

Instrução Normativa SDA/MAPA 36/2007

(D.O.U. 08/10/2007)

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 36, DE 5 DE OUTUBRO DE 2007

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 42, do Anexo I, do Decreto nº 5.351, de 21 de janeiro de 2005, tendo em vista o disposto na Instrução Normativa nº 18, de 27 de fevereiro de 2004, e o que consta do Processo nº 21000.007355/2007-84, resolve:

Art. 1º O Anexo I da Instrução Normativa nº 18, de 27 de fevereiro de 2004, passa a vigorar com a seguinte redação:

ANEXO I

NORMAS SOBRE OS REQUISITOS DE QUALIDADE PARA O CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO DAS ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS (EET) EM RUMINANTES, PELA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

10.7.	...
10.7.1.	...
10.7.2.	Usando o cromógeno DAB
10.7.2.1.	Agregar a solução de proteinase K sobre o corte do tecido na lâmina e incubar por um minuto. Enxaguar três vezes por vinte segundos, em TBST;
10.7.2.2.	No caso de utilizar o sistema do tipo MicroProbe agregar 150 (cento e cinquenta) microlitros de solução de proteinase K em um pocinho dosificador tipo Isolon e incubar por um minuto;
10.7.2.3.	Enxaguar três vezes por vinte segundos, em TBST;
10.7.2.4.	Agregar o anticorpo monoclonal F99/97.6.1 diluído conforme recomendações do fabricante, em diluente de anticorpo e preparado no dia do uso, incubando por dez minutos;
10.7.2.5.	Enxaguar com TBST, três vezes por vinte segundos;
10.7.2.6.	Agregar o complexo Biotina-IgG anti-camundongo e incubar por dez minutos, entre 22º e 25ºC (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius);.
10.7.2.7.	Enxaguar com TBST, três vezes por vinte segundos;
10.7.2.8.	Agregar a Peroxidase-Estreptavidina ou Peroxidase-Avidina e incubar por dez minutos entre 22º e 25ºC (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius);
10.7.2.9.	Enxaguar com TBST, três vezes por vinte segundos;
10.7.2.10.	Agregar substrato DAB cromógeno e incubar por quatro a cinco minutos;
10.7.2.11.	Enxaguar com água destilada, duas vezes por vinte segundos;
10.7.2.12.	Contracorar com hematoxilina;
10.7.2.13.	Enxaguar com água corrente, três vezes por vinte segundos;
10.7.2.14.	Deixar em água corrente entre dois a cinco minutos até atingir a coloração azulada;
10.7.2.15.	Este processo pode ser substituído sub-mergindo as lâminas cinco vezes em banho contendo uma solução de hidróxido de amônio ou Scotts Water Substitute;
10.7.3.	Usando o cromógeno AEC
10.7.3.1.	Microprova por capilaridade

10.7.3.1.1.	Tratar os tecidos com uma solução de proteinase K (proteinase K ready-to-use) por exatamente noventa segundos, entre 22°C e 25°C. Usar 150 microlitros da solução em cada poço dosificador de borracha hidrofóbica (isolon reagente isolators rubber 30-well). Todas as etapas de aspiração dos reagentes devem ser feitas por capilaridade, devendo para isto tocar a extremidade das lâminas pareadas no slide holder, na solução contida no dosificador.
10.7.3.1.2.	Enxaguar com tampão TBST por três vezes. Usar 150 microlitros para cada par de lâminas da solução em cada poço dosificador de borracha hidrofóbica(isolon reagente isolators rubber 3-well). Todas as etapas de drenagem dos reagentes devem ser feitas por capilaridade, devendo para isto tocar a extremidade das lâminas em papel toalha.
10.7.3.1.3.	Tratar os tecidos com anticorpo monoclonal (F99/97.6.1.) por dez minutos (diluído conforme indicação do fabricante), entre 22°C e 25°C. Usar 150 microlitros da solução em cada poço dosificador de borracha hidrofóbica (isolon reagente isolators rubber 30-well)
10.7.3.1.4.	Enxaguar com tampão TBST por três vezes. Usar 150 microlitros para cada par de lâminas da solução em cada poço dosificador de borracha hidrofóbica(isolon reagente isolators rubber 3-well)
10.7.3.1.5.	Agregar o complexo Biotina-IgG anticamundongo e incubar por dez minutos, entre 22°C e 25°C. Usar 150 microlitros da solução em cada poço dosificador de borracha hidrofóbica (isolon reagente isolators rubber 30-well)
10.7.3.1.6.	Enxaguar com tampão TBST por três vezes. Usar 150 microlitros para cada par de lâminas da solução em cada poço dosificador de borracha hidrofóbica (isolon reagente isolators rubber 3-well)
10.7.3.1.7.	Tratar os tecidos com solução amplificadora de estreptavidina-peroxidase (Streptavidin-HRP), incubar por dez minutos, entre 22°C e 25°C. Usar 150 microlitros da solução em cada poço dosificador de borracha hidrofóbica (isolon reagente isolators rubber 30-well)
10.7.3.1.8.	Enxaguar com tampão TBST por três vezes. Usar 150 microlitros para cada par de lâminas da solução em cada poço dosificador de borracha hidrofóbica (isolon reagente isolators rubber 3-well)
10.7.3.1.9.	Adicionar aos cortes de tecidos a solução de substrato com cromógeno AEC (AEC Substrate-chromogem, ready-to-use), por dez minutos, entre 22°C e 25°C. Usar 150 microlitros da solução em cada poço dosificador de borracha hidrofóbica (isolon reagente isolators rubber 30-well)
10.7.3.1.10.	Enxaguar com tampão TBST por três vezes. Usar 150 microlitros para cada par de lâminas da solução em cada poço dosificador de borracha hidrofóbica(isolon reagente isolators rubber 3-well)
10.7.3.1.11.	Contrastar com hematoxilina
10.7.3.1.12.	Retirar as lâminas do suporte especial (Slide holder) e coloca-las em rack para coloração e usar solução aquosa de hematoxilina (Mayer's, lillies modification), por dez minutos se for tecido nervoso e vinte segundos se for tecido linfóide, entre 22°C e 25°C.
10.7.3.1.13.	Enxaguar com água destilada por três vezes por vinte segundos
10.7.3.1.14.	Tratar os cortes com hidróxido de amônia 37mM
10.7.3.1.14.1.	Submergir dez vezes as lâminas nesta solução
10.7.3.1.14.2.	Lavar com água por cinco minutos

10.7.3.1.14.3.	Manter as lâminas na água até a montagem
10.7.3.1.14.4.	Montar as lâminas em meio aquoso (faramount)
10.7.3.1.14.5.	Cobrir com lamínula
10.7.3.1.14.6.	Ler em microscópio ótico. - OBS.: Desidratação com álcool ou xilol remove a imunocoloração
10.7.4.	Usando o sistema Shandon
10.7.4.1.	Aplicar 100 microlitros de solução de proteinase K ao sistema SHANDON e incubar por exatamente 90 segundos, entre 22° e 25°
10.7.4.2.	Adicionar 2 ml de PBST ao sistema e aguardar cinco minutos, repetir a operação mais duas vezes
10.7.4.3.	Aplicar 100 microlitros de anticorpo monoclonal (F99/97.6.1.) (diluído conforme fabricante) ao sistema SHANDON, incubar por dez minutos, entre 22°C e 25°C
10.7.4.4.	Adicionar 2 ml de PBST ao sistema e aguardar cinco minutos, repetir a operação mais duas vezes
10.7.4.5.	Adicionar 100 microlitros do complexo Biotina-IgG anti-camundongo ao sistema SHANDON e incubar por dez minutos, entre 22°C e 25°C
10.7.4.6.	Adicionar 2 ml de PBST ao sistema e aguardar cinco minutos, repetir a operação mais duas vezes
10.7.4.7.	Aplicar 100 microlitros da solução de estreptavidina-peroxidase (Streptavidin-HRP) ao sistema SHANDON e incubar por dez minutos
10.7.4.8.	Adicionar 2 ml de PBST ao sistema e aguardar cinco minutos, repetir a operação mais duas vezes
10.7.4.9.	Aplicar 100 microlitros do substrato AEC ao sistema SHANDON e incubar por cinco minutos, adicionar mais 100 microlitros de substrato uma segunda vez ao sistema SHANDON e incubar por cinco minutos, e mais uma terceira vez 100 microlitros ao sistema SHANDON e incubar por dez minutos. Cada par de lâminas requer o uso de trezentos microlitros de substrato, aplicado no período de vinte minutos
10.7.4.10.	Adicionar 2 ml de PBST ao sistema e aguardar cinco minutos, repetir a operação mais duas vezes
10.7.4.11.	Contrastar com hematoxilina
10.7.4.12.	Retirar as lâminas do suporte especial (Slide holder) e coloca-las em rack para coloração e usar solução aquosa de hematoxilina (Mayer's, lillies modification), por dez minutos se for tecido nervoso e vinte segundos se for tecido linfóide, entre 22°C e 25°C
10.7.4.13.	Enxaguar com água destilada por três vezes por vinte segundos
10.7.4.14.	Tratar os cortes com hidróxido de amônia 37mM
10.7.4.14.1.	Submergir dez vezes as lâminas nesta solução
10.7.4.14.2.	Lavar com água por cinco minutos
10.7.4.14.3.	Manter as lâminas na água até a montagem
10.7.4.14.4.	Montar as lâminas em meio aquoso (faramount)
10.7.4.14.5.	Cobrir com lamínula
10.7.4.14.6.	Ler em microscópio ótico.
- OBS.: Desidratação com álcool ou xilol remove a imunocoloração."(NR)	

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

INÁCIO AFONSO KROETZ

D.O.U., 08/10/2007 - Seção 1