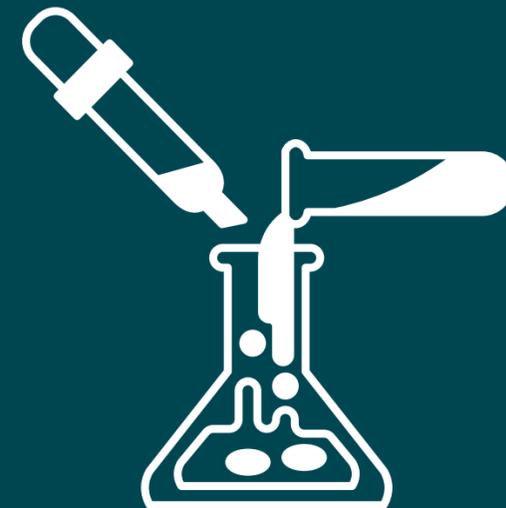


PLANO DE CONTINGÊNCIA LABORATORIAL

INFLUENZA AVIÁRIA DE ALTA
PATOGENICIDADE (IAAP)

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA - MAPA



© 2023 Ministério da Agricultura e Pecuária.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, 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.
1ª ed. Ano 2023.

Elaboração, distribuição, informações:

Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA | Ministro Carlos Fávaro

Secretaria de Defesa Agropecuária - SDA | Secretário Carlos Goulart

Departamento de Serviços Técnicos - DTEC | Diretor José Luis Ravagnani Vargas

Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários - CGAL | Coordenador-Geral Rodrigo Barbosa Nazareno

Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Anexo B, 4º andar, sala 430

CEP: 70043-900, Brasília - DF

Tel.: (61) 3225-5098

www.gov.br/agricultura/pt-br

e-mail: cgal@agro.gov.br

Central de Relacionamento: 0800 704 1995

Equipe Técnica:

Elaboração:

Daniel Nogoceke Sifuentes - CDI/CGAL/DTEC/SDA

Jorge Caetano Junior - CDL/CGAL/DTEC/SDA

Lorena Ribeiro Martins - CDL/CGAL/DTEC/SDA

Revisão:

Ana Cristina Gonçalves Pinto da Rocha - CDL/CGAL/DTEC/SDA

Dilmara Reischak - LFDA-SP/CGAL/DTEC/SDA

Leandro Barbieri de Carvalho - CDL/CGAL/DTEC/SDA

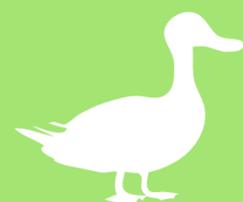
Diagramação:

Louise Jank - StDL/CGAL/DTEC/SDA

Matheus Bernardes Paim Lalis - StDL/CGAL/DTEC/SDA

Tiago Silveira Fernandes - StDL/CGAL/DTEC/SDA

Índice



1. Introdução	04
1.1 Diagnóstico da Influenza Aviária (IA)	04
2. Objetivos do Plano e definições	07
2.1. Objetivo	07
2.2. Meios de conservação para o transporte de amostras	07
2.3. Detecção do Agente	08
2.4. Testes sorológicos	09
3. Diagnóstico da IA na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários	10
3.1 Fluxograma para processamento de amostras de vigilância ativa em Laboratório	14
Vigilância Ativa	14
Vigilância passiva	16
4. Níveis de alerta e ações pertinentes	17
5. Distribuição, acesso e manutenção do Plano	19
6.1 Diretrizes e Regulamentos Nacionais e Regionais relevantes para o planejamento de contingência	20
7. Situação dos Laboratórios	21
7.1 Capacidade operacional	21
7.2 Instalações biosseguras para diagnóstico de IA	22
7.3 Aquisição e disponibilização de Insumos para diagnóstico laboratorial da IA	23
8. Execução do plano	24
8.1 Lista de verificação para nível de alerta A	24
8.2 Lista de verificação para nível de alerta B	25
8.3 Lista de verificação para nível de alerta C	26
8.4 Lista de Verificação do Nível de Alerta D	27
9. Comunicação	28
10. Apêndice	30
11. Referências	31

1. Introdução

1. 1. Diagnóstico da Influenza Aviária (IA)

A influenza A é causada por vírus específicos que são membros da família *Orthomyxoviridae* pertencentes ao gênero *Alphainfluenzavirus* (Influenzavirus A ou influenza A vírus). Além do gênero influenza A, há os gêneros influenza B e influenza C, mas apenas os vírus influenza A são conhecidos por infectar aves. De acordo com o Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para os Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) em sua última versão, aprovada em maio de 2022, o diagnóstico da influenza aviária é realizado por meio do isolamento do vírus ou pela detecção e caracterização de fragmentos de seu genoma, considerando que as infecções em aves podem dar origem a uma grande variedade de sinais clínicos de acordo com o hospedeiro, cepa de vírus, estado imunológico do hospedeiro, presença de quaisquer organismos exacerbadores secundários e condições ambientais.

Infecções por vírus altamente patogênicos de influenza aviária são ocorrências de notificação obrigatória imediata à OMSA. A Influenza Aviária é uma doença viral altamente transmissível que afeta várias espécies de aves domésticas e silvestres e, ocasionalmente, mamíferos como ratos, gatos, cães, raposas, cavalos, suínos, bem como o homem. O vírus é transmitido de forma eficaz por meio de aerossóis respiratórios, fezes e fluidos corporais, seja diretamente pelo contato com aves infectadas - vivas ou mortas, ou indiretamente, por intermédio da água ou de objetos contaminados.

Apesar de ser exótica em território nacional, ou seja, nunca ter sido detectada no Brasil, a influenza aviária de alta patogenicidade é uma doença que ocorre em ciclos pandêmicos, com graves consequências à saúde animal, e, potencialmente, à humana. As perdas diretas ocasionadas pela doença e seu potencial zoonótico

são os principais determinantes dos vultosos prejuízos que a doença pode ensejar ao comércio interno e internacional de produtos avícolas e, por extensão, à segurança alimentar e à economia dos Países, como um todo. Estima-se que, nos EUA, entre os anos de 2014 e 2015, houve uma perda de cinquenta milhões de frangos, resultando em um impacto econômico da ordem de 3 bilhões de dólares. A Influenza A, ocorrida na Ásia, em 2003, resultou, na mesma linha, em perdas de bilhões de dólares (Neto, 2019).

Os hospedeiros naturais dos vírus da Influenza aviária são aves aquáticas da ordem dos Anseriformes e dos Charadriiformes. Porém, estes vírus apresentam alta capacidade de mutação (*drift e shift antigênico*) e, conseqüentemente, de adaptação a novos hospedeiros. Com isso, podem desenvolver novas cepas virais com maior patogenicidade, causadoras de surtos de elevada mortalidade em aves silvestres, domésticas, e, ocasionalmente, de alta letalidade para humanos, nos quais a adaptação dos vírus de influenza aviária já foi identificada em várias oportunidades, ensejando eventos de elevada magnitude para a saúde pública.

A patogenicidade do vírus da influenza aviária (AIV) encontra-se relacionada às proteínas de superfície “Hemaglutinina” (H1-H18) e “Neuraminidase” (N1-N9). As várias combinações entre os subtipos destas proteínas podem ser classificadas como de alta patogenicidade

(IAAP) e de baixa patogenicidade (IABP). As cepas de alta patogenicidade são aquelas de maior importância para a saúde animal e humana. Eventualmente, vírus da IABP podem aumentar a sua virulência e tornar-se altamente patogênicos subitamente, vindo a ocasionar doença emergente, especialmente quando constituídos das hemaglutininas 5 ou 7 (H5 ou H7). Por essa razão, a vigilância da Influenza aviária tem como objetivo detectar precocemente o vírus e monitorar sua disseminação e patogenicidade.

Os métodos utilizados para a determinação da virulência de cepas para aves evoluíram nos últimos anos em decorrência de uma maior compreensão da base molecular associada à patogenicidade. Independentemente de sua patogenicidade para galinhas, os vírus da influenza A detentores de hemaglutininas dos tipos 5 ou 7 (vírus H5 ou H7) que apresentam uma sequência de aminoácidos no sítio de clivagem da HA0, semelhante a qualquer uma das observadas em vírus de alta patogenicidade, são monitorados de modo especial, considerando o seu potencial de evolução para ocorrências de alta patogenicidade, não obstante os isolados H5 e H7 que não são altamente patogênicos para galinhas e não possuam uma sequência de múltiplos aminoácidos básicos no sítio de clivagem da HA0, sejam classificados como de baixa patogenicidade.

No entanto, em algumas circunstâncias, é necessário verificar a patogenicidade alta ou baixa de um isolado de vírus usando a inoculação intravenosa de vírus infeccioso. Isso pode ser feito para um mínimo de oito indivíduos susceptíveis da espécie *Gallus gallus domesticus* com 4 a 8 semanas de idade. Nesse caso, as cepas inoculadas são consideradas de alta patogenicidade se causarem mais de 75% de mortalidade das aves inoculadas em 10 dias. Mesma conclusão se dá se inoculadas 10 aves de 4 a 8 semanas de idade, o resultado do índice de patogenicidade intravenosa (IPIV) for superior a 1,2.

Em qualquer situação, a caracterização de cepas por meio do IPIV, deve ser realizada em um laboratório com nível de biossegurança adequado para esse tipo de agente, em função de seu risco potencial para humanos e animais.



2. Objetivos do Plano e definições

2.1. Objetivo

Este documento, voltado à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do MAPA, detalha o plano de contingência laboratorial para a IAAP, estabelecendo as estratégias, identificando

os recursos necessários e definindo ações e responsabilidades ante eventual ocorrência desta infecção no País.

2.2. Meios de conservação para o transporte de amostras

Os meios utilizados para transporte de amostras até o laboratório que as processará são:

- Meio MEM (Meio Essencial Mínimo);
- Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*);
- Caldo TPB (Caldo Triptose Fosfato Tamponado);

- Meio de transporte molecular (do inglês: *Molecular Transport Media - MTM*),
- Meio de transporte universal para vírus (UTM – *Universal Transport Medium* ou VTM – *Viral Transport Medium*), e;
- Cartões FTA (do inglês: *Flinders Technology Associates*).

A utilização de meio de transporte molecular inativante ou cartão FTA deverá ocorrer sempre que o laboratório de destino das amostras não dispuser de condições de biossegurança necessárias ao processamento de amostras potencialmente infectantes.

O meio de transporte molecular e os cartões FTA, já utilizados em outros países de modo eficaz, facilitam o transporte de amostras, sem prejuízo à conservação das características necessárias do patógeno para detecção laboratorial e serão admitidos pela CGAL quando necessário.

O meio de transporte molecular (do inglês: *Molecular Transport Media* - MTM), inativa o vírus da influenza aviária, agiliza e permite o processamento de amostras em laboratórios regulares de biologia molecular, sem a necessidade de medidas de biossegurança mais rígidas ou outros meios. Seu uso permite a expansão da rede de laboratórios responsável pela detecção do vírus da influenza aviária no Brasil.

Já os cartões FTA são cartões de celulose à base de algodão, que contêm produtos químicos que rompem as células, desnaturam as proteínas e protegem o DNA, resultando em uma amostra adequada para identificação molecular sem o risco de contaminação.

As amostras colhidas e armazenadas em cartões FTA podem ser

enviadas por correio regular, não havendo necessidade de meios conservantes, caixas isotérmicas e manutenção da cadeia de frio, o que reduz os custos do SVO (Serviço Veterinário Oficial) relacionados ao encaminhamento das amostras.

As amostras colhidas em cartões FTA possibilitam a detecção bem-sucedida do RNA do vírus pelas técnicas moleculares preconizadas pela OMSA (RT-qPCR, RT-PCR e sequenciamento), sem qualquer prejuízo ao diagnóstico.

Em relação aos meios inativantes e ao cartão FTA, seu detalhamento poderá ser objeto de consulta mediante acesso ao apêndice, em anexo a este documento.

2.3. Detecção do Agente

O caráter agudo ou superagudo da IAAP impõe limitações ao emprego da sorologia. Em contrapartida, as provas moleculares ganham importância, com destaque para o RT-qPCR e para o sequenciamento genético.

Suspensões em solução antibiótica de swabs de orofaringe e cloacal (ou fezes) obtidas de aves vivas, ou de fezes e pool de

amostras de órgãos de aves mortas, são analisados por reação em cadeia mediada pela polimerase, precedida de transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR), com iniciadores específicos para o gene da matriz viral (M).

Também há a possibilidade dessas amostras serem inoculadas na cavidade alantóide de ovos embrionados da espécie *Gallus gallus domesticus*, de 9 a 11 dias de idade. Após inoculação, os ovos são incubados a 37°C (faixa 35–39°C) por 2–7 dias.

Ao final de período de incubação, o líquido alantóide de todos os ovos inoculados (com ou sem mortalidade embrionária) é analisado para a detecção de atividade hemaglutinante.

A presença do vírus influenza A em amostras processadas pode ser confirmada por um teste de imunodifusão entre o vírus concentrado e um anti-soro para a nucleoproteína e/ou antígenos de matriz, ambos comuns a todos os vírus influenza A.

O isolamento em ovos embrionados foi largamente substituído pelo RT-qPCR no diagnóstico inicial, que detecta diretamente um ou mais segmentos do genoma da influenza A usando primers específicos.

O genoma associado aos subtipos H e N é identificado usando tecnologias de detecção de RNA com primers e sondas específicos (por exemplo, RT-qPCR), ou sequenciamento e análise filogenética. Após haver a identificação positiva do vírus da influenza A por RT-

qPCR, para subtipagem sorológica do vírus, um laboratório de referência deve realizar inibição da hemaglutinação e inibição da neuraminidase contra uma bateria de antissoros policlonais ou monoespecíficos para cada um dos 16 subtipos de hemaglutinina (H1–16) e 9 neuraminidase (N1–9) do vírus influenza A.

2.4. Testes sorológicos

Como todos os vírus influenza A têm nucleoproteínas e antígenos de matriz antigenicamente semelhantes, esses são os alvos preferidos dos métodos sorológicos aplicados ao grupo influenza A. Os Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) são também utilizados para detectar anticorpos para esses antígenos em formatos de teste dependentes da espécie hospedeira (indiretos) ou independentes da espécie (competitivos).

3. Diagnóstico da IA na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários

Os Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA) são os laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura e Pecuária.

O diagnóstico laboratorial de IA no Brasil ocorre majoritariamente no LFDA-SP, cuja unidade de diagnóstico animal (DIA) conta com toda a estrutura de biossegurança necessária para execução de testes de triagem até as provas confirmatórias do agente infeccioso.

O LFDA-SP é reconhecido pela Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) como laboratório de referência em diagnóstico de IA e de Doença de Newcastle (DNC), e tem oferecido suporte essencial a países da América Latina na confirmação dos recentes casos prováveis. No item 7 deste documento há um melhor detalhamento de suas estruturas laboratoriais.

O LFDA-RS possui a estrutura apropriada para execução de técnicas moleculares e sorológicas de triagem, estando habilitado a receber

soro ou outras amostras quando inativadas.

Os laboratórios credenciados possuem em seu escopo as técnicas moleculares e sorológicas e atuam exclusivamente em análises de certificação para exportação, importação de material genético avícola e compartimentos livres de doenças.

Os outros órgãos externos ao MAPA possuem técnicas moleculares e sorológicas implantadas para pesquisa ou vigilância de outras doenças e podem ser usados, a depender do cenário que se apresenta em relação à influenza A.

Atualmente, o escopo dos laboratórios utilizados no Plano de vigilância de Influenza aviária e Doença de Newcastle inclui os ensaios laboratoriais apresentados no quadro 1.



Quadro 1 - Escopo analítico, segundo o Laboratório Federal Agropecuário envolvido.

Classe de Ensaio	Determinação	Técnica	Matriz	Inclusão no escopo do LFDA-SP	Inclusão no escopo do LFDA-RS
Virologia	Vírus Hemaglutinante (Doença de Newcastle - DNC/Influenza Aviária - IA)	Isolamento em ovo embrionado	Swab de cloaca Swab de traqueia Swab de fundo de caixa Fezes frescas Pulmão Traqueia Cérebro Cerebelo Intestino delgado com pâncreas Ceco com tonsilas cecais Pintinho de 1 dia Ovos com embriões mortos	-	Não
Sorologia	Influenza Aviária - IA	ELISA	Soro Sanguíneo	Sim	Sim
Sorologia	Influenza Aviária - IA	Imunodifusão em ágar-gel - IDGA	Soro Sanguíneo	Sim	Não

Sorologia	Influenza Aviária - IA	Inibição da Neuraminidase - NI	Soro Sanguíneo	Sim	Não
Virologia	Influenza Aviária - IA	Inibição da Neuraminidase - NI	Líquido alantóide	Sim	Não
Virologia	Influenza Aviária - IA	Índice de Patogenicidade Intravenosa - IVPI	Líquido alantóide	Sim	Não
Biologia Molecular	Influenza Aviária - IA	PCR em tempo real com transcrição reversa - RT-qPCR	Swab de cloaca Swab de traqueia Swab de fundo de caixa Fezes frescas Pulmão Traqueia Cérebro Cerebelo Intestino delgado com pâncreas Ceco com tonsilas cecais Pintinho de 1 dia Ovos com embriões mortos	Sim	Sim (exclusivamente em Swab)

Biologia Molecular	Influenza Aviária - IA	PCR em tempo real com transcrição reversa - RT-qPCR - subtipo H5	Swab de cloaca Swab de traqueia Swab de fundo de caixa Fezes frescas Pulmão Traqueia Cérebro Cerebelo Intestino delgado com pâncreas Ceco com tonsilas cecais Pintinho de 1 dia Ovos com embriões mortos	Sim	Não
Biologia Molecular	Influenza Aviária - IA	PCR em tempo real com transcrição reversa - RT-qPCR - subtipo H7	Swab de cloaca Swab de traqueia Swab de fundo de caixa Fezes frescas Pulmão Traqueia Cérebro Cerebelo Intestino delgado com pâncreas Ceco com tonsilas cecais Pintinho de 1 dia Ovos com embriões mortos	Sim	Não
Biologia Molecular	Influenza Aviária - IA	Sequenciamento genético	Produto da reação de PCR	Sim	Não

Obs.: Os LFDAs em Pernambuco e Goiás encontram-se em preparação para execução do RT-qPCR em Swabs em meio de transporte molecular inativante e/ou Cartão FTA.

3.1 Fluxograma para processamento de amostras de vigilância ativa em Laboratório

Figura 1 - Fluxograma para processamento de amostras de soro, de vigilância ativa

Vigilância ativa

O fluxo de análises de amostras para diagnóstico laboratorial oriundas de Vigilância ativa, processadas pelos LFDA's, segue de acordo com a figura 1.

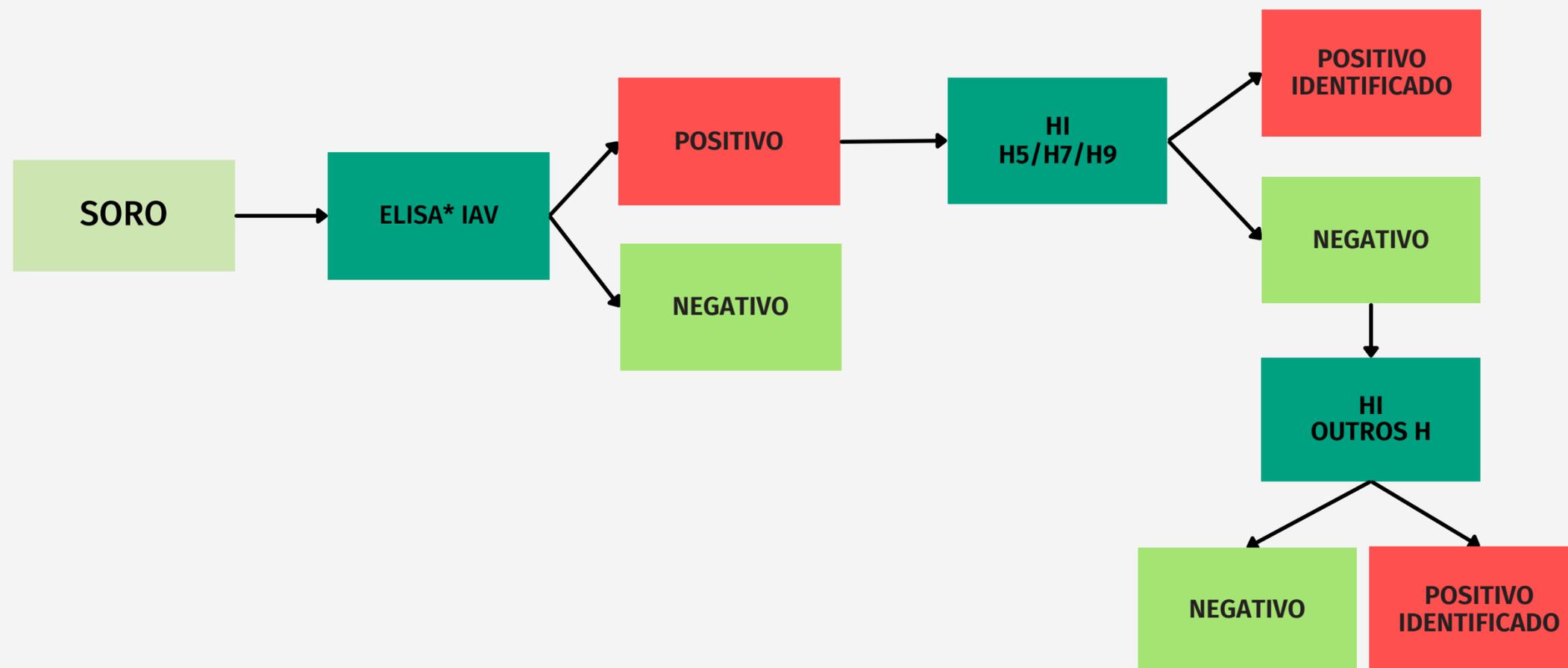
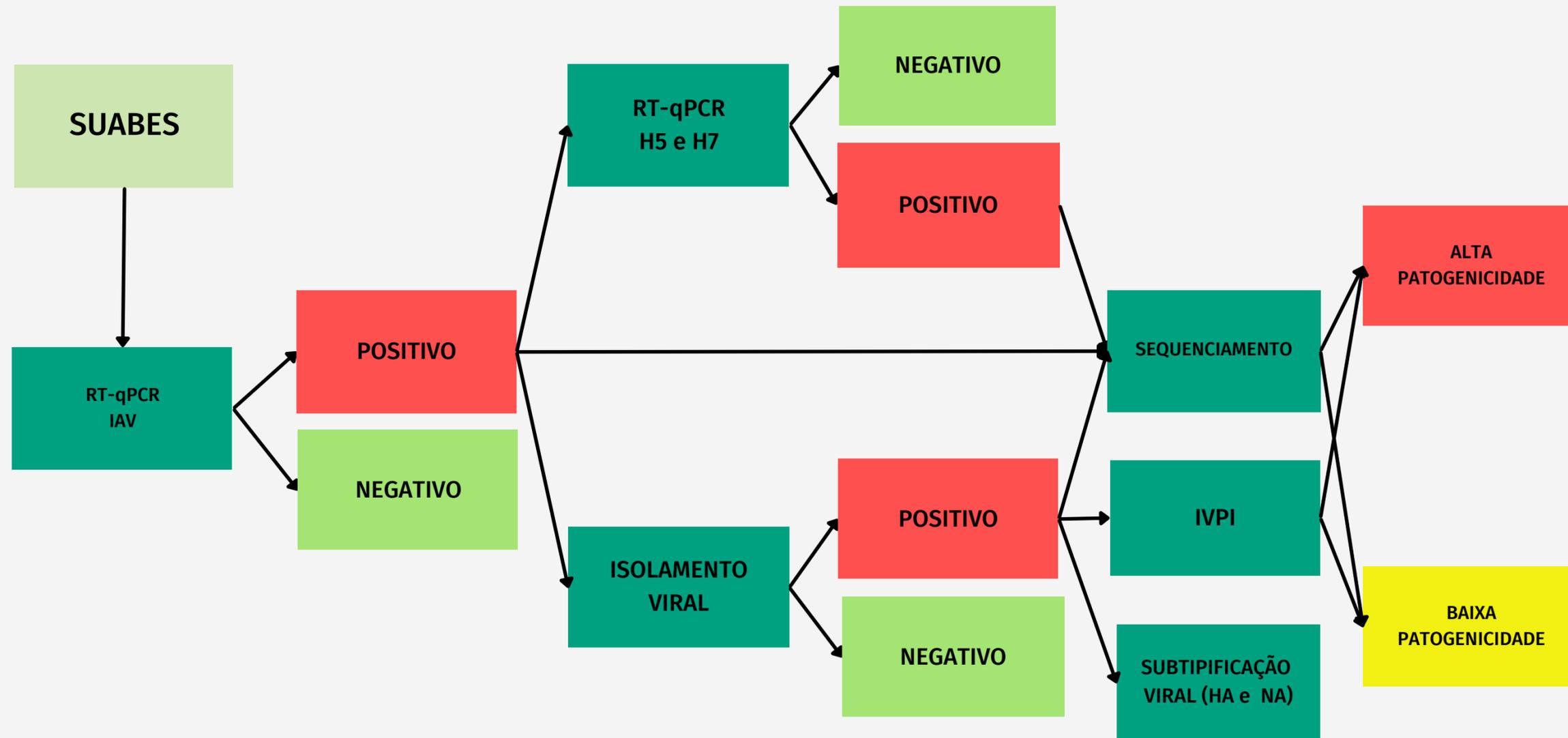


Figura 2 - Fluxograma para processamento de amostras de swabs de vigilância ativa



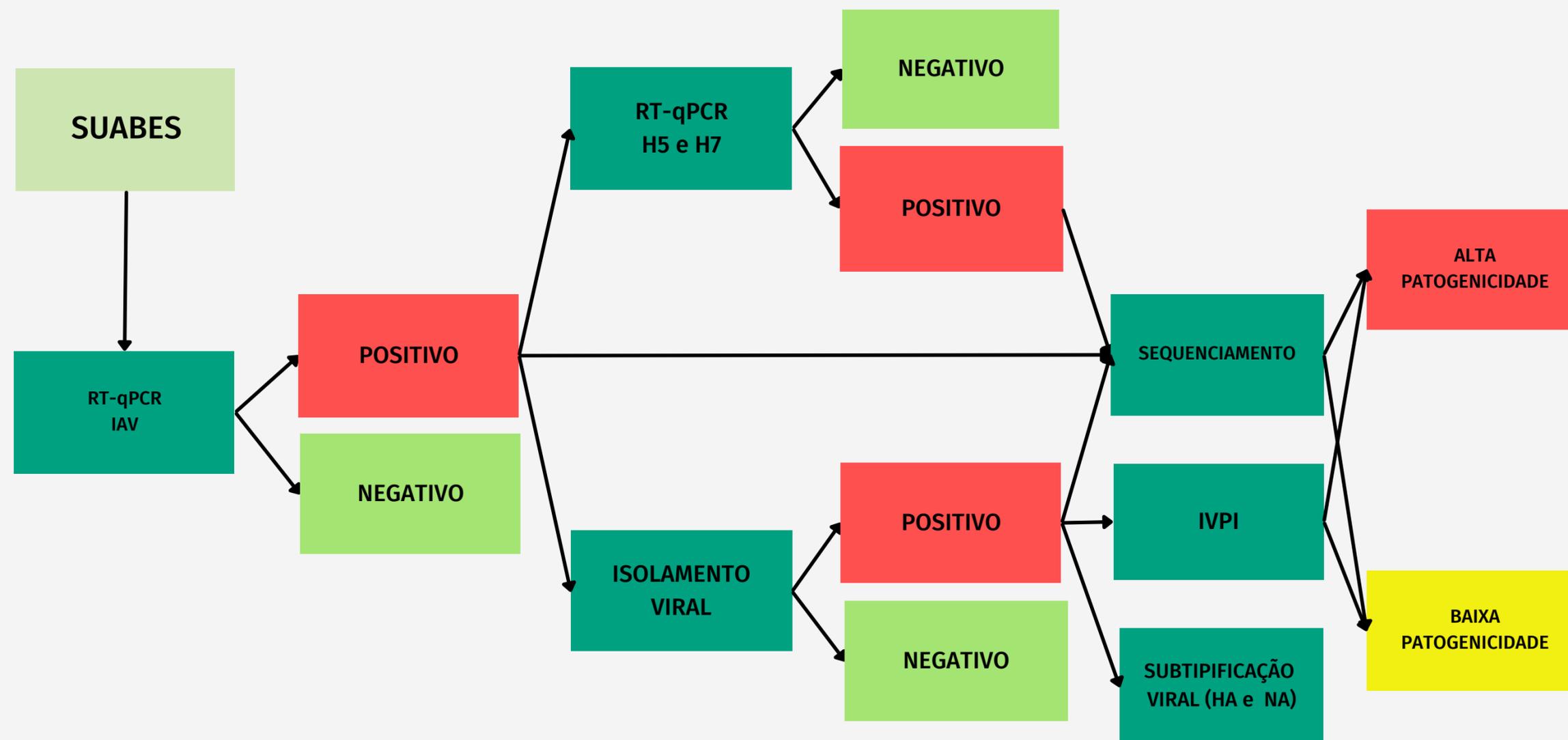
Vigilância passiva

O fluxo de análises de amostras oriundas de vigilância passiva é representado na figura 3.

Caso a amostra seja positiva para influenza A, será direcionada também para o isolamento viral e ao sequenciamento genômico. As amostras positivas para influenza A também serão submetidas à RT-qPCR com oligonucleotídeos específicos para detecção dos subtipos H5, H7 e H9.

A investigação laboratorial de influenza aviária é encerrada após obtenção de resultado negativo na prova de RT-qPCR para detecção de influenza A ou após resultado negativo no isolamento viral.

Figura 3 - Fluxograma para processamento de amostras de swabs e órgãos, de vigilância passiva



4. Níveis de alerta e ações pertinentes

O plano é baseado em quatro níveis de alerta: A, B, C e D, descritos no quadro 2.

Quadro 2 - Níveis de alerta e condições para acionamento

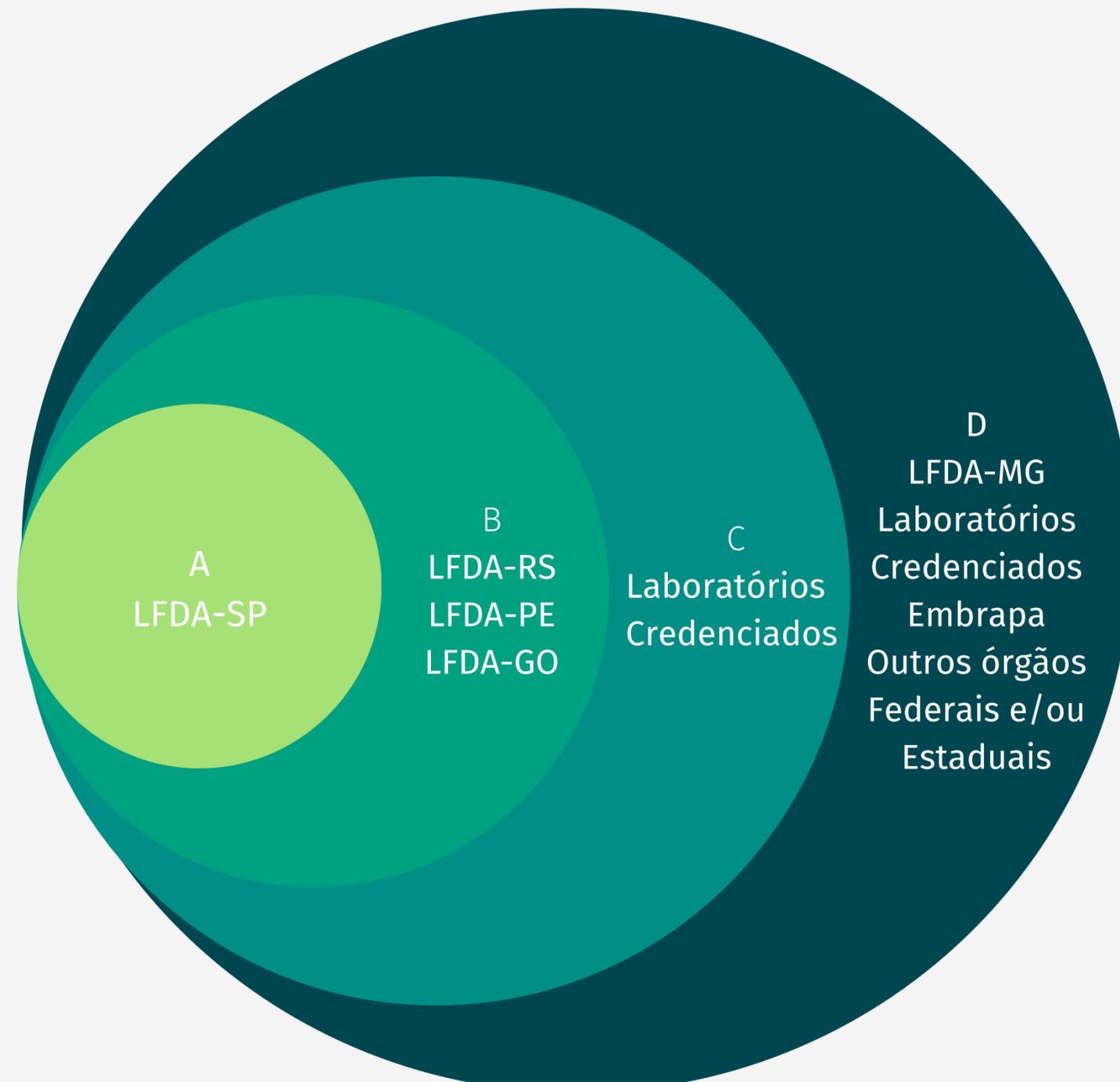
NÍVEL DE ALERTA	CONDIÇÃO PARA ACIONAMENTO
A	Ameaça de introdução iminente da IAAP no Brasil devido à ocorrência da doença em países vizinhos, porém o número de amostras recebidas no LFDA-SP se mantém dentro da normalidade.
B	O número de amostras de vigilância ativa e passiva aguardando a etapa de extração de RNA no LFDA-SP alcança 500 ou mais, em três momentos de processamento consecutivos.
C	O número de amostras de vigilância ativa nos LFDA-RS, LFDA-PE ou LFDA-GO ultrapassa os respectivos limites de processamento.
D	O número de amostras de vigilância passiva nos LFDA-SP, LFDA-RS, LFDA-PE e LFDA-GO, ultrapassa o limite de processamento em seu conjunto.

LFDA-SP deverá atualizar diariamente a planilha das amostras que aguardam a etapa de extração para PCR. A planilha deverá permanecer no Google Drive, com acesso compartilhado com a CGAL, de modo a permitir sua verificação, a qualquer tempo, pela equipe da Coordenação-Geral.

Observados três momentos consecutivos em que o número de amostras se apresenta acima de 500, o nível de alerta seguinte deverá ser ativado, seguindo-se as orientações de comunicação, conforme o item 9 deste documento.

Quando houver necessidade de confirmação da presença de IA em amostras originárias da vigilância passiva, em uma nova localidade, tais amostras deverão ser encaminhadas ao Laboratório de Referência, o LFDA-SP.

Figura 4 - Níveis de alerta e Laboratórios envolvidos



5. Distribuição, acesso e manutenção do Plano

Este é um documento interno da CGAL/DTEC, de responsabilidade da Coordenação de Gestão de Demandas Laboratoriais, e será divulgado imediatamente após sua conclusão, e sempre que sofrer atualizações, aos seguintes destinatários:

- Departamento de Saúde Animal - DSA/SDA;
- Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária - LFDAs;
- Coordenação de Gestão da Qualidade Laboratorial/CGAL/DTEC/SDA;
- Coordenação de Planejamento e Gestão Laboratorial/CGAL/DTEC/SDA;
- Coordenação de Desenvolvimento e Inovação Laboratorial/CGAL/DTEC/SDA.



6.1 Diretrizes e Regulamentos Nacionais e Regionais relevantes para o planejamento de contingência

- Plano de vigilância de Influenza Aviária e Doença de Newcastle - DSA/SDA; <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/manuais-tecnicos>
- Ficha técnica IA de dezembro de 2022 - DSA/SDA: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/influenza-aviaria/manuais-planos-e-notas-tecnicas/ficha-tecnica-ia-dez-2022.pdf/view>
- Manual de colheita de amostras PNSA: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/imagens/Modelo_de_Manual_colheita_PNSA.versao_01.Final.pdf
- Plano de contingência de IA e DNC - DSA/SDA: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/influenza-aviaria/manuais-planos-e-notas-tecnicas/plano-de-contingencia-ia-e-dnc-versao1-4-2013.pdf/view>
- Manual de apoio administrativo para ações de emergência agropecuária - DSA/SDA: https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Gest%C3%A3o/manual_de_apoio_administrativo_as_acoes_de_emergencia_agropecuaria

7. Situação dos Laboratórios

7.1 Capacidade operacional

Capacidade semanal de processamento de amostras segundo o tipo de ensaio realizado e a unidade laboratorial considerada

Ensaio	LFDA-SP	LFDA-RS	LFDA-PE	IB Descalvado	IB Bastos	CEDISA	Marcos Enrietti
ELISA	900	900	–	1.104	120	6.900	5.000
PCR em tempo real com transcrição reversa - RT-qPCR	500	180	125*	144	–	360	500
PCR em tempo real com transcrição reversa - RT-qPCR - subtipo H5	500	180*	125*	144*	–	360*	500*
PCR em tempo real com transcrição reversa - RT-qPCR - subtipo H7	500	180*	125*	144*	–	360*	500*

7.2 Instalações biosseguras para diagnóstico de IA

O Diagnóstico de IA é realizado no LFDA-SP em sua unidade de virologia, podendo-se contar, se necessário, com as demais áreas. Cada uma dessas áreas possui características físicas e procedimentos específicos para acesso e operação.

Por possuir estrutura com nível de segurança biológica 3 (NB3) é o único laboratório em condições de receber amostras não inativadas para processamento com vistas ao diagnóstico de IA. O LFDA-MG, embora não realize diagnóstico de IA atualmente, conta com unidade NB3 que poderá, excepcionalmente e em última instância, ser utilizada para o diagnóstico de IA associado à vigilância passiva, embora em detrimento de outras rotinas do diagnóstico animal.

O Laboratório NB3 possui sistema de ar condicionado independente e tratamento térmico de efluentes e resíduos. A pressão de ar é negativa, com distintos gradientes entre os ambientes (salas), em relação ao ambiente externo, e 100% do ar é filtrado com filtros HEPA, tanto na entrada, quanto na saída. A entrada se dá por acesso eletrônico, mediante os vestiários masculino e feminino.

A área possui seis unidades de isolamento para ensaios experimentais com aves. Os isoladores possuem sistema de regulação de pressão (positiva ou negativa) e filtragem de ar na entrada e saída, por meio de filtros HEPA.

A Unidade está subdividida em eclusa, sala de freezers (com acesso eletrônico), estufa, sala para ovos, virologia, sala dos isoladores, preparo de amostras e expurgo, com autoclave de fronteira para remoção de todo resíduo após descontaminação. Essa autoclave comunica-se com a sala de descarte de resíduos na área NB2.

Para acesso a essa área são observadas as orientações descritas em procedimento operacional específico.

A entrada de itens de ensaio, documentos, materiais e equipamentos na área NBA3 ocorre em consonância com o referido procedimento operacional específico.

Todo efluente ou resíduo sólido gerado no laboratório NB3 é autoclavado. Os resíduos sólidos são recolhidos por empresa especialmente contratada para esse fim.

O acesso à área de biologia molecular apresenta algumas particu-

laridades: é necessária a troca de aventais para adentrar em cada sala e, para acesso à sala de pré PCR também ocorre a troca de sapatos.

7.3 Aquisição e disponibilização de Insumos para diagnóstico laboratorial da IA

Os LFDA respondem, entre outros, pela realização de ensaios laboratoriais de interesse da defesa agropecuária, atuando, no campo administrativo, como unidades gestoras, capacitadas à realização de aquisições governamentais e de contratação de serviços.

Em relação à influenza aviária, há necessidade da aquisição de insumos específicos para a realização do diagnóstico laboratorial da infecção, em suporte ao diagnóstico clínico e epidemiológico.

Tendo em vista a expansão da demanda por esse tipo de insumo, especialmente após o ingresso da doença no continente sul-americano, sua aquisição por meio de compras governamentais é essencial para assegurar as melhores condições de enfrentamento de uma possível introdução da doença em território nacional.

Quando necessária a presença de um colaborador “plantonista” em finais de semana ou feriados, o responsável pela unidade a comunica à SAG por e-mail.

Limitações relacionadas à disponibilidade e prazos podem ser determinantes para o sucesso das ações de controle e erradicação de focos de influenza aviária de alta patogenicidade.

Por essa razão, em atenção aos distintos cenários previamente estabelecidos, é essencial o dimensionamento das necessidades de insumos para básicos para o diagnóstico da IA, como kits para detecção de IA, *primers* e sondas, reagentes de extração, reagentes de amplificação, kits para sequenciamento, entre outros.

O artigo 2 das Regras Internas de laboratórios de referência da OMSA, como é o caso do LFDA-SP, estabelece que, havendo resultados positivos para as enfermidades de notificação à Organização, o laboratório de referência deve informar imediatamente ao Delegado do País Membro de onde se originaram as amostras e, concomitantemente, à Sede da OMSA.

8. Execução do plano

8.1 Lista de verificação para nível de alerta A

Em situação de emergência sanitária, o processamento de amostras originárias da vigilância passiva passa a substituir o processamento de amostras de vigilância ativa no LFDA-SP. Novos focos passam a ter suas amostras processadas no LFDA-SP, enquanto que aquelas originárias de focos já identificados, no âmbito da vigilância ativa, são processadas em outros laboratórios, uma vez inativadas.

8.1.1 Situação:

- Ameaça de introdução iminente da IAAP no Brasil devido à ocorrência da doença em países vizinhos, porém o número de amostras recebidas no LFDA-SP se mantém dentro da normalidade.

8.1.2 Acompanhamento:

- Verificação do número de amostras aguardando etapa de processamento de extração para PCR no LFDA-SP: deve se man-

manter, preferencialmente, inferior a 500 amostras.

- Verificação constante dos informes de notificação da OMSA, principalmente da ocorrência em países limítrofes.

8.1.3 Ações:

- Estabelecer uma rotina de reuniões para revisão de ações com equipe do DTEC.
- Implantar a técnica de RT-qPCR para IA nos LFDA-PE e LFDA-GO e adquirir os kits para diagnóstico.
- Estabelecer tratativas com a Receita Federal para agilizar a entrada de insumos essenciais ao diagnóstico no país.
- Treinar o pessoal de outras unidades do LFDA a serem deslocados para o DIA.
- Armazenar de maneira segura os dados laboratoriais associados à epidemia de IAAP.
- Verificar a necessidade de revisão deste Plano de Contingência.

8.2 Lista de verificação para nível de alerta B

8.2.1 Situação:

- O número de amostras de vigilância ativa e passiva aguardando a etapa de extração de RNA no LFDA-SP alcança 500 ou mais, em três momentos de processamento consecutivos.

8.2.2 Acompanhamento:

- Manter a verificação do número de amostras aguardando etapa de extração para PCR no LFDA-SP: deve ser, preferencialmente, inferior a 500 amostras.
- Verificação constante dos informes de notificação da OMSA, principalmente da ocorrência em países limítrofes.
- Verificação do aumento da busca por análises de certificação de compartimentos para fins de exportação.

8.2.3 Ações:

- Rever a frequência das reuniões de check de ações com equipe do DTEC.

- Avaliar a necessidade de redirecionamento de servidores de outras unidades do LFDA-SP para o DIA.
- Avaliar a necessidade de redirecionamento de servidores de outros LFDA para o DIA do LFDA-SP.
- Comunicar ao DSA a necessidade de redirecionamento das amostras da vigilância ativa para os LFDA-RS, LFDA-PE e LFDA-GO, de forma que o LFDA-SP se concentre apenas nas amostras de vigilância passiva, informando sobre o início obrigatório do uso de meios de transporte com inativantes, objetivando o deslocamento das amostras de vigilância ativa para outros LFDAs, que não dispõem de áreas com biossegurança NB3.
- Considerar o adiamento de férias ou de outras circunstâncias que impliquem em ausência de profissionais-chave.
- Definir plantões aos finais de semana para manter a continuidade do diagnóstico.
- Verificar status da implantação do sequenciamento do genoma no LFDA-GO para subtipificação do vírus.
- Identificar, junto aos laboratórios credenciados, as capacidades de atendimento da demanda por análises de

certificação de granjas para exportação.

- Armazenar de maneira segura os dados laboratoriais associados à epidemia de IAAP.

- Verificar a necessidade de revisão deste Plano de Contingência.

8.3 Lista de verificação para nível de alerta C

8.3.1 Situação:

- O número de amostras de vigilância ativa nos LFDA-RS, LFDA-PE ou LFDA-GO ultrapassa os respectivos limites de processamento.

8.3.2 Acompanhamento:

- Verificação do número diário de amostras aguardando etapa de extração para PCR no LFDA-RS, LFDA-PE e LFDA-GO na vigilância passiva e atualização ao DSA dos laboratórios passíveis de recepção de amostras, segundo o tipo de vigilância.

8.3.3 Ações:

- Comunicar ao DSA sobre a inserção de novos LFDAs no processamento de amostras de vigilância passiva à medida que

estes as forem absorvendo.

- Comunicar ao DSA a necessidade de redirecionamento das amostras inativadas da vigilância ativa para os laboratórios credenciados, de forma que outros LFDAs, iniciando pelo LFDA-RS, passem a assumir o processamento de amostras de vigilância passiva, uma vez inativadas, que não puderem ser processadas pelo LFDA-SP.
- Inserir, nesta ordem, os LFDA-RS, LFDA-PE e LFDA-GO na vigilância passiva.
- Informar ao DSA sobre a obrigatoriedade de envio de amostras inativadas.
- Comunicar aos laboratórios públicos de outras instituições previamente identificados, sobre o início da recepção e processamento de amostras oriundas da vigilância ativa.
- Adiar licenças ou outras ausências para o pessoal.
- O LFDA-SP, como laboratório de referência, deve avaliar criteriosamente o recebimento de amostras de outros países.

- Implantar a verificação diária do número de amostras aguardando etapa de extração para PCR nos outros três LFDA's envolvidos e nos laboratórios credenciados.

- Armazenar, de maneira segura, os dados laboratoriais associados à epidemia de IAAP.
- Verificar a periodicidade de revisão deste Plano de Contingência.

8.4 Lista de Verificação do Nível de Alerta D

8.4.1 Situação:

- O número de amostras de vigilância passiva nos LFDA-SP, LFDA-RS, LFDA-PE e LFDA-GO, ultrapassa o limite de processamento em seu conjunto.

8.4.2 Acompanhamento:

- Manter a verificação do número diário de amostras aguardando processamento de extração, frente à capacidade de processamento diária, para PCR no LFDA-SP, LFDA-RS, LFDA-PE e LFDA-GO na vigilância passiva, e Laboratórios credenciados na vigilância ativa.

8.4.3 Ações:

- Manter atualização ao DSA dos laboratórios passíveis de recepção de amostras, segundo o tipo de vigilância.

- É mandatário aos laboratórios credenciados participantes que reportem diariamente à CGAL por intermédio de email (ou outra forma, previamente definida), sobre a situação da capacidade de processamento diário de amostras.
- Avaliar a inserção do LFDA-MG no processamento de amostras da vigilância passiva.
- Reforço emergencial da força pessoal de trabalho dos LFDA's, dando preferência aos profissionais capacitados e treinados nas técnicas necessárias.
- Buscar parcerias com Embrapa e entidades terceiras (Institutos, Universidades, etc) para o recebimento de amostras ou a transferência de recursos humanos de forma emergencial.
- Armazenar de maneira segura os dados laboratoriais associados à epidemia de IAAP.
- Verificar a necessidade de revisão deste Plano de Contingência.

9. Comunicação

Quando observado o aumento acima de 500 amostras para processamento por três momentos consecutivos, como definido anteriormente, deverão ser desencadeados dois gatilhos concomitantemente: o DIA do LFDA-SP deverá alertar à CDL/CGAL, via aplicativo de mensagem (ex. whatsapp), e-mail e/ou ligação telefônica, enquanto a equipe administrativa do LFDA-SP providenciará ofício pelo SEI à CGAL/DTEC comunicando o ocorrido, para providências.

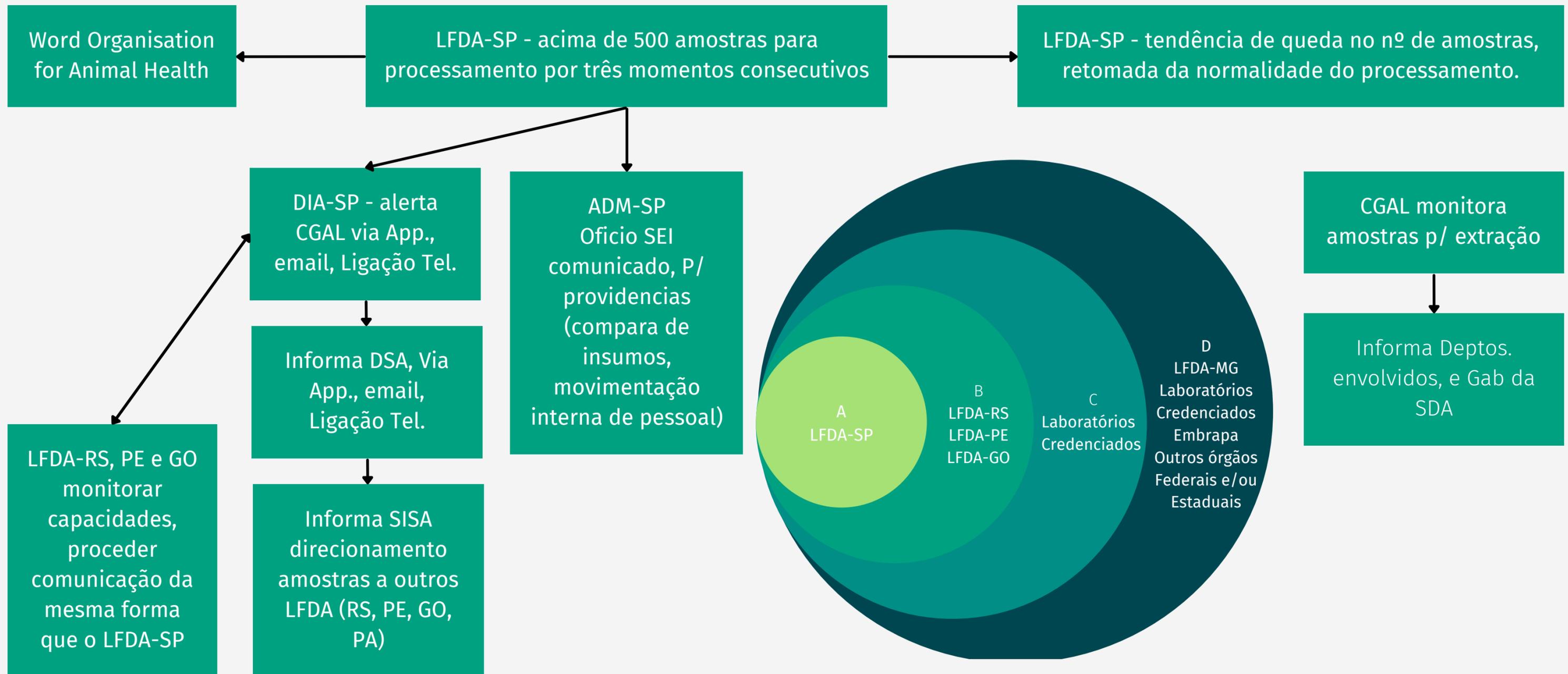
Logo que receber o alerta, a CDL/CGAL deverá informar de modo expresso ao DSA utilizando de ferramentas como aplicativo de mensagem, e-mail ou telefone e encaminhar o processo SEI formalizando o ocorrido ao DSA, para que este possa informar aos SISA sobre a necessidade de redirecionamento das amostras de vigilância ativa aos outros LFDA (RS, PE, GO e PA), mantendo o envio ao LFDA-SP apenas das amostras de vigilância passiva. Concomitantemente, deve ser enviado alerta, via e-mail e ligação telefônica, sobre o encaminhamento do processo (Figura 5).

Os LFDA-RS, PE e GO deverão monitorar suas capacidades de processamento de amostras e proceder à comunicação, da mesma forma que o realizado pelo LFDA-SP.

A CDL/CGAL monitorará o número de amostras de vigilância ativa e passiva recebidas e aguardando a etapa de extração, e informará aos Departamentos envolvidos e ao Gabinete da SDA.

À medida que o número de amostras começar a demonstrar tendência de queda, o LFDA-SP deve informar à CGAL, da mesma forma que informaram o aumento, sobre a diminuição do acúmulo e retomada da normalidade de processamento, permitindo que as amostras voltem a ser direcionadas, gradativamente, ao LFDA-SP, conforme desenho inicial estabelecido no plano de vigilância da IA e DNC.

Figura 5 - Fluxo de comunicação no âmbito do Plano de contingência Laboratorial



10. Apêndice

Os meios de coleta e transporte de amostras apontados neste Plano tem por base o inserido no anexo 6 (ANEXO 6 – FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE TRANSPORTE E PREPARO DOS TUBOS PARA COLHEITA) do Plano de vigilância de influenza aviária e doença de Newcastle (DSA), na FICHA TÉCNICA INFLUENZA AVIÁRIA (DSA), e no Manual de MANUAL DE COLHEITA, ARMAZENAMENTO E ENCAMINHAMENTO DE AMOSTRAS (PNSA). Além desses, são recomendados os meios considerados inativantes, por possibilitarem a análise mesmo em laboratórios em que não haja nível de biossegurança superior, além do transporte ser mais simples e menos oneroso.

Os cartões de coleta de amostras biológicas são uma importante ferramenta nesse sentido. A informação 11, abaixo descrita, demonstra suas características principais e referências de utilização.

Já o **Meio de transporte Molecular**, tendo como exemplo o disponível em <https://bioboavista.com.br/meio-de-transporte-molecular/>, é formulado com um agente inativante e uma base estabilizante que garante a preservação do material genético (DNA/RNA) após a coleta em temperatura ambiente por até 4 semanas e até 6 meses à -20°C. São confeccionados em tubos

plásticos de 2 mL ou 3 mL, e são livres de DNase e RNase. Como principal vantagem, eles são capazes de preservar a estrutura molecular em temperatura ambiente até 35 °C e são compatíveis com as técnicas de PCR e RT-PCR. É destinado a preservação de ácidos nucleicos DNA/RNA e inativação de diferentes microrganismos, como fungos, bactérias e vírus de amostras biológicas. Como também é um meio que inativa o vírus, permite também a coleta, transporte em temperatura ambiente, e análise de amostras em laboratórios que não possuem nível de biossegurança maior.

11. Referências

- WOA. Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para os Animais Terrestres. Paris: WOA, Dezembro 2022. Acesso em 8 de fevereiro de 2023. <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>
- Meio de transporte molecular inativante: <https://bioboavista.com.br/meio-de-transporte-molecular/>.
- Plano de vigilância de Influenza Aviária e Doença de Newcastle - DSA/SDA/MAPA; 2022.
- Manual de colheita, armazenamento e encaminhamento de amostras – PNSA – 1ª Edição – 2020.
- Cardona-Ospina JA, Villalba-Miranda MF, Palechor-Ocampo LA, Mancilla LI, Sepúlveda-Arias JC. A systematic review of FTA cards® as a tool for viral RNA preservation in fieldwork: Are they safe and effective? *Prev Vet Med.* 2019 Nov 15;172:104772. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104772. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31607414; PMCID: PMC7126379.
- Jóźwiak, Michał, Wyrostek, Krzysztof, Domańska-Blicharz, Katarzyna, Olszewska-Tomczyk, Monika, Śmietanka, Krzysztof and Minta, Zenon. "Application of FTA® Cards for detection and storage of avian influenza virus". *Journal of Veterinary Research*, vol.60, no.1, 2016, pp.1- 6. <https://doi.org/10.1515/jvetres-2016-0001>.
- Kraus RH, van Hooft P, Waldenström J, Latorre-Margalef N, Ydenberg RC, Prins HH. Avian influenza surveillance with FTA cards: field methods, biosafety, and transportation issues solved. *J Vis Exp.* 2011 Aug 2;(54):2832. doi: 10.3791/2832. PMID: 21847074; PMCID: PMC3211123.
- Kraus, R. H., van Hooft, W. F., Waldenstrom, J., Latorre-Margalef, N., Ydenberg, R. C., & Prins, H. H. T. (2011). Avian Influenza surveillance: on the usability of FTA cards to solve biosafety and transport issues. *Journal of Visualized Experiments*, 2011(54), [e2832]. <https://doi.org/10.3791/2832>.
- Abdelwhab EM, Lüscho D, Harder TC, Hafez HM. The use of FTA® filter papers for diagnosis of avian influenza virus. *J Virol Methods.* 2011 Jun;174(1-2):120-2. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.03.017. Epub 2011 Mar 17. PMID: 21419801.
- Keeler SP, Ferro PJ, Brown JD, Fang X, El-Attrache J, Poulson R, Jackwood MW, Stallknecht DE. Use of FTA sampling cards for molecular detection of avian influenza virus in wild birds. *Avian Dis.* 2012 Mar;56(1):200-7. doi: 10.1637/9862-072611-Reg.1. PMID: 22545547.
- AMORIM NETO, Carlos Santos. Importância econômica da política de prevenção de doenças avícolas para o Brasil : o caso da Influenza Aviária [doi:10.11606/T.11.2019.tde-21112019-171115]. Piracicaba : Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2019. Tese de Doutorado em Economia Aplicada. [acesso 2023-04-14].

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA
E PECUÁRIA

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
UNIÃO E RECONSTRUÇÃO



Saiba mais sobre o LFDA:

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

