

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 27 DE FEVEREIRO DE 2004

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso das atribuições que lhe conferem o inciso II, Art. 15, do Decreto nº 4.629, de 21 de março de 2003 e o art. 4º, da Portaria Ministerial nº 516, de 9 de dezembro de 1997, e tendo em vista o que consta do Processo nº 21000.012718/2003-70, resolve:

Art. 1º Estabelecer as normas sobre os requisitos de qualidade para efeito de credenciamento e monitoramento de laboratório pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com vistas a procederem a diagnósticos das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET) em ruminantes pela técnica de imunohistoquímica (IHQ), conforme disposto no Anexo I, bem como, aprovar os modelos de formulários para requisição e laudo de resultado de exames e registro de amostras, nas formas constantes dos anexos II a IV desta Instrução.

Parágrafo único. Para o credenciamento e monitoramento previstos no caput deste artigo serão observadas as normas sobre os requisitos de qualidade constantes do Anexo I desta Instrução Normativa e as da [Instrução Normativa nº 51, de 27 de junho de 2003](#).

Art. 2º O laboratório a ser credenciado deverá dispor de Responsável Técnico (RT) com formação profissional de Médico Veterinário, experiência comprovada em patologia veterinária e domínio da técnica de IHQ.

Art. 3º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

MAÇÃO TADANO ANEXO I

NORMAS SOBRE OS REQUISITOS DE QUALIDADE PARA O CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO DAS ENCEFALO-PATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS(EET) EM RUMINANTES, PELA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA(IHQ)

1. DAS DEFINIÇÕES

1.1 Bulbo: porção do tronco encefálico que inicia aproximadamente na altura da inserção do primeiro par de nervos cervicais e se estende rostralmente até o bordo caudal da ponte;

1.2 Óbex: marcação anatômica no tronco encefálico que consiste na junção das tênias do sexto ventrículo no ângulo posterior;

1.3 Cerebelo: porção do metencéfalo localizada caudalmente aos lobos occipitais do telencéfalo e sobre a ponte e o bulbo (medula oblonga), formando a maior parte do teto do quarto ventrículo;

1.4 Órgãos Linfóides: locais de produção de células linfóides, como timo, baço e linfonodos e, agregados linfóides: tonsilas, placas Peyer e terceira pálpebra; e

1.5 Protocolo: ambiente destinado ao recebimento das amostras, registro, expedição dos resultados e arquivo dos mesmos.

2. DAS AMOSTRAS

2.1 A amostra de eleição a ser testada é constituída por fragmento de tecido devidamente fixado em formol a 10% (dez por cento) de está discriminada conforme a espécie:

2.1.1 Bovina - bulbo na altura do óbex; e

2.2.2 Ovina e Caprina - bulbo na altura do óbex, cerebelo e órgãos linfóides.

3. DOS RECEBIMENTOS DAS AMOSTRAS

3.1 As amostras deverão estar acompanhadas de formulário de requisição de exame, devidamente preenchido, conforme modelo estabelecido no Anexo II; e

3.2 As amostras serão registradas em livro próprio conforme modelo estabelecido no Anexo III.

4. DA CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM

4.1 A amostra deve ser conservada em formol a 10% (dez por cento), até a inclusão em blocos de parafina e a confecção das lâminas; e

4.2 Os blocos de parafina e as preparações histológicas deverão ser arquivados por, pelo menos, sete anos.

5. DA SEGURANÇA BIOLÓGICA

5.1 O laboratório deverá seguir os procedimentos de biossegurança preconizados para doenças priônicas;

5.2 Na ocorrência de amostra positiva deverão ser adotados os seguintes procedimentos:

5.2.1 O material utilizado para o diagnóstico, no dia, deverá ser submetido a um processo de desinfecção com Hidróxido de Sódio a 2N por duas horas e, após bem enxaguado, autoclavado a 134° C (cento e trinta e quatro graus celsius), por uma hora; e

5.2.2 O material a ser descartado deverá ser duplamente embalado em sacos adequados para lixo infecciosos e incinerado posteriormente.

6. DO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO

6.1 A técnica de IHQ descrita no item 10, deste anexo, é um dos métodos indicados para o diagnóstico das EET;

6.2 Os procedimentos no manejo de reativos utilizados na técnica de IHQ são os descritos no item 11 deste anexo; e

6.3 Qualquer alteração na metodologia analítica deverá ser previamente aprovada pelo MAPA.

7. DOS RESULTADOS E RELATÓRIOS

7.1 Os laudos de resultados dos exames deverão ser emitidos em formulários próprios conforme modelo constante do Anexo IV, de acordo com o seguinte fluxo:

7.1.1 O resultado negativo será encaminhado ao requisitante e ao setor competente do MAPA;

7.1.2 O resultado suspeito ou duvidoso será encaminhado ao requisitante, ao setor competente do MAPA e ao laboratório de referência para o diagnóstico das EET no Brasil; e

7.1.3 Todo laboratório credenciado deverá encaminhar ao setor competente do MAPA, até o décimo dia útil do mês subsequente, relatório das atividades mensais, elaborado em sistema específico.

8. DAS INSTALAÇÕES E EQUIPAMENTOS DO LABORATÓRIO

8.1 O laboratório deve possuir instalações e equipamentos adequados para a realização do exame de IHQ;

8.2 As instalações devem obedecer a um fluxo operacional coerente com a técnica desenvolvida;

8.3 O local de exame deve estar provido de bancada impermeável e resistente à desinfecção, fontes de eletricidade suficientes e adequadas ao perfeito funcionamento dos equipamentos e paredes com superfície lavável; e

8.4 O setor de esterilização e lavagem deve estar provido de fontes de eletricidade, tanques ou pias que permitam a higienização de todo material utilizado na realização da análise.

8.5 O laboratório deve estar equipado com:

8.5.1 Arquivo;

8.5.2 Microcomputador;

8.5.3 Caixas para arquivo das lâminas e blocos de tecidos;

8.5.4 Micrótomo;

8.5.6 Processador automático de tecidos (opcional);

8.5.7 Autoinclusor de parafina (opcional);

8.5.8 Banho Maria histológico;

8.5.9 Refrigerador/ freezer -20°C (vinte graus celsius negativos);

8.5.10 Capela de fluxo contínuo;

8.5.11 Capela de fluxo laminar;

8.5.12 Estufa;

8.5.13 Agitador de tubos (opcional);

8.5.14 Pipetas monocanais de 1-10 µl, 10-100 µl e 200-1000 µl, ou similares;

8.5.15 Vidraria de laboratório;

8.5.16 Armário para estoque dos reagentes e soluções;

8.5.17 Microscópio óptico;

8.5.18 Medidor de pH;

8.5.19 Balança analítica;

8.5.20 Autoclave;

8.5.21 Destilador; e

8.5.22 Deionizador (opcional).

9. DO RESPONSÁVEL TÉCNICO (RT) TITULAR E SUBSTITUTO

9.1 O RT titular e seu substituto, designados pelo laboratório deverão ser submetidos a treinamento, no

laboratório de referência, na técnica utilizada;

9.2 Após o treinamento e para efeito de credenciamento ou monitoramento, o RT titular e seu eventual substituto, serão submetidos a auditorias técnicas com acompanhamento do ensaio no próprio laboratório, realizadas por auditores designados pelo MAPA;e

9.3 Os laudos laboratoriais e o relatório mensal deverão ser, obrigatoriamente, assinados pelo responsável técnico titular ou seu substituto.

10. DOS PROCEDIMENTOS PARA O DIAGNÓSTICO PELA TÉCNICA DE IHQ

10.1 A fixação e descontaminação do material devem ser realizadas como se segue:

10.1.1 Os tecidos frescos devem ser fixados em formalina a 10% (dez por cento), preferencialmente tamponada. O cérebro e linfonodos inteiros necessitam de, pelo menos, três a cinco dias de fixação antes de serem clivados. Biópsia de linfonodos requer, pelo menos, dois dias de fixação. Fragmentos de tecidos que tenham espessura em torno de sete milímetros podem ser fixados em um dia;

10.1.2 Após o tempo necessário à fixação, os tecidos são clivados em fragmentos de aproximadamente dois milímetros de espessura e colocados em cassetes para inclusão;

10.1.3 Os tecidos são descontaminados em uma solução de ácido fórmico variando de 95% a 98% (noventa e cinco a noventa e oito por cento) por uma hora, em uma cabine de fluxo contínuo. Os cassetes devem estar totalmente imersos na solução;

10.1.4 Enxaguar rapidamente os tecidos por três vezes em dez volumes de água e, em seguida, submetê-los a lavagem contínua em água corrente até a total eliminação do odor do ácido;

10.1.5 Enxaguar em água bidestilada ou deionizada por dez minutos; e

10.1.6 Colocar os cassetes em solução de formalina fresca tamponada a 10%, (dez por cento) por vinte e quatro horas.

10.2 Do processamento e inclusão dos tecidos em parafina:

10.2.1 O material, depois de clivado, deverá ser processado rotineiramente para exame histológico. Este poderá ser feito em processador automático de tecidos (histotécnico) ou manualmente, regulado conforme as conveniências do laboratório, mas obedecendo, em geral, os tempos abaixo discriminados:

CUBAS	REAGENTES	TEMPO DE IMERSÃO
Copo Becker 1	Álcool 95% (formol)	1h00min
Copo Becker 2	álcool 95%	1h00min.
Copo Becker 3	álcool 95%	1h00min.
Copo Becker 4	álcool absoluto	1h00min.
Copo Becker 5	álcool absoluto	1h00min.
Copo Becker 6	Xilol	1h00min.
Copo Becker 7	Xilol	1h00min.
Copo Becker 8	Xilol	1h00min.
Estufa 1	Parafina	1h30min.
Estufa 2	Parafina	1h30min.

10.2.2 Após o processamento descrito acima é feita a inclusão do material em parafina a uma temperatura variando de 58° a 65°C (cinquenta e oito a sessenta e cinco graus celsius).

10.3 Da Preparação dos Cortes Histológicos e Lâminas:

10.3.1 A amostra a ser testada e os controles da prova nos blocos de parafina são cortadas em quatro a seis micrômetros de espessura e colocados em lâminas especiais com carga elétrica (tipo Probe On Plus), seguindo as orientações de uso do fabricante. Devem ser utilizadas duas lâminas controle positivo e duas lâminas controle negativo:

10.3.1.1 Como controle positivo devem ser usados tecidos de animais comprovadamente positivos para Scrapie, inativados com Ácido Fórmico variando de 95% a 98% (noventa e cinco a noventa e oito por cento) por uma hora;

10.3.1.2 No caso de utilizar o sistema do tipo MicroProbe as lâminas devem ser pareadas de maneira que forme um espaço capilar, com as partes pintadas fazendo contato, e colocadas no suporte próprio para lâminas (tipo Slide Holder);

10.3.2 Para remoção da parafina as lâminas podem ser colocadas na estufa a 65°C (sessenta e cinco graus celsius) por vinte minutos; e

10.3.2.1 No caso de utilizar o sistema do tipo MicroProbe, após este período, as lâminas são imersas em xilol, por dez minutos a 65°C (sessenta e cinco graus celsius), trocar o xilol e imergi-las por mais três minutos a 65°C (sessenta e cinco graus celsius) e realizar três enxágües rápidos.

10.4 A reidratação dos tecidos deve ser procedida na forma seguinte:

10.4.1 Lavar em xilol por cinco minutos; Lavar em álcool absoluto por dois minutos;

10.4.2 Lavar em álcool 95% (noventa e cinco por cento) por dois minutos;

10.4.3 Lavar em álcool 80% (oitenta por cento) por dois minutos;

10.4.4 Lavar em álcool 70% (setenta por cento) por um minuto.

10.5 Para o bloqueio da peroxidase endógena devem ser tomadas as seguintes providências:

10.5.1 Enxaguar as lâminas com uma solução de água oxigenada (H₂O₂) e metanol a três por cento (1ml de H₂O₂ a 30% em 30ml de metanol) preparada antes do uso;

10.5.2 Incubar por dez minutos entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius) com a mesma solução; e

10.5.3 Enxaguar as lâminas submergindo-as quatro vezes em água deionizada ou bidestilada. Se necessário, as lâminas podem ficar algumas horas submersas em água.

10.6 Para a ativação do antígeno devem ser tomadas as seguintes providências:

10.6.1 Incubar os tecidos em uma solução de ácido fórmico 95% (noventa e cinco por cento) por cinco minutos entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius), em um recipiente resistente ao ácido;

10.6.2 Lavar cuidadosamente e neutralizar em tampão Tris-HCl, usando três enxágües rápidos, seguido de incubação por um minuto em tampão fresco. O pH do lavado final deve ficar entre 7 e 8 (sete e oito).

Para o controle do pH, colocar as lâminas sobre um papel medidor de pH e continuar as lavagens até atingir o pH adequado;

10.6.3 Transferir o suporte com as lâminas para um recipiente resistente ao calor, contendo solução tampão adequada;

10.6.4 Tampar o recipiente, envolvê-lo em papel alumínio e autoclavar a 121°C (cento e vinte e um graus celsius) por vinte minutos. A contagem do tempo é iniciada quando a temperatura atinge 121°C (cento e

vinte e um graus celsius); e

10.6.5 Transferir as lâminas para o tampão Tris com tween20 (TBST) por dez minutos. Se necessário, as lâminas podem ser mantidas em tampão por algumas horas.

10.7 As providencias para a coloração Imuno-histoquímica devem ser as seguintes:

10.7.1 Nesta etapa a temperatura ambiente deve ser mantida entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius);

10.7.2 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;

10.7.2.1 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;

10.7.3 Enxaguar três vezes por vinte segundos, em TBST;

10.7.4 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;

10.7.5 Enxaguar com TBST, três vezes por vinte segundos;

10.7.6 Agregar o complexo Biotina-IgG anti-camundongo e incubar por dez minutos, entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius);

10.7.7 Enxaguar com TBST, três vezes por vinte segundos;

10.7.8 Agregar a Peroxidase-Estreptavidina ou Peroxidase

Avidina e incubar por dez minutos entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius);

10.7.9 Enxaguar com TBST, três vezes por vinte segundos;

10.7.10 Agregar substrato DAB cromógeno e incubar por quatro a cinco minutos;

10.7.11 Enxaguar com água destilada, duas vezes por vinte segundos;

10.7.12 Contracorar com hematoxilina;

10.7.13 Enxaguar com água corrente, três vezes por vinte segundos;

10.7.14 Deixar em água corrente entre dois a cinco minutos até atingir a coloração azulada:

10.7.14.1 Este processo pode ser substituído submergindo as lâminas cinco vezes em banho contendo uma solução de hidróxido de amônio ou Scotts Water Substitute;

10.7.15 Enxaguar com água corrente, duas vezes por vinte segundos; e

10.7.16 Deixar as lâminas na água até começar a montagem com lamínula.

10.8 Para a desidratação dos tecidos deve ser providenciado o seguinte:

10.8.1 Lavar em álcool 70% (setenta por cento) por dois minutos;

10.8.2 Lavar em álcool 80% (oitenta por cento) por dois minutos;

10.8.3 Lavar em álcool 95% (noventa por cento) por dois minutos;

10.8.4 Lavar em álcool absoluto por dois minutos;

10.8.5 Lavar em xilol por cinco minutos; e

10.8.6 Lavar em xilol por cinco minutos.

10.9 Montar as lâminas utilizando bálsamo do Canadá natural ou sintético para fixar a lamínula.

10.10 Ler em microscópio óptico.

10.11 Registrar o resultado.

11. DO MANEJO DOS REATIVOS

11.1 Anticorpos:

11.1.1 A solução Estoque de anticorpos, em uso, deve ser armazenada entre 2° e 7°C (dois e sete graus celsius);

11.1.2 Não são recomendados o congelamento e o descongelamento repetidos;

11.1.3 Os anticorpos são diluídos no dia do uso e mantidos sob refrigeração; e

11.1.4 O congelamento de anticorpos pré-diluídos, especialmente quando estão combinados, não é recomendado.

11.2 Substrato Cromógeno DAB 11.2.1 Utilizar conforme recomendações do fabricante;

11.2.3 Deve ser mantido sob refrigeração até o seu uso; e

11.2.4 Se apresentar um precipitado deve ser bem agitado antes do uso.

11.3 Tampão TRIS-HCl a 0.1 M 11.3.1 Dissolver 12,1 (doze virgula um) gramas de Tris base em 800ml (oitocento mililitro) de água bidestilada;

11.3.2 Ajustar o pH para 7,6 (sete virgula seis) com HCl concentrado e completar para um litro; e

11.3.3 Pode ser mantido em temperatura variando entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius).

11.4 Tampão Tris com Tween20 (Tbst)

11.4.1 Adicionar 6,06 (seis virgula zero seis) gramas de Tris base e 17,5 (dezesete virgula cinco) gramas de Cloreto de Sódio (NaCl) em 800ml (oitocentos mililitro) de água bidestilada;

11.4.2 Ajustar o pH para 7,6 (sete virgula seis) com Ácido Clorídrico (HCl) concentrado e completar para um litro de água, homogeneizando bem;

11.4.3 Adicionar 1ml (um mililitro) de Tween20 e homogeneizar evitando formar espuma; e

11.4.4 Conservar em temperatura variando entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius).

11.5 Solução de Hidróxido de Amônia

11.5.1 Adicionar 2,5ml (dois virgula cinco mililitro) de Hidróxido de amônia 14,8 N em um litro de água

bidestilada; e

11.5.2 Conservar em temperatura variando entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius) em frasco com tampa para evitar a evaporação.

11.6 Scott'S Water Substitute

11.6.1 Diluir dez gramas de Sulfato de Magnésio em um litro de água bidestilada; e

11.6.2 Conservar em temperatura variando entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius).

ANEXO III

INFORMAÇÕES QUE DEVEM CONSTAR DO LIVRO DE REGISTRO DE AMOSTRAS PELA TÉCNICA DE IHQ

1. Número do exame IHQ;
2. Número no DXSNC;
3. Número do protocolo;
4. Nome e endereço do remetente;
5. Nome do responsável pelo recebimento;
6. Nome e endereço do proprietário do animal;
7. Número do Animal;
8. Espécie, raça, sexo e idade do animal;
9. Data de encaminhamento da amostra;
10. Data de entrada;
11. Data de saída; e
12. O resultado.

ANEXO IV

MODELO DE FORMULÁRIO DE LAUDO DE RESULTADO DE EXAME PELA TÉCNICA DE IHQ

Nº do Protocolo Remetente:	Categoria de exame:
-------------------------------	---------------------

Espécie:	Raça:	Sexo:	Idade:
----------	-------	-------	--------

Proprietário:	Procedência:
---------------	--------------

Data de entrada:	Data de encaminhamento:	Número de blocos:	Data de saída:
------------------	-------------------------	-------------------	----------------

Remetente:

Endereço do órgão requisitante:

Histórico:

Diagnóstico:

Assinatura:	
Responsável técnico:	Data:

D.O.U., 23/03/2004

RET., 25/03/2004