

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº8, DE 12 DE ABRIL DE 2012

O SECRETÁRIO SUBSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe conferem os arts.10 e 42 do Anexo I do Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010, tendo em vista o disposto no Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, na Instrução Normativa MAPA nº 1, de 16 de janeiro de 2007, na Instrução Normativa MAPA nº 5, de 1º de março de 2002, na Portaria SDA nº 168, de 27 de setembro de 2005, e o que consta do Processo nº 21000.003435/2008-41, resolve:

Art. 1º Definir os requisitos e critérios para a realização do diagnóstico de raiva, por meio dos métodos denominados Teste de Imunofluorescência Direta (TIFD) e Prova Biológica em camundongos (PB), a serem adotados pelos laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, em atendimento ao Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH).

Art. 2º Aprovar os métodos previstos nos Anexos I e II desta Instrução Normativa.

Art. 3º O laboratório de que trata o art. 1º desta Instrução Normativa deverá designar um responsável técnico e um responsável técnico substituto, com experiência comprovada de, no mínimo, dois anos na realização dos métodos de que trata esta Instrução Normativa.

Parágrafo único. O responsável técnico e o responsável técnico substituto não poderão responder por mais de um laboratório.

Art. 4º O laboratório de que trata o art. 1º desta Instrução Normativa deverá dispor das seguintes instalações:

I - área específica para recebimento das amostras;

II - área destinada à manipulação das amostras, preparo das lâminas e da suspensão de Sistema Nervoso Central - SNC;

III - sala escura destinada à leitura e interpretação de lâminas por microscopia de fluorescência;

IV - infectório ou biotério de experimentação destinado à manutenção de camundongos durante a Prova Biológica;

V - área de desinfecção e lavagem, destinada à esterilização de materiais e amostras biológicas potencialmente infectadas, assim como à lavagem e secagem dos materiais previamente esterilizados; e

VI - área de esterilização destinada à embalagem e esterilização de vidraria e de outros materiais não descartáveis.

Art. 5º São consideradas amostras para o diagnóstico de raiva:

I - o Sistema Nervoso Central; e

II - o animal inteiro, no caso de animais silvestres pequenos, menores ou iguais a 20 cm (vinte centímetros) de comprimento.

Art. 6º As amostras para o diagnóstico de raiva deverão ser encaminhadas resfriadas ou congeladas, dependendo do período de tempo transcorrido entre a coleta e a sua chegada ao laboratório, nos seguintes termos:

I - a amostra será encaminhada refrigerada quando o período entre a coleta e o recebimento no laboratório não ultrapassar 24 (vinte e quatro) horas, devendo estar acondicionada em frasco, preferencialmente inquebrável, com tampa e tamanho adequado, ou saco plástico duplo devidamente lacrado, identificada individualmente e mantida à temperatura de 2 a 4 °C (dois a quatro graus Celsius), por meio de gelo reciclável, em caixa isotérmica perfeitamente vedada, provida do símbolo de risco biológico e afixados os dizeres: "URGENTE, MATERIAL BIOLÓGICO PERECÍVEL";

II - a amostra será encaminhada congelada quando o período entre a coleta e o recebimento no laboratório ultrapassar 24 (vinte e quatro) horas, devendo estar acondicionada em frasco, preferencialmente inquebrável, com tampa e tamanho adequado, ou saco plástico duplo devidamente lacrado, identificada individualmente e contida em caixa isotérmica perfeitamente vedada, de forma a manter o congelamento, provida do símbolo de risco biológico e afixados os dizeres: "URGENTE, MATERIAL BIOLÓGICO PERECÍVEL".

§ 1º O gelo reciclável utilizado para encaminhamento das amostras para o diagnóstico de raiva ao laboratório não deverá ser reutilizado.

§ 2º Excepcionalmente, as amostras poderão ser encaminhadas ao laboratório conservadas em glicerol, caso não seja possível a sua refrigeração ou congelamento.

§ 3º A amostra conservada em glicerol, nos termos do § 2º, deverá ser acondicionada em frasco, preferencialmente inquebrável, com tampa e tamanho adequado, contendo solução de glicerina 50% (cinquenta por cento) em tampão fosfato pH 7,4, identificada individualmente e contida em embalagem secundária impermeável perfeitamente vedada, provida do símbolo de risco biológico e afixados os dizeres: "URGENTE, MATERIAL BIOLÓGICO PERECÍVEL".

Art. 7º O Formulário Único de Requisição de Exames para Síndromes Neurológicas deverá acompanhar toda amostra suspeita de raiva enviada ao laboratório, conforme definido no Manual Técnico - 2009 - Controle da Raiva dos Herbívoros, do PNCRH, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, aprovado pela Portaria SDA nº 168, de 27 de setembro de 2005.

Art. 8º As amostras deverão ser registradas em livro próprio contendo, no mínimo, as informações referentes ao número do protocolo, responsável pelo recebimento, espécie, sexo, idade, raça, data da coleta, data do encaminhamento, data do recebimento, data de emissão do relatório de ensaio, número de partida e título do conjugado.

Art. 9º O laboratório deverá manter uma alíquota da amostra congelada e devidamente identificada, à temperatura de - 20 °C (vinte graus Celsius negativos) ou inferior, por um período mínimo de 6 (seis) meses.

Parágrafo único. As amostras deverão ser conservadas em congeladores exclusivos a esta finalidade, de capacidade suficiente ao volume de análises realizadas, estocadas de forma ordenada e em local de acesso restrito.

Art. 10. Toda amostra oriunda do sistema de vigilância do PNCRH deverá ser submetida ao TIFD e à PB.

§ 1º O relatório de ensaio do TIFD deverá ser liberado no prazo máximo de 48 (quarenta e oito) horas úteis, contadas a partir da entrada do material suspeito no laboratório.

§ 2º A PB deverá ser iniciada no prazo máximo de 48 (quarenta e oito) horas úteis, contadas a partir da entrada do material suspeito no laboratório.

§ 3º No caso de utilização de camundongos desmamados, o relatório de ensaio da PB deverá ser liberado no prazo máximo de 28 (vinte e oito) dias, contados a partir do dia da inoculação ou eventual reinoculação.

§ 4º No caso de utilização de camundongos lactentes, o relatório de ensaio da PB deverá ser liberado no prazo máximo de 21 (vinte e um) dias, contados a partir do dia da inoculação ou eventual reinoculação.

Art. 11. O resultado deverá vir destacado no relatório de ensaio pelas expressões POSITIVO ou NEGATIVO.

§ 1º O relatório de ensaio com resultado NEGATIVO deverá ser emitido, no mínimo, em 3 (três) vias, das quais uma será encaminhada à Superintendência Federal de Agricultura na Unidade Federativa de origem da amostra, outra ao requisitante e a outra deverá ser mantida no laboratório.

§ 2º O relatório de ensaio com resultado POSITIVO, no TIFD ou na PB, deverá ser imediatamente informado à Superintendência Federal de Agricultura na Unidade Federativa de origem da amostra, ao órgão estadual de defesa sanitária animal da Unidade Federativa, às autoridades de Saúde, ao requisitante e à Coordenação- Geral de Apoio Laboratorial - CGAL/SDA, aos quais será obrigatório o envio de uma via do relatório de ensaio, enquanto outra via deverá ser mantida no laboratório.

Art. 12. Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

RICARDO DA CUNHA CAVALCANTI JÚNIOR

ANEXO I

TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (TIFD)

1. Objetivo

O Teste de Imunofluorescência Direta (TIFD) tem o objetivo de pesquisar a presença de antígenos do vírus da raiva, por imunofluorescência direta, em impressões de amostras de Sistema Nervoso Central (SNC) de animais suspeitos ou de tecido cerebral de camundongos inoculados com amostras suspeitas para diagnóstico de raiva.

2. Material a ser pesquisado As regiões anatômicas do SNC de predileção a serem pesquisadas para o diagnóstico da raiva são o hipocampo (corno de Ammon), o cerebelo, o córtex e a medula espinhal. Para as amostras de equídeos, deverá ser incluída, sempre que possível, a medula espinhal. É recomendado pesquisar no mínimo 3 (três) regiões anatômicas do SNC antes de se concluir por um resultado negativo.

3. Método

3.1. Preparação dos controles do teste

3.1.1. Todo ensaio ou série de ensaios deverá incluir lâminas para controle positivo e controle negativo.

3.1.2. O controle positivo deverá ser preparado antecipadamente, a partir de duas impressões em lâmina, do cérebro de camundongo albino suíço, inoculado por via intracerebral com amostra positiva para raiva, submetido à eutanásia na fase paralítica da doença.

3.1.3. O controle negativo deverá ser preparado a partir de duas impressões, em lâmina, de cérebro de camundongo albino suíço sadio.

3.1.4. As lâminas poderão, a critério do laboratório, ser fixadas por imersão em acetona PA a -20°C, por, no mínimo, 15 (quinze) minutos. Após este período, retirar as lâminas da acetona, escorrer e deixar secar em temperatura ambiente.

3.1.5. As lâminas para controle deverão estar identificadas e datadas, podendo ser mantidas em temperatura de -20°C e utilizadas por até 10 (dez) dias.

3.2. Diluição do conjugado em Cérebro de Camundongo Normal (CCN) e Cérebro de Camundongo

Infectado (CCI) - diluições de trabalho

3.2.1. A diluição do conjugado em suspensão de Cérebro de Camundongo Infectado (CCI) e em suspensão de Cérebro de Camundongo Normal (CCN) - diluição de trabalho - deverá ser determinada encontrando-se o melhor título a ser empregado no exame das amostras suspeitas. Este título é representado pela diluição que proporciona a melhor fluorescência específica com o mínimo de fluorescência inespecífica pela TIFD, utilizando diluições seriadas das suspensões de CCN + conjugado e CCI + conjugado, perante lâminas positivas.

3.2.2. A avaliação do conjugado deverá ser realizada a cada novo lote ou sempre que necessário, pois repetidos congelamentos, descongelamentos e filtrações podem alterar o título do conjugado. O laboratório deverá manter registro desta avaliação.

3.2.3. Para o preparo do CCN e CCI, o seguinte protocolo deverá ser adotado:

a) preparar duas suspensões a 20% de cérebro de camundongo em salina tamponada fosfatada (PBS), pH 7,4, suplementada com 2% de soro de equino livre de anticorpos antivírus da raiva ou com uma suspensão a 10% de gema de ovos de galinha embrionados de 6 a 7 dias:

a.1) uma suspensão a partir de cérebro de camundongo normal - CCN;

a.2) uma suspensão a partir de cérebro de camundongo infectado- CCI, coletado de animais na fase paralítica da doença, após inoculação de 0,03 mL de suspensão de vírus da raiva fixo (CVS - Challenge Virus Standard, com título mínimo de 10^5 DL50/0,03mL em camundongos), diluído na proporção de 1/100 ou 1/1000;

b) homogeneizar adequadamente as suspensões de cérebro;

c) centrifugar por 10 (dez) minutos a 1000 x g (força centrífuga relativa);

d) coletar o sobrenadante e distribuir em alíquotas devidamente identificadas;

e) conservar em temperatura de -20°C ou inferior;

f) utilizar as alíquotas dos sobrenadantes para diluir o conjugado na proporção indicada pela titulação previamente encontrada.

3.3 Preparação do material para ensaio em lâminas de microscopia - impressão ou decalque

3.3.1 Para a preparação do material suspeito para o ensaio em lâminas de microscopia por impressão ou decalque, deverá ser adotado o seguinte protocolo:

a) identificar as lâminas, de acordo com a amostra a ser examinada;

b) cortar fragmentos de hipocampo, cerebelo, córtex e medula espinhal;

c) colocar cada fragmento em espátula, papel filtro ou pinça cirúrgica, com o corte voltado para cima;

d) secar o fragmento com papel de filtro, passando-o levemente sobre o material;

e) fazer a impressão ou decalque do material em lâmina.

Devem ser feitas pelo menos duas impressões de cada fragmento de SNC. Se necessário, retirar o excesso de tecido com papel de filtro e deixar secar;

f) as lâminas poderão, a critério do laboratório, ser fixadas por imersão em acetona PA a -20°C, por, no mínimo, 15 (quinze) minutos. Após este período, retirar as lâminas da acetona, escorrer e deixar secar em

temperatura ambiente.

3.4. Coloração e montagem das lâminas

3.4.1. Para a coloração e montagem das lâminas, deverá ser adotado o seguinte protocolo:

- a) o conjugado deverá ser adicionado a volume apropriado de CCN ou CCI, de forma a constituir a diluição trabalho;
- b) demarcar, com lápis demográfico, esmalte ou semelhante, as impressões de tecido nervoso do material sob exame e dos controles de prova, ou utilizar lâminas de vidro extrafina, com dois círculos e extremidade fosca;
- c) recobrir a área delimitada com algumas gotas do conjugado de diluição de trabalho. A disposição de utilização da solução de conjugado + CCN e solução de conjugado + CCI deve estar prevista na documentação do laboratório e ser sempre a mesma.

Sugere-se a seguinte forma:

c.1) lâminas de controle positivo e controle negativo: recobrir a impressão de tecido nervoso localizada próximo à descrição de identificação da lâmina com a solução de conjugado + CCN.

Recobrir a impressão de tecido nervoso mais distante da descrição de identificação da lâmina com a solução de conjugado + CCI;

c.2) lâminas de material suspeito: recobrir a impressão de tecido nervoso localizada próximo à descrição de identificação da lâmina com a solução de conjugado + CCN. Recobrir a impressão de tecido nervoso mais distante da descrição de identificação da lâmina com a solução de conjugado + CCI;

d) colocar as lâminas em câmara úmida (bandeja forrada com papel de filtro ou similar umidificado e provida de tampa) e levar à estufa a 37°C por 30 (trinta) minutos;

e) lavar as lâminas com PBS, pH 7,4 a 7,8, mantendo-as levemente inclinadas horizontalmente e evitando a mistura entre as duas soluções (conjugado+CCI e conjugado+CCN);

f) submergir as lâminas em PBS, pH 7,4, por dez minutos.

Repetir este procedimento por, no mínimo, três vezes;

g) secar as lâminas ao ar em posição vertical. Colocar uma gota de solução de glicerol a 50% em PBS (pH 7,6) sobre cada impressão e sobrepor com lamínula. Esta etapa poderá ser suprimida, desde que as lâminas sejam mantidas em PBS (pH 7,4 a 7,8);

h) proceder imediatamente à leitura em microscópio de fluorescência.

3.5. Leitura

3.5.1. A leitura deverá ser realizada em microscópio de fluorescência, em magnitude de 10 x 40, abrangendo todas as áreas demarcadas, inicialmente nas lâminas-controle e, em seguida, no material suspeito.

3.6. Interpretação dos resultados

3.6.1 Validação do ensaio: para que o ensaio tenha validade, as lâminas-controle deverão apresentar o seguinte padrão de visualização:

3.6.1.a) Controle positivo: apresentar fluorescências características na impressão onde foi acrescentado o

conjugado + CCN, e não apresentar tais fluorescências na impressão onde foi acrescentado o conjugado + CCI;

3.6.1.b) Controle negativo: não apresentar quaisquer fluorescências características nas 2 (duas) impressões.

3.6.2. Resultado do material suspeito

3.6.2.1. Resultado positivo: quando qualquer uma das impressões das lâminas contendo conjugado + CCN apresentar fluorescência característica.

3.6.2.2. Resultado negativo: quando não houver qualquer fluorescência característica em todas as impressões das lâminas da amostra suspeita.

3.6.3. Fluorescências características são reações antígeno-anticorpo, de fluorescência brilhante, em cor de maçã verde ou verde amarelada, de tamanho variável. Algumas são minúsculas (chamadas comumente de poeiras ou areia) e as maiores têm as dimensões e formas comparáveis aos corpúsculos de Negri. As inclusões são geralmente circulares ou ovais e possuem a margem mais brilhante que a área central.

ANEXO II

PROVA BIOLÓGICA (PB) - ISOLAMENTO DO VÍRUS DA RAIVA EM CAMUNDONGOS

1. Objetivo

A Prova Biológica (PB) é o teste complementar ao Teste de Imunofluorescência Direta (TIFD), utilizada para detectar infectividade de uma suspensão de material suspeito de raiva, em animais de laboratório.

2. Material a ser pesquisado As regiões anatômicas de predileção a serem utilizadas no preparo do inóculo para diagnóstico de raiva são o hipocampo (corno de Ammon), o cerebelo, o córtex e a medula espinhal. É recomendada a inclusão de fragmentos de pelo menos três regiões anatômicas distintas. Para as amostras de equídeos, deverá ser incluída, sempre que possível, a medula espinhal.

3. Método

3.1. Seleção dos animais Para a PB, deverá ser selecionado um grupo de no mínimo oito camundongos da linhagem albino suíço, sadios, adultos jovens desmamados, de 21 (vinte e um) a 28 (vinte e oito) dias de idade (12 a 14 g), do mesmo sexo, ou uma ninhada de no mínimo dez camundongos albinos suíços, sadios, lactentes, de 1 (um) a 2 (dois) dias de idade.

3.2. Preparo do inóculo

a) retirar pequenos fragmentos do tecido nervoso suspeito, elegendo áreas que melhor representem as regiões anatômicas a serem pesquisadas;

b) pesar os fragmentos de tecido nervoso, macerar, homogeneizar e acrescentar volume de PBS (pH 7,4 a 7,8), de forma a obter uma suspensão de 10 a 20% (p.v.);

c) centrifugar em centrífuga refrigerada a 200 x g durante cinco minutos ou deixar em repouso por, no mínimo, 01 (uma) hora à temperatura de 4°C;

d) retirar o sobrenadante e adicionar 1.000 UI de penicilina e 2 mg de estreptomomicina por mL. Esta etapa poderá ser suprimida, desde que estes antibióticos sejam adicionados em etapa anterior;

e) o inóculo deverá ser mantido à temperatura de 4°C até ser utilizado. A inoculação deverá ser realizada no mesmo dia e o inóculo mantido em banho de gelo durante o procedimento de inoculação.

3.3. Inoculação a) aspirar o inóculo utilizando seringa de 0,25 mL a 1,0 mL (tuberculina) com agulha de calibre 0,40-0,45 mm por 1-1,5 cm de comprimento;

b) com uma das mãos, conter o animal pela pele da região dorso-cervical, mantendo-o aprisionado com o dedo polegar e o indicador, pressionando-o levemente sobre uma superfície plana. Com a outra mão, posicionar o conjunto agulha-seringa perpendicularmente à cabeça e distante 1-2 mm do arco frontal, na direção de um dos hemisférios cerebrais;

c) introduzir 1 a 2 mm da agulha, através da caixa craniana, no tecido cerebral e inocular a dose de 0,03 mL por camundongo desmamado ou a dose de 0,02 mL por camundongo lactente;

d) substituir os animais que porventura morrerem durante ou imediatamente após o procedimento de inoculação.

3.4. Observação dos animais a) manter o grupo de animais em gaiola adequada e devidamente identificada, com livre acesso à água e ração, e em ambiente com luz, temperatura e umidade controladas (infectório) de acordo com normas técnicas;

b) observar os animais diariamente e registrar na ficha de observação, que deverá conter todos os dados do material suspeito, as alterações ocorridas com os camundongos, assim como aqueles que se mantêm saudáveis;

c) o registro será feito por meio de símbolos, que deverão estar indicados em legenda, para as categorias abaixo listadas, para as quais são sugeridos: S = para animal sadio; D = para animal doente;

P = para animal paralítico; M = para animal morto; E = para animal submetido à eutanásia; NC = para animal não considerado (exemplo, sem condições de análise);

d) observar os camundongos desmamados até o 28º dia pós-inoculação e os camundongos lactentes até o 21º dia pós-inoculação;

e) examinar pelo TIFD o cérebro dos camundongos desmamados que, entre o 5º e o 28º dia pós-inoculação, morreram ou foram submetidos à eutanásia por estarem doentes ou paralíticos.

Seguir o mesmo procedimento para os camundongos lactentes que, entre o 4º e o 21º dia pós-inoculação, morreram ou foram submetidos à eutanásia por estarem doentes ou paralíticos;

f) para apressar o resultado da inoculação em camundongos neonatos, poderá ser realizada eutanásia de um camundongo por vez, aos 5, 7, 9 e 11 dias pós-inoculação, seguidos da realização da IFD.

3.4.1. Quando uma amostra, depois de inoculada, causar a morte, durante o período de observação dos animais, de um quantitativo superior a 3 (três) animais em 8 (oito) inoculados, e os mortos, após examinados, resultarem negativos para raiva no TIFD ou, ainda, caso seu exame seja impossível, dever-se-á proceder a uma nova inoculação da amostra em um lote com o dobro de animais inicialmente inoculados.

3.4.2. O diagnóstico será concluído como "Negativo" se ao menos 5 (cinco) dos animais inoculados sobreviverem saudáveis aos 28 (vinte e oito) dias de observação, no caso de desmamados, e 21 (vinte e um) dias, no caso de lactentes, e os mortos apresentarem-se negativos para raiva ao TIFD. Caso contrário, e não se tratando de material Positivo, o diagnóstico pela PB é considerado "Impossível".

3.5. Interpretação dos resultados 3.5.1. Resultado positivo: quando a impressão em lâmina do cérebro de um ou mais camundongos que morreram ou foram submetidos à eutanásia durante o período de observação apresentar fluorescência característica do vírus da raiva, pelo TIFD.

3.5.2. Resultado negativo: quando, durante o período de observação, não ocorrer morte ou sintomatologia característica para a raiva, no grupo de camundongos inoculados com o material suspeito ou quando a

impressão em lâmina do cérebro de um ou mais camundongos, que morreram ou foram submetidos à eutanásia durante o período de observação, não apresentar fluorescência característica do vírus da raiva pelo TIFD.

D.O.U., 13/04/2012 - Seção 1