

10.4. Preparar os demais padrões de hemólise misturando volumes proporcionais da SE com a SH como mostrado na Tabela 7, a seguir:

Tabela 7: Preparo dos PC.

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	---

11. Execução da prova de FC (microtécnica).

11.1. Preparar uma suspensão de eritrócitos com 3 % de volume celular (item 6.4).

11.2. Preparar uma solução de HL para a prova (item 6.5).

11.3. Sensibilizar os eritrócitos (item 6.6).

11.4. Preparar uma solução de C' para a prova (item 6.7).

11.5. Preparar uma suspensão de Ag para a prova (item 6.8).

11.6. Preparar PC com 0 %, 25 %, 50 %, 75 % e 100 % de hemólise (item 6.9).

11.7. Diluir as amostras de soro em teste a 1:2 (60 ?L de soro + 60 ?L de tampão de uso).

11.8. 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).

11.9. Identificar a(s) placa(s) reservando a linha H para o controle anticomplementar do soro (CAC S) e a coluna 12 para os padrões de cor (PC).

11.10. 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.

11.11. Distribuir 25 µL de tampão de uso em todas as orifícios, exceto nos sombreados, de acordo com a tabela 08, a seguir:

Tabela 08: Distribuição dos reagentes na microplaca para teste.

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.

11.12. 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.

11.13. 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.

11.14. Distribuir 25 µL de antígeno diluído em cada orifício das colunas 01 até 11, exceto na linha H.

11.15. Distribuir 25 µL de C' 5 CH50 em todos os orifícios das colunas 01 até 11.

11.16. Agitar a placa por um minuto em agitador de microplaca.

11.17. Incubar a placa tampada em estufa a 37 °C + 2 °C por 30 minutos.

11.18. Distribuir 25 µL de suspensão de eritrócitos sensibilizados (ES), em todos os orifícios das colunas 01 até 11, inclusive na linha H.

11.19. Distribuir 100 µL de cada padrão de cor na coluna 12.

11.20. Agitar a placa por um minuto em agitador de microplaca.

11.21. Incubar em estufa a 37 °C + 2 °C por 30 minutos, com agitação aos 15 minutos.

11.22. Centrifugar a microplaca a 900 x g por 5 minutos.

11.23. 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.

12. Controles.

12.1. Controle do C'.

12.1.1. É realizado em macrovolumes, em paralelo com a prova.

12.1.2. Distribuir 700 µL de tampão de uso em 04 tubos.

12.1.3. Distribuir 50 µL de C' 5 CH50 em cada um dos tubos.

12.1.4. Incubar em banho-maria a 37 °C + 2 °C por 30 minutos.

12.1.5. Adicionar 250 µL da suspensão de ES em cada tubo.

12.1.6. Incubar em banho-maria a 37 °C + 2 °C por 30 minutos, com agitação aos 15 minutos.

12.1.7. Adicionar 1 mL de tampão de uso gelado, entre 2 °C e 8 °C, em cada tubo e centrifugar a 1500 x g por 10 minutos e determinar a DO em cada tubo.

12.1.8. Calcular a porcentagem de hemólise em cada tubo comparando os resultados obtidos com o tubo contendo 100 % de hemólise e determinar a média.

12.1.9. 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.

12.1.10. Calcular a absorbância média dos 04 tubos. O teste será considerado válido se o valor encontrado variar entre 25 % e 75 % de hemólise.

12.2. Controle de reagentes.

12.2.1. Poderá ser realizado alternativamente ao controle do C'.

12.2.2. É realizado em microvolumes, juntamente com o teste.

12.2.3. Reservar a coluna 11 e o orifício 12 H para este controle.

12.2.4. Distribuir os reagentes e realizar a leitura conforme tabela 09, a seguir:

Tabela 09: 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	---	0	
	B	2,5 CH ₅₀	25	25	25	---	Traços	
	C	1,25 CH ₅₀	25	25	25	---	+1 a +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	

12.3. Interpretação.

12.3.1. A prova será considerada válida se todos os controles derem os resultados esperados.

12.3.2. Se um dos controles falhar e os demais derem os resultados esperados o técnico que realizou a prova deverá realizar análise crítica dos resultados juntamente com o responsável pelo DDB e os dois deverão julgar a validade ou não da prova.

12.3.3. Se dois dos controles apresentarem resultados não esperados, invalidar e repetir a prova, após análise da causa dos fatos ocorridos.

12.3.4. 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.

12.3.5. 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.

12.3.6. A interpretação dos resultados é baseada no percentual de hemólise dos eritrócitos sensibilizados, comparado com o padrão de cor, conforme tabela 10, a seguir.

Tabela 10: Interpretação da prova de FC.

% hemólise	% Fixação do Complemento	Resultado do orifício	Escore
00	100	Positivo	+ 4
25	75	Positivo	+ 3
50	50	Positivo	+ 2
75	25	Positivo	+ 1
75 a 100	00 a 25	Negativo	T
100	00	Negativo	0

12.3.7. 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.

12.3.8. 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.

12.3.9. No controle anticomplementar do soro, os eritrócitos deverão estar completamente lisados.

12.4. Resultados.

12.4.1. A interpretação dos resultados é de responsabilidade do solicitante com base no histórico do animal e/ou rebanho e legislação vigente.

12.4.2. Os resultados referem-se única e exclusivamente as amostras enviadas ao laboratório.

12.4.3. Expressar o resultado na forma de título ou de Unidades Internacionais de Fixação de Complemento (ICFTU).

12.4.4. O título será a maior diluição onde ocorreu, pelo menos, 25 % de fixação de complemento, isto é, 75 % de hemólise ou +1.

12.4.4.1. Reagente: título ≥ 4 com mínimo de 25% de fixação de complemento.

12.4.4.2. Não Reagente: título < 4.

12.4.4.3. Reagente: ≥ 20 ICFTU/mL.

12.4.4.4. Não Reagente: < 20 ICFTU/mL.

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 37, DE 18 DE SETEMBRO DE 2017

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o disposto na Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003, no Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004, na Instrução Normativa nº 9, de 2 de junho de 2005, na Instrução Normativa nº 24, de 16 de dezembro de 2005, e o que consta do Processo nº 21000.005235/2012-18, resolve:

Art. 1º A Instrução Normativa nº 48, de 24 de setembro de 2013, passa a vigorar com a seguinte redação:

"Art.17....."

I - ser de tela de malha nas dimensões máximas de 87 (oitenta e sete) centésimos de milímetro por 30 (trinta) centésimos de milímetro, tanto na cobertura, quanto nas laterais;

....." (NR)

Art. 2º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

BLAIRO MAGGI

PORTARIA Nº 2.018, DE 13 DE SETEMBRO DE 2017

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso de suas atribuições que lhe confere o art. 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o disposto no Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, que regulamenta os arts. 27-A, 28-A e 29-A da Lei nº 8.171, de 17 de

janeiro de 1991, e organiza o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA), e o disposto na Portaria Ministerial nº 91, de 10 de maio de 2016, e o que consta do Processo SEI nº 21000.023069/2017-38, resolve:

Art. 1º Instituir o Comitê Científico da Secretaria de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Parágrafo único. O Comitê Científico tem como objetivo assessorar o Secretário da SDA nas ações do Plano de Defesa Agropecuária (PDA) contidas no Eixo do Conhecimento e Inteligência Estratégica, bem como atender outras demandas técnicas da Secretaria.

Art. 2º O Comitê Científico será composto por 5 (cinco) membros titulares, e respectivos suplentes em caso de ausência ou impedimento, designados por portaria do Secretário da SDA, sendo:

I - Um representante da Coordenação de Gestão Estratégica e Inteligência - CGE/SDA;

II - Um representante dos departamentos da área animal da SDA;

III - Um representante dos departamentos da área vegetal da SDA;

IV - Um representante da Coordenação Geral de Laboratórios Agropecuários - CGAL/SDA;

V - Um representante da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa.

§ 1º Todos os membros indicados, titulares e suplentes, deverão ter a titulação de doutorado.

§ 2º Dentre os membros indicados, o Secretário da SDA designará o Coordenador do Comitê e seu substituto.

§ 3º Para a designação do representante da Embrapa, o Secretário da SDA submeterá consulta formal ao Diretor-Executivo de Pesquisa e Desenvolvimento daquela Empresa.

§ 4º A Coordenação-Geral de Operações (CGOP/SDA) prestará apoio logístico e de secretariado ao Comitê Científico.

§ 5º Os integrantes do comitê desempenharão as suas atividades sem prejuízo das funções que ordinariamente exercem nesse Ministério.

§ 6º A participação dos integrantes no comitê não enseja qualquer tipo de remuneração.

§ 7º As reuniões e comunicações do comitê serão realizadas preferencialmente por meio eletrônico quando necessário, objetivando evitar despesas com diárias e passagens.

Art. 3º O Comitê Científico poderá, no desenvolvimento de suas funções, constituir grupos de trabalho para a realização de tarefas específicas, bem como convidar especialistas para contribuir com suas atividades.

Art. 4º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

BLAIRO MAGGI

PORTARIA Nº 2.048, DE 19 DE SETEMBRO DE 2017

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o disposto no Decreto nº 8.701, de 31 de março de 2016, o que consta no Processo 21000.041180/2016-25, e o disposto no parágrafo único