatórios para soluções (cubetas);
- l) Papel absorvente;
- m) Microplacas para cultivo celular em poliestireno com 96 cavidades de fundo chato;
- n) Caneta para identificação de vidraria;
- o) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;
- p) Gral e Pistilo;
- q) Tesoura cirúrgica e bisturi.

3.3.2 Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica, classe II A.;
- b) Geladeira;
- c) Freezer;
- d) Estufa com atmosfera de CO₂;
- e) Termômetros;
- f) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- g) Pipetador automático ou manual;
- h) Agitador de tubos;
- i) Microscópio óptico invertido;
- j) Autoclave;
- k) Microscópio de fluorescência;
- l) Cronômetro;
- m) Balança analítica;
- n) Centrífuga refrigerada.

3.3.3 Insumos

- a) Anticorpo antirrábico monoclonal ou policlonal marcado com fluoresceína (conjugado);
- b) Acetona, grau para análise (P.A);
- c) Suspensão celular de linhagem sensível - Células de neuroblastoma, N2a, CCL-131 da American Type Culture Collection (ATCC);
- d) Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), reconstituído de acordo com o fabricante;
- e) Soro fetal bovino (SFB), livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma;
- f) Papel filtro;
- g) antibiótico comercial (Penicilina +Streptomycin);

h) Solução Salina Tamponada com Fosfatos (PBS).

3.3.4. Soluções

- a)** Solução salina fosfatada tamponada 0,1 M pH 7,4
- b)** Ácido cítrico 0,2 % ou Hipoclorito de Sódio 0,5%
- c)** Solução de álcool 70° GL;

3.3.5. Realização do ensaio

- a)** Preparar uma suspensão de tecidos a 20% (p/v) utilizando uma solução de salina fosfatada tamponada 0,1M pH 7,4 com antibiótico comercial (Penicilina +Streptomicina) na proporção de 1 mL de antibiótico por litro de salina, adicionado de 20 mL de soro fetal bovino.
- b)** Colocar a suspensão na geladeira por 60 minutos.
- c)** Centrifugar por 30 minutos a 3.000 x G. Se não for usar imediatamente, colete o sobrenadante e congele. Essa suspensão é composta por um pool de cornos de amon, córtex cerebral, medula oblonga, cerebelo, etc e é usada para inocular cultura de células.
- d)** Adicionar 100 µl de cada amostra e dos controles positivo e negativo em quatro poços de uma placa de 96 poços;
- e)** Adicionar em cada poço, 200µL de uma suspensão celular de N2a, CCL-131 na concentração de 2×10^5 células/mL e incubar as microplacas a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, em estufa com 5% de atmosfera de CO_2 ;
- f)** Após 24 horas de incubação, o sobrenadante de cada poço é removido e 200 µl de meio fresco é adicionado a cada poço.
- g)** Ao final de 72 horas de incubação, o sobrenadante é removido com micropipeta e mantido para realizar uma passagem em cultivo celular, se necessário, para aumentar a sensibilidade da prova. Geralmente três passagens consecutivas devem ser feitas para confirmar um resultado negativo.
- h)** As células são fixadas com acetona 80% fria, com 200 µl por poço, durante 30 minutos. Secar as placas.
- i)** Prepare o conjugado antirrábico conforme indicado pelo fabricante.
- j)** Adicione 50 µl do conjugado na diluição de trabalho (titulação prévia) aos poços da placa. Incubar a 37°C por 60 minutos.
- k)** Lavar a placa três vezes com PBS pH 7,4. Após lavar por três vezes com água destilada, deixar secar e adicionar 50 µl de glicerina a 10%. Ler em microscópio de imunofluorescência.

Obs.: A citotoxicidade é um fator comumente relatado que limita a robustez do teste. As técnicas propostas para reduzir a citotoxicidade incluem a adição de agentes de permeabilidade celular (por exemplo, DEAE-dextrano), redução do tempo de incubação antes da troca do meio e diluição das amostras, etc. Essas variações devem ser totalmente validadas antes do uso.

3.3.6 Critérios de aceitação das provas

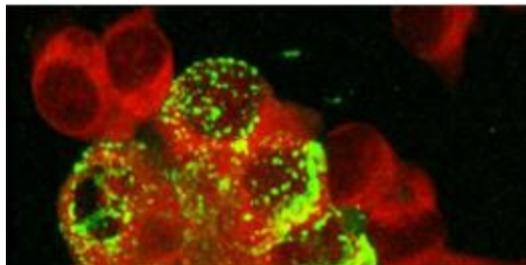
- a)** As provas de isolamento serão consideradas válidas quando:
 - I. Os cultivos celulares sabidamente infectados (controles positivos) apresentarem fluorescência específica e ausência de fluorescência específica nos controles negativos;
 - II. Ausência de reação de toxidez nos cultivos inoculados.

3.3.7 Interpretação dos resultados

a) POSITIVO – presença de reações fluorescentes específicas no cultivo de células inoculadas (FIGURA 1B).

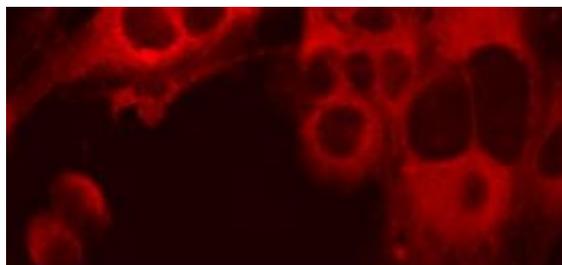
b) NEGATIVO – ausência de reações fluorescentes específicas no cultivo de células inoculadas (FIGURA 2B).

FIGURA 1B



Fonte: Instituto Pasteur-São Paulo

FIGURA 2B



Fonte: Instituto Pasteur-São Paulo

3.3.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como POSITIVO ou NEGATIVO.

3.3.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) As amostras devem ser registradas em formulários próprios e conferidas antes do descarte. Serão submetidas ao processo de autoclavagem com temperatura de 121°C durante 30 minutos para então serem descartadas.

b) Todo material, não autoclavável, utilizado na realização do ensaio, que não for autoclavável, deve ser imerso completamente em cuba com solução de ácido cítrico 0,2% ou de hipoclorito de sódio 0,5% durante no mínimo 60 minutos. Após esse período, conforme o material, pode ser descartado ou reutilizado após devida higienização.

c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.3.10. Retenção de Itens de Ensaio

a) Amostras negativas para detecção do agente da raiva e oriundas de bovinos com idade igual ou maior que 24 meses, bem como ovinos e caprinos com idade igual ou maior que 12 meses deverão ser submetidas a ensaios para Encefalopatia Espongiforme Transmissíveis (EETs). Caso o laboratório não realize os ensaios, as amostras deverão ser encaminhadas com a maior brevidade possível ao LFDA indicado pela CGAL, enviando preferencialmente amostras contendo o tronco encefálico e óbex.

b) As demais amostras, podem ser descartadas após um período mínimo de 6 meses após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

c) Durante o período de armazenamento as amostras devem ser armazenadas congeladas em temperatura de no máximo -65°C.

3.4 Isolamento do agente por Inoculação intracerebral em camundongos e identificação por IFD – Prova Biológica

3.4.1 Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Placas de Petri;
- e) Tubo de centrífuga;
- f) Tubos de ensaio;
- g) Caneta para identificação de vidraria;
- h) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;
- i) Gral e Pistilo;
- j) Tesoura cirúrgica e bisturi

3.4.2 Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica, classe II A.;
- b) Geladeira;
- c) Freezer;
- d) Autoclave;
- e) Pipetador automático ou manual;
- f) Cronômetro;
- g) Balança analítica;
- h) Centrífuga refrigerada.

3.4.3 Insumos

- a) antibiótico comercial (Penicilina +Streptomicona);
- b) Soro fetal bovino (SFB), livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma.

3.4.4. Soluções

- a) Ácido cítrico 0,2 % ou Hipoclorito de Sódio 0,5%;
- b) Solução de álcool 70° GL.

3.4.5. Realização do ensaio

- a) Preparar uma suspensão de tecidos a 20% (p/v) utilizando uma solução de salina fosfatada tamponada 0,1M pH 7,4 com antibiótico comercial (Penicilina +Streptomicona) na proporção de 1 mL de antibiótico por litro de salina, adicionado de 20 mL de soro fetal bovino.
- b) Colocar a suspensão na geladeira por 60 minutos. Centrifugar por 30 minutos a 3.000 x G. Se não for usar imediatamente, colete o sobrenadante e congele.

- c) Essa suspensão é composta por um pool de cornos de amon, córtex cerebral, medula oblonga, cerebelo.
- d) Oito a dez camundongos de 3 a 4 semanas de idade pesando entre 12 e 14 g, ou uma ninhada de camundongos recém-nascidos de 2 dias, são inoculados intracerebralmente com a suspensão de tecidos.
- e) Inocular o volume de 0,01 mL para camundongos recém-nascidos e 0,03 mL para camundongos adultos.
- f) Os camundongos são observados diariamente durante 28 dias.
- g) Cada camundongo morto ou com sintomas, é examinado para raiva usando o teste imunofluorescência direta. Para resultados mais rápidos em camundongos recém-nascidos, é possível verificar um camundongo nos dias 5, 7, 9 e 11 pós-inoculação. Quaisquer mortes ocorridas durante os primeiros 4 dias são consideradas inespecíficas (devido a estresse/infecção bacteriana etc.).
- h) Nos animais mortos após o quinto dia, coletar o cérebro e proceder a IFD conforme item 3.2.

OBS. Uma vez que a cultura de células validada e confiável exista em laboratório, deve-se considerar substituir o teste de inoculação em camundongo pela cultura celular sempre que possível, pois evita o uso de animais vivos, é mais barato e produz resultados mais rápidos.

3.4.6 Critérios de aceitação do ensaio

O ensaio de isolamento em camundongos será considerado válido quando os animais sobreviverem, após o quarto dia de inoculação.

3.4.7 Interpretação dos resultados

O resultado é interpretado pela IFD conforme item 3.2.7.

3.4.8. Emissão dos resultados

Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como POSITIVO ou NEGATIVO.

3.4.9. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) As amostras devem ser registradas em formulários próprios e conferidas antes do descarte. Serão submetidas ao processo de autoclavagem com temperatura de 121°C durante 30 minutos para então serem descartadas.
- b) Todo material não autoclavável utilizado na realização do ensaio deve ser imerso completamente em cuba com solução de ácido cítrico 0,2% ou de hipoclorito de sódio 0,5% durante no mínimo 60 minutos. Após esse período, conforme o material, pode ser descartado ou reutilizado após devida higienização;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.4.10. Retenção de Itens de Ensaio

- a) Amostras negativas para detecção do agente da raiva e oriundas de bovinos com idade igual ou maior que 24 meses, bem como ovinos e caprinos com idade igual ou maior que 12 meses deverão ser submetidas a ensaios para Encefalopatia Espongiforme Transmissíveis (EETs). Caso o laboratório não realize os ensaios, as amostras deverão ser encaminhadas com a maior brevidade possível ao LFDA indicado pela CGAL, enviando preferencialmente amostras contendo o tronco encefálico e óbex.
- b) As demais amostras, podem ser descartadas após um período mínimo de 6 meses após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.
- c) Durante o período de armazenamento as amostras devem ser armazenadas congeladas em temperatura de no máximo -65°C.

3.5 RT-PCR hemi-nested panlyssavirus convencional (hnRT-PCR).

3.5.1 Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Pipetas graduadas;
- c) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- d) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- e) Estantes para microtubos;
- f) Gaze ou papel toalha.

3.5.2 Equipamentos e Instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II ou estação de trabalho para PCR) (Workstation PCR) bcom luz UV germicida
- b) Geladeira;
- c) Freezer
- d) Cubas e fonte de eletroforese;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- g) Agitador de microtubos;
- h) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional)
- i) Pipetador automático ou manual;
- j) Autoclave
- k) Termociclador;
- l) Balança de precisão;
- m) Micro-ondas;
- n) Microcomputador;
- o) Sistema de fotodocumentação;
- p) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional);

3.5.3 Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Mix de dNTP;
- c) Oligonucleotídeos para RT-PCR
- d) Kit de RT-PCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);

- g) Corante para ácidos nucleicos;
- h) Marcador de peso molecular;
- i) Tampão de carregamento ("*loading buffer*");
- j) Gel de agarose;
- k) Amostras de tecido como controle positivo, controle negativo e branco.

3.5.4 Soluções

- a) Solução de álcool 70° GL;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses.

3.5.5 Realização do Ensaio

a) Extração de RNA

- I. A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- II. Não utilizar reagente após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- III. Adicionar amostras controles a cada procedimento de extração: amostras de tecido como controle positivo, controle negativo e branco (água).

b) Reação RT-PCR: primeira etapa

- I. Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR), isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de amostras extraídas para placa ou microtubos (sala de PCR);
- II. Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° GL;
- III. As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades;
- IV. A mistura de enzimas deve ser mantida no gelo. Os demais reagentes podem ser descongelados à temperatura ambiente;
- V. Incluir os controles positivo, negativo e branco;
- VI. Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (TABELA 1) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, com pelo menos volume sobrando para uma reação a mais;
- VII. Onde nenhum amplicon é gerado na primeira reação, deve ser realizada uma segunda reação. É possível uma amplificação de segundo ciclo opcional para aumentar a sensibilidade e/ou confirmar a especificidade do primeiro produto de PCR.

c) Reação RT-PCR: segunda etapa

- I. Uma segunda amplificação (hemi-nested PCR) é feita para aumentar a sensibilidade e / ou para confirmar a especificidade do produto da primeira rodada de PCR
- II. Limpar a bancada com um desinfetante apropriado antes de usar ou preparar a estação de trabalho de PCR;
- III. A mistura de enzimas deve ser mantida no gelo. Os demais reagentes podem ser descongelados à temperatura ambiente;
- IV. Um controle negativo adicional deve ser incluído em cada segunda reação de PCR para confirmar que o master mix não está contaminado;

- V. Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (vírus da raiva) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, pelo menos com volume sobrando para uma reação a mais.

d) Eletroforese

- I. Preparar o gel de agarose em concentração adequada ao protocolo de PCR utilizado (1,5% a 2%). Adicionar um corante para ácidos nucleicos em proporção suficiente para visualização das bandas;
- II. Para a corrida das amostras, adicionar tampão de carregamento (*loading buffer*) ao produto de PCR;
- III. Aplicar marcador de peso molecular em um dos poços do gel;
- IV. Realizar a corrida em cuba de eletroforese, utilizando o tempo e a voltagem adequados para o volume do gel e o protocolo de PCR utilizado;
- V. Visualizar o gel sob luz ultravioleta, fotografar com o auxílio de um fotodocumentador e analisar o resultado.

3.5.6 Critérios de Aceitação do Ensaio

- a) As amostras de controle positivo para raiva devem apresentar bandas de tamanhos correspondentes aos *amplicons* do protocolo utilizado;
- b) As amostras de controle negativo (controle negativo da extração e branco) não devem apresentar bandas de amplificação.

3.5.7 Interpretação dos Resultados

- a) Comparar os resultados das amostras testadas ao das amostras controle, a fim de classificá-las como positivas ou negativas;
- b) A leitura das bandas deve ser clara e livre de *amplicons* inespecíficos para o teste ser considerado satisfatório;
- c) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada.

3.5.8 Emissão dos Resultados

Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”.

3.5.9 Descarte de Amostras e Resíduos

- a) As amostras devem ser registradas em formulários próprios e conferidas antes do descarte. Serão submetidas ao processo de autoclavação com temperatura de 121°C durante 30 minutos para então serem descartadas.
- b) Todo material não autoclavável utilizado na realização do ensaio, que não for autoclavável, deve ser imerso completamente em cuba com solução de ácido cítrico 0,2% ou de hipoclorito de sódio 0,5% durante no mínimo 60 minutos. Após esse período, conforme o material, pode ser descartado ou reutilizado após devida higienização;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.5.10 Retenção de Itens de Ensaio

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas por dois analistas antes do descarte;

- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

3.6 RT-PCR panlyssavirus em tempo real

3.6.1 Materiais

- a) Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.6.2 Equipamentos e instrumentos

- a) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II
- b) Estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Termociclador para PCR em tempo real;
- g) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- h) Agitador de microtubos;
- i) Autoclave;
- j) Microcomputador;
- k) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.6.3 Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Oligonucleotídeos para RT-qPCR
- c) Controle positivo para raiva (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);
- d) Kit de RT-qPCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);
- g) Recomenda-se o uso de reações de passo único (*one step*) para síntese e amplificação de cDNA no mesmo tubo.

3.6.4 Soluções

- a) Solução de álcool 70° GL;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses.

3.6.5 Realização do ensaio

a) Extração de RNA

I.A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;

- II. Não utilizar reagente após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- III. Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle negativo (água).

b) Reação de Amplificação de Ácido Nucleico por RT-qPCR

- I. Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- II. Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° GL;
- III. As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

c) Preparo do Mix de Reação

- I. Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (vírus da raiva) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, e no mínimo para mais uma reação;
- II. Após o preparo do mix, adicionar o RNA e os controles nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica; e deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);
- III. Devem ser incluídos nas análises:
 - i) Controle positivo para raiva;
 - ii) Controle negativo da extração;
 - iii) Branco (água livre de nucleases);
 - iv) Controle positivo e negativo do kit utilizado (se houver);
 - v) Um teste interno de beta-actina.

d) Reação de RT-qPCR

- I. Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- II. Iniciar e entrar com os dados no software do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- III. Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- IV. Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.6.6 Critérios de Aceitação da Prova

- a) Para a validação do ensaio, o controle positivo deve apresentar uma curva sigmoide (forma de S) e um C_q satisfatório;
- b) O controle negativo deve ter C_q indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle negativo deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.6.7 Interpretação dos Resultados

- a) Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle positivo, controle negativo, controle da extração, background de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;
- b) O limiar de C_q a ser considerado positivo deve ser avaliado conforme definido na verificação de desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;

- c) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada;

3.6.8 Emissão dos Resultados

Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”.

3.6.9 Descarte das amostras e Resíduos

- a) As amostras devem ser registradas em formulários próprios e conferidas antes do descarte. Serão submetidas ao processo de autoclavagem com temperatura de 121°C durante 30 minutos para então serem descartadas.
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio, que não for autoclavável, deve ser imerso completamente em cuba com solução de ácido cítrico 0,2% ou de hipoclorito de sódio 0,5% durante no mínimo 60 minutos. Após esse período, conforme o material, pode ser descartado ou reutilizado após devida higienização;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.6.10. Retenção de itens de ensaio

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas por dois analistas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

QUADRO 1: Sugestão de oligonucleotídeos para RT-PCR hemi-nested panlyssavirus convencional e RT-PCR panlyssavirus em tempo real para detecção molecular do vírus da raiva

Oligonucleotídeo	Tipo de PCR	Sequência	Referência
JW12	hnRT-PCR	5'atgtaacaccyctacaatg3'	Heaton.,1997
JW6UNI	hnRT-PCR	5'cartvgcrcacatytrtg3'	Heaton, 1997
JW10UNI	hnRT-PCR	5'gtcatyarwgtrtgrtgytc3'	Heaton, 1997
N165-146	hnRT-PCR	5'gcagggtaytrtactcata3'	Freuling, 2014
BatRat Beta-actin intronic	RT-PCR	5'cgatgaagatcaagatcattg3'	Freuling., 2014
BatRat Beta-actin reverse	RT-PCR	5'aagcatttgcggtggac3'	Freuling, 2014

Referências Bibliográficas

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Técnico de controle da raiva dos herbívoros – MAPA, 2009

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de procedimentos para diagnóstico das doenças do sistema nervoso central dos bovinos – MAPA, 2002

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual Veterinário de coleta e envio de amostras – MAPA/OPAS, 2010.

CLIQUET F., AUBERT M. & SAGNE L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods*, 212, 79–87.

FREULING C.M., HOFFMANN B., FISCHER M., MCELHINNEY L.M., MARSTON D.A., FOOKS A.R. & MÜLLER T.F. (2014). Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Demonstration of Lyssavirus Nucleic Acid. In: *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research, and Prevention*, Volume 1, Rupprecht C. 1 Nagarajan T., eds. Academic Press, Elsevier, San Diego, USA.

HEATON P.R., JOHNSTONE P., MCELHINNEY L.M., COWLEY R., O’SULLIVAN E. & WHITBY J.E. (1997). Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 2762–2766.

Rabies (infection with rabies virus). CHAPTER 3.1.17. Version (NB: version adopted in May 2018). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão on line. Disponível em <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>. Acesso em 15 de ago. de 2021

ROBARDET E., PICARD-MEYER E., ANDRIEU S., SERVAT A. & CLIQUET F. (2011). International interlaboratory trials on rabies diagnosis: an overview of results and variation in reference diagnosis techniques (fluorescent antibody test, rabies tissue culture infection test, mouse inoculation test) and molecular biology techniques. *J. Virol. Methods*, 177, 15–25.

RUDD R.J. & TRIMACHI C.V. (1989). Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 2522–2528.

ANEXO 1

1. Acetona 80%

- a) Reagentes: Acetona PA e Água desmineralizada;
- b) Preparo: Em um becker de 1000mL, colocar 800mL de acetona PA e 200mL água desmineralizada; Misturar a solução com um bastão de vidro;
- c) Armazenamento: 2°C a 8°C;

2. Glicerina 50%

- a) Reagentes: Glicerina e Solução Salina Tamponada Ph 7,6;
- b) Preparo: Diluir a Glicerina junto a Solução Salina Tamponada em partes iguais e misturar até a completa homogeinização;
- c) Armazenamento: Temperatura Ambiente;

3. Glicerina tamponada 10%

- a) Reagentes: Glicerina PA e solução de salima tamponada;
- b) Preparo: Diluir 10 ml de Glicerina PA em 90 ml de Solução Salina Tamponada
- c) Armazenamento: Temperatura Ambiente;

4. Hipoclorito de Sódio 0,5%

- a) Reagentes: Hipoclorito e Água desmineralizada;
- b) Preparo: Diluir 5 mL de hipoclorito em 1000 mL de água desmineralizada (q.s.p.);
- c) Armazenamento: Temperatura Ambiente;

5. Solução Salina 0,85%

- a) Reagentes: NaCl e Água Destilada;
- b) Preparo: Adicionar 8,5 g de NaCl em 800 ml de água destilada. Diluir esta solução com um bastão magnético. Após a completa diluição completa-se o volume até 1000 ml com água destilada;
- c) Armazenamento: 2 a 8°C;

6. Solução Salina Tamponada Fosfatada PH 7,6

- a) Reagentes: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl e H_2O destilada.
- b) Preparo: Para 1000 ml de SST dissolver os sais em uma parte de água destilada, adicionar os sais na quantidade de 2,65g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,36g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 8,17g de NaCl e após dissolução, completar o volume final de 1000 ml no recipiente com água destilada.
- c) Armazenamento: 2°C a 8°C

CAPÍTULO 2.6.4 BRUCELOSE

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da Brucelose:

1.1. Diagnóstico indireto

- a) Soro sanguíneo

1.2 Identificação do agente

- a) Linfonodos
- b) Leite
- c) Colostro
- d) Suabe vaginal
- e) Carúnculas uterinas
- f) Conteúdo estomacal fetal
- g) Suabe retal fetal
- h) Conteúdo seroso de bursites cervicais
- i) Baço
- j) Fígado
- k) Glândula mamária
- l) Ligamento cervical (bolsa burstica)

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

a) Para atendimento aos Programas e Controle Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

b) As amostras deverão ser encaminhadas ao laboratório, individualmente separadas por matriz, e obedecendo a critérios de biossegurança.

c) A manipulação das amostras para isolamento de *Brucella* deverá ser realizada em nível de biossegurança 3.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

a) Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

b) Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

c) O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos;

- I. Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente;
- II. Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

d) Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios de interpretação dos resultados;

e) O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

f) Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas críticas realizadas para cada amostra analisada;

g) Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos e equipamentos utilizados, e outras informações pertinentes à rastreabilidade da análise devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

3.2. Teste de polarização fluorescente

a) Materiais

- I. Luvas para procedimentos
- II. Vidraria necessária para a realização do teste
- III. Ponteiras descartáveis
- IV. Descartador de ponteiras
- V. Reservatórios para soluções (cubas para descarte de soluções ou equivalentes)
- VI. Caneta para identificação de vidraria

b) Equipamentos e instrumentos

- I. Geladeira
- II. Termômetros
- III. Micropipetas monocanal de volumes reguláveis
- IV. Pipetador automático ou manual
- V. Cronômetros
- VI. Agitador de tubos tipo vórtex (opcional)
- VII. Leitor de luz polarizada

c) Insumos

- I. Kit de diagnóstico para Brucelose por polarização fluorescente
- II. Água destilada ou deionizada, conforme recomendação do fabricante do kit.

d) Soluções

No preparo das soluções devem ser utilizados somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados

e) Realização do ensaio

Para realização dos ensaios de polarização fluorescente devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote.

f) Critérios de aceitação do Ensaio

Devem ser obedecidos os critérios de aceitação para os resultados dos soros controles presentes na bula do fabricante do Kit.

g) Interpretação dos resultados

- I. Não Reagente: menos de 10 mP (milipolarização) acima da média dos controles negativo
- II. Inconclusivo: de 10 a 20 mP acima da média dos controles negativos
- III. Reagente: mais de 20 mP acima da média dos controles negativos

h) Emissão dos resultados

Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “REAGENTE”, “NÃO REAGENTE” ou “INCONCLUSIVO”, ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

i) Descarte de Amostras e Resíduos

- I. Anteriormente ao descarte de amostras e produtos de ensaio, deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.2 subitem j) Retenção de Itens de Ensaio.
- II. Anteriormente ao descarte de amostras e produtos de ensaio, deve ser realizado registro de descarte em formulário próprio e conferência.
- III. Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- IV. O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

j) Retenção de itens de ensaio

As amostras de soro poderão ser descartadas 60 dias após a emissão do relatório de ensaio.

3.3. Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT)

a) Materiais

- I. Luvas para procedimentos
- II. Placas de vidro quadriculadas
- III. Ponteiras descartáveis
- IV. Descartador de ponteiras

b) Equipamentos e instrumentos

- I. Geladeira
- II. Freezer
- III. Micropipetas monocanal de volumes reguláveis ou volume fixo de 30 µL
- IV. Caixa de leitura de luz indireta (Huddleson)

c) Insumos

Antígeno para a prova de AAT

d) Soluções

Não aplicável

e) Realização do ensaio

- I. A temperatura ambiente deve ser de $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$
- II. As placas e misturadores devem ser limpos com água e detergente, devendo ser reutilizados somente após estarem secos
- III. Deixar os soros e o antígeno à temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ por, pelo menos, 30 (trinta) minutos. Caso os soros estejam congelados, este período de equilíbrio à temperatura ambiente deve ser de uma hora ou até que o material descongele e atinja a temperatura de prova
- IV. Homogeneizar os soros e o antígeno antes de realizar o ensaio
- V. Dispensar 30 μL de antígeno em cada quadrado da placa de vidro
- VI. Dispensar 30 μL do soro a ser testado ao lado do antígeno, preferencialmente sem que os dois entrem em contato
- VII. Misturar, com movimentos circulares, o soro e o antígeno, de modo a obter um círculo de aproximadamente 2 cm de diâmetro.
- VIII. Agitar a placa com movimentos contínuos, por 4 minutos
- IX. Colocar a placa na caixa de leitura com luz indireta e proceder a leitura
- X. Em todas as provas a utilização de soros controle positivo e negativo é obrigatória

f) Critérios de aceitação do Ensaio

Os resultados só serão válidos se forem obtidos os resultados esperados para os controles de prova. Resultados positivos obtidos após os 4 minutos de prova não deverão ser considerados.

g) Interpretação dos resultados

- I. Amostra REAGENTE – serão caracterizadas pela presença de aglutinações
- II. Amostra NÃO REAGENTE – serão caracterizadas pela ausência de aglutinações

h) Emissão dos resultados

Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como “REAGENTE” ou “NÃO REAGENTE”.

i) Descarte de amostras e resíduos

- I. Anteriormente ao descarte de amostras e produtos de ensaio, deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.3 subitem j) Retenção de Itens de Ensaio.
- II. Anteriormente ao descarte de amostras e produtos de ensaio, deve ser realizado registro de descarte em formulário próprio e conferência.
- III. Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- IV. O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

j) Retenção de itens de ensaio

Amostras de soro poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio.

3.4. Teste por meio da técnica de Soroaglutinação Lenta em Tubos e Redução pelo 2 - Mercaptoetanol (SAL/2-ME)

a) Materiais

- I. Luvas para procedimentos
- II. Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis
- III. Provetas graduadas
- IV. Béqueres
- V. Erlenmeyers
- VI. Tubos de ensaio
- VII. Ponteiras descartáveis
- VIII. Descartador de ponteiras
- IX. Reservatórios para descarte de soluções (cubas)
- X. Papel absorvente
- XI. Caneta para identificação de vidraria
- XII. Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação

b) Equipamentos e instrumentos

- I. Capela de exaustão química
- II. Geladeira
- III. Freezer
- IV. Estufa
- V. Termômetros
- VI. Micropipetas monocanal de volumes reguláveis
- VII. Pipetador automático ou manual
- VIII. Agitador de tubos
- IX. Balança analítica
- X. Centrífuga refrigerada

c) Insumos

- I. 2-ME com 99% de pureza mínim
- II. Antígeno para prova de soroaglutinação lenta em tubos para o diagnóstico da brucelose (SAL/2-ME)

d) Soluções

- I. Salina 0,85 % sem adição de formol
- II. Salina a 0,85% contendo 0,5% de fenol (salina fenicada)

e) Disposições gerais

- I. A diluição do antígeno para a série de tubos com 2-ME deve ser realizada em solução salina a 0,85%, sem adição de fenol;
- II. Quando não indicado pelo fabricante, os antígenos diluídos devem ser conservados sob refrigeração (+4°C a +8°C), podendo ser utilizados por um período de até uma semana
- III. O 2-ME, com 99% de pureza mínima, deve ser mantido em frascos de cor âmbar, hermeticamente fechados, armazenado de acordo com a recomendação do fabricante, e

manipulado em capela de exaustão química

- IV. Em cada teste serão incluídos soros para controle de prova padronizado e com resultados conhecidos pelo laboratório. Devem ser observadas reações positivas e negativas no SAL e no 2-ME, assim como uma reação com título maior na SAL que no 2-ME

f) Realização do ensaio

- I. Permitir que a temperatura de todos os reagentes e amostras se equilibre com a do ambiente
- II. Diluir em tubos, o antígeno para Soroaglutinação Lenta (SAL) 100 (cem) vezes em solução salina a 0,85% contendo 0,5% de fenol. Concentração final 0,045%
- III. Diluir o antígeno para a prova de 2-ME em tubos 50 (cinquenta) vezes em solução salina 0,85% sem adição de fenol. Concentração final 0,090%
- IV. Preparar solução de 2-ME a 0,1M misturando-se 7,8 mL de 2-ME a 992,20 mL de solução salina a 0,85% sem fenol. Para volumes diferentes, utilizar a mesma proporção;
- V. Colocar, em uma estante, duas fileiras de quatro tubos de vidro de 13 mm X 75 mm, para cada amostra de soro a ser testada
- VI. Utilizando micropipetas, fazer diluições seriadas das amostras de soro a 1:200, 1:100, 1:50 e 1:25, distribuindo-se, nessa ordem, 10 µL, 20 µL, 40 µL e 80 µL de soro em cada fileira de tubo
- VII. Dispensar 1 mL de solução de 2-ME 0,1 mol/L diluído em solução salina nos quatro tubos para a prova de 2-ME
- VIII. Deixar esses tubos em repouso por, pelo menos, 15 (quinze) minutos em temperatura ambiente, para que o 2-ME lise as moléculas de IgM
- IX. Enquanto os tubos da prova de 2-ME estiverem em repouso, dispensar 2 mL do antígeno diluído 1:100 em salina fenicada nos quatro tubos para a prova de SAL
- X. Após os quinze minutos, dispensar 1 mL do antígeno diluído 1:50 em solução salina nos quatro tubos para a prova de 2-ME. A concentração final do antígeno na solução será de 0,045% e a do 2-ME de 0,05 mol/L
- XI. Misturar bem agitando a grade de tubos
- XII. Incubar a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 ± 3 horas
- XIII. Realizar a leitura da prova que é feita por meio de uma fonte de luz indireta contra um fundo escuro e opaco, com uma fonte de luz que atravesse os tubos. As fontes de luz estranhas devem ser reduzidas

g) Critérios de aceitação do Ensaio

- I. Os resultados só serão válidos se forem obtidos os resultados esperados para os controles de prova;
- II. Ocasionalmente, em amostras que apresentam título elevado, o tubo da diluição 1:25 pode estar um pouco turvo na prova do 2-ME, ainda que os tubos subsequentes estejam claros. Isto não deve ser considerado como resultado negativo do teste.

h) Interpretação dos resultados

- I. As interpretações baseiam-se no grau de turvação dos tubos e na firmeza dos grumos (aglutinação do antígeno), após agitação suave dos tubos.
- II. O resultado de cada amostra será determinado pelo título sorológico encontrado nas provas de SAL e 2-ME. Esse título será correspondente ao inverso da maior diluição em que se observa reação de aglutinação.
- III. O grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições deve ser classificado como: completo

(+), incompleto (I) ou negativo (-):

- i) Reação completa: é aquela em que o líquido da mistura soro/antígeno aparece translúcido, e a agitação suave não rompe os grumos;
- ii) Reação incompleta: é aquela em que a mistura soro/antígeno aparece parcialmente translúcida, e uma suave agitação não rompe os grumos;
- iii) Reação negativa: é aquela em que a mistura soro/antígeno aparece opaca ou turva, e uma agitação suave não revela grumos;

IV. A interpretação dos resultados da prova é realizada segundo os QUADROS 1 e 2.

QUADRO 1: interpretação da prova do 2-ME para fêmeas com idade igual ou superior a 24 (vinte e quatro) meses e vacinadas entre 3 (três) e 8 (oito) meses de idade.

2-ME SAL	NR	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200
NR	-								
25 I	-	-							
25	-	-	+						
50 I	-	-	+	+					
50	-	-	+	+	+				
100 I	-	-	+	+	+	+			
100	Inc	Inc	+	+	+	+	+		
200 I	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	
200	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	+

(+): positivo; (-): negativo; SAL: Soroaglutinação Lenta; 2 ME: Teste do 2-Mercaptoetanol; NR: não reagente; I: Reação incompleta; Inc: reação inconclusiva; Área hachurada: Combinação teoricamente não esperada.

Fonte: BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (2006).

QUADRO 2: interpretação da prova do 2-ME para fêmeas não vacinadas ou vacinadas com a vacina RB51 e machos com idade superior a 8 (oito) meses.

2-ME SAL	NR	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200
NR	-								
25 I	-	-							
25	-	-	+						
50 I	-	-	+	+					
50	Inc	Inc	+	+	+				
100 I	Inc	Inc	+	+	+	+			
100	Inc	Inc	+	+	+	+	+		
200 I	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	
200	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	+

(+): positivo; (-): negativo; SAL: soroaglutinação Lenta; 2 ME: Teste do 2-Mercaptoetanol; NR: não reagente; I: reação incompleta; Inc: reação inconclusiva; Área hachurada: combinação não esperada teoricamente.

Fonte: BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (2006).

i) Emissão dos resultados

Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “título (completo ou incompleto)”.

j) Descarte de Amostras e Resíduos

- I. Anteriormente ao descarte de amostras e produtos de ensaio, deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.4. subitem k) Retenção de Itens de Ensaio.
- II. Anteriormente ao descarte de amostras e produtos de ensaio, deve ser realizado registro de descarte em formulário próprio e conferência.
- III. Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos.
- IV. O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

k) Retenção de itens de ensaio

Amostras de soro poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio.

3.5. Teste do Anel do Leite (TAL)

a) Materiais

- I. Luvas para procedimentos
- II. Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis
- III. Tubos de ensaio
- IV. Ponteiras descartáveis
- V. Descartador de ponteiras
- VI. Caneta para identificação de vidraria
- VII. Cubas para descarte de materiais

b) Equipamentos e instrumentos

- I. Geladeira
- II. Estufa ou banho-maria
- III. Termômetros
- IV. Micropipetas monocanal de volumes reguláveis, ou de volumes fixos de 30 µL e 1000 µL
- V. Pipetador automático ou manual
- VI. Cronômetros
- VII. Agitador de tubos tipo vórtex (opcional)

c) Insumos

Antígeno para a prova de TAL

d) Soluções

Não aplicável

e) Disposições gerais

- I. As amostras de leite devem ser mantidas entre 2°C e 8°C por pelo menos 24 horas antes da realização do TAL.
- II. Amostras que foram congeladas ou pasteurizadas não podem ser utilizadas.

f) Realização do ensaio

- I. Deixar as amostras de leite e o antígeno à temperatura de 22°C ± 4°C por, aproximadamente, 60 (sessenta) minutos, ou até que as temperaturas do leite e do antígeno se equilibrem com a temperatura ambiente
- II. Homogeneizar as amostras e dispensar 1 mL em tubos de 10 mm x 100 mm, 10 mm x 75 mm ou equivalentes, de modo que a coluna de leite tenha, aproximadamente, 2 cm de altura. A quantidade de leite a ser utilizada no teste deve ser aumentada de acordo com o descrito no QUADRO 3;
- III. Adicionar 30 µL de antígeno ao leite, tampar o tubo e homogeneizar até obter uma mistura homogênea do antígeno no leite
- IV. Incubar por 1 hora a 37°C ± 2°C e proceder à leitura

QUADRO 3. Quantidade de leite a ser utilizada no teste (TAL)

Nº de animais	Volume de leite (em mL)
Até 150	1
151 a 450	2
451 a 700	3
Acima de 700	Dividir em lotes menores

Fonte: BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (2006)

g) Critérios de aceitação do Ensaio

De acordo com os resultados dos controles de prova:

- I. Reagente: anel de gordura com coloração azulada igual ou maior que a coluna de leite;
- II. Não Reagente: coluna de leite com coloração azulada mais intensa que o anel de gordura;

h) Interpretação dos resultados

- I. Amostra REAGENTE: anel de gordura com coloração azulada igual ou maior que a coluna de leite azulada;
- II. Amostra NÃO REAGENTE: coluna de leite com coloração azulada mais intensa que o anel de gordura.

i) Emissão dos resultados

Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “reagente”, “não reagente”, ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

j) Descarte de Amostras e Resíduos

- I. Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos.
- II. O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

k) Retenção de itens de ensaio

Descartar das amostras após a realização do ensaio.

3.6. Teste de Fixação do Complemento (FC)

3.6.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos
- b) Vidraria necessária para a realização da prova
- c) Ponteiras descartáveis
- d) Descartador de ponteiras
- e) Papel milimetrado (log/log ou log/probability) – opcional
- f) Papel milimetrado
- g) Caneta para identificação de vidraria
- h) Cubas para descarte de materiais

3.6.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Geladeira
- b) Estufa
- c) Termômetros
- d) Micropipetas monocanal e multicanal para 25 µL
- e) Pipetador automático ou manual
- f) Cronômetros
- g) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional)
- h) Agitador de microplacas
- i) Espelho para leitura de microplacas (opcional)

3.6.3. Insumos

- a) Antígeno para diagnóstico da brucelose pela prova de soroaglutinação lenta (Ag)
- b) Controle Positivo Baixo (CL)
- c) Controle Negativo (CN)
- d) Padrão de Cianometahemoglobina (CMH)
- e) Hemácia de Carneiro
- f) Complemento de cobaio
- g) Hemolisina (procedência: coelho)

3.6.4. Soluções

- a) Solução de Alséver ou ACD
- b) Solução de Drabkin (SD)
- c) Tampão Veronal (1X) ou Trietanolamina
- d) Suspensão de eritrócitos
- e) Tampão Veronal 5X (20,3g de MgCl₂, 3,32g de CaCl₂, 340g de NaCl, 15g de Barbiturato de sódio, 23g de Barbital e 8000 mL de água destilada)

3.6.5. Realização do ensaio

a) Tratamento das amostras do ensaio e soros controle

- I. Inativar as amostras que serão analisadas no ensaio e os soros controle, em banho-maria por 30 minutos, a temperatura de $58^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para amostras de soro bovino e $62,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ para amostras de soro bubalino
 - i) Após o período de inativação, se as amostras forem imediatamente testadas podem ser mantidas à temperatura ambiente ou à temperatura de refrigeração (2°C a 8°C)
 - ii) As amostras inativadas podem permanecer sob refrigeração (2° a 8°C) por no máximo 24h. Após este período devem ser congeladas em temperatura máxima de -20°C ;
- II. As amostras do ensaio e soros controle devem ser diluídos em Solução de Trabalho que consiste em 100 mL de tampão veronal 5x concentrado, 395 mL de água destilada, e 5mL de gelatina solúvel 10%, na proporção de 1:10.
- III. Manter, preferencialmente, os reagentes em banho de gelo durante os procedimentos de titulação e execução do ensaio;
- IV. A solução de complemento e o complemento deverão ser mantidos em banho de gelo durante todo período de ensaio ou titulação.

b) Determinação da densidade óptica (DO) alvo

I. Método da cianometahemoglobina

- i) Neste método, a Hb é convertida em cianometahemoglobina (mais estável), por diluição em RC resultando em um padrão que é utilizado para ajustar o volume celular da suspensão de eritrócitos.
- ii) Para uma suspensão de eritrócitos a 3%, diluída 1:16, tem-se 60 mg de Hb/dL.

II. Cálculo do fator de calibração

- i) Preparar uma solução padrão de hemoglobina (Hb) contendo 60 mg/dL em 5 mL de RC
- ii) Homogeneizar e aguardar 5 minutos
- iii) Ler a densidade óptica (DO), em 540 nm, usando RC como branco em aparelho espectrofotômetro. A leitura corresponde à DO alvo.

c) Lavagem da suspensão de eritrócitos

- I. Coletar aproximadamente 50 mL de sangue de carneiro em 12,5 mL de solução de ACD ou volume correspondente (50 mL) de Alsever.
- II. Armazenar o sangue coletado por uma semana sob refrigeração (2°C a 8°C). Descartar caso apresente sinais de contaminação ou hemólise excessiva.
- III. Filtrar volume de suspensão de eritrócitos suficiente para a realização das provas. Sugere-se 5 mL a 10 mL, conservados em ACD ou Alsever, em um filtro delgado de gaze e algodão, para um tubo cônico de centrífuga de 50 mL;
- IV. Adicionar volume proporcional de tampão de uso perfazendo uma diluição final de 1:5 (aproximadamente 40 mL);
- V. Sedimentar os eritrócitos por centrifugação. Sugere-se centrifugar a $1500 \times g$ por 10 minutos.
- VI. Descartar o sobrenadante e retirar a fina camada de células brancas que se deposita sobre os eritrócitos sedimentados;
- VII. Repetir o processo de lavagem 2 vezes;
- VIII. Descartar o sobrenadante;
- IX. Ressuspender o volume de eritrócitos obtido, em volume 25 vezes maior de tampão de uso, afim de produzir uma suspensão a aproximadamente 4%. Exemplo de cálculo no QUADRO 4.

QUADRO 4. Exemplo de cálculo de suspensão a 4% para volume celular obtido de 3,5 mL

1 mL de ER ----- 25 mL de tampão de uso
3,5 mL de ER obtido ----- X mL de tampão de uso
X = 87,5 mL.

Fonte: LFDA-MG

d) Padronização da suspensão de eritrócitos a 3% volume celular (vc)

- I. Romper 0,5 mL da suspensão de eritrócitos preparada anteriormente em 7,5 mL de RC, obtendo-se uma solução final 1:16;
- II. Ler a DO em 540 nm usando RC como branco;
- III. Calcular a porcentagem de eritrócitos presente nesta suspensão considerando que a DO alvo possui 3% de eritrócitos;
- IV. Se necessário, ajustar o volume final adicionando ou retirando tampão de uso da suspensão quando ela apresentar volume celular maior ou menor que 3%, respectivamente, de acordo com a fórmula;
- V. Romper 0,5 mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3% de células em 7,5 mL de RC (1:16);
- VI. Ler a DO em 540 nm, usando RC como branco;
- VII. Calcular a porcentagem de eritrócitos presente nesta suspensão considerando que a DO alvo possui 3% de eritrócitos.
- VIII. Caso os valores não sejam correspondentes, repetir os procedimentos até obter uma suspensão a 3% vc.
- IX. Esta é a DO a ser utilizada na rotina (100% de hemólise).
- X. A suspensão de eritrócitos padronizada, se estocada sob refrigeração, poderá ser usada por até 72 horas após preparo, desde que não haja evidência de lise.

e) Titulação da HL

- I. Titular a HL a cada novo lote;
- II. Preparar uma suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc;
- III. Preparar uma diluição inicial de HL 1:10 para um volume final de 3 mL;
- IV. Preparar 10 mL de uma solução de HL 1:100 (1 mL de HL 1:10 + 9 mL de tampão de uso). Pode-se diluir a HL 1:100 em alíquotas e estocá-las congeladas;
- V. Escolher 9 diluições da HL de acordo com o QUADRO 5. As diluições indicadas são apenas sugestões e podem variar de acordo com a atividade do lote de HL utilizado;
- VI. Identificar uma série de 9 tubos com as diferentes diluições de HL que serão utilizadas;
- VII. Colocar 1 mL de eritrócitos (ER) padronizados a 3 % em cada um dos tubos;
- VIII. Adicionar 1 mL de cada diluição de HL no respectivo tubo, formando o SH;
- IX. Homogeneizar os tubos e incubá-los em banho-maria a 37 °C ± 2 °C por 15 minutos, com agitação a cada 5 minutos;
- X. Preparar uma diluição inicial de C' 1:10 para um volume final de 3 mL (300 µL de C' + 2,7 mL de tampão de uso);
- XI. Escolher 3 diluições do C' de acordo com o QUADRO 6. As diluições indicadas são apenas sugestões e podem variar de acordo com a atividade do lote de C' utilizado.
- XII. Preparar 3 séries de tubos correspondentes às diluições do complemento que serão utilizadas, de modo que este produza 70 % a 80 % de hemólise com a diluição de HL mais concentrada;

- XIII. Identificar os tubos de cada série de acordo com as diluições de HL e C' utilizadas;
- XIV. Adicionar 1 mL de tampão de uso e 0,5 mL de cada C' diluído;
- XV. Transferir 0,5 mL do sistema hemolítico (SH) de cada diluição da HL para cada tubo das 3 séries contendo C' e tampão de uso, e homogeneizar;
- XVI. Incubar em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, com agitação aos 15 minutos;
- XVII. Retirar os tubos do banho-maria e adicionar 2 mL de tampão de uso gelado, a temperatura de $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ em cada um deles para ajustar o volume para leitura no espectrofotômetro;
- XVIII. Centrifugar a aproximadamente $1.500 \times g$ por 10 minutos, para depositar qualquer eritrócito remanescente não lisado;
- XIX. Determinar a absorvância de cada um dos tubos no comprimento de onda de 540 nm, utilizando água destilada como branco;
- XX. Calcular a porcentagem de hemólise em cada tubo comparando os resultados obtidos acima com o tubo contendo 100 % de hemólise;
- XXI. Usar como valor de 100 % de hemólise a DO da solução obtida lisando 0,5 mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc em 7,5 mL de água destilada;
- XXII. Plotar a porcentagem de hemólise x diluição da hemolisina em papel milimetrado com escala aritmética;
- XXIII. Para calibrar a abscissa, medir uma distância arbitrária (por exemplo, 20 cm), com divisões em escala de 10, a partir da extremidade esquerda e colocar aí um ponto representando a diluição de HL 1:500. Isso forma a extremidade final direita da abscissa. As distâncias representando as outras diluições são calculadas dividindo 500 pela diluição recíproca e multiplicando o resultado pelo comprimento da abscissa (no caso, 20 cm). A porcentagem de hemólise é marcada linearmente ao longo da ordenada, com a distância entre os pontos de 1 cm;
- XXIV. Ligar os pontos do gráfico ignorando os *outliers*;
- XXV. Determinar o ponto do gráfico no qual se inicia o platô;
- XXVI. Interpretação dos resultados
 - i) Os resultados da titulação serão considerados satisfatórios se o referido platô estiver entre 30 % e 80 % de hemólise;
 - ii) Para os testes, usar uma diluição acima do ponto onde se inicia o platô ou, no mínimo, 25% mais concentrada que a diluição supracitada;
 - iii) A quantidade de HL utilizada no teste não é crítica, ao contrário da quantidade de amostra. Um excesso de HL não afeta a sensibilidade do teste significativamente. Diluições muito baixas de HL, podem provocar aglutinação dos eritrócitos.

QUADRO 5. Diluições da HL

Diluições da HL	HL 1:10 (mL)	HL 1:100 (mL)	HL 1:1.000 (mL)	Tampão de uso (mL)	Volume final (mL)
1:100	1,0	-----	-----	9,0	10,0
1:250	-----	1,2	-----	1,8	3,0
1:300	-----	1,0	-----	2,0	3,0
1:500	-----	1,0	-----	4,0	5,0
1:750	-----	1,5	-----	3,5	5,0
1:1.000	-----	1,0	-----	9,0	10,0
1:1.500	-----	0,2	-----	2,8	3,0
1:2.000	-----	-----	1,0	1,0	2,0
1:3.000	-----	-----	1,0	2,0	3,0
1:5.000	-----	-----	1,0	4,0	5,0
1:10.000	-----	-----	1,0	9,0	10,0

Fonte: LFDA/MG, adaptado de Alton et al. (1988)

QUADRO 6. Diluições do C' para titulação da HL

Diluições do C'	C' 1:10 (µL)	Tampão de uso (mL)	Volume final (mL)
1:150	400	5,60	6,0
1:200	300	5,70	6,0
1:250	240	5,76	6,0
1:300	200	5,80	6,0
1:350	171	5,83	6,0
1:400	150	5,85	6,0

Fonte: LFDA/MG, adaptado de Alton et al. (1988)

f) Sensibilização dos eritrócitos

- I. Preparar uma suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc;
- II. Diluir a HL de acordo com o título encontrado para a prova;
- III. Misturar partes iguais desses dois componentes;
- IV. Incubar em banho-maria a 37 °C ± 2 °C por 15 minutos, com agitação a cada 5 minutos.

g) Titulação do Complemento (C')

- I. Titular o C' a cada novo lote ou quando houver suspeita de degradação do mesmo;
- II. Preparar uma suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc;
- III. Diluir a HL, de acordo com o título encontrado para a prova, em um volume final de 5 mL e sensibilizar os eritrócitos;
- IV. Preparar uma diluição inicial de C' 1:10 para um volume final de 2 mL;
- V. Escolher 3 diluições do C' de acordo com o QUADRO 9 (As diluições indicadas são apenas sugestões e podem variar de acordo com a atividade do lote de C' utilizado);
- VI. Identificar três séries de tubos, sendo uma série para cada diluição do C'. Cada série deverá conter 6 tubos identificados com os volumes de C' a seguir: 0,3 mL; 0,4 mL; 0,5 mL; 0,6 mL; 0,7 mL e 0,8 mL;

- VII. Distribuir e incubar os reagentes de acordo com o QUADRO 10;
- VIII. Após incubação final, adicionar 2 mL de tampão de uso gelado, entre 2 °C e 8 °C, em cada tubo e centrifugar a 1500 x g por 10 minutos para deposição de qualquer eritrócito não lisado;
- IX. Determinar a absorbância de cada um dos tubos no comprimento de onda de 540 nm, utilizando água destilada como branco;
- X. Calcular a porcentagem de hemólise em cada tubo comparando os resultados obtidos com o tubo contendo 100 % de hemólise;
- XI. Usar como valor de 100 % de hemólise a DO da solução obtida lisando 0,5 mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc em 7,5 mL de água destilada;
- XII. Caso seja utilizado papel milimetrado com escala dilog, determinar o índice de hemólise (IH) através da fórmula descrita no QUADRO 7:

QUADRO 7. Determinação do índice de hemólise

$$IH = \% \text{ de hemólise do tubo} / (100 - \% \text{ de hemólise do tubo})$$

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

- XIII. Plotar o volume de C' (ordenadas) x % de hemólise (abscissas) em papel milimetrado log x probability ou o volume de C' (ordenadas) x IH (abscissas) em papel milimetrado dilog;
- XIV. Considerar somente os tubos que apresentarem valores entre 10 % e 90 % de hemólise;
- XV. O gráfico será válido quando dois pontos estiverem à esquerda do valor correspondente a 50 % de hemólise e dois pontos à direita deste valor;
- XVI. Determinar os pontos médios entre os dois valores acima de 50 % de hemólise e os dois valores abaixo. Uni-los em uma linha reta;
- XVII. Traçar uma reta perpendicular ao eixo das abscissas ligando os pontos 50 % de hemólise (abscissas) e o gráfico obtido acima;
- XVIII. Determinar o valor correspondente a este ponto nas ordenadas. Este é o volume 1 C'H50 (volume de C' diluído capaz de lisar 50 % de eritrócitos sensibilizados);
- XIX. Determinar a diluição de uso (DU) do complemento através da fórmula descrita no QUADRO 8.

QUADRO 8. Determinação da diluição de uso (DU) do complemento

$$DU = (0,5 \times \text{diluição utilizada na titulação}) / 5CH50 \text{ da Titulação}$$

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

- XX. Determinar a inclinação da reta (tangente do ângulo ou coeficiente angular da reta) encontrada na titulação do complemento. A partir de qualquer ponto próximo a extremidade esquerda do gráfico, traçar uma reta de 10 cm de comprimento paralela às abscissas. Medir a distância, em mm, entre esta e o gráfico;
- i) Quando se utilizar papel log x probability este valor deve corresponder a 44 mm ± 20 % e, para papel dilog o valor encontrado deve ser de 20 mm ± 10 %;
 - ii) Valores de inclinação fora dos limites estabelecidos não interferem nos testes diagnósticos, no entanto, obtém-se maior reprodutibilidade e repetitividade de resultados quando os critérios acima citados forem atendidos.

QUADRO 9. Diluições do Complemento (C')

Diluições do C'	C' 1:10 (µL)	Tampão de uso (mL)	Volume final (mL)
1:150	400	5,60	6,0
1:200	300	5,70	6,0
1:250	240	5,76	6,0
1:300	200	5,80	6,0
1:350	171	5,83	6,0
1:400	150	5,85	6,0
1:450	133	5,86	6,0

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

QUADRO 10. Diluições dos reagentes para titulação do C'

Reagentes (mL)	Tubos					
	01	02	03	04	05	06
C' diluído	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
Tampão de uso	1,2	1,1	1,0	0,9	0,8	0,7

* Incubar em banho-maria a 37 °C + 2 °C / 30 minutos; ** Incubar em banho-maria a 37 °C + 2 °C / 30 minutos com agitação aos 15 minutos.

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

h) Titulação do Ag

- I. Realizar a titulação em microvolumes, em placas de microtitulação com 96 orifícios;
- II. Titular o antígeno sempre que um novo lote for utilizado;
- III. Escolher um soro de título baixo a moderado (de preferência entre 1:50 e 1:100 nas provas de aglutinação, ou 1:16 a 1:32) e diluí-lo a 1:2 (300 µL de soro + 300 µL de tampão de uso);
- IV. Inativá-lo em banho-maria a 58 °C ± 2 °C por 30 minutos;
- V. Preparar uma suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc;
- VI. Diluir a HL de acordo com o título encontrado para a prova, em um volume final de 3 mL e sensibilizar os eritrócitos;
- VII. Preparar as diluições do antígeno para SAL de acordo com o QUADRO 11;
- VIII. Preparar uma diluição do complemento 5 C'H₅₀, de acordo com o título recomendado para uso em prova e diluí-la para 2,5 C'H₅₀ e 1,25 C'H₅₀;
- IX. Recomenda-se preparar 3 mL da diluição 5 C'H₅₀ e 0,5 mL das demais;
- X. Distribuir 25 µL de tampão de uso em todas os orifícios, exceto nos sombreados, de acordo com o QUADRO 12;
- XI. Colocar 25 µL de soro inativado e diluído a 1:2 nas colunas 01 e 02, da linha A até a H;
- XII. Com pipetador multicanal, diluir o soro em diluições duplas a partir da coluna 02 até a coluna 07, nas linhas A até G, desprezando os 25 µL restantes. A linha H deverá conter apenas as diluições 1:2 e 1:4. Desprezar os 25 µL restantes do orifício 2H;
- XIII. As colunas 10, 11 e 12 recebem mais 25 µL de tampão de uso, em lugar do soro, para detectar atividade anticomplementar do Ag;
- XIV. Colocar 25 µL de antígeno, nas respectivas diluições, nas linhas A até G, nas colunas 01 até 07 e 10 a 12.
- XV. Os dois primeiros orifícios da linha H recebem mais 25 µL de tampão de uso, em lugar do antígeno, para detectar atividade anticomplementar do soro;
- XVI. Colocar 25 µL de C' contendo 5 C'H₅₀ em todas os orifícios contendo soro e, também, na coluna 10, da linha A até a linha G, para controle anticomplementar do Ag;

- XVII. Colocar 25 µL de C' contendo 2,5 C'H₅₀ e 1,25 C'H₅₀ nas colunas 11 e 12, respectivamente, da linha A até a linha G;
- XVIII. Agitar a placa por um minuto e incubá-la tampada, a 37 °C ± 2 °C por 30 minutos;
- XIX. Preparar padrões de cor com 0 %, 25 %, 50 %, 75 % e 100 % de hemólise e distribuir 100 µL de cada um na coluna 08;
- XX. Adicionar 25 µL de eritrócitos sensibilizados em todos os orifícios, exceto os da coluna 08. Agitar a placa por um minuto e incubá-la, tampada, a 37 °C ± 2 °C por 30 minutos com agitação aos 15 minutos;
- XXI. Centrifugar a placa a no máximo 900 x g por 10 minutos;
- XXII. Fazer a leitura observando o grau de hemólise de cada cavidade;
- XXIII. Determinar a diluição do antígeno com a qual se obtém o maior título do soro. A diluição mais sensível do antígeno é aquela que produz um nível máximo de fixação do C' com o antissoro específico;
- XXIV. No teste, o antígeno é usado com o dobro da concentração ótima para reduzir a ocorrência de prozona;
- XXV. A diluição do antígeno escolhida deve mostrar 100 % de hemólise com 5 C'H₅₀ e 2,5 C'H₅₀ e, no mínimo, 50 % de hemólise com 1,25 C'H₅₀;
- XXVI. No controle anticomplementar do soro, os eritrócitos deverão estar completamente lisados.

QUADRO 11: Diluições do Ag

Diluições	Ag (µL)	Ag 1:100 (µL)	Tampão de uso (mL)	Volume final (mL)
1:100	100	-----	9,90	10,0
1:200	-----	1000	1,00	2,0
1:300	-----	600	1,40	2,0
1:400	-----	500	1,50	2,0
1:600	-----	500	2,50	3,0
1:800	-----	500	3,50	4,0
1:1.200	-----	300	3,70	4,0

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

QUADRO 12. Esquema de distribuição dos reagentes na placa de microtitulação

Linhas	Diluições do Ag	Colunas										
		01	02	03	04	05	06	07	08	10	11	12
		Diluições do soro							PC	CAC Ag / C'H ₅₀		
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	5,0	2,5		1,25		
A	1:100								00			
B	1:200								25			
C	1:300								50			
D	1:400								75			
E	1:600								100			
F	1:800											
G	1:1200											
H	CAC S											

CAC S: controle anticomplementar do soro; PC: padrões de cor; CAC Ag: controle anticomplementar do antígeno; Coluna 09: não é utilizada

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

i) Preparo dos padrões de cor (PC)

- I. Os padrões de cor simulam diferentes graus de hemólise. São usados como um modelo para comparação na leitura do teste;
- II. Preparar uma suspensão de eritrócitos (SE), contendo 0 % de hemólise, diluindo 1 mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % em 7 mL de tampão de uso;
- III. Preparar uma solução de hemoglobina (SH) 100 % de hemólise, rompendo 1 mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % em 5,6 mL em água destilada. Agitar até que todas as células sejam lisadas. Adicionar 1,4 mL de tampão veronal 5x concentrado para restabelecer a isotonicidade da solução. Não inverter a ordem da mistura de reagentes;
- IV. Preparar os demais padrões de hemólise misturando volumes proporcionais da SE com a SH como mostrado no QUADRO 13.

QUADRO 13. Preparo dos Padrões de Cor

Reagentes (mL)	Porcentagem de hemólise				
	00	25	50	75	100
ER 3 % vc	1,0	---	---	---	1,0
Água destilada	---	---	---	---	5,6
Tampão veronal 5x	---	---	---	---	1,4
Tampão de uso	7,0	---	---	---	---
SE	---	0,75	0,50	0,25	---
SH	---	0,25	0,50	0,75	---

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

j) Execução da prova de FC (microtécnica)

- I. Preparar uma suspensão de eritrócitos com 3 % de volume celular;
- II. Preparar uma solução de HL para a prova;
- III. Sensibilizar os eritrócitos;
- IV. Preparar uma solução de C' para a prova;
- V. Preparar uma suspensão de Ag para a prova;
- VI. Preparar PC (padrão de cor) com 0 %, 25 %, 50 %, 75 % e 100 % de hemólise;
- VII. Diluir as amostras de soro em teste a 1:2 (60 µL de soro + 60 µL de tampão de uso);
- VIII. Incubar as amostras de soro diluídas a 1:2 em banho-maria a 58 °C ± 2 °C por 30 minutos para inativar o complemento natural do soro e também as IgM (imunoglobulinas M);
- IX. Identificar a(s) placa(s) reservando a linha H para o controle anticomplementar do soro (CAC S) e a coluna 12 para os PC;
- X. Reservar duas colunas de uma das placas para os soros controles, sendo uma para o soro controle positivo (de título médio) e outra para o soro controle negativo;
- XI. Distribuir 25 µL de tampão de uso em todas os orifícios, exceto nos sombreados, de acordo com o QUADRO 14;
- XII. Distribuir 25 µL dos soros diluídos a 1:2 e inativados nos orifícios das linhas A, B e H das colunas 01 até 11, sendo que cada coluna corresponde a um soro;
- XIII. Na linha B, homogeneizar o soro e o tampão de uso com auxílio de um micropipetador multicanal e transferir 25 µL desta solução para a linha C. Repetir este procedimento até a linha G, diluindo o soro a 1:4 até a 1:128. Descartar os 25 µL restantes;
- XIV. Distribuir 25 µL de antígeno diluído em cada orifício das colunas 01 até 11, exceto na linha H;
- XV. Distribuir 25 µL de C' 5 C'H₅₀ em todos os orifícios das colunas 01 até 11;
- XVI. Agitar a placa por um minuto em agitador de microplaca;

- XVII. Incubar a placa tampada em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos;
- XVIII. Distribuir 25 μL de suspensão de eritrócitos sensibilizados (ES), em todos os orifícios das colunas 01 até 11, inclusive na linha H;
- XIX. Distribuir 100 μL de cada padrão de cor na coluna 12;
- XX. Agitar a placa por um minuto em agitador de microplaca;
- XXI. Incubar em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, com agitação aos 15 minutos;
- XXII. Centrifugar a microplaca a $900 \times g$ por 5 minutos;
- XXIII. Fazer a leitura observando o grau de hemólise, o tamanho e a espessura dos botões de eritrócitos em cada cavidade, comparando os resultados dos soros em teste com os padrões de cor da coluna 12 do QUADRO 14.

QUADRO 14. Esquema de distribuição dos reagentes na placa de microtitulação

Linhas	Diluições do Soro	Colunas											
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
		Amostras										PC	
A	1:2												00
B	1:4												25
C	1:8												50
D	1:16												75
E	1:32												100
F	1:64												
G	1:128												
H	CAC S												

CAC S: controle anticomplementar do soro; PC: padrões de cor.

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

k) Controles

I. Controle do C'

- i) Deve ser realizado em macrovolumes, em paralelo com a prova.
- ii) Distribuir 700 μL de tampão de uso em 04 tubos;
- iii) Distribuir 50 μL de C' 5 CH50 em cada um dos tubos;
- iv) Incubar em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos;
- v) Adicionar 250 μL da suspensão de ES em cada tubo;
- vi) Incubar em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, com agitação aos 15 minutos;
- vii) Adicionar 1 mL de tampão de uso gelado, a temperatura entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, em cada tubo e centrifugar a aproximadamente $1500 \times g$ por 10 minutos e determinar a DO em cada tubo;
- viii) Calcular a porcentagem de hemólise em cada tubo comparando os resultados obtidos com o tubo contendo 100 % de hemólise e determinar a média;
- ix) Usar como valor de 100 % de hemólise a DO da solução obtida lisando 0,5 mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc em 7,5 mL de água destilada;
- x) Calcular a absorbância média dos 04 tubos. O teste será considerado válido se o valor encontrado variar entre 25 % e 75 % de hemólise.

II. Controle de reagentes

- i) Poderá ser realizado alternativamente ao controle do C'. É realizado em microvolumes, juntamente com o teste.
- ii) Reservar a coluna 11 e o orifício 12 H para este controle;
- iii) Distribuir os reagentes e realizar a leitura conforme QUADRO 15.

QUADRO 15. Controle de reagentes

Orifício	Controle	Tampão de uso (µL)	Ag (µL)	C' (µL)	ES (µL)	ER (µL)	Resultados esperados	
11	A	5 CH ₅₀	25	25	25	25	---	0
	B	2,5 CH ₅₀	25	25	25	25	---	Traços
	C	1,25 CH ₅₀	25	25	25	25	---	+1 à +2
	D	5 CH ₅₀ + ES	50	---	25	25	---	0
	E	Ag + ES	50	25	---	25	---	+4
	F	5 CH ₅₀ + ER (1:2)	50	---	25	---	25	+4
	G	Ag + ER (1:2)	50	25	---	---	25	+4
	H	ER (1:2)	75	---	---	---	25	+4
12	H	ES	75	---	---	25	---	+4

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

f) Critérios de aceitação do Ensaio

- I. A prova será considerada válida se todos os controles derem os resultados esperados;
- II. Se um dos controles falhar e os demais derem os resultados esperados, deve-se realizar análise crítica dos resultados para julgar a validade ou não da prova;
- III. Se todo o C' fixou durante o primeiro estágio, não haverá hemólise e isso significa que o soro em teste contém Ac anti - brucela e, então, é positivo;
- IV. Se ocorrer lise dos eritrócitos significa que o C' não foi fixado no primeiro estágio, pois o soro teste não continha Ac anti - brucela e, então, é negativo;
- V. A interpretação dos resultados é baseada no percentual de hemólise dos eritrócitos sensibilizados, comparado ao padrão de cor;
- VI. O percentual de hemólise é baseado no tamanho do botão de hemácias, na cor do sobrenadante e na espessura do botão, nesta ordem de importância;
- VII. Orifícios com botões grandes têm menos hemólise e, então, maior escore. Se o sobrenadante de um orifício é escuro, mais hemólise ocorreu e o escore é menor. Se o botão é compacto, menos hemólise ocorreu e o escore é maior;
- VIII. No controle anticomplementar do soro, os eritrócitos deverão estar completamente lisados.

g) Interpretação dos resultados

- I. A prova será considerada válida se todos os controles apresentarem resultados esperados;
- II. Se um dos controles falhar e os demais apresentarem os resultados esperados pode ser realizada análise crítica dos resultados para julgar a validade ou não da prova;
- III. Se dois dos controles apresentarem resultados não esperados, invalidar e repetir a prova, após análise da causa dos fatos ocorridos;
- IV. Se todo o C' fixou durante o primeiro estágio, não haverá hemólise e isso significa que o soro em teste contém Ac anti - brucela e, então, é positivo;
- V. Se ocorrer lise dos eritrócitos significa que o C' não foi fixado no primeiro estágio, pois o soro teste não continha Ac anti - brucela e, então, é negativo;
- VI. A interpretação dos resultados é baseada no percentual de hemólise dos eritrócitos sensibilizados, comparado ao padrão de cor, conforme QUADRO 16.

QUADRO 16. Interpretação da prova de Fixação de Complemento (por poço)

% de Hemólise	% Fixação de Complemento	Resultado no Orifício	Escore
00	100	Reagente	+4
25	75	Reagente	+3
50	50	Reagente	+2
75	25	Reagente	+1
75 a 100	00 a 25	Não Reagente	T (traços)
100	00	Não Reagente	0

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

h) Emissão dos resultados

Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “REAGENTE”, “NÃO REAGENTE”, ou de acordo com o preconizado pelo fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

i) Descarte de Amostras e Resíduos

- I. Anteriormente ao descarte de amostras e produtos de ensaio, deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.6 subitem j) Retenção de Itens de Ensaio
- II. Anteriormente ao descarte de amostras e produtos de ensaio, deve ser realizado registro de descarte em formulário próprio e conferência.
- III. Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- IV. O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

j) Retenção de itens de ensaio

Soros sanguíneos poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio.

3.7 Isolamento

3.7.1 Materiais

- a) Alças bacteriológicas estéreis e descartáveis
- b) Bandejas de material resistente à autoclavação
- c) Caixa de leitura com luz indireta
- d) Cubetas de vidro
- e) Descartador para alças bacteriológicas e *suabes*
- f) Descartador de pipetas
- g) Lâminas para microscopia
- h) Papel filtro de 0,45 µm
- i) Pinças, tesouras e bisturis estéreis
- j) Pipetas graduadas de 5 mL e 10 mL
- k) Pipetas de transferência de 1 mL ou 2 mL
- l) Placas de Petri de aproximadamente 9,5 mm de diâmetro
- m) Sacos plásticos para homogeneizador tipo *Stomacher*

- n) Suabe estéril
- o) Tubos de ensaio de 13 mm x 75 mm e 18 mm x 180 mm
- p) Grades para tubos de ensaio

3.7.2 Equipamentos e instrumentos

- a) Banho-maria a 56 °C
- b) Cabine de Segurança Biológica (CSB), Classe A Tipo II (requisito mínimo)
- c) Centrífuga refrigerada
- d) Espectrofotômetro
- e) Estufa a 37 °C ± 2 °C
- f) Estufa a 37 °C ± 2 °C com 5% a 10% de CO₂;
- g) Macropipetadores
- h) Micropipetadores de volumes de 20 µL, 100 µL e 1000 µL
- i) Microscópio óptico
- j) Microscópio estereoscópico
- k) Homogeneizador tipo *Stomacher*
- l) Geladeira
- m) Autoclave

3.7.3 Insumos

- a) Água destilada
- b) Coloração de Lâminas pelo Método de Gram
- c) Produção de fagos Tb
- d) Meio SIM
- e) Ágar sangue de carneiro desfibrinado
- f) Ágar triptose
- g) Ágar uréia de Christensen
- h) Meio nitrato
- i) Caldo tioglicolato
- j) Meio de gelatina (12%) nutritivo para punção
- k) Ágar nutriente com extrato de levedura
- l) Ágar triptose com corantes (tionina, fucsina básica e safranina O);
- m) Ágar triptose com 5% de soro;
- n) Ágar triptose com suplemento seletivo Farrel e 5% de soro
- o) Fitas de acetato de chumbo
- p) Ágar triptose com Eritritol
- q) Ágar triptose com penicilina
- r) Ágar MacConkey
- s) N'N'N'N'Tetrametil-p-fenileno
- t) Etanol 95 °GL
- u) Reativo de Kovac's
- v) Ágar citrato de Simmon's
- w) Ágar vermelho de fenol com Glicose a 1%

3.7.4 Soluções

- a) Solução de cristal de violeta (bateria de GRAM)
- b) Solução de cristal violeta 1:40 para teste de dissociação
- c) Solução salina 0,5% peptonada a 1%
- d) Solução salina 0,85%
- e) Solução salina fenicada
- f) Solução de ácido sulfanílico 0,8% em ácido acético 5 mol/L
- g) Solução de alfa-naftilamina 0,5% em ácido acético 5 mol/L
- h) Solução de acriflavina 1:10.000
- i) Solução de safranina 0,25%
- j) Solução de lugol
- k) Álcool etílico 95 ° INPM

3.7.5 Realização do ensaio

3.7.5.1 Disposições gerais

- a) Todas as etapas deste ensaio deverão ser realizadas em CSB Classe A Tipo II (requisito mínimo) e atender as recomendações do nível 3 de Biossegurança.
- b) As amostras não devem ser congeladas e descongeladas repetidas vezes pelo risco de reduzir drasticamente a viabilidade das células bacterianas.
- c) Os testes para tipificação deverão ser feitos o quanto antes, após o isolamento inicial, pois algumas culturas são instáveis e podem tornar-se dissociadas ou inviáveis após vários repiques.

3.7.5.2 Isolamento de bactérias do gênero *Brucella*

a) Isolamento primário

As amostras deverão ser descongeladas sob refrigeração *overnight* ou em temperatura ambiente quando forem processadas no mesmo dia.

I. Meios de cultura e reagentes

- i) Ágar triptose com 5% de soro
- ii) Ágar triptose com 5% de soro e suplemento seletivo Farrel
- iii) Salina 0,85% ou
- iv) Salina 0,85% peptonada 1%

II. Leite

- i) Centrifugar entre 6.000 x *g* e 7.000 x *g* por 15 minutos, sob refrigeração;
- ii) Descartar a fase intermediária em um recipiente com solução desinfetante;
- iii) Misturar o sobrenadante e o depósito com um suabe estéril ou alça bacteriológica;
- iv) Estriar a mistura em placas com os meios de cultura citados acima;
- v) Incubar as placas invertidas a 37 °C ± 2 °C por até 14 dias em atmosfera contendo 5% a 10% de CO₂

III. Suabe vaginal, uterino ou retal

- i) Estriar o *suabe* diretamente em placas com os meios de cultura citados acima;
- ii) Incubar as placas invertidas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 14 dias em atmosfera contendo 5% a 10% de CO_2 .

IV. Tecidos sólidos

- i) Remover a gordura da amostra;
- ii) Cortar o tecido em pequenos pedaços de aproximadamente 2 cm, usando instrumental esterilizado;
- iii) Colocar os pedaços em um saco de *stomacher* e adicionar um volume de salina peptonada correspondente a aproximadamente duas vezes o volume do material;
- iv) Processar no *stomacher* durante 2 a 3 minutos;
- v) Inocular o material processado em, pelo menos, uma das placas contendo ágar triptose com 5 % de soro e ágar triptose com Farrel;
- vi) Incubar as placas invertidas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 14 dias em atmosfera contendo 5% a 10% de CO_2 .

V. Interpretação de resultados

- i) As colônias de brucela podem ser visualizadas na superfície do ágar a partir do 3^o ou 4^o dia de incubação. Eventualmente, podem ser identificadas após 48 horas de incubação;
- ii) São arredondadas, brilhantes, convexas, branco-pérola, com margens lisas e com 1 a 2 mm de diâmetro. Quando as placas são colocadas contra a luz, as colônias apresentam-se transparentes e com característica cor de mel;
- iii) No isolamento primário, as colônias podem apresentar uma forma atípica devido à distorção pelos glóbulos de gordura ou fragmentos de tecido deixados no meio;
- iv) Uma minuciosa procura nas placas deve ser feita, pois, frequentemente, pode aparecer apenas uma pequena colônia do microrganismo.

b) Isolamento secundário

- I. No caso de placa muito contaminada ou de colônias muito próximas, repicar as colônias características em placas contendo ágar triptose com 5% de soro e/ou ágar triptose com suplemento seletivo;
- II. Incubar as placas invertidas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 4 dias em atmosfera contendo 5% a 10% de CO_2 ;
- III. Verificar o crescimento diariamente, pois as colônias podem crescer antes deste período.

c) Seleção de colônias características

- I. Selecionar pelo menos 3 colônias características;
- II. Repicar as colônias em ágar triptose com 5 % de soro e incubá-las a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 4 dias em atmosfera contendo 5 % a 10 % de CO_2 para produção de massa bacteriana;
- III. Recolher a massa e ressuspender em aproximadamente 1 mL de salina estéril 0,85%;
- IV. Inativar em banho-maria à 65°C por 1 hora para serem enviadas à identificação por reação em cadeia da polimerase (PCR). Outra parte da massa bacteriana não inativada será recolhida e armazenada em freezer para posterior identificação bioquímica.

3.7.5.3 Características morfo-tintoriais (Gram)

3.7.5.3.1 Disposições gerais

- a) Utilizar lâminas limpas, secas e desengorduradas;
- b) Usar luvas para evitar contato direto da pele com os corantes;

- c) Em caso de fixação do material em chama, aquecer a lâmina somente até o ponto em que o calor seja suportável ao contato com a pele;
- d) Não colocar a lâmina diretamente sobre a chama;
- e) Evitar confecção de esfregaços muito espessos.

3.7.5.3.2 Realização do Ensaio

a) Preparo do esfregaço

I. Culturas em meio sólido

- i) Instilar uma gota de salina 0,85% sobre uma lâmina limpa, seca e desengordurada;
- ii) Com auxílio de uma alça bacteriológica, coletar uma pequena amostra do cultivo a ser examinado;
- iii) Misturar o cultivo com a salina e espalhar, com movimentos suaves, sobre a superfície da lâmina.

II. Culturas em meio líquido

- i) Coletar uma alçada do material a ser observado diretamente do cultivo;
- ii) Espalhar o cultivo, com movimentos suaves, sobre a superfície de uma lâmina limpa, seca e desengordurada.

b) Fixação e coloração

- I. Fixar o esfregaço sob luz ultravioleta por pelo menos 15 minutos ou fixá-lo pelo calor passando a lâmina 3 vezes através da chama;
- II. Corar o esfregaço com solução de cristal violeta por 1 minuto;
- III. Escorrer o excesso de corante e enxaguar, suavemente, em água corrente por 5 segundos;
- IV. Enxaguar a lâmina com solução de lugol e inundá-la com a mesma solução por 1 minuto;
- V. Escorrer o excesso de lugol e enxaguar, suavemente, em água corrente por 5 segundos;
- VI. Descorar o esfregaço com álcool etílico 95° INPM por 15 segundos a 30 segundos;
- VII. Enxaguar imediatamente em água corrente por 5 segundos;
- VIII. Contra-corar com solução de safranina por 1 minuto;
- IX. Lavar a lâmina suavemente em água corrente;
- X. Secar ao ar.

c) Leitura no microscópio óptico

- I. Limpar a objetiva do microscópio com um lenço de papel antes e após cada leitura;
- II. Instilar uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço já corado, sem deixar a ponta do conta-gotas encostar na lâmina;
- III. Observar ao microscópio com objetiva de imersão em aumento de 1000 X.

3.7.5.3.3 Interpretação de resultados

- a) Microrganismos Gram positivos: corados em azul;
- b) Microrganismos Gram negativos: corados em vermelho;
- c) Culturas muito velhas, muito novas e lâminas fixadas em calor excessivo podem fazer com que microrganismos Gram positivos se coram como Gram negativos;
- d) Mudanças na técnica sem a prévia validação podem causar alterações nos padrões de coloração dos microrganismos.

3.7.5.3.4 Descarte de resíduos

- a) O excesso dos corantes e a água de enxágue deverão ser recolhidos em uma cuba e, ao final da coloração, transferidos com o auxílio de um funil para um recipiente grande e com tampa, devidamente identificado e próprio para este fim;
- b) Quando este atingir no máximo 2/3 de sua capacidade, autoclavar a 121°C por 1 hora;
- c) Medir o volume do resíduo autoclavado com proveta;
- d) Transferir para Erlenmeyer ou balão de fundo chato e inserir uma barra magnética no recipiente;
- e) Adicionar 10 g de carvão ativado para cada litro de resíduo;
- f) Deixar sob agitação em agitador magnético por 10 minutos;
- g) Filtrar à vácuo em funil Buchner com papel filtro e Kitasato;
- h) Repetir o procedimento desde a adição de carvão vegetal até que o filtrado fique translúcido;
- i) Medir e ajustar o pH do filtrado com NaOH 4% até pH neutro. Descartar na rede de tratamento de esgoto;
- j) Secar o resíduo sólido (papel de filtro e carvão) em uma bandeja a temperatura ambiente e acondicionar em saco plástico.

3.7.5.4 Morfologia colonial – Dissociação

Esta prova deve ser realizada imediatamente depois do isolamento para evitar que os sucessivos subcultivos promovam o aparecimento de mutantes.

a) Meio de cultura e reagentes

- I. Ágar triptose
- II. Solução de cristal violeta 1:40
- III. Solução de acriflavina 1:10.000
- IV. Água destilada

b) Método

- I. A partir de um cultivo puro recente, fazer estrias em placas contendo ágar triptose de forma a se obter colônias isoladas;
- II. Incubar a 37 °C ± 2 °C por 2 a 3 dias;
- III. Observar a placa semeada ao microscópio estereoscópico para avaliar qualitativamente o grau de dissociação das colônias;
- IV. Inundar as placas com solução de cristal violeta diluída em água destilada 1:50, e aguardar 15 a 20 segundos;
- V. Desprezar o excesso de corante com o auxílio de uma pipeta em um recipiente de descarte contendo solução desinfetante;
- VI. Observar as placas contra a luz e ao microscópio estereoscópico;

c) Interpretação de resultados

I. Observação direta ao microscópio estereoscópico

- i) Colônias lisas: redondas, brilhantes e azuladas ou verde-azuladas;
- ii) Colônias rugosas: possuem aparência seca e granular e são amareladas ou branco amareladas;
- iii) Colônias mucóides: podem ser transparentes e acinzentadas, possuem consistência viscosa quando tocadas;
- iv) Colônias intermediárias: aparência intermediária entre lisa e rugosa. São fracamente opacas e mais granulares que as colônias lisas.

II. Observação após coloração com cristal violeta

- i) Colônias lisas: não são coradas;
- ii) Colônias rugosas: são coradas em diversos tons de vermelho e roxo e a superfície pode mostrar rachaduras radiais.

III. Teste de acriflavina

- i) Colocar em uma lâmina ou placa de Petri, uma gota de solução de acriflavina diluída a 1:10.000;
- ii) Com o auxílio de uma alça bacteriológica, depositar sobre a gota uma colônia tipicamente lisa para verificar se a solução de acriflavina está em boas condições (controle negativo);
- iii) Homogeneizar e observar ao microscópio estereoscópico;
- iv) Colônias lisas: permanecem em suspensão;
- v) Colônias rugosas: são aglutinadas imediatamente;
- vi) Colônias intermediárias: podem permanecer em suspensão ou pode ocorrer pequena aglutinação;
- vii) Colônias mucoides: formam-se pequenas linhas;
- viii) *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*: são lisas;
- ix) *B. ovis*, *B. canis* e RB51: são rugosas.

3.7.5.5 Características gerais

a) Hemólise

I. Meio de cultura e reagentes

- i) Ágar sangue de carneiro desfibrinado;
- ii) Controle positivo: *Staphylococcus aureus*;
- iii) Controle negativo: *Brucella* spp ou meio não inoculado.

II. Método

- i) Semear as placas com inóculo denso de um cultivo puro recente;
- ii) Incubar a 37 °C ±2 °C por 2 a 3 dias.

III. Interpretação de resultados

- i) Verificar a presença de hemólise, evidenciada pela formação de um halo transparente ao redor do crescimento microbiano;
- ii) Hemólise positiva: presença de halo;
- iii) Hemólise negativa: ausência de halo;
- iv) *Brucella* não produz hemólise.

b) Fermentação da lactose

I. Meios de cultura e reagentes

- i) Ágar MacConkey
- ii) Controle positivo: *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* ou *Enterobacter*
- iii) Controle negativo: *Brucella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Edwardsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* ou meio não inoculado.

II. Método

- i) Semear as placas com inóculo denso de um cultivo puro recente;

- ii) Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 a 3 dias. A incubação prolongada pode levar a resultados confusos.

III. Interpretação de resultados

- i) Fermentadores da lactose (Lac +): colônias cor de rosa ou vermelho tijolo e opacas, se o crescimento for denso; as colônias podem ser circundadas por zonas de bile precipitada (de cor vermelho claro) devido à ação do ácido (produzido pela fermentação da lactose e queda do pH), sobre os sais biliares com subsequente absorção do vermelho neutro.
- ii) Não fermentadores da lactose (Lac -): colônias pouco coloridas ou transparentes, observadas melhor contra a luz; se as colônias estiverem perto de colônias Lac +, algumas áreas de bile precipitada podem aparecer; *Brucella* não fermenta a lactose.
- iii) Fermentadores tardios da lactose: colônias pouco coloridas até 24h e colônias rosa - pálidas após 48h. Exemplo: *Citrobacter*, *Providencia*, *Serratia* e *Hafnia*.

c) Fermentação da glicose

I. Meio de cultura e reagentes

- i) Ágar vermelho de fenol com 1 % de glicose
- ii) Controle positivo: *Escherichia coli*
- iii) Controle negativo: *Brucella* spp ou meio sem inoculação

II. Método

- i) Semear o meio com inóculo denso de um cultivo puro recente;
- ii) Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 a 3 dias.

III. Interpretação de resultados

- i) Resultado positivo: meio ácido (pH 6,8) com cor amarela. Presença de gás nos tubos de Duhan;
- ii) Resultado positivo retardado: cor alaranjada. Voltar a incubar;
- iii) Resultado negativo: meio alcalino (pH 8,4) com cor rosa.

3.7.5.6 Provas bioquímicas

a) Prova da catalase

I. Reagentes

- i) Peróxido de hidrogênio a 30% (Deve ser conservado em frasco âmbar, e mantido sob refrigeração);
- ii) Controle positivo : *Brucella* spp ou *Staphylococcus aureus*;
- iii) Controle negativo: *Streptococcus* spp, *Clostridium sporogenes*, *Enterococcus* ssp.

II. Método

- i) Com uma alça, pegar uma pequena quantidade de um cultivo puro recente e colocar em uma lâmina de vidro para microscopia ou em uma placa de Petri;
- ii) Instilar uma gota de H_2O_2 a 30 % sobre o cultivo;

- iii) Não inverter a ordem do método, pois podem produzir-se resultados falsos positivos;
- iv) Não é necessário misturar o cultivo com o peróxido de hidrogênio.

III. Interpretação de resultados

- i) Prova positiva: formação imediata de borbulhas bem visíveis (formação de O₂);
- ii) Prova negativa: não há formação de borbulhas (não se forma O₂);
- iii) *Brucella* é catalase positiva.

b) Prova da oxidase

I. Reagentes

- i) N´N´N´ tetrametil-parafenileno
- ii) Controle positivo: *Brucella* spp (exceto *B. ovis*) ou *Pseudomonas aeruginosa*
- iii) Controle negativo: *Brucella ovis* ou *Escherichia coli*

II. Método

- i) Colocar um pedaço de aproximadamente 6 cm² de papel de filtro em uma placa de Petri;
- ii) Instilar 2 ou 3 gotas do reagente no centro do papel;
- iii) Com uma alça bacteriológica, estender uma porção de um cultivo puro recente sobre o papel impregnado com o reativo, seguindo uma linha de 1 a 2 cm de longitude;
- iv) Usar somente alça de platina, bastão de vidro ou alças descartáveis. Alças de níquel-cromo podem conter resquícios de ferro, o que pode levar a um resultado falso positivo.

III. Interpretação de resultados

- i) Resultado positivo: a reação é indicada por uma cor negra purpúrea que se desenvolve entre 10 e 60 segundos;
- ii) Resultado negativo: não há mudança de cor das colônias. O desenvolvimento tardio de cor, passado um período de 60 segundos, indica uma prova negativa;
- iii) *Brucella* é oxidase positiva, com exceção de *B. neotomae* e *B. ovis* que são sempre negativas.

c) Utilização do citrato como única fonte de carbono

I. Meios de cultura e reagentes

- i) Ágar citrato de Simmons
- ii) Controle positivo: *Bacillus subtilis*, *Salmonella* spp ou *Pseudomonas aeruginosa*
- iii) Controle negativo: *Brucella* spp ou *Escherichia coli*

II. Método

- i) Semear este meio antes dos outros para evitar que substâncias, principalmente glicose, sejam carregadas de outros meios para ele, podendo levar a um resultado falso positivo;
- ii) Semear toda a superfície do bisel com inóculo pouco denso de um cultivo puro recente. Não inocular a base, pois a mesma serve como controle de cor;
- iii) Incubar a 37 °C ± 2 °C por 2 a 3 dias.

III. Interpretação de resultados

- i) Prova positiva: crescimento com uma cor azul intensa no bisel;
- ii) Prova negativa: não se observa crescimento e nem mudança de cor (verde);

iii) *Brucella* não utiliza o citrato como única fonte de carbono.

d) Atividade uréase

I. Meios de cultura e reagentes

- i) Ágar uréia de Christensen
- ii) Controle positivo: *Brucella* spp (exceto *B. ovis*), *Proteus vulgaris* ou *Proteus mirabilis*
- iii) Controle negativo: *Brucella ovis*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* ou *B. abortus* 544

II. Método

- i) Semear toda a superfície do bisel com inóculo denso de um cultivo puro recente. Não inocular a base, pois a mesma serve como controle de cor;
- ii) Incubar a 37 °C ±2 °C por até 6 dias.

III. Interpretação de resultados

- i) Urease positiva: bisel com cor vermelho-violeta intenso. A cor pode penetrar dentro do ágar. A extensão da cor indica o grau de hidrólise da uréia;
- ii) Urease negativa: a cor do meio permanece inalterada (amarelo pálido);
- iii) Quase todas as cepas de *Brucella* possuem atividade ureásica, mas as de *B. suis* decompõem a uréia com maior rapidez. A reação é mais tardia nos cultivos de *B. abortus*. No geral, os cultivos de *B. melitensis* demoram mais em decompor a uréia que os cultivos de *B. abortus*. Também desintegram a uréia, *B. neotomae* e *B. canis*, mas não *B. ovis*.
- iv) Grau de hidrólise: "4+" = tubo inteiro com cor vermelho-violeta intenso; Grau de hidrólise "2+" = Bisel com cor vermelho-violeta intenso, mas a base não é alterada;
- v) Fracamente positivos: topo do bisel rosa e o restante não alterado.
- vi) Positivos rápidos: alteração do meio em até 6 horas de incubação.
- vii) Positivos tardios: 24h a 6 dias de incubação, não mais que isso.

e) Liquefação da gelatina

I. Meios de cultura e reagentes

- i) Caldo nutritivo com gelatina
- ii) Controle positivo: *Pseudomonas aeruginosa* ou *S. aureus*
- iii) Controle negativo: *Brucella* spp ou *Escherichia coli*

II. Método

- i) Semear o ágar com inóculo denso de um cultivo puro recente;
- ii) Este deve ser picado a uma profundidade de até 2/3 no centro do meio de cultura;
- iii) Incubar a 37 °C ± 2 °C por 2 dias ou, por até 14 dias.

III. Interpretação de resultados

- i) Não agitar os tubos ao retirá-los da estufa;
- ii) Colocar os tubos em geladeira ou banho de gelo até que esfriem (~ 15 min) antes de fazer a leitura;
- iii) Reação positiva: o meio permanece liquefeito;
- iv) Reação negativa: o meio torna-se sólido;
- v) *Brucella* não liquefaz a gelatina.

f) Motilidade

I. Meios de cultura e reagentes

- i) Meio SIM (Meio semi-sólido utilizado para exibir, além de outras coisas, motilidade)
- ii) Controle positivo: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella Typhimurium* ou *Proteus vulgaris*
- iii) Controle negativo: *Brucella* spp ou meio não inoculado

II. Método

- i) Preparar os tubos em duplicata;
- ii) Um inóculo pouco denso de um cultivo puro recente deve ser picado a uma profundidade de até 2/3, no centro do meio de cultura;
- iii) Incubar uma parte dos tubos a 22 °C ± 2 °C (temperatura ambiente) e a outra a 37 °C ± 2 °C, ambas por 2 a 3 dias.

III. Interpretação de resultados

- i) Motilidade positiva: crescimento difuso para fora da linha de inoculação ou turbidez do meio;
- ii) Motilidade negativa: o crescimento está presente apenas na linha de inoculação;
- iii) *Brucella* é imóvel.

g) Produção de indol

I. Meios de cultura e reagentes

- i) Meio SIM
- ii) Reagente de Kovac
- iii) Controle positivo: *Escherichia coli*
- iv) Controle negativo: *Brucella* spp, *Salmonella* spp ou *Proteus mirabilis*

II. Método

- i) Utilizar os mesmos tubos do Teste de Motilidade a 37 °C para realizar a leitura;
- ii) Instilar aproximadamente 5 gotas do reagente de Kovac diretamente no tubo;
- iii) Agitar suavemente;

III. Interpretação de resultados

- i) Reação positiva: forma-se um anel vermelho na superfície do meio;
- ii) Reação negativa: a cor do reagente não é alterada (amarela);
- iii) Reação variável: cor alaranjada na superfície do meio devido ao desenvolvimento de escatol, um composto metilado que pode ser um precursor da formação de indol;
- iv) *Brucella* não produz indol.

h) Redução do nitrato

I. Meios de cultura e reagentes

- i) Caldo nutriente com nitrato 0,1% (1mL / tubo) com 0,2% a 0,4% de ágar;
- ii) α -naftilamina 0,5% ou dimetil- α -naftilamina 0,6%. Armazenar sob refrigeração por até 3 meses;

- iii) Ácido Sulfanílico 0,8%. Armazenar sob refrigeração por até 3 meses;
- iv) Pó de zinco;
- v) Controle positivo: *Brucella* spp (exceto *B. ovis* e *B. abortus* RB51), *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*;
- vi) Controle negativo: *Brucella abortus* RB51, *Brucella abortus* 2308.

II. Método

- i) Semear o caldo com inóculo denso de um cultivo puro recente;
- ii) Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 a 3 dias;
- iii) Colocar aproximadamente 1mL de α -naftilamina 0,5% ou dimetil- α -naftilamina 0,6% diretamente sobre o cultivo;
- iv) Imediatamente após, colocar aproximadamente 1mL de ácido Sulfanílico 0,8% diretamente sobre o cultivo;

III. Interpretação de resultados

- i) Resultado positivo: aparecimento de uma cor vermelho tijolo dentro de 30 segundos, indicando uma prova completa;
- ii) Resultado negativo: sem aparecimento de cor. Proceder à 2ª fase.
- iii) Agregar diretamente ao tubo que contém os dois reativos acima (α -naftilamina e ácido Sulfanílico) aproximadamente 20 mg de pó de zinco;
- iv) O aparecimento de uma cor vermelha ao final de 30 segundos confirma um resultado negativo;
- v) *Brucella* reduz o nitrato, exceto *B. ovis* e *B. abortus* RB51.

i) Relação com o oxigênio

I. Meios de cultura e reagentes

- i) Caldo tioglicolato com indicador de anaerobiose, resazurina ou azul de metileno. A resazurina é mais indicada como indicador de *Eh* (potencial de oxirredução).
- ii) Antes de inocular, checar a porção superior do meio em cada tubo. Se o indicador usado indicar mais de 1/3 da coluna de líquido oxidada, descartar o tubo. Se a oxidação for em 1/3 ou menos retirar a rolha e ferver em banho-maria, sem agitação, por 10 minutos para eliminar o oxigênio absorvido. Resfriar à temperatura ambiente antes do uso;
- iii) Não ferver o meio mais de uma vez, pois disso resulta o desenvolvimento de produtos tóxicos. Estocá-lo em temperatura ambiente e no escuro;
- iv) Controle positivo da anaerobiose: *Clostridium sporogenes* ou *Bacteroides fragilis*;
- v) Controle positivo da aerobiose: *Bacillus subtilis*, *S. aureus* ou *Escherichia coli*, *Brucella* ssp;
- vi) Controle negativo: tubo não inoculado ou *B. abortus* 544.

II. Método

- i) Semear o caldo com inóculo denso de um cultivo puro recente;
- ii) Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 a 3 dias.

III. Interpretação de resultados

- i) Registrar a presença ou ausência de crescimento;
- ii) Crescimento na porção superior: aeróbios;
- iii) Crescimento na porção inferior: anaeróbios. Os anaeróbios tornam o meio turvo devido à floculação na parte onde a concentração de oxigênio é menor;
- iv) Crescimento em toda a extensão do tubo: anaeróbios facultativos;

v) *Brucella* é aeróbio estrito.

vi) O QUADRO 17 resume as principais características que diferem *Brucella* de outros microrganismos Gram-negativos.

QUADRO 17: Características diferenciais entre *Brucella* e outros Gram negativos

Provas	<i>Brucella</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Campylobacter fetus</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> 09
Morfologia	Pequenos cocobacilos	Pequenos cocobacilos	Forma de vírgula	Diplococos	Diplococos	Bastonete
Motilidade 37°C	-	+	+	-	-	-
Motilidade 25°C	-	-	-	-	-	+
Lactose	-	-	-	V ^a	V	-
Glicose	- ^b	-	-	-	V	+
Hemólise	-	+	-	V	V	-
Catalase	+	+	+	V	+	+
Oxidase	+ ^c	+	+	+	-	-
Urease	+ ^d	+	-	V	V	+
Nitrato	+ ^e	+	+	V	-	+
Citrato	-	+	-	-	V	-

+: positivo; -: negativo; V: Variável entre positivo e negativo; a: espécies positivas e negativas dentro do gênero; b: *B. neotomae* pode mostrar alguma fermentação; c: exceto *B. ovis*, *B. neotomae* e ocasionalmente cepas de *B. abortus* que são negativas; d: exceto *B. ovis* e ocasionalmente cepas de *B. abortus* que são negativas; e: exceto *B. ovis* que não reduz nitrato a nitrito.

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

3.7.5.7 Tipificação de culturas de *Brucella*

3.7.5.7.1 Disposições gerais

- Após a cepa ter sido identificada como membro do gênero *Brucella*, é importante tentar estabelecer a espécie e biovar. Os testes de tipificação identificarão a maioria das cepas de *Brucella* como um biovar particular de uma das espécies estabelecidas.
- Ocasionalmente, algumas cepas não serão classificadas exatamente dentro da lista de biovars, por exemplo, *B. abortus* tem sempre uma ou duas características que diferem daquelas mostradas na QUADRO 18. Antes de dar a esta cepa o *status* de um novo biovar, ela deverá ser descrita como pertencente a um biovar existente, exceto em situações distintas.
- Quando culturas atípicas são identificadas, é importante estabelecer se este fenômeno que se repete representa um modelo local de taxonomia ou erro de laboratório. Características atípicas firmemente estabelecidas em isolados poderão servir como marcadores epidemiológicos, possibilitando traçar mais facilmente os hospedeiros e a extensão geográfica dessas cepas.
- A identificação da espécie é baseada em duas propriedades principais: lise por fagos e requerimento de soro, além do hospedeiro preferencial.
- Para *B. melitensis*, *B. abortus* e *B. suis*, a identificação até o nível de biovar é feita por meio de quatro testes: requerimento de CO₂, produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), sensibilidade a corantes (tionina, fucsina básica e safranina O) e aglutinação com antissoro monoespecífico A e M. Entretanto, em um pequeno número de casos, somente as provas metabólicas oxidativas permitem estabelecer a classificação com toda segurança. Os aparatos e materiais necessários para efetuar esta prova são custosos. Além disso, exigem tempo, somente podem ser realizadas por pessoal especializado e oferecem ao operador grave risco de infecção por

brucelas. Sendo assim, não são práticas para a tipificação em série de grande número de cultivos.

3.7.5.7.2 Identificação da espécie

a) Lise por fagos

I. Meios de cultura e reagentes

- i) Ágar triptose
- ii) Salina 0,85%

II. Método

- i) Com auxílio de suabes semear placas de ágar triptose com a amostra fazendo as estrias bem próximas umas das outras;
- ii) Incubar a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ durante 2 a 3 dias;
- iii) Coletar o cultivo com aproximadamente 10 mL salina 0,85%. Pode-se utilizar a mesma suspensão preparada na prova de crescimento na presença de corantes;
- iv) Padronizar a suspensão coletada acima de modo que contenha, aproximadamente, 10^9 microrganismos/mL. Para isso, diluir 0,5 mL da suspensão em 20 mL de salina 0,85%;
- v) Identificar as placas e marcar o local onde serão depositadas as diferentes concentrações do fago;
- vi) Dispensar 20 μL de cada concentração do fago nos lugares predeterminados;
- vii) Aguardar até que os inóculos de fago sequem;
- viii) Incubar a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 2 a 3 dias, se necessário em estufa de CO_2 .

III. Interpretação de resultados

- i) Positivo: formação de um halo transparente, indicando que brucelas foram lisadas pelo fago Tb;
- ii) Negativo: sem formação de halo, indicando que brucelas não foram lisadas pelo fago Tb;
- iii) Lise parcial: formação de halo mais denso que na reação positiva;
- iv) Interpretar os resultados de acordo com o QUADRO 18.

b) Requerimento de soro

I. Reagentes

- i) Ágar triptose
- ii) Ágar triptose com adição de soro
- iii) Salina 0,85%
- iv) Controle: *B. abortus* B19

II. Método

- i) Com auxílio de suabes, semear placas de ágar triptose 5% soro com a amostra;
- ii) Coletar o cultivo com, aproximadamente, 10 mL salina 0,85%. Esta suspensão poderá ser utilizada nas provas de lise por fagos, aglutinação com antissoro monoespecífico A e M, diferenciação de cepas vacinal e de campo;
- iii) Inocular cada placa de Ágar triptose com uma estria de cada suspensão preparada anteriormente. Inocular até 6 suspensões por placa;
- iv) Inocular as amostras de referência para controle, sendo *B. abortus* B19;
- v) Como controle negativo, não inocular nenhuma amostra;

vi) Incubar a 37 °C ± 2 °C com atmosfera de 5-10% de CO₂. Por 48 horas.

III. Interpretação de resultados

- i) Verificar se houve crescimento e em qual meio;
- ii) Interpretar os resultados de acordo com o QUADRO 18.

QUADRO 18: Características diferenciais entre espécies do gênero *Brucella*

Espécies	Morfologia Colonial	Requerimento de Soro	Lise por Fagos (Tb)		Oxidase	Urease	Hospedeiro Preferencial
			DHP	10 ⁴ x DHP			
<i>B. melitensis</i>	Lisa	-	-	-	+	+ ^a	Ovinos e caprinos
<i>B. abortus</i>	Lisa	- ^b	+	+	+ ^c	+ ^d	Bovinos
<i>B. suis</i>	Lisa	-	-	+	+	+ ^e	Suínos
<i>B. neotomae</i>	Lisa	-	- ^f	+	-	+ ^e	Ratos do deserto
<i>B. ovis</i>	Rugosa	+	-	-	-	-	Carneiros
<i>B. canis</i>	Rugosa	-	-	-	+	+ ^e	Cães

+: positivo; -: negativo; a: velocidade intermediária, algumas cepas rápidas; b: exceto *B. abortus biovar 2* que geralmente requer soro para crescimento no isolamento primário; c: exceto cepas de *B. abortus biovar 3* isoladas no Senegal e Guinéa Bissau, que são negativas; d: velocidade intermediária, exceção para a cepa de referência 544 e, ocasionalmente, algumas cepas de campo que são negativas; e: velocidade rápida; f: placas minúsculas.

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

3.7.5.7.3 Identificação da biovar

a) Requerimento de CO₂

I. Reagentes

- i) Ágar triptose com 5% de soro
- ii) Salina 0,85%
- iii) Controle: *B. abortus* B19 e *B. abortus* 544

II. Método

- i) Com auxílio de suabes, semear placas de ágar triptose 5% soro com a amostra;
- ii) Coletar o cultivo com, aproximadamente, 10 mL salina 0,85%. Esta suspensão poderá ser utilizada nas provas de lise por fagos, aglutinação com antissoro monoespecífico A e M, diferenciação de cepas vacinal e de campo;
- iii) Inocular cada placa de Ágar triptose com 5 % de soro com uma estria de cada suspensão preparada anteriormente. Inocular até 6 suspensões por placa;
- iv) Inocular as amostras de referência para controle, sendo *B. abortus* 544; *B. abortus* B19;
- v) Incubar a 37 °C ± 2 °C por 48 horas

III. Interpretação de resultados

- i) Verificar se houve crescimento e em qual atmosfera. Se no cultivo em atmosfera normal só aparecer colônias escassas, não levá-las em consideração;

- ii) Interpretar os resultados de acordo com o QUADRO 19.

b) Produção de H₂S (ácido sulfídrico)

I. Meios de cultura e reagentes

- i) Fitas impregnadas com acetato de chumbo
- ii) Ágar nutriente (em tubos inclinados)
- iii) Controle positivo: *B. abortus*, *B. suis* 1, *Proteus mirabilis* ou *Proteus vulgaris*
- iv) Controle negativo: *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. abortus* bio 5, *B. abortus* bio 6, *B. abortus* RB51, *B. suis* bio 2 ou *B. suis* bio 3 ou *Pseudomonas aeruginosa*

II. Método

- i) Semear o ágar com inóculo denso de um cultivo puro recente;
- ii) Assepticamente, colocar uma tira de acetato de chumbo estéril sobre a parede do tubo que não contém ágar a aproximadamente, 10 mm acima do nível deste;
- iii) Dobrar a extremidade externa sobre o tubo e colocar a tampa para manter a fita em seu lugar;
- iv) Incubar a 37 °C ± 2 °C por 3 a 4 dias;
- v) Observar diariamente;

III. Interpretação de resultados

- i) O período em que se produz H₂S somente é importante em espécies de *Brucella*;
- ii) Registrar os resultados diariamente seguindo o modelo: “H₂S produzido nos primeiros dois dias”, “H₂S produzido desde o 1º ao 5º dia” etc.;
- iii) Positivo: coloração negra-pardacenta na tira de papel, podendo ter brilho;
- iv) Negativo: não se observa mudança na coloração da tira de papel ou a presença de traços;
- v) Interpretar os resultados de acordo com o QUADRO 19.

c) Crescimento na presença de corantes

I. Reagentes

- i) Ágar triptose com 5% de soro
- ii) Ágar triptose com 5% de soro e corantes Tionina e fucsina básica 1:50.000, 1:80.000 ou 1:100.000; Safranina 0 a 1:25.000
- iii) Salina 0,85% (10 mL/placa)
- iv) Controles: *B. abortus* 544, *B. abortus* B19, *B. melitensis* 16M e *B. suis* 1330

II. Método

- i) Com auxílio de suabes, semear placas de ágar triptose 5% soro com a amostra;
- ii) Coletar o cultivo com aproximadamente 10 mL salina 0,85%. Esta suspensão poderá ser utilizada nas provas de lise por fagos, aglutinação com antissoro mono específico A e M, diferenciação de cepas vacinal e de campo e para testes de requerimento de CO₂ e requerimento de soro;
- iii) Inocular cada placa de Agar triptose com 5 % de soro e corantes com uma estria de cada suspensão preparada anteriormente. Inocular até 6 suspensões por placa;
- iv) Inocular as amostras de referência para controle, sendo: *B. abortus* 544; *B. abortus* B19; *B. melitensis* 16M; *B. suis* 1330.
- v) Incubar a 37 °C ± 2 °C em atmosfera com 5 a 10% de CO₂ por 2 a 3 dias;

III. Interpretação de resultados

- i) Verificar se houve crescimento no meio e comparar os resultados com os controles
- ii) Interpretar os resultados de acordo com o QUADRO 19.

d) Aglutinação com antissoro mono específico A e M

I. Reagentes

- i) Salina fenicada
- ii) Salina 0,85%
- iii) Soro anti - A
- iv) Soro anti – M
- v) Controles Anti – A (*B. abortus* biovar 1, *B. suis* biovar 1)
- vi) Controles Anti – M (*B. melitensis* biovar 1, *B. abortus* biovar 4)

II. Método 1

- i) Preparar soluções estoque de soro mono específico anti-A e anti-M diluindo cada soro em salina fenicada até que uma gota aglutine a suspensão controle homóloga dentro de 1 minuto, sem aglutinação visível das outras duas suspensões controle durante o mesmo período. Essas soluções estoque se mantêm conservadas por vários meses se estocadas sob refrigeração;
- ii) Com auxílio de suabes, semear placas de ágar triptose com a amostra fazendo as estrias bem próximas umas das outras;
- iii) Incubar a 37 °C ± 2 °C durante 2 a 3 dias;
- iv) Coletar o cultivo com, aproximadamente, 10 mL salina 0,85%. Pode-se utilizar a mesma suspensão preparada na prova de crescimento na presença de corantes. Inativar essa suspensão aquecendo-a em banho-maria a 65 °C durante 1 hora;
- v) Colocar uma gota de cada soro diluído, A e M, em uma placa de Petri;
- vi) Adicionar uma gota da suspensão da cultura em cada soro e misturar;
- vii) Observar a aglutinação que deverá ocorrer dentro de 1 minuto com um dos soros.

III. Método 2

- i) Preparar uma suspensão bacteriana de modo a se obter aproximadamente 40 % de Transmitância em 600 nm;
- ii) Diluir os soros anti-A e anti-M conforme título recomendado para a partida utilizada na prova;
- iii) Distribuir 1 mL de cada suspensão em 2 tubos de vidro de 13 mm x 75 mm;
- iv) Distribuir 1 mL do soro anti-A diluído em um dos tubos e 1 mL do soro anti-M no outro tubo;
- v) Incubar a 37 °C ± 2 °C por 48h;
- vi) Proceder a leitura observando a turbidez do sobrenadante e presença de aglutinação;
- vii) A prova poderá ser realizada em microplaca utilizando-se um décimo do volume empregado na prova em tubos, incubando-se a 37 °C ± 2 °C por 24h.

IV. Interpretação de resultados

Interpretar os resultados de acordo com o QUADRO 19.

QUADRO 19: Diferenciação entre biovars das espécies do gênero *Brucella*

Espécies	Biovar	Requerimento de CO ₂	Produção de H ₂ S	Crescimento em Corantes ^a	Aglutinação em Soros ^b
----------	--------	---------------------------------	------------------------------	--------------------------------------	-----------------------------------

				Tioni na	Fucsi na	Safrani na	A	M	R
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+ ^c	+	-	+	+	+	-	-
	2	+ ^c	+	-	-	-	+	-	-
	3	+ ^c	+	+	+	+	+	-	-
	4	+ ^c	+	-	+ ^d	+	-	+	-
	5	-	-	+	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	+	-	-
	9	+ ou -	+	+	+	+	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	- ^e	- ^h	+	-	-
	2	-	-	+	-	- ^h	+	-	-
	3	-	-	+	+	- ^h	+	-	-
	4	-	-	+	- ^f	- ^h	+	+	-
	5	-	-	+	-	- ^h	-	+	-
<i>B. neotomae</i>	N/A	-	+	- ^g	-	N/A	+	-	-
<i>B. ovis</i>	N/A	+	-	+	- ^f	N/A	-	-	+
<i>B. canis</i>	N/A	-	-	+	- ^f	N/A	-	-	+

+: positivo; -: negativo; a: Concentração de corante: 20µg / mL (1:50.000), exceto Safranina O 100µg / mL (1:10.000); b: A: antissoro monoespecífico A, M: antissoro monoespecífico M e R: antissoro anti-brucela rugosa; c: Usualmente positivo no isolamento primário; d: Algumas cepas isoladas no Canadá, Grã Bretanha e USA não crescem em corantes; e: Algumas cepas resistentes à fucsina básica foram isoladas na América do Sul e Sudeste Asiático; f: Negativo para a maioria das cepas; g: Crescimento poderá ocorrer na concentração de 10µg / mL (1:100.000) de tionina; h: A maioria das cepas de *B. suis* são inibidas por Safranina O na concentração de 100µg / mL (1:10.000); N/A: não se aplica.

Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

3.7.5.8 Diferenciação de amostra vacinal (B19) e amostra de campo

a) Reagentes

- i) Ágar triptose com i-eritritol (1 mg/mL)
- ii) Ágar triptose com penicilina (5 UI/mL)
- iii) Controles: *B. abortus* B19 e *B. abortus* biovar 544

b) Método

- i) Pode-se utilizar a mesma suspensão;
- ii) Padronizar uma suspensão de modo que contenha, aproximadamente, 10⁹ microrganismos/mL. Para isso, diluir 0,5 mL da suspensão preparada na prova de crescimento na presença de corantes, em 20 mL de salina 0,85%;
- iii) Inocular as placas contendo os diferentes reagentes com uma estria de cada suspensão. Pode-se inocular até seis suspensões por placa;
- iv) Incubar as placas a 37 °C ± 2 °C por 3 a 4 dias.

c) Interpretação de resultados

Interpretar os resultados de acordo com o QUADRO 20.

QUADRO 20: Características diferenciais entre *B. abortus* cepa 19 (cepa vacinal) e *B. abortus* biovar 1 (cepa de campo)

Cepa	Requerimento de CO ₂	Crescimento em meio contendo	
		i - eritritol (1 mg/mL)	Penicilina (5 UI/mL)
<i>B. abortus</i> biovar 1	+ ^a	+	+ ^a
<i>B. abortus</i> 19	-	- ^b	-

+: positivo; - negativo; a: usualmente positivo no isolamento primário; b: O padrão de mutação para tolerância ao eritritol é bastante alto e algumas cepas suspeitas B19 isoladas podem crescer em eritritol embora pareça com a cepa B19 em outros testes. Fonte: LFDA-MG, adaptado de Alton et al. (1988)

3.7.6 Critérios de aceitação do ensaio

- a) O isolamento positivo é conclusivo e definitivo;
- b) Devido à baixa sensibilidade da prova, o não isolamento do microrganismo requer que a interpretação dos resultados seja feita pelo solicitante com base no histórico do animal e/ou rebanho e legislação vigente;
- c) Os resultados referem-se única e exclusivamente às amostras enviadas ao laboratório;

3.7.7 Interpretação de resultados

- a) O isolamento positivo é conclusivo e definitivo;
- b) Devido à baixa sensibilidade da prova, o não isolamento do microrganismo requer que a interpretação dos resultados seja feita com base no histórico do animal e/ou rebanho e legislação vigente.

3.7.8 Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como “positivo” ou “não isolado”.

3.7.9 Descarte de amostras e resíduos

- a) Anteriormente ao descarte de amostras e produtos de ensaio, deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.7.10. Retenção de Itens de Ensaio.
- b) Anteriormente ao descarte de amostras e produtos de ensaio, deve ser realizado registro de descarte em formulário próprio e conferência.
- c) Todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavagem apropriado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos e registros próprios do laboratório;
- d) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- e) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.7.10 Retenção de itens de ensaio

- a) As amostras de espécimes clínicos poderão ser descartadas 60 dias após a emissão do relatório de ensaio.

b) As brucelas isoladas deverão ser recolhidas em veículos de liofilização e congeladas a -70°C para posterior envio ao LFDA-MG.

3.8 Identificação de *Brucella* spp e diferenciação de amostra vacinal da amostra de campo, por biologia molecular - PCR convencional multiplex

a) Materiais

- I. Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- II. Microtubos de volumes variados;
- III. Microplacas ou microtubos de PCR;
- IV. Adesivo selante para microplacas ou tampas para os microtubos de PCR;
- V. Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- VI. Estantes para microtubos;
- VII. Gaze ou papel toalha.

b) Equipamentos e instrumentos

- I. Estação de trabalho para PCR (*Workstation* PCR) com luz UV germicida;
- II. Geladeira;
- III. Freezer;
- IV. Micropipetas de volumes reguláveis;
- V. Termociclador para PCR convencional;
- VI. Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- VII. Agitador de microtubos (opcional);
- VIII. Microcomputador;
- IX. Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

c) Insumos

- I. Agarose;
- II. Água livre de nucleases;
- III. Corante para ácidos nucléicos;
- IV. Mix de dNTP (deoxinucleotídeos trifosfato);
- V. MgCl₂ 25 mmol/L;
- VI. Tampão da Taq DNA polimerase;
- VII. DNA polimerase;
- VIII. Tampão TE pH=8;
- IX. Iniciadores para PCR (QUADRO 21);
- X. Controles positivos: isolados de *B. abortus* biovar 1, 2 ou 3; *B. abortus* biovar 3, 5, 6 ou 9; *B. suis*; *B. melitensis*; cepa vacinal *B. abortus* B19; *B. ovis*

QUADRO 21. Sugestão de oligonucleotídeos para PCR multiplex para detecção molecular de *Brucella*

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA (5'-3')	REFERÊNCIA
<i>B. abortus</i>	GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC	BRICKER & HALLING, 1993
<i>B. melitensis</i>	AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA	BRICKER & HALLING, 1993
<i>B. ovis</i>	CGG GTT CTG GCA CCA TCG TCG	BRICKER & HALLING, 1993
<i>B. suis</i>	GCG CGG TTT TCT GAA GGT TCA GG	BRICKER & HALLING, 1993
IS711	TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT TCG CAG	BRICKER & HALLING, 1993
16S F	GTG CCA GCA GCC GCC GTA ATA C	BRICKER, 2003
16S R	TGG TGT GAC GGG CGG TGT GTA CAA G	BRICKER, 2003
428F	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG	LÓPEZ-GOÑI, 2008
428R	AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG	LÓPEZ-GOÑI, 2008

Fonte: Orzil et al. (2016)

d) Soluções

- I. Solução de álcool 70° INPM;
- II. Solução descontaminante de DNA e DNAses;
- III. Solução tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 1X;
- IV. Soluções estoque dos iniciadores: ressuspender os iniciadores liofilizados em tampão TE pH=8, de modo que a solução estoque seja de 500 pmol/μL;
- V. Soluções de trabalho: preparar soluções de trabalho de concentração 5pmol/μL a partir das soluções estoque. Usar como diluente o tampão TE pH=8 ou água livre de nucleases.

e) Realização do ensaio

- I. **Disposições gerais**
 - i) Observar a diferenciação entre as áreas físicas de preparo de amostra, preparo do mix de PCR, aplicação da amostra e eletroforese, a fim de prevenir contaminações com amostra ou com produto amplificado;
 - ii) As micropipetas utilizadas para cada uma das etapas da metodologia devem ser exclusivas para tais finalidades;
 - iii) As concentrações das soluções estoque e soluções de trabalho dos iniciadores poderá variar desde que observadas a concentração final de cada reagente do mix de reação de PCR contida no QUADRO 22.
- II. **Extração da amostra**
 - i) Ressuspender as culturas puras do isolamento bacteriano em aproximadamente 1 mL de salina estéril 0,85%;
 - ii) Extrair o DNA genômico através da lise pelo calor em banho-maria à 65°C por 1 hora;
- III. **Preparo do mix de reação**
 - i) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a estação de trabalho e os materiais a serem utilizados, com solução específica (para degradação de DNA, RNA,

- proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM, com auxílio de papel toalha ou gaze e com lâmpada UV por no mínimo 15 minutos;
- ii) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (*Brucella sp.*) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, controle positivo e branco de reação;
 - iii) Homogeneizar preferencialmente em agitador de tubos e adicionar o mix de reação a cada poço da microplaca ou microtubo para PCR;
 - iv) Devem ser incluídos nas análises: controle DETECTADO para *Brucella spp* e Branco (mix de PCR com água livre de nucleases aplicada no lugar do DNA).

IV Aplicação da amostra

- i) Antes e após a aplicação da amostra, descontaminar a estação de trabalho e os materiais a serem utilizados, com solução específica (para degradação de DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM, com auxílio de papel toalha ou gaze e se possível com lâmpada UV por no mínimo 15 minutos;
- ii) Adicionar o DNA nos poços da placa ou em microtubos identificados com a numeração da amostra a ser testada;
- iii) Utilizar como controles positivos de reação, as cepas descritas em 3.8 subitem c);
- iv) Utilizar como branco de reação, água no lugar do DNA.

V Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Proceder à amplificação em termociclador certificado, de acordo com especificações de temperatura do protocolo utilizado.

VI Eletroforese em gel de agarose

- i) ¹Preparar o gel de agarose em concentração adequada ao protocolo de PCR utilizado. Adicionar corante para ácidos nucleicos em proporção suficiente para visualização das bandas;
- ii) Para a corrida das amostras, adicionar tampão de carregamento (*loading buffer*) ao produto de PCR;
- iii) Aplicar marcador de peso molecular em um dos poços do gel;
- iv) Realizar a corrida em cuba de eletroforese, utilizando o tempo e a voltagem adequados para o volume do gel e o protocolo de PCR utilizado. Sugere-se 100 volts por 90 minutos².
- v) Visualizar o gel sob luz ultravioleta, fotografar com o auxílio de um fotodocumentador e analisar o resultado.

NOTA: ¹ A metodologia de eletroforese capilar pode ser utilizada como alternativa de acordo com protocolo da marca e cuja validação possa ser devidamente comprovada;

² Para a identificação de *B. ovis* é necessário utilizar os parâmetros de corrida 180 minutos em gel de agarose 2% ou tempo e concentração ótimos definidos em cada laboratório cujos testes sejam devidamente registrados e comprovados.

f) Critérios de aceitação do Ensaio

- I. Os controles positivos devem apresentar bandas de tamanhos correspondentes aos *amplicons* do protocolo utilizado. Em caso da utilização dos iniciadores contidos no QUADRO 21, os controles positivos devem apresentar bandas de acordo com o seguinte padrão: o produto amplificado correspondente à IS711 é de aproximadamente 498 pares de base (pb) para *B. abortus*, 537 pb para *B. abortus* B19, 731 pb para *B. melitensis*, 976 pb para *B. ovis*, 285 pb para *B. suis* bv1. O gene universal 16S é de 900 pb. O gene EriC por sua vez, corresponde a aproximadamente 587 pb.
- II. O branco de reação não deve apresentar bandas de amplificação.

g) Interpretação dos resultados

- I. Avaliar a correspondência entre o padrão de bandas apresentado pela amostra e por cada um dos controles positivos utilizados a fim de classificá-las como positivas ou negativas;
- II. Avaliar a presença de banda relativa ao gene constitutivo de procaríotos;
- III. A leitura das bandas deve ser clara e livre de *amplicons* inespecíficos para que o teste seja considerado satisfatório;
- IV. Qualquer amostra questionável deverá ser repetida em novo teste.

NOTA: A metodologia não faz distinção entre *B. abortus* biovar 1, 2 ou 3 nem entre *B. abortus* biovar 3, 5, 6 ou 9. Os resultados para tais biovariedades devem ser, portanto, reportados como “detectado” ou “não detectado” para o respectivo grupo.

h) Emissão dos resultados

Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”.

i) Descarte de Amostras e Resíduos

- I. Anteriormente ao descarte de amostras e produtos de ensaio, deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.8 subitem j) Retenção de Itens de Ensaio.
- II. Anteriormente ao descarte de amostras e produtos de ensaio, deve ser realizado registro de descarte em formulário próprio e conferência.
- III. Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- IV. O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

j) Retenção de itens de ensaio

- I. Os isolados para análise de PCR devem ser armazenados por período mínimo de 12 meses a partir da realização das análises, em freezer a -20 °C.
- II. As amostras negativas devem ser armazenadas por período mínimo de 90 dias a partir da realização das análises, em freezer a -20 °C.

Referências Bibliográficas

Anônimo. Standardised Complement Fixation Test for Bovine Brucellosis. Australian Veterinary Journal, V.53, P. 394-440, 1977

ALTON, G.G. et al. Las Técnicas de laboratorio en la Brucelosis. 2ª edição. Genebra: Organización Mundial de la Salud, 1976. 190p.

ALTON, G.G.; LOUIS M. JONES; R. D. ANGUS; J. M. VERGER. Techniques for the Brucellosis Laboratory. 1988.

BARTHOLOMEW, J.W. Variables influencing results, and precise definition of steps in Gram staining as a means of standardizing the results obtained. Stain Technology, v. 37, p. 139-155, 1962.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT). Organizadores, Vera Cecilia Ferreira de Figueiredo, José Ricardo Lobo, Vitor Salvador Picão Gonçalves. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 188 p., 2006.

BRICKER, B.J.; HALLING, S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 1994, p.2660-2666.

Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) infection with (*B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). Cap. 3 .1 .4. Version (NB: Version adopted in May 2016). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 27 de out. de 2021

GOÑI, L.; YOLDI, G; MARÍN, C. M.; MIGUEL, M. J.; MUÑOZ, P. M.; BRASCOL, J. M.; JACQUES, I. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. Journal of Clinical Microbiology, v.46, n.10, p.3484-3487, 2008.

GRAYON, M.; CLOECKAERT, A.; FERREIRA, A. C.; CARDOSO, R.; CORRÊA DE SÁ, M. I.; WALRAVENS, K.; ALBERT, D.; BASTUJI, G. Evaluation of a Multiplex PCR Assay (Bruce-ladder) for Molecular Typing of All *Brucella* Species, Including the Vaccine Strains. Journal of Clinical Microbiology, 2008, p. 3484-3487.

MACFADDIN, J. F. Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, 1980. 274p.

MACFADDIN, J. F. Media for Isolation – Cultivation – Identification – Maintenance of Medical Bacteria. Londres, 1985. 928p.

ORZIL, L. L.; PREIS I.S.; ALMEIDA I. G.; SOUZA, P. G.; FILHO, P. M. S. JACINTO, F. B., JÚNIOR, A. A. F. Validation of the multiplex PCR for identification of *Brucella* spp. *Ciência Rural* v.46, n.5, 2016, p.847-852.

USDA, SEROPRO1022.02/SEROPRO1022.03 – Complement fixation test for detection of antibodies to *Brucella abortus*. National Veterinary Laboratory Services, Ames IA, 2000, 26P.

CAPÍTULO 2.6.5

DOENÇA DE AUJESZKY

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da Doença de Aujeszky:

1.1. Detecção da Resposta Imune

- a) Soro sanguíneo

1.2. Identificação do Agente

- a) Cérebro;
- b) Pulmão;
- c) Tonsilas Palatinas;
- d) Linfonodos;
- e) Gânglio Trigêmeo (suínos com infecção latente) e
- f) Medula espinhal (bovinos).

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2. Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos

a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

Detecção da Resposta Imune

3.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.2.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Ponteiras descartáveis;
- g) Descartador de ponteiras;
- h) Reservatórios para soluções (cubetas);
- i) Papel absorvente;
- j) Selador ou tampa para placas de ELISA;
- k) Caneta para identificação de vidraria;
- l) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavagem.

3.2.2 Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Geladeira;
- c) Estufa;
- d) Termômetros
- e) Micropipetas monocanal e multicanal de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Leitora de ELISA;
- h) Cronômetros;
- i) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- j) Agitador de microplacas (opcional);
- k) Lavadora de microplacas (opcional);

3.2.3. Insumos

- a) Kits de ELISA de detecção de anticorpos para o vírus da Doença de Aujeszky.

3.2.4. Soluções

- a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados.
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;
- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;

d) Diluir a soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5. Realização do ensaio

a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;

b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;

c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;

d) Utilizar ponteiros distintas para cada controle e amostra de soro;

e) Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;

f) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;

g) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;

h) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2.6. Critérios de aceitação do Ensaio

a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos resultados

a) De acordo com as DOs obtidas consideram-se as amostras como reagentes ou não reagentes. As amostras reagentes devem ser encaminhadas para o Laboratório Federal de Defesa Agropecuário (LFDA) designado para realizar a confirmação por Virusneutralização;

b) Amostras com DO entre os dois pontos de corte estabelecidos serão consideradas inconclusivas e deverão ser novamente ensaiadas. Se no reensaio o inconclusivo persistir, a amostra deve ser encaminhada ao (LFDA) para confirmação por teste de Virusneutralização.

3.2.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, reagente, não reagente, ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

d) O laboratório deve assegurar a biosseguridade dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidos antes do descarte.

b) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

3.3. Teste de Virusneutralização

3.3.1. Materiais

a) Luvas para procedimentos;

b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;

c) Provetas graduadas;

d) Béqueres;

e) Erlenmeyers;

f) Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;

g) Ponteiras descartáveis;

h) Descartador de ponteiras;

i) Reservatórios para soluções (cubetas);

j) Papel absorvente;

k) Microplacas para cultivo celular em poliestireno cristal com 96 cavidades de fundo chato;

l) Caneta para identificação de vidraria;

m) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.3.2. Equipamentos e instrumentos

a) Autoclave;

b) Cabine de segurança biológica classe II B1 (requisito mínimo);

c) Geladeira;

d) Freezer;

e) Estufa com atmosfera de CO₂;

- f) Estufa;
- g) Banho seco ou que empregam água;
- h) Termômetros;
- i) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- j) Pipetador automático ou manual;
- k) Agitador de tubos;
- l) Microscópio invertido;
- m) Balança analítica;
- n) Centrífuga refrigerada.

3.3.3. Insumos

- a) Suspensão celular de linhagem sensível (PK-15, SK-6 ou MDBK);
- b) Meio MEM (Meio Essencial Mínimo, reconstituído de acordo com o fabricante);
- c) Soro fetal bovino (SFB) livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma;
- d) Solução de antibióticos e antifúngicos;
- e) Anticorpo reagente e não reagente para os vírus da Doença de Aujeszky;
- f) Vírus da Doença de Aujeszky – VDA.

3.3.4. Soluções

- a) Meio MEM com adição de antimicrobianos;
- b) Solução de salina 0,15 mol/L %;
- c) Ácido cítrico 0,2 %;
- d) Solução salina 0,85 % fosfatada tamponada (PBS) pH 7,2-7,4;
- e) Solução de antibióticos e antifúngicos.

3.3.5. Realização do ensaio

3.3.5.1 Método qualitativo

- a) Incubar as amostras de soro em banho seco ou que empregam água a 56 °C por 30 minutos para inativação do complemento;
- b) Os soros deverão ser testados em triplicata
- c) Utilizar microplacas para cultivo de células de 96 poços, com 12 colunas identificadas de 1 a 12, e 8 linhas identificadas com a letra A até H;
- d) Adicionar 50 µL de MEM por poço nas colunas 1, 5 e 9 (controle de toxidez);
- e) Adicionar 50 µL do soro a ser testado em três poços adjacentes (ex. soro 1: A1, A2, A3). O mesmo procedimento deve ser feito com uma amostra de soro reagente e uma de soro não reagente, com fins de controle de prova;
- f) Manter pelo menos uma coluna da microplaca para controle de células.—Adicionar nesta coluna, 100 µL de MEM e 50 µL volume da suspensão celular utilizada na prova, conforme descrito no item l;
- g) Retirar um criotubo do vírus da Doença de Aujeszky do ultrafreezer, o qual já deverá ter sido titulado pelo método de Reed-Muenchen. Este método será também empregado na titulação da diluição de trabalho do vírus (retrotitulação);
- h) Diluir o vírus de acordo com o título para que no ensaio sejam utilizados aproximadamente 100 TCID₅₀/50 µL (DT- diluição de trabalho);

- i)** Adicionar 50 µL da diluição trabalho do vírus aos poços, com exceção do controle de toxidez (colunas 1,5,9) e da coluna de controle de células. Homogeneizar batendo suavemente na lateral da placa;
- j)** Incubar as microplacas a 37 ° C ± 1 °C, em estufa com 5% de atmosfera de CO₂ por um período de 1 hora ou por 24 horas sob refrigeração;
- k)** Adicionar a todos os poços 50 µL de suspensão celular contendo 3,0 x 10⁵ células/mL com 10% SFB iniciando-se pela coluna referente ao controle de células;
- l)** Incubar as microplacas a 37 ° C ± 1 °C, em estufa com 5% de atmosfera de CO₂ por 72 horas;
- m)** Após o término do período de incubação realizar a leitura da microplaca em microscópio de luz com imagem invertida.

3.3.5.2 Método quantitativo

- a)** O método quantitativo poderá ser usado diretamente nos soros a serem avaliados ou em soros reagentes previamente testados no método qualitativo;
- b)** Os soros deverão ser testados em duplicata utilizando-se microplacas para cultivo de células de 96 poços, com 12 colunas identificadas de 1 a 12, e 8 linhas identificadas com a letra A até H;
- c)** Desde que os soros tenham a toxicidade avaliada no método qualitativo, não é necessário avaliar a toxicidade no método quantitativo;
- d)** Caso seja necessário realizar o controle de toxidez adicionar 50 µL de MEM nas linhas A e de C a H. Em seguida, adicionar 50 µL de soro nos poços A1 e A2 (amostra 1) e 100 µL de soro nos poços B1 e B2 (amostra 1). Transferir 50 µL de soro da linha B para a linha C, homogeneizar com auxílio de micropipeta e transferir 50 µL dos soros para a linha D, e da D para a linha E e assim sucessivamente até a linha H (diluição final 1/128);
- e)** Desde que os soros tenham a toxicidade avaliada no método qualitativo, não é necessário avaliar a toxicidade no método quantitativo. Deste modo, adicionar 50 µL de MEM nas linhas B a H;
- f)** Em seguida, adicionar 100 µL do soro a ser testado nos poços A1 e A2 (amostra 1). O mesmo procedimento deve ser feito com uma amostra de soro reagente e uma de soro não reagente, com fins de controle de prova;
- g)** Transferir 50 µL de soro da linha A para a linha B, homogeneizar com auxílio de micropipeta e transferir 50 µL dos soros para a linha C, e da C para a linha D e assim sucessivamente até a linha H (diluição final 1/256);
- h)** Descartar 50 µL do material da linha H;
- i)** Manter pelo menos uma coluna da microplaca para controle de células.–Adicionar nesta coluna, 100 µL de MEM e 50 µL volume da suspensão celular utilizada na prova, conforme descrito no item l;
- j)** Retirar um criotubo do vírus da Doença de Aujeszky do ultrafreezer, o qual já deverá ter sido titulado pelo método de Reed-Muenchen. Este método será também empregado na titulação da diluição de trabalho do vírus (retrotitulação);
- k)** Diluir o vírus de acordo com o título para que no ensaio sejam utilizados aproximadamente 100 TCID₅₀/50 µL (DT- diluição de trabalho);
- l)** Adicionar 50 µL da diluição trabalho do vírus aos poços, com exceção do controle de toxidez (linha A) e da coluna de controle de células. Homogeneizar batendo suavemente na lateral da placa;
- m)** Incubar as microplacas a 37 ° C ± 1 °C, em estufa com 5% de atmosfera de CO₂ por um período de 1 hora ou 24 horas refrigerado;
- n)** Adicionar a todos os poços 50 µL de suspensão celular contendo 3,0 x 10⁵ células/mL com 10% SFB iniciando-se pela coluna referente ao controle de células;
- o)** Incubar as microplacas a 37 ° C ± 1 °C, em estufa com 5% de atmosfera de CO₂ por 72 horas;

p) Após o término do período de incubação realizar a leitura da microplaca em microscópio de luz com imagem invertida.

3.3.5.3. Retrotitulação

a) Preparar três diluições do vírus em base 10 a partir da diluição de trabalho (10^{-1} 10^{-2} e 10^{-3}). Essas três diluições serão utilizadas para a titulação da diluição de trabalho (retrotitulação);

b) Adicionar 50 μ L de MEM em três colunas de uma microplaca;

c) Adicionar 50 μ L de cada uma das diluições do vírus em uma coluna, começando pelo vírus mais diluído, de forma que possam ser utilizadas as mesmas ponteiros e o mesmo reservatório para todas as diluições do vírus;

d) Incubar as microplacas a $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$, em estufa com 5% de atmosfera de CO_2 por 1 hora ou 24 horas sob refrigeração;

e) Adicionar a todos os poços 50 μ L de suspensão celular contendo 225×10^5 células/mL com 10% SFB iniciando-se pela coluna referente ao controle de células;

f) Incubar as placas em estufa de CO com 5% de atmosfera de CO_2 por 72 horas;

g) Após o término do período de incubação realizar a leitura da microplaca em microscópio de luz com imagem invertida;

h) Cálculo do título deve ser feito pelo método de Reed-Muenchen com base na presença ou ausência de crescimento viral nas colunas inoculadas com as diluições do vírus.

3.3.6. Critérios de aceitação da prova

a) A prova estará válida quando a retrotitulação do vírus de prova na diluição de trabalho apresentar as doses infectantes dentro da variação $10^{2 \pm 0.5}$, que corresponde a 31 a 316 TCID₅₀/50 μ L;

b) Quando a retrotitulação do vírus de prova na diluição de trabalho apresentar título inferior a $10^{1.5}$ poderão ser validados os resultados das amostras não reagentes, e do mesmo, retrotitulação com título superior a $10^{2.5}$ poderão ser validados as amostras reagentes;

c) Será considerada válida a prova em que os soros controle se apresentarem dentro do comportamento esperado:

d) Soro controle REAGENTE, com ausência de efeito citopático (ECP) nos três poços (FIGURA 1 A);

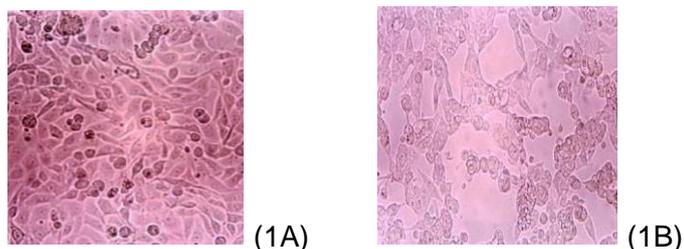
e) Soro controle NÃO REAGENTE, com presença de ECP nos três poços (FIGURA 1B);

f) Controle de toxicidade: na presença de toxicidade as amostras devem ser reanalisadas por ELISA ou pelo método quantitativo;

g) Controle de células apresentando tapete íntegro e todos os poços isentos de contaminação ou toxidez;

h) Se o resultado de um ou mais controles não atender aos critérios estabelecidos, os ensaios deverão ser repetidos. Estando em conformidade, avaliar o resultado das amostras.

FIGURA 1 – Cultivo de células PK₁₅ sem ECP (1A) e com a presença de ECP (1B) causado pelo vírus da Doença de Aujeszky.



Fonte: LFDA-MG

3.3.7. Interpretação dos resultados

3.3.7.1 Método qualitativo – resultados apresentados em triplicata

- a) Amostras não reagentes: presença de ECP nos três poços;
- b) Amostras reagentes: ausência de ECP nos três poços. Devem ser confirmadas pelo método quantitativo;
- c) Amostras inconclusivas: presença de ECP em um ou dois poços. Devem ser avaliadas pelo método quantitativo;
- d) Amostra tóxica: A amostra será considerada tóxica quando se observar a ausência de multiplicação celular, ou destruição das células por componentes do soro no poço de controle de toxidez. Geralmente é caracterizada pela sedimentação do cultivo semeado no fundo do poço. Na presença de toxicidade as amostras devem ser reanalisadas por ELISA ou pelo método quantitativo.
- e) Amostra contaminada - a amostra será considerada contaminada quando se observar o crescimento bacteriano ou fúngico no poço amostra processada.

3.3.7.2 Método quantitativo

- a) Amostras não reagentes: presença de ECP nos poços;
- b) Amostras reagentes: o título de um soro é expresso pelo denominador da mais alta diluição em que houve neutralização completa dos ECP do vírus em 50% dos poços. Se houver neutralização apenas na amostra não diluída solicitar nova colheita, pelo menos, oito dias após a primeira colheita. (QUADRO 1)
- c) Amostra tóxica: A amostra será considerada tóxica quando se observar a ausência de multiplicação celular, ou destruição das células por componentes do soro no poço de controle de toxidez. Geralmente é caracterizada pela sedimentação do cultivo semeado no fundo do poço. Na presença de toxicidade as amostras devem ser reanalisadas por ELISA ou pelo método quantitativo.
- d) Amostra contaminada - a amostra será considerada contaminada quando se observar o crescimento bacteriano ou fúngico no poço amostra processada.

QUADRO 1. Título neutralizante expresso pela recíproca da diluição mais alta do soro em que houve inibição da replicação viral em 50% dos poços.

DILUIÇÃO	TÍTULO	TÍTULO LOGARÍTMICO
1/2	2	0,3
1/4	4	0,6
1/8	8	0,9
1/16	16	1,2
1/32	32	1,5
1/64	64	1,8
1/128	≥ 128	$\geq 2,1$

3.3.8. Emissão dos resultados

a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, reagente, não reagente. Caso a amostra seja considerada reagente, deve ser descrito a valor do título final, que é expresso como o logaritmo da diluição em que houve 100% de Virusneutralização.

3.3.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

d) O laboratório deve assegurar a biosseguridade dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.3.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidos antes do descarte.

b) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

Identificação do Agente

3.4. Isolamento viral

3.4.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Placas de Petri;
- g) Frascos de vidro tipo penicilina com tampa;
- h) Tubo de centrífuga;
- i) Tubos de ensaio;
- j) Ponteiras descartáveis;
- k) Descartador de ponteiras;
- l) Reservatórios para soluções (cubetas);
- m) Papel absorvente;
- n) Microplacas para cultivo celular em poliestireno com 24 cavidades de fundo chato;
- o) Microplacas para cultivo celular em poliestireno com 96 cavidades de fundo chato;
- p) Caneta para identificação de vidraria;
- q) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação;
- r) Areia estéril;
- s) Filtro para seringa (0,45 µm);
- t) Gral e Pistilo;
- u) Tesoura cirúrgica e bisturi
- v) Seringa descartável;

3.4.2. Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica classe II A (requisito mínimo);
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Estufa com atmosfera de CO₂;
- f) Estufa;
- g) Banho seco ou que empregam água;
- h) Termômetros;
- i) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- j) Pipetador automático ou manual;
- k) Agitador de tubos;
- l) Microscópio invertido.
- m) Cronômetro
- n) Balança analítica;
- o) Centrífuga refrigerada.

3.4.3. Insumos

- a) Suspensão celular de linhagem sensível (PK-15 ou SK-6);
- b) Meio MEM (Meio Essencial Mínimo, reconstituído de acordo com o fabricante);
- c) Soro fetal bovino (SFB), livre de pestivirus (BVDV) e micoplasma;
- d) Solução de antibióticos e antifúngicos;

- e) Anticorpo hiperimune para o vírus da Doença de Aujeszky;
- f) Anticorpo anti-IgG de suíno marcada com isotiocianato de fluoresceína ou peroxidase;
- g) Cepas do vírus da Doença de Aujeszky;
- h) Ovoalbumina Grau V;
- i) Peróxido de hidrogênio 30 % (V/V);
- j) Tween 80 ou Tween 20

3.4.4. Soluções

- a) Meio MEM tratado com solução de antibióticos e antifúngicos;
- b) Ácido cítrico 0,2 %;
- c) Solução de antibióticos e antifúngicos.

3.4.5. Realização do ensaio

3.4.5.1. Preparo das amostras

- a) Selecionar os órgãos e tecidos encaminhados do mesmo animal que serão submetidos à prova e utilizar aproximadamente 0,5 cm³ de cada tecido;
- b) Remover o excesso de tecido conjuntivo;
- c) Recortar e macerar os fragmentos de cada órgão preparando um pool para cada requisição, utilizando gral, pistilo e MEM tratado com solução antimicrobiana até que se forme uma pasta homogênea. Pode ser utilizada areia estéril como abrasivo se necessário.
- d) Completar o volume com MEM resultando em uma suspensão de 20 % (P/V);
- e) Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos;
- f) Colher o sobrenadante, filtrar e colocar em frasco devidamente identificado; descartar o precipitado;
- g) Adicionar 100 µL de solução antimicrobiana;
- h) Encaminhar 400 µL de inóculo ou de fragmentos do tecido tratado com 1,0 mL de Trizol para diagnóstico molecular.

3.4.5.2. Sangue total ou plasma

- a) Caso sejam recebidas mais de uma amostra de sangue na requisição preparar um pool com volume final de 1,0 mL. Por exemplo para quatro amostras adicionar 250 µL de cada amostra;
- b) Adicionar 10 µL de solução antimicrobiana.

3.4.5.3. Passagens em células (suspensão celular)

- a) Adicionar 100 µL do inóculo de macerado de tecidos e 50 µL do inóculo de sangue total em um poço da microplaca de 24 poços. Caso seja utilizada uma garrafa de 25 cm² utilizar 0,5 mL de inóculo de macerado de tecidos ou 0,1 mL de sangue total;
- b) Acrescentar 1 mL de suspensão celular com 10 % de soro fetal bovino na concentração de 300.000 células/mL;
- c) Incubar a microplaca por 48 a 72 horas em estufa de CO₂.
- d) Fazer a leitura e registrar os resultados. Os materiais em que for observada contaminação não deverão ser submetidos à segunda passagem.
- e) Congelar a microplaca e descongelar;

- f) Inocular o material da primeira passagem em microplaca de 96 poços sendo que para cada poço da microplaca de 24 poços ou garrafa deverá ser utilizada uma coluna da microplaca de 96 poços;
- g) Inocular 10 µL do inóculo nos poços A1, B1, C1 e D1;
- h) Inocular 5 µL do inóculo nos poços E1, F1, G1 e H1;
- i) Adicionar 100 µL de células em todos os poços reservando uma coluna para o controle de células e uma para o controle de vírus;
- j) Para o controle de vírus utilizar uma amostra da cepa do VDA;
- k) Realizar a leitura dos cultivos por 72 horas em microscópio óptico. Amostras que apresentarem características de efeito citopático deverão ser encaminhadas para a confirmação por biologia molecular.

3.4.6. Critérios de aceitação das provas

- a) As provas de identificação do agente serão consideradas válidas quando os cultivos celulares sabidamente infectados (controles DETECTADOS) apresentam efeito citopático caracterizado pelo destacamento do cultivo celular e formação de células sinciciais e ausências de ECP nos cultivos que não foram infectados (controles NÃO DETECTADOS ou de células).
- b) Na presença de ECP deverá ser realizada a confirmação do isolamento por método molecular.
- c) Controle de células apresentando tapete íntegro em todos os poços isentos de contaminação ou toxidez.

3.4.7. Interpretação dos resultados

- a) DETECTADO - presença de ECP nos cultivos infectados pelo VDA, Fig. (1B).
- b) NÃO DETECTADO – ausência de ECP nos cultivos celulares Fig. (1A).
- c) CONTAMINADA - A amostra será considerada contaminada quando se observar o crescimento bacteriano ou fúngico no poço amostra processada.

3.4.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO” no isolamento viral do vírus para Doença de Aujeszky.

3.4.9. Descarte de Amostras e Resíduos

a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio

b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;

c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;

d) O laboratório deve assegurar a biosseguridade dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.4.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte.

b) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

3.5 Técnica de PCR convencional (PCR) para detecção do Herpesvírus suíno 1 (SuHV-1)

3.5.1. Materiais

- a)** Luvas de procedimento nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b)** Pipetas graduadas;
- c)** Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- d)** Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- e)** Estantes para microtubos;
- f)** Gaze ou papel toalha.

3.5.2. Equipamentos e instrumentos

a) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;

b) Geladeira;

c) Freezer;

d) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;

e) Pipetador automático ou manual;

f) Termociclador;

g) Balança de precisão;

h) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;

i) Agitador de microtubos;

j) Micro-ondas;

k) Cuba e fonte para eletroforese;

l) Microcomputador;

- m) Sistema de fotodocumentação;
- n) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional);

3.5.3. Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Mix de dNTP;
- c) Oligonucleotídeos para PCR (QUADRO 2);
- d) Kit de PCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);
- g) Corante para ácidos nucleicos;
- h) Marcador de peso molecular;
- i) Tampão de carregamento ("*loading buffer*");
- j) Gel de agarose;
- k) Controle DETECTADO para SuHV-1
- l) Sugestão de iniciadores apresentados no QUADRO 2.

QUADRO 2: Sugestão de oligonucleotídeos para PCR para detecção molecular de SuHV-1

Oligonucleotídeo	Tipo de PCR	Sequência	Referência
SuHV-1.gE.493.F	PCR	ccgcgggcccgtgtctttgt	Huang, 2004
SuHV-1.gE.493.R		cgtggccgttggtgcat	
SuHV-1.gC.788.F	Sequenciamento	gttctctgattcacgcccacgc	Goldberg, 2011
SuHV-1.gC.788.R		gaagggctcaccgaagaggac	

3.5.4 Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses;

3.5.5. Realização do ensaio

3.5.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NÃO DETECTADO (água ou tecido bovino ou suíno).

3.5.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico (PCR)

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.5.5.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (SuHV-1) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Adicionar o mix de reação a cada poço da microplaca (ou microtubos);
- c) Devem ser incluídos nas análises:
 - I. Controle DETECTADO para SuHV-1;
 - II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - III. Branco (água livre de nucleases).

3.5.5.4. Reação de PCR

- a) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos identificados com a numeração da amostra a ser testada;
- b) Realizar a amplificação em termociclador certificado, conforme as especificações de temperatura do protocolo utilizado.

3.5.5.5 Eletroforese

- a) Preparar o gel de agarose em concentração adequada ao protocolo de PCR utilizado. Adicionar um corante para ácidos nucleicos em proporção suficiente para visualização das bandas;
- b) Para a corrida das amostras, adicionar tampão de carregamento (*loading buffer*) ao produto de PCR;
- c) Aplicar marcador de peso molecular em um dos poços do gel;
- d) Realizar a corrida em cuba de eletroforese, utilizando o tempo e a voltagem adequados para o volume do gel e o protocolo de PCR utilizado;
- e) Visualizar o gel sob luz ultravioleta, fotografar com o auxílio de um fotodocumentador e analisar o resultado.

3.5.6. Critérios de aceitação da prova

- a) As amostras de controle DETECTADO para SuHV-1 devem apresentar bandas de tamanhos correspondentes aos *amplicons* do protocolo utilizado;
- b) As amostras de controle NÃO DETECTADO (controle NÃO DETECTADO da extração e branco) não devem apresentar bandas de amplificação.

3.5.7. Interpretação dos resultados

- a) Comparar os resultados das amostras testadas ao das amostras controle, a fim de classificá-las como positivas ou negativas;
- b) A leitura das bandas deve ser clara e livre de *amplicons* inespecíficos para o teste ser considerado satisfatório;
- c) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada.

3.5.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO” ou “NÃO DETECTADO”;
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.5.9. Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

3.6. Técnica de PCR em tempo real com transcrição reversa (qPCR) para SuHV-1

3.6.1 Materiais

- a) Luvas de procedimento, nitrílica ou de látex isentas de pó;
- b) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- c) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de qPCR;
- d) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de qPCR;
- e) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- f) Estantes para microtubos;
- g) Gaze ou papel toalha.

3.6.2 Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Termociclador para PCR em tempo real;
- g) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- h) Agitador de microtubos;
- i) Microcomputador;
- j) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.6.3 Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Oligonucleotídeos para qPCR (QUADRO 3);
- c) Controle DETECTADO para SuHV-1 (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);
- d) Kit de qPCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);
- g) Recomenda-se o uso de reações de passo único (*one step*) para síntese e amplificação de cDNA no mesmo tubo;
- h) Sugestão de iniciadores apresentada do Tabela 3.

QUADRO 3: Sugestão de oligonucleotídeos para qPCR para detecção molecular de SuHV-1

Oligonucleotídeo	Tipo de PCR	Sequência	Referência
SuHV-1.gB.92.F	qPCR	ctctgccgcacctgaag	Nonaka, 2017
SuHV-1.gB.92.R		gtctggaagcggtagaagcc	
SuHV-1.gB.92.P		FAM-cggaactcgctgacgcacca-NFQ	
SuHV-1.gE.136.F	qPCR	gatgcagggctcgtacac	Nonaka, 2017
SuHV-1.gE.136.R		ggacacgttcgacctgatg	
SuHV-1.gE.136.P		FAM-agcgtggcggtagaagtctcg-NFQ	

3.6.4 Soluções

- a) Solução de álcool 70° INPM;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAsas;

3.6.5. Realização do ensaio

3.6.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NÃO DETECTADO (água ou tecido bovino ou suíno).

3.6.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico por qPCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);

b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou álcool 70° INPM;

c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.6.5.3. Preparo do mix de reação

a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (SuHV-1) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;

b) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;

c) A adição de DNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);

d) Devem ser incluídos nas análises:

- I. Controle DETECTADO para SuHV-1;
- II. Controle NÃO DETECTADO da extração;
- III. Branco (água livre de nucleases);
- IV. Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.6.5.4. Reação de qPCR

a) Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;

b) Iniciar e entrar com os dados no *software* do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;

c) Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;

d) Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.6.6. Critérios de aceitação da prova

a) Para a validação do ensaio, o controle DETECTADO deve apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um C_q satisfatório;

b) O controle NÃO DETECTADO deve ter C_q indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle NÃO DETECTADO deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.6.7. Interpretação dos resultados

a) Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle DETECTADO, controle NÃO DETECTADO, controle da extração, background de fluorescência e gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;

b) O limiar de C_q a ser considerado DETECTADO deve ser avaliado conforme definido na verificação desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;

- c) Amostra com resultado inconclusivo: aquelas com valor de Cq intermediário entre o valor para detectado e não detectado.
- d) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada;
- e) Amostras positivas devem ser submetidas a sequenciamento para genotipagem viral.

3.6.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO”, “NÃO DETECTADO” ou “INCONCLUSIVO”
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.6.9. Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 90 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

Referências Bibliográficas

Aujeszky's disease (infection with Aujeszky's disease virus). CHAPTER 3.1.2. Version (NB: Version adopted in May 2018). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 2021, versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 16 de jun. de 2021.

Goldberg TL, Weigel RM, Hahn EC, Scherba G. **Comparative utility of restriction fragment length polymorphism analysis and gene sequencing to molecular epidemiological investigation of a viral outbreak**. Epidemiol. Infect. 2001, 126, 415–424.

Huang C, Hung JJ, Wu CY, Chien MS. **Multiplex PCR for rapid detection of pseudorabies virus, porcine parvovirus and porcine circoviruses**. Vet Microbiol. 2004 Jul 14;101(3):209-14.

Nonaka CKV, Fonseca Junior AA, Guedes EO, D'Ambros, RM, Lima, GK, Camargos MF, Heinemann MB (2017). **Different methods of real-time PCR for detection of pseudorabies virus**. Ciência Rural, 47(3), e20160342.

Reed LJ, Muench H. **A simple method of estimating fifty per cent endpoints**. Am J Hyg. 1938; 27:493–497.

CAPÍTULO 2.6.6

LÍNGUA AZUL

1. Amostras

São consideradas amostras para o diagnóstico da Língua Azul:

1.1. Detecção da Resposta Imune

a) Soro sanguíneo

1.2. Identificação do Agente

- a) Sangue total;
- b) Baço;
- c) Fígado;
- d) Medula óssea;
- e) Linfonodos;

2. Recebimento das Amostras

2.1. Disposições Gerais

2.1.1. Para atendimento aos Programas e Controles Oficiais do MAPA os Laboratórios credenciados somente receberão as amostras previstas na legislação em vigor para as finalidades e ensaios previstos no seu escopo de credenciamento.

2.1.2. Deverão ser obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo de verificação de conformidade de amostras.

3. Técnicas de Diagnóstico

3.1. Disposições Gerais

3.1.1. Somente poderão ser utilizados insumos de diagnóstico que tenham registro no MAPA, segundo legislação em vigor;

3.1.2. Todos os insumos utilizados na análise devem ser controlados e previamente testados e aprovados;

3.1.3. O laboratório deverá realizar os ensaios obedecendo as temperaturas preconizadas pelo fabricante dos insumos

a) Quando esta informação não constar na bula o laboratório deverá consultar o fabricante, mesmo que a indicação seja de realização a temperatura ambiente

b) Quando não informado pelo fabricante, serão considerados como temperatura ambiente, valores de temperatura entre 18 a 25°C.

3.1.4 Antes da utilização dos insumos, realizar a avaliação de todos os parâmetros referentes aos lotes e valores de ponto de corte dos critérios interpretação dos resultados;

3.1.5 O laboratório deve estabelecer um meio de avaliação apropriado para todos os insumos utilizados nos ensaios;

3.1.6. Devem ser retidos os registros dos controles dos ensaios realizados, devendo ser registrada data e responsável de todas as etapas realizadas para cada amostra analisada;

3.1.7. Os resultados encontrados para cada amostra e controles, dados dos insumos utilizados e outras informações pertinentes devem ser registrados em formulários próprios do laboratório.

Detecção da Resposta Imune

3.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

3.2.1. Materiais

- a) Luvas para procedimentos
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Ponteiras descartáveis;
- g) Descartador de ponteiras;
- h) Reservatórios para soluções (cubetas);
- i) Papel absorvente;
- j) Selador ou tampa para placas de ELISA;
- k) Caneta para identificação de vidraria;
- l) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.3.8 Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Geladeira;
- c) Estufa;
- d) Termômetros
- e) Micropipetas monocal e multicanal de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Leitora de ELISA;
- h) Cronômetros;
- i) Agitador de tubos tipo vórtex (opcional);
- j) Agitador de microplacas (opcional);
- k) Lavadora de microplacas (opcional);

3.2.3. Insumos

- a) Kits de ELISA de detecção de anticorpos para o vírus da Língua Azul.

3.2.4. Soluções

- a) No preparo das soluções deve ser utilizado somente os reagentes fornecidos pelo fabricante, ou aqueles por ele indicados.
- b) Conjugados, substratos e solução de parada deverão ser utilizados obedecendo-se as condições do fabricante;

- c) No preparo da solução de lavagem deve-se assegurar que não existem cristais precipitados na solução;
- d) Diluir a soluções utilizando água ultrapura ou destilada conforme instruções do fabricante e homogeneizar bem.

3.2.5. Realização do ensaio

- a) Para realização dos ensaios de ELISA devem ser consideradas as orientações do fabricante do kit de diagnóstico utilizado. Atentar para ocorrência de atualização na bula do kit, principalmente em mudanças de lote;
- b) A ordem de execução das etapas do ensaio, duração, volumes utilizados e temperatura de incubação variam de acordo com fabricante do kit utilizado;
- c) Homogeneizar gentilmente todos reagentes e amostras antes do uso;
- d) Utilizar ponteiros distintos para cada controle e amostra de soro;
- e) Homogeneizar as placas tocando-as na lateral ou utilizando um agitador de placas;
- f) Nas etapas de incubação, as placas devem ser seladas para se evitar evaporação;
- g) As placas devem ser lavadas com a solução indicada pelo kit. Após a última lavagem remover resíduos em um material absorvente (papel toalha ou toalha). Deixar as placas secas o mínimo de tempo possível entre a lavagem e adição do próximo reagente;
- h) Decorridas todas as etapas do teste, realizar a leitura da absorbância na leitora de ELISA utilizando filtro com comprimento de onda indicado nas instruções do fabricante.

3.2.6. Critérios de aceitação do Ensaio

- a) O resultado do ensaio será considerado válido somente se as DOs dos soros controles estiverem dentro dos limites aceitáveis e determinados pelo fabricante. Caso contrário, o ensaio deve ser repetido.

3.2.7. Interpretação dos resultados

- a) De acordo com as DOs obtidas consideram-se as amostras como reagentes ou não reagentes;
- b) Amostras com DO entre os dois pontos de corte estabelecidos serão consideradas inconclusivas e deverão ser novamente ensaiadas.

3.2.8. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como, “REAGENTE”, “NÃO REAGENTE”, ou de acordo com o preconizado com o fabricante do insumo (kit de diagnóstico).

3.2.9. Descarte de Amostras e Resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 5. Retenção de Itens de Ensaio
- b) Todo material utilizado na realização do ensaio deve ser imerso em cuba com solução de ácido cítrico 0,2%, hipoclorito de sódio 0,5% ou solução para descontaminação similar, por no mínimo de 1 hora;
- c) Após este período, todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado e validado. A efetividade de esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório;
- d) O laboratório deve assegurar a biosseguridade dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo processo de descarte.

3.2.10. Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Poderão ser descartados 60 dias após a emissão do relatório de ensaio, registrando-se nos formulários próprios e conferidos antes do descarte.

- b) Amostras positivas de qualquer origem devem ser armazenadas de forma permanente, incluindo todos os registros e documentação pertinente, devendo elas serem registradas e controladas pelo laboratório responsável pela análise.

3.3 Técnica da imunodifusão em gel-ágar (IDGA) para pesquisa de anticorpos para o vírus da Língua Azul

O IDGA para Língua Azul não tem especificidade que consiga diferenciar exclusivamente entre anticorpos para os sorogrupos e para a Doença Hemorrágica Epizootica BT e EHD, portanto, não pode ser usado definitivamente para detectar anticorpos para BTV como uma reação positiva pode ter sido o resultado de uma infecção para outra espécie de Orbivirus.

3.3.1 Materiais

- a) Luvas para procedimentos;
- b) Pipetas de vidro graduadas ou descartáveis;
- c) Provetas graduadas;
- d) Béqueres;
- e) Erlenmeyers;
- f) Balão volumétrico;
- g) Ponteiras descartáveis;
- h) Placa de Petri de poliestireno de 90mm ou 30-40mm de diâmetro;
- i) Descartador de ponteiras;
- j) Caneta para identificação de vidraria;
- k) Cubas para descarte de materiais resistente à autoclavação.

3.3.2 Equipamentos

- a) Autoclave;
- b) Geladeira;
- c) Freezer;
- d) Microondas;
- e) Micropipetas monocanal de volumes reguláveis;
- f) Pipetador automático ou manual;
- g) Balança analítica;
- h) Medidor de pH;
- i) Destilador ou deionizador de água;
- j) Centrifuga;
- k) Autoclave;
- l) Cortador de gel padrão;
- m) Câmara Úmida;
- n) Fonte de luz;
- o) Bomba de vácuo (opcional);
- p) Bancada nivelada.

3.3.3 Insumos

- a) Antígeno do vírus da língua azul para prova de imunodifusão em ágar-gel - IDGA;
- b) Soro controle positivo para o vírus da língua azul;
- c) Soros controle forte-positivo, fraco-positivo e negativo para o vírus da língua azul.

3.3.4 Soluções

- a) Gel de ágar a 0,9% em solução salina 0,85%.

3.3.4 Realização do ensaio

3.3.4.1 Preparação das Lâminas ou Placas de Petri

- a) Identificar as lâminas ou placas de petri conforme o formulário de acompanhamento do ensaio utilizando caneta apropriada;
- b) Aquecer o Gel de ágar a 0,9%, em microondas, por tempo necessário até a completa fusão, evitando o borbulhamento e extravasamento;
- c) Distribuir o gel na lâmina ou placa de petri e deixá-lo solidificar em temperatura ambiente (20°C a 25°C) ou de refrigeração (2 a 8°C) durante 30 minutos;
- d) Perfurar o gel com auxílio do cortador padrão, posicionando as rosetas de forma equidistante;
- e) Remover o gel dos poços das rosetas;
- f) Armazenar as lâminas ou placas de petri na câmara úmida se não forem utilizadas imediatamente, para evitar o ressecamento do gel.

3.3.4.2. Execução

- a) Homogeneizar as amostras antes do uso;
- b) Distribuir as amostras a serem testadas, alternadamente.
- c) Distribuir o soro controle positivo (SP), alternadamente com as amostras testadas.
- d) Distribuir o antígeno (Ag) no poço central.

- e) Durante a distribuição evitar o extravasamento de material dos poços. Quando corretamente distribuídos, a superfície fica levemente côncava. Em caso de extravasamento, descartar a lâmina;
- f) Incubar em câmara úmida durante 48 horas;
- g) Registrar a temperatura, no momento inicial da incubação, com 24 horas e 48 horas;
- h) Realizar a leitura após 48 horas de incubação com auxílio de uma fonte de luz;
- i) O resultado final somente será emitido após a leitura com 48 horas.

3.3.5. Critérios de aceitação

- a) As linhas de precipitação que indicam a interação antígeno-anticorpo devem se formar entre os poços em que foram adicionados os soros controle sabidamente positivos e o antígeno.
- b) Os soros controles devem apresentar linhas de precipitação dentro do esperado;
- c) Caso as linhas estejam fracas para serem visualizadas, incubar por mais 24 horas e realizar a leitura novamente.

3.3.6. Interpretação dos resultados

- a) Amostra reagente: a linha de precipitação do soro controle se une com a formada pelo Ag e pela amostra, apresentando uma linha contínua, de identidade total;
- b) Amostra fraco reagente: a linha de precipitação de uma amostra com baixa concentração de anticorpos tende a se formar mais próxima à cavidade onde a amostra se encontra;
- c) Amostra não reagente: a linha de precipitação formada entre o Ag e o soro controle se dirige para a cavidade onde se encontra a amostra;
- d) Amostra inespecífica: ocasionalmente se formam linhas de precipitação entre os soros e/ou entre soros e antígeno, que não têm identidade com a linha do soro controle positivo. Estas linhas cruzam a linha de precipitação formada entre o soro controle positivo e o antígeno. As presenças de reações inespecíficas podem ocorrer concomitantes com uma reação positiva entre o soro problema e o antígeno ou com uma reação negativa entre ambos. A linha não específica não forma uma linha contínua com as linhas do SCP.

3.3.7. Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expresso como “POSITIVO” ou “NEGATIVO”.
- b) Soros positivos para AGID devem ser testados novamente usando um ensaio específico para sorogrupo, Virusneutralização ou ELISA, se a especificidade por sorogrupo for necessária.

3.3.8 Descarte das amostras e resíduos

- a) Antes da realização do descarte de amostras e produtos de ensaio deverão ser observados os prazos mínimos estabelecidos no item 3.3.9.
- b) Todo o material utilizado na realização do ensaio deve ser submetido ao processo de autoclavação apropriado. A efetividade da esterilização deve estar comprovada em procedimentos próprios do laboratório e devem ser utilizados controles físicos, químicos e biológicos para o monitoramento do processo;

- c) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- d) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados, e seguir as legislações ambientais vigentes durante todo o processo do descarte.

3.3.9 Retenção de itens de ensaio

a) Soro sanguíneo

Após um período mínimo de 90 dias da emissão do relatório de ensaio, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se em formulários próprios e conferidas antes do descarte.

3.6. Técnica de RT-qPCR para o vírus da BTV

3.5.1 Materiais

- o) Luvas de procedimento nitrílicas ou de látex isentas de pó;
- p) Microtubos de volumes variados ou microplacas;
- q) Microplacas ou microtubos para leitura óptica de RT-qPCR;
- r) Tampas adesivas para microplacas para leitura óptica de RT-qPCR;
- s) Ponteiras com filtro, estéreis, livres de DNAses e RNAses;
- t) Estantes para microtubos;
- u) Gaze ou papel toalha.

3.5.5 Equipamentos e instrumentos

- a) Autoclave;
- b) Cabine de segurança biológica com filtro HEPA classe II (requisito mínimo) ou estação de trabalho para PCR (Workstation PCR) com luz UV germicida;
- c) Geladeira;
- d) Freezer;
- e) Micropipetas mono e multicanais de volumes reguláveis;
- f) Termociclador para PCR em tempo real;
- g) Centrífuga refrigerada com rotores para microtubos;
- h) Agitador de microtubos;
- i) Microcomputador;
- j) Equipamento para extração automatizada de ácidos nucleicos (opcional).

3.5.6 Insumos

- a) Água livre de nucleases;
- b) Oligonucleotídeos para RT-qPCR (QUADRO 2);
- c) Controle DETECTADO para o vírus da BTV (sempre utilizar RNA viral para averiguar eficiência da transcrição reversa);
- d) Kit de RT-qPCR;
- e) Kit de extração de RNA (automática);
- f) Trizol (manual);

- g)** Recomenda-se o uso de reações de passo único (*one step*) para síntese e amplificação de cDNA no mesmo tubo.

QUADRO 2: Sugestão de oligonucleotídeos para RT-qPCR para detecção molecular do vírus da BTV (VCSF)

Oligonucleotídeo	Tipo de PCR	Sequência	Referência
BTV.west.91F	RT-qPCR	GCTTTTGAGGTGTACGTGAAC	Shaw et al., 2007
BTV.west.91R		TCTCCCTTGAAACTCTATAATTACG	
BTV.East.97F		GCGTTCGAAGTTTACATCAAT	
BTV.East.97R		CAGTCATCTCTAGACACTCTATAATTACG	
BTV.west/east.S		FAM-CYG GAT CAA GTT CAC TCC AYG GC-Iowa Black	
BTV.OIE.2014.F	RT-qPCR	TGG-AYA-AAG-CRA-TGT-CAA-A	Hofmann et al., 2008
BTV.OIE.2014.R		ACR-TCA-TCA-CGA-AAC-GCT-TC	
BTV.OIE.2014.S		FAM-ARG-CTG-CAT-TCG-CAT-CGT-ACG- C-IowaBlack	
BTV.S5.76.F	RT-qPCR	GGCAACYACCAAACATGGA	Toussaint et al., 2007
BTV.S5.76..R		AAAGTYCTCGTGGCATTWGC	
BTV.S5.76..P		FAM-CYCCACTGATRTTGTATTTTCTCAA-TAMRA	

3.5.7 Soluções

- a) Solução de Álcool 70%;
- b) Solução descontaminante de DNA e DNAses.

3.5.5. Realização do ensaio

3.5.5.1. Extração de RNA

- a) A extração pode ser realizada de forma automatizada ou manual, através de kits de extração de RNA ou reagentes específicos para o tipo de material a ser analisado, seguindo as recomendações do fabricante;
- b) Não utilizar reagentes após a data de validade e não misturar reagentes de lotes diferentes;
- c) Adicionar as seguintes amostras controle a cada procedimento de extração: controle NÃO DETECTADO (água ou tecido bovino ou suíno).

3.5.5.2. Reação de amplificação de ácido nucleico por RT-qPCR

- a) Realizar o ensaio em duas áreas separadas: uma para o preparo do mix de reação (sala de pré-PCR) isenta de material genético e *amplicons*, e outra para a transferência de DNA para placa ou microtubos (sala de PCR);
- b) Antes e após o preparo do mix de reação, descontaminar a cabine e os materiais a serem utilizados com solução descontaminante (para DNA, RNA, proteínas e nucleases) e/ou Álcool 70° INPM;
- c) As micropipetas utilizadas para o preparo do mix de reação e adição das amostras devem ser exclusivas para tais finalidades.

3.5.5.3. Preparo do mix de reação

- a) Preparar o mix de reação de acordo com protocolos validados e específicos para o agente pesquisado (vírus da BTV) em quantidade suficiente para o número de amostras a serem testadas, considerando algumas a mais;
- b) Após o preparo do mix, adicionar o RNA nos poços da placa ou em microtubos para leitura óptica;
- c) A adição de DNA e das amostras controle deve ser realizada em uma área distinta do preparo do mix (sala de PCR);
- d) Devem ser incluídos nas análises:
 - V. Controle DETECTADO para vírus da BTV;
 - VI. Controle NÃO DETECTADO da extração;
 - VII. Branco (água livre de nucleases);
 - VIII. Controle DETECTADO e NÃO DETECTADO do kit utilizado (se houver).

3.5.5.4. Reação de RT-qPCR

- a) Selar a placa com adesivo óptico ou fechar a tampa dos microtubos. Verificar se há bolhas no fundo do poço e/ou gotículas na parede dos poços da placa ou tubo. Caso isto ocorra, centrifugar brevemente para reduzir as bolhas e para que o conteúdo se posicione na parte inferior da placa ou tubo;
- b) Iniciar e entrar com os dados no *software* do termociclador (identificação das amostras e seleção dos fluoróforos), conforme especificações do fabricante;
- c) Inserir a placa ou os tubos no termociclador, salvar o arquivo e iniciar a corrida;
- d) Ao finalizar, salvar os dados e interpretar os resultados.

3.5.9 Critérios de aceitação da prova

- a) Para a validação do ensaio, o controle DETECTADO deve apresentar uma curva sigmoide (em forma de S) e um Cq satisfatório;
- b) O controle NÃO DETECTADO deve ter Cq indeterminado ou maior que o limite do kit. O gráfico do controle NÃO DETECTADO deve apresentar traços de fluorescência na linha de base durante todo o ensaio. Esses traços não devem apresentar curva sigmoide ou um aumento gradual na fluorescência.

3.5.10 Interpretação dos resultados

- a) Ao analisar os resultados da corrida, o operador deve avaliar os seguintes componentes: controle DETECTADO, controle NÃO DETECTADO, controle da extração, background de fluorescência e

gráficos de amplificação de cada amostra individualmente. Após a validação do ensaio, interpretar os resultados conforme especificações do fabricante;

- b) O limiar de Cq a ser considerado DETECTADO deve ser avaliado conforme definido na verificação de desempenho da técnica ou conforme consta a literatura;
- c) Amostra com resultado inconclusivo: aquelas com valor de Cq intermediário entre o valor para detectado e não detectado.
- d) Qualquer amostra questionável deverá ser retestada;
- e) Amostras positivas devem ser submetidas a sequenciamento para genotipagem viral.

3.5.11 Emissão dos resultados

- a) Os resultados deverão ser emitidos em documento denominado “Relatório de Ensaio” e expressos como “DETECTADO”, “NÃO DETECTADO” ou “INCONCLUSIVO”
- b) Expressar a quantidade de alíquotas positivas ou negativas dentre o total de alíquotas analisadas.

3.5.10 Descarte das amostras e Resíduos

- a) Após um período mínimo de 30 dias da realização das análises, as amostras negativas poderão ser descartadas, registrando-se nos formulários próprios e conferidas antes do descarte;
- b) Os materiais descartados devem ser separados adequadamente entre resíduos químicos e biológicos;
- c) O laboratório deve assegurar a biossegurança dos resíduos gerados e seguir as legislações ambientais vigentes para o descarte.

Referências Bibliográficas

Bluetongue (Infection with Bluetongue virus). CHAPTER 3.1.3. Version (NB: Version adopted in May 2021). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2021**, versão online. versão online. Disponível em: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em 20 jun. 2021

Hofmann M, Griot C, Chaignat V, Peler L, Thuer B. Bluetongue disease reaches Switzerland. Schweiz. Arch. Tierheilk. 150:115-126.

Shaw AE, Monaghan P, Alpar HO, Anthony S, Darpel KE, Batten CA, Guercio A, Alimena G, Vitale M, Bankowska K, Carpenter S, Jones H, Oura CA, King DP, Elliott H, Mellor PS, Mertens PP. Development and initial evaluation of a real-time RT-PCR assay to detect bluetongue virus genome segment 1. J Virol Methods. 2007 Nov;145(2):115-26. doi: 10.1016/j.jviromet.2007.05.014. Epub 2007 Jun 21. PMID: 17586061.

Toussaint JF, Sailleau C, Breard E, Zientara S, De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. J Virol Methods. 2007 Mar;140(1-2):115-23. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.11.007. Epub 2006 Dec 28. PMID: 17196266.