

# MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

## GABINETE DO MINISTRO

### INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 34, DE 8 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 8.852, de 20 de setembro de 2016, no Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, na Instrução Normativa MAPA nº 57, de 11 de dezembro de 2013, na Instrução Normativa nº 19 de 10 de outubro de 2016, e o que consta do Processo nº 21000.000486/2013-89, resolve:

Art. 1º Definir os requisitos e critérios para a realização do diagnóstico de brucelose, por meio dos métodos do Teste do Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), do Teste do 2 - Mercaptoetanol (2ME), do Teste do Anel em Leite (TAL), do Teste de Polarização Fluorescente (FPA) e do Teste de Fixação do Complemento (CFT), 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 e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT).

Art. 2º Ficam aprovados os métodos previstos nos Anexo I a V desta Instrução Normativa.

Art. 3º O laboratório de que trata o art. 1º desta Instrução Normativa deve designar responsável(is) técnico(s), médico veterinário, que será(ão) submetido(s) a exames em um laboratório oficial ou por meio do acompanhamento do ensaio no próprio laboratório, realizados por auditores designados pela Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial - CGAL/SDA/MAPA para fins de comprovação de sua competência na condução dos métodos previstos nesta Instrução Normativa.

Parágrafo único. O(s) responsável(is) técnico(s) não poderá(ão) responder por mais de um laboratório.

Art. 4º O laboratório deverá dispor das seguintes instalações:

I - Área específica para recebimento das amostras;

II - Área específica para execução do método; e

III - 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.

Art. 5º É considerada amostra para diagnóstico sorológico de brucelose, o soro sanguíneo, no mínimo 2,5mL, congelado ou resfriado até 8º C (oito graus Celsius);

Art. 6º A amostra deverá estar acompanhada do formulário de requerimento de realização de teste para o diagnóstico de brucelose, devidamente preenchido e assinado pelo médico veterinário habilitado, com sua identificação profissional, ou pelo serviço oficial de defesa sanitária.

Parágrafo único. A amostra será obrigatoriamente dividida em três alíquotas e identificadas, uma para teste, e outras duas para contraprova.

Art. 7º Soros com aspecto de excessiva hemólise, sujidade ou indícios de contaminação devem ser desprezados.

Art. 8º No caso de recebimento de sangue, o mesmo deverá ser centrifugado, e o soro receberá o tratamento do artigo anterior.

Art. 9º A amostra a ser testada deverá ser mantida sob refrigeração até a realização da análise ou

congelada se a mesma for realizada 48 horas após o recebimento.

Art. 10. As amostras deverão ser registradas em livro próprio, ou sistema de registro aprovado pela CGAL/SDA, contendo, no mínimo, as informações referentes ao número do protocolo, responsável pelo encaminhamento da amostra e solicitação do exame, responsável pelo recebimento, espécie, sexo, idade, raça, data da coleta, data do encaminhamento, data do recebimento e data de emissão do relatório de ensaio.

Art. 11. Os modelos de solicitação e de relatórios de ensaio com os resultados dos testes deverão ser emitidos em formulários próprios, disponibilizados pela CGAL/SDA/MAPA no endereço eletrônico <http://www.agricultura.gov.br/laboratorios/credenciamento>. e expedidos 03(três) vias.

§ 1º Os relatórios de ensaio com os resultados dos testes deverão ser emitidos em 03(três) vias.

§ 2º Uma via do relatório de ensaio com resultado NÃO REAGENTE será enviada ao médico veterinário habilitado requisitante do teste, uma via será enviada ao órgão estadual de defesa sanitária do estado onde está localizada a propriedade de origem da amostra e outra deverá ser mantida no laboratório.

§ 3º O relatório de ensaio com resultado REAGENTE ou INCONCLUSIVO deverá ser comunicado imediata e obrigatoriamente ao médico veterinário habilitado requisitante do exame e ao órgão estadual de defesa sanitária do estado onde está localizada a propriedade de origem da amostra num prazo máximo de 24 (vinte e quatro) horas.

§ 4º No caso de haver 1 (um) resultado REAGENTE OU INCONCLUSIVO em um lote, todos os relatórios de ensaio deverão ser tratados de acordo com o § 2º deste artigo.

§ 5º Cópias eletrônicas dos relatórios de ensaio deverão ser encaminhadas a endereço eletrônico do serviço responsável pela saúde animal da SFA/MAPA onde está localizada a propriedade de origem da amostra.

Art. 12. A solicitação de contraprova deve obedecer ao prazo máximo de 8 (oito) dias úteis a contar da data do recebimento do resultado.

§ 1º A realização da primeira contraprova é efetuada no laboratório realizador do teste.

§ 2º A contraprova deve ser solicitada ao Serviço de Saúde Animal da SFA da Unidade Federativa onde se encontra o animal reagente, por meio de documento oficial contendo justificativa para a solicitação.

§ 3º O requisitante da contraprova obriga-se a pessoalmente, ou por seu representante, acompanhar, assistido ou não por técnicos de sua confiança, aos procedimentos que serão realizados na contraprova.

§ 4º Cabe ao técnico indicado pelo requisitante da contraprova apenas assistir, fiscalizar e observar a exatidão do resultado do ensaio.

§ 5º É obrigatória a comunicação ao Serviço de Saúde Animal da SFA, da data e horário da realização da contraprova, podendo o técnico daquele Serviço assistir, fiscalizar e observar a exatidão do resultado.

§ 6º A ausência do representante do Serviço de Saúde Animal da SFA não constitui óbice para a realização da mesma, desde que tenha sido observado o disposto no § 2º deste artigo.

§ 7º Após a realização da contraprova, será lavrada uma ata assinada pelos interessados presentes, onde constará o resultado desse ensaio e a descrição de todo método analítico nele utilizado.

§ 8º A desistência do requisitante da contraprova, ou seu representante, mediante declaração escrita, ou a sua ausência na realização da contraprova, importará no prevalecimento do resultado obtido no primeiro ensaio.

Art. 13. A solicitação da segunda contraprova somente poderá ser requerida após a realização da primeira contraprova e deve obedecer ao prazo máximo de 2 (dois) dias úteis a contar da data de realização desta última.

§ 1º O teste de que trata o caput deste artigo somente será realizado caso haja divergência entre os resultados de teste e primeira contraprova.

§ 2º A contraprova prevista no caput deste artigo será realizada em laboratório designado pela CGAL/SDA e a terceira alíquota, que fica sob responsabilidade do laboratório, deve ser encaminhada lacrada e acompanhada de requisição preenchida pelo serviço oficial.

§ 3º A contraprova mencionada no parágrafo anterior será solicitada ao Serviço de Saúde Animal da SFA da Unidade Federativa onde se encontra o animal reagente, por meio de documento oficial.

§ 4º O requisitante da contraprova obriga-se a pessoalmente, ou por seu representante, acompanhar, assistido ou não por técnicos de sua confiança, aos procedimentos que serão realizados na contraprova.

§ 5º Cabe ao técnico indicado pelo requisitante da contraprova apenas assistir, fiscalizar e observar a exatidão do resultado do ensaio.

§ 6º É obrigatória a comunicação ao Serviço de Saúde Animal da SFA, da data e horário da realização da contraprova, podendo o técnico daquele Serviço assistir, fiscalizar e observar a exatidão do resultado.

§ 7º A ausência do representante do Serviço de Saúde Animal da SFA não constitui óbice para a realização da mesma, desde que tenha sido observado o disposto no § 2º deste artigo.

§ 8º Após a realização da contraprova, será lavrada uma ata assinada pelos interessados presentes, onde constará o resultado desse ensaio e a descrição de todo método analítico nele utilizado.

§ 9º A desistência do requisitante da 2ª contraprova, ou seu representante, mediante declaração escrita, ou a sua ausência na realização da contraprova, importará no prevalecimento do resultado obtido na primeira contraprova.

Art. 14. Os relatórios mensais de atividades operacionais serão expedidos em 02 (duas) vias, em modelo disponibilizado pela CGAL/SDA, sendo uma via emitida à unidade laboratorial da CGAL/SDA responsável pelas atividades de credenciamento de laboratórios de brucelose e uma via ser arquivada no laboratório.

§ 1º Cópia eletrônica do relatório mensal de atividades operacionais deverá ser encaminhada ao endereço eletrônico do serviço responsável pela saúde animal da SFA onde está localizado o laboratório.

§ 2º Somente o responsável técnico poderá assinar o relatório de ensaio de resultado do teste e os relatórios mensais.

Art. 15. As normas de segurança biológica deverão ser respeitadas em todos os procedimentos realizados e o laboratório deverá dispor de práticas e instalações que atendam no mínimo o Nível de Biossegurança 2 (NB2), da Organização Mundial de Saúde (OMS).

Art. 16. Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 17. Fica revogada a [Instrução Normativa nº 41, de 24 de novembro de 2006](#).

BLAIRO MAGGI

ANEXO I

## TESTE DE POLARIZAÇÃO FLUORESCENTE

### 1. Reagentes.

1.1. São fornecidos pelos kits comerciais.

1.2. Quando não indicado pelo fabricante do Kit, os kits para o teste de Polarização Fluorescente devem ser armazenados sob refrigeração de 2 a 8°C;

1.3. Os reagentes e amostras devem estar à temperatura ambiente (18 a 25°C) antes do uso;

1.4. A temperatura ambiente (18 a 25°C) deve ser monitorada;

1.5. Variações de temperatura durante o procedimento devem ser evitadas;

1.6. Tubos de borosilicato podem ser reutilizados desde que estejam devidamente limpos.

1.7. Tubos riscados não devem ser usados;

1.8. Periodicamente ou a cada novo lote do antígeno, o aparelho deve ser calibrado:

1.8.1. Entrar na configuração de calibração do aparelho.

1.8.2. Pipetar em um tubo de vidro de borosilicato (10 X 75 mm) 1mL do tampão diluído e fazer a leitura "Blank".

1.8.3. Pipetar mais 10µL do antígeno conjugado, esperar dois minutos e fazer a leitura "Tracer".

1.8.4. O "Fator G" deve ser ajustado para que o número obtido no "Sample mP" esteja em  $80 \pm 1$  mP.

1.8.5. A cada rodada de testes, devem-se realizar três leituras do soro controle negativo e uma leitura do soro controle positivo que fazem parte do kit para validação dos resultados e determinação do ponto de corte da prova.

### 2. Técnica.

2.1. Seguir as instruções do fabricante do kit

### 3. Interpretação dos resultados.

3.1. Negativo: menos de 10mP acima da média dos controles negativos.

3.2. Inconclusivo: de 10 a 20mP acima da média dos controles negativos.

3.3. Positivo: mais de 20mP acima da média dos controles negativos

## ANEXO II

### TESTE DO ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO (AAT)

## 1. Antígenos.

### 1.1. São adquiridos diretamente dos fabricantes.

1.2. Quando não indicado pelo fabricante, o antígeno deve ser estocado sempre entre 4 e 8°C (quatro e oito graus Celsius).

## 2. Técnica.

2.1. O ambiente no qual será realizada a prova, deve estar em temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ .

2.2. Deixar os soros e o antígeno à temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$  por, pelo menos, 30 (trinta) minutos.

2.2.1. Caso os soros estejam congelados este período de equilíbrio à temperatura ambiente deve ser de uma hora.

2.3. As placas e misturadores devem ser limpos com água e detergente, devendo ser reutilizados somente após estarem secos.

2.4. Homogeneizar os soros e o antígeno antes de realizar o ensaio.

2.5. Dispensar, uma dose de 30µL (trinta microlitros) de antígeno em cada quadrado da placa de vidro.

2.6. Dispensar 30µL do soro a ser testado ao lado do antígeno, preferencialmente sem que os dois entrem em contato.

2.7. Misturar, com movimentos circulares, o soro e o antígeno, de modo a obter um círculo de aproximadamente 2 cm (dois centímetros).

2.8. Agitar a placa com movimentos oscilatórios contínuos, numa frequência de aproximadamente 30 (trinta) movimentos por minuto, por 4 (quatro) minutos. Os movimentos devem ser feitos de tal forma que a mistura antígeno e soro fique em agitação constante, sem a necessidade de movimentos vigorosos. A indicação de frequência é baseada na máquina que faz a agitação.

2.9. Colocar a placa na caixa de leitura com luz indireta e proceder à leitura.

2.10. Em todas as provas devem ser realizados soros controle de prova positivo e negativo.

2.11. Os resultados só serão válidos se forem obtidos os resultados esperados para os controles de prova.

2.12. Resultados positivos obtidos após os quatro minutos de prova não deverão ser considerados.

## 3. Interpretação dos resultados.

3.1. Presença de grumos - Reagente.

3.2. Ausência de grumos - Não Reagente.

## TESTE DO 2-MERCAPTOETANOL (2-ME)

### 1. Precauções na execução do ensaio.

1.1. A diluição do antígeno para a série de tubos com 2-ME deve ser realizada em solução salina a 0,85%, sem adição de fenol.

1.2. Quando não indicado pelo fabricante, os antígenos diluídos devem ser conservados sob refrigeração (+4°C a +8°C), podendo ser utilizados por um período de até uma semana.

1.3. O 2-ME, com 99% de pureza mínima, deve ser mantido em frascos de cor âmbar, hermeticamente fechados e sob refrigeração.

1.4. O 2-ME é tóxico para o ser humano e deve ser manuseado em capela de exaustão química.

1.5. Em cada teste serão incluídos soros para controle de prova padronizados e com resultados conhecidos pelo laboratório. Devem ser observadas reações positivas e negativas na SAL e no 2ME, assim como uma reação com título maior na SAL que no 2ME;

1.6. Ocasionalmente, em amostras que apresentam título elevado, o tubo da diluição 1:25 pode estar um pouco turvo na prova do 2-ME, ainda que os tubos subsequentes estejam claros. Isto não deve ser considerado como resultado negativo do teste.

### 2. Técnica.

2.1. Permitir que a temperatura de todos os reagentes e amostras se equilibrem com a do ambiente.

2.2. Diluir o antígeno para Soro aglutinação Lenta (SAL) em tubos 100 (cem) vezes em solução salina a 0,85% contendo 0,5% de fenol. Concentração final 0,045%.

2.3. Diluir o antígeno para a prova de 2-ME em tubos 50 (cinquenta) vezes em solução salina 0,85% sem adição de fenol. Concentração final 0,090%.

2.4. Preparar solução de 2-ME a 0,1M misturando-se 7,8mL de 2-ME a 992,20mL de solução salina a 0,85% sem fenol. Para volumes diferentes, utilizar a mesma proporção.

2.5. Colocar, em uma estante, duas fileiras de quatro tubos vidro 13 mm X 75 mm, para cada amostra de soro a ser testada.

2.6. Utilizando micropipetas, fazer diluições seriadas das amostras de soro a 1:200, 1:100, 1:50 e 1:25, distribuindo-se, nessa ordem, 10µL, 20µL, 40µL e 80µL de soro em cada fileira de tubo;

2.7. Dispensar 1mL de solução de 2-ME 0,1 mol/L diluído em solução salina nos quatro tubos para a prova de 2-ME.

2.8. Deixar esses tubos em repouso por, pelo menos, quinze minutos em temperatura ambiente, para que o 2-ME lise as moléculas de IgM.

2.9. Enquanto os tubos da prova de 2-ME estiverem em repouso, dispensar 2mL do antígeno diluído 1:100 em salina fenicada nos quatro tubos para a prova de SAL.

2.10. Após os quinze minutos, dispensar 1mL do antígeno diluído 1:50 em solução salina nos quatro tubos para a prova de 2ME. A concentração final do antígeno na solução será de 0,045% e a do 2-ME de 0.05 mol/L.

2.11. Misturar bem agitando a grade de tubos.

2.12. Incubar a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  por  $48 \pm 3$  h.

2.13. A leitura da prova é feita por meio de uma fonte de luz indireta contra um fundo escuro e opaco, com uma forte luz que atravesse os tubos. As fontes de luz estranhas devem ser reduzidas. As interpretações baseiam-se no grau de turvação dos tubos e na firmeza dos grumos, após agitação suave dos tubos (aglutinação do antígeno).

2.14. O resultado de cada amostra será determinado pelo título sorológico encontrado nas provas de SAL e 2-ME. Esse título será correspondente ao inverso da maior diluição em que se observa reação de aglutinação.

### 3. Interpretação dos resultados.

3.1. O grau de aglutinação em cada uma das distintas diluições deve ser classificado como: completo (+), incompleto (I) ou negativo (-).

3.1.1. Reação completa - é aquela em que o líquido da mistura soro/antígeno aparece translúcido, e a agitação suave não rompe os grumos.

3.1.2. Reação incompleta - é aquela em que a mistura soro/antígeno aparece parcialmente translúcida, e uma suave agitação não rompe os grumos.

3.1.3. Reação negativa - é aquela em que a mistura soro/antígeno aparece opaca ou turva, e uma agitação suave não revela grumos.

3.1.4. A interpretação dos resultados da prova é realizada segundo os quadros 1 (um) e 2 (dois), a seguir:

QUADRO 1: interpretação da prova do 2-ME para fêmeas com idade igual ou superior a 24 (vinte e quatro) meses e vacinadas entre 3 (três) e 8 (oito) meses de idade

2-ME SAL	NR	25 I	25	50 I	50	100 I	100	200 I	200
NR	-								
25 I	-	-							
25	-	-	+						
50 I	-	-	+	+					
50	-	-	+	+	+				







Nº de animais	Volume de leite (em mL)
Até 150	1
151 a 450	2
451 a 700	3
Acima de 700	Dividir em lotes menores

2.3. Adicionar 30µL de antígeno ao leite, tampar o tubo e homogeneizar até obter uma mistura homogênea do antígeno no leite.

2.4. Incubar por 1 (uma) hora a 37° C (trinta e sete graus Celsius) e proceder à leitura.

### 3. Interpretação dos Resultados.

3.1. Anel de creme azul e coluna de leite branca ou azulada: REAGENTE.

3.2. Anel de creme branco e coluna de leite azul: NÃO-REAGENTE.

## ANEXO V

### TESTE DA FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

#### 1. Precauções na execução do teste.

1.1. A Solução de Drabkin (SD) é cianeto de potássio (500mg/dl). Não deve ser misturada a ácidos fortes, inclusive durante o descarte, devido ao risco de formação de ÁCIDO CIANÍDRICO composto volátil, incolor, inodoro e fatal.

1.2. Sempre que a operação envolver a utilização de um reagente comercial, seguir as orientações do fabricante quanto à reconstituição, armazenamento e validade.

1.3. Pode ser utilizada água destilada em substituição a SD, após estudo de equivalência de resultados no laboratório.

#### 2. Tratamento das amostras do ensaio e soros controle.

2.1. As amostras que serão analisadas no ensaio e os soros controle são inativados em banhomaria por 30 (trinta) minutos com as seguintes temperaturas.

2.1.1. Bovinos: 58° C ± 1°C.

2.1.2. Bubalinos:  $62,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

2.2. Após o período de inativação, se as amostras forem imediatamente testadas podem ser mantidas à temperatura ambiente ou à temperatura de refrigeração ( $2^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$ ).

2.3. As amostras inativadas podem permanecer sob refrigeração ( $2^{\circ}$  a  $8^{\circ}\text{C}$ ) por, no máximo, 24h. Após este período devem ser congeladas em temperatura máxima de  $-20^{\circ}\text{C}$  (vinte graus Celsius negativos).

2.4. As amostras do ensaio e soros controle devem ser diluídos em Solução de Trabalho (100mL de tampão veronal 5x concentrado + 395mL de água destilada + 5mL de gelatina solúvel 10%) na proporção de 1:10

2.5. Manter os reagentes em banho de gelo durante os procedimentos de titulação e execução do ensaio.

### 3. Determinação da densidade óptica (DO) alvo.

#### 3.1. Método da cianometahemoglobina.

3.1.1. Neste método, a Hb é convertida em cianometahemoglobina (mais estável), por diluição em RC resultando em um padrão que é utilizado para ajustar o volume celular da suspensão de eritrócitos.

3.1.2. Para uma suspensão de eritrócitos a 3 %, diluída 1:16, tem-se 60mg de Hb/dL.

#### 3.2. Cálculo do fator de calibração.

3.2.1. Ligar o espectrofotômetro e aguardar que o mesmo termine a sequência de autodiagnóstico, que leva cerca de 15 minutos, antes de usá-lo.

3.2.2. Preparar uma solução padrão de hemoglobina (Hb) contendo 60mg/dL em 5mL de RC.

3.2.3. Homogeneizar e aguardar 5 minutos.

3.2.4. Ler a densidade ótica (DO), em 540 nm, usando RC como branco.

3.2.5. Esta é a DO alvo.

### 4. Lavagem da suspensão de eritrócitos

4.1. Coletar aproximadamente 50mL de sangue de carneiro em 12,5mL de solução de ACD ou volume correspondente de Alsever.

4.2. Armazenar o sangue coletado por uma semana sob refrigeração ( $2^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$ ). Descartar caso apresente sinais de contaminação ou hemólise excessiva.

4.3. Filtrar volume de suspensão de eritrócitos suficiente para a realização das provas, sugere-se 5mL a 10mL, conservados em ACD ou Alsever, em um filtro delgado de gaze e algodão, para um tubo cônico de centrifuga de 50mL.

4.4. Adicionar volume proporcional de tampão de uso perfazendo uma diluição final de 1:5 (aproximadamente 40mL).

4.5. Sedimentar os eritrócitos por centrifugação a  $1500 \times g$  por 10 minutos.

4.6. Descartar o sobrenadante e retirar a fina camada de células brancas que se deposita sobre os eritrócitos sedimentados.

4.7. Repetir o processo de lavagem 2 vezes.

4.8. Descartar o sobrenadante.

4.9. Ressuspender o volume de eritrócitos encontrado 25 vezes em tampão de uso. Para produzir uma suspensão de + 4% (que é um pouco mais densa que a suspensão padrão requerida).

Ex: volume celular encontrado = 3,5mL

1mL de ER ----- 25mL de volume final	X = 87,5mL de tampão de uso.
3,5mL de ER encontrado ----- X mL de volume final	

5. Padronização da suspensão de eritrócitos a 3 % volume celular (vc)

5.1. Romper 0,5mL da suspensão de eritrócitos preparada anteriormente em 7,5mL de RC, obtendo-se uma solução final 1:16.

5.2. Ler a DO em 540 nm usando RC como branco.

5.3. Calcular a porcentagem de eritrócitos presente nesta suspensão considerando que a DO alvo possui 3 % de eritrócitos.

5.4. Se necessário, ajustar o volume final adicionando ou retirando tampão de uso da suspensão quando ela apresentar vc maior ou menor que 3%, respectivamente, de acordo com a fórmula:

$C1 \times V1 = C2 \times V2$
-------------------------------

C1: DO da suspensão de eritrócitos inicialmente preparada;

V1: Volume total da suspensão inicialmente preparada;

C2: DO alvo (60 mg/dL);

V2: Volume final para obtenção de uma suspensão com 3% de eritrócitos.

5.5. Romper 0,5mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3% de células em 7,5mL de RC (1:16).

5.6. Ler a DO em 540 nm, usando RC como branco.

5.7. Calcular a porcentagem de eritrócitos presente nesta suspensão considerando que a DO alvo possui 3

% de eritrócitos.

5.8 Caso os valores não sejam correspondentes, repetir os procedimentos até obter uma suspensão a 3 % vc.

5.9. Romper 0,5mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % de células em 7,5mL de água destilada (1:16).

5.10. Esta é a DO a ser utilizada na rotina (100 % de hemólise).

5.11. A suspensão de eritrócitos padronizada, se estocada sob refrigeração, poderá ser usada por até 72 horas após preparo, desde que não haja evidência de lise.

## 6. Titulação da HL.

6.1. Titular a HL a cada novo lote.

6.2. Preparar uma suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc.

6.3. Preparar uma diluição inicial de HL 1:10 para um volume final de 3mL.

6.4. Preparar 10mL de uma solução de HL 1:100 (1mL de HL 1:10 + 9mL de tampão de uso). Pode-se diluir a HL 1:100 em alíquotas e estocá-las congeladas.

6.5. Escolher 9 diluições da HL de acordo com a tabela 1, a seguir. As diluições indicadas são apenas sugestões e podem variar de acordo com a atividade do lote de HL utilizado.

Tabela 1: Diluições da HL.

Diluições da HL	HL 1:10 (mL)	HL 1:100 (mL)	HL 1:1.000 (mL)	Tampão de uso (mL)	Volume final (mL)
1:100	1,0	-----	-----	9,0	10,0
1:250	-----	1,2	-----	1,8	3,0
1:300	-----	1,0	-----	2,0	3,0
1:500	-----	1,0	-----	4,0	5,0
1:750	-----	1,5	-----	3,5	5,0
1:1.000	-----	1,0	-----	9,0	10,0
1:1.500	-----	0,2	-----	2,8	3,0

1:2.000	-----	-----	1,0	1,0	2,0
1:3.000	-----	-----	1,0	2,0	3,0
1:5.000	-----	-----	1,0	4,0	5,0
1:10.000	-----	-----	1,0	9,0	10,0

6.6. Identificar uma série de 9 tubos com as diferentes diluições de HL que serão utilizadas.

6.7. Colocar 1mL de ER padronizados a 3 % em cada um dos tubos.

6.8. Adicionar 1mL de cada diluição de HL no respectivo tubo, formando o SH.

6.9. Homogeneizar os tubos e incubá-los em banho-maria a 37°C + 2°C por 15 minutos, com agitação a cada 5 minutos.

6.10. Preparar uma diluição inicial de  $C_i$  1:10 para um volume final de 3mL (300  $\mu$ L de  $C_i$  + 2,7mL de tampão de uso).

6.11. Escolher 3 diluições do  $C_i$  de acordo com a tabela 2, a seguir. As diluições indicadas são apenas sugestões e podem variar de acordo com a atividade do lote de  $C_i$  utilizado.

6.12. Preparar 3 séries de tubos correspondentes às diluições do complemento que serão utilizadas, de modo que este produza 70 % a 80 % de hemólise com a diluição de HL mais concentrada.

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.

6.13. Identificar os tubos de cada série de acordo com as diluições de HL e  $C_i$  utilizadas.

6.14. Adicionar 1mL de tampão de uso e 0,5mL de cada  $C_i$  diluído.

6.15. Transferir 0,5mL do SH de cada diluição da HL para cada tubo das 3 séries contendo  $C_i$  e tampão de uso, e misturar.

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

Tabela 2: Diluições do  $C_i$  para titulação da HL.

Diluições do $C_i$	$C_i$ 1:10 ( $\mu$ L)	Tampão de uso (mL)	Volume final (mL)
1:150	400	5,60	6,0
1:200	300	5,70	6,0

1:250	240	5,76	6,0
1:300	200	5,80	6,0
1:350	171	5,83	6,0
1:400	150	5,85	6,0

6.17. Retirar os tubos do banho-maria e adicionar 2mL de tampão de uso gelado, entre 2°C e 8°C, em cada um deles para ajustar o volume para leitura no espectrofotômetro.

6.18. Centrifugar a 1.500 x g por 10 minutos, para depositar qualquer eritrócito remanescente não lisado.

6.19. Determinar a absorbância de cada um dos tubos no comprimento de onda de 540nm, utilizando água destilada como branco.

6.20. Calcular a porcentagem de hemólise em cada tubo comparando os resultados obtidos acima com o tubo contendo 100 % de hemólise.

6.21. Usar como valor de 100 % de hemólise a DO da solução obtida lisando 0,5mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc em 7,5mL de água destilada.

6.22. Plotar a porcentagem de hemólise x diluição da hemolisina em papel milimetrado com escala aritmética.

6.23. Para calibrar a abscissa, medir uma distância arbitrária (por exemplo, 20 cm), com divisões em escala de 10, a partir da extremidade esquerda e colocar aí um ponto representando a diluição de HL 1:500. Isso forma a extremidade final direita da abscissa. As distâncias representando as outras diluições são calculadas dividindo 500 pela diluição recíproca e multiplicando o resultado pelo comprimento da abscissa (no caso, 20 cm). A porcentagem de hemólise é marcada linearmente ao longo da ordenada, com a distância entre os pontos de 1 cm.

6.24. Ligar os pontos do gráfico ignorando os "outliers", ou seja, pontos que estão fora.

6.25. Determinar o ponto do gráfico no qual se inicia o platô.

6.26. Os resultados da titulação serão considerados satisfatórios se o referido platô estiver entre 30 % e 80 % de hemólise.

6.27. Para os testes, usar uma diluição acima do ponto onde se inicia o platô ou, no mínimo, 25 % mais concentrada que a diluição supracitada.

6.28. A quantidade de HL utilizada no teste não é crítica, ao contrário da quantidade de amostra.

Um excesso de HL não afeta a sensibilidade do teste significativamente.

## 7. Sensibilização dos eritrócitos.

7.1. Preparar uma suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc.

7.2. Diluir a HL de acordo com o título encontrado para a prova.

7.3. Misturar partes iguais desses dois componentes.

7.4. Incubar em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, com agitação a cada 5 minutos.

## 8. Titulação do $\text{C}_i$ .

8.1. Titular o  $\text{C}_i$  a cada novo lote ou quando houver suspeita de degradação do mesmo.

8.2. Preparar uma suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc.

8.3. Diluir a HL, de acordo com o título encontrado para a prova, em um volume final de 5mL e sensibilizar os eritrócitos.

8.4. Preparar uma diluição inicial de  $\text{C}_i$  1:10 para um volume final de 2mL.

8.5. Escolher 3 diluições do  $\text{C}_i$  de acordo com a tabela 3, a seguir.

8.6. As diluições indicadas são apenas sugestões e podem variar de acordo com a atividade do lote de  $\text{C}_i$  utilizado.

Tabela 3: Diluições do  $\text{C}_i$ .

Diluições do $\text{C}_i$	$\text{C}_i$ 1:10 (?L)	Tampão de uso (mL)	Volume final (mL)
1:150	400	5,60	6,0
1:200	300	5,70	6,0
1:250	240	5,76	6,0
1:300	200	5,80	6,0
1:350	171	5,83	6,0
1:400	150	5,85	6,0
1:450	133	5,86	6,0



8.7. Identificar três séries de tubos, sendo uma série para cada diluição do  $C_i$ . Cada série deverá conter 6 tubos identificados com os volumes de  $C_i$  a seguir: 0,3mL; 0,4mL; 0,5mL; 0,6mL; 0,7mL e 0,8mL.

8.8. Distribuir e incubar os reagentes de acordo com a tabela 4, a seguir.

Tabela 4: Diluições dos reagentes para titulação do  $C_i$ . 02 03 04 05 06

Reagentes (mL)	Tubos					
	01	02	03	04	05	06
$C_i$ diluído	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
Tampão de uso	1,2	1,1	1,0	0,9	0,8	0,7
Incubar em banho-maria a $37^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$ / 30 minutos.						
ER Sensibilizados	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Incubar em banho-maria a $37^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$ / 30 minutos com agitação aos 15 minutos.						

8.9. Após incubação final, adicionar 2mL de tampão de uso gelado, entre  $2^{\circ}\text{C}$  e  $8^{\circ}\text{C}$ , em cada tubo e centrifugar a  $1500 \times g$  por 10 minutos para depositar qualquer eritrócito não lisado.

8.10. Determinar a absorbância de cada um dos tubos no comprimento de onda de 540 nm, utilizando água destilada como branco.

8.11. Calcular a porcentagem de hemólise em cada tubo comparando os resultados obtidos como tubo contendo 100 % de hemólise.

8.12. Usar como valor de 100 % de hemólise a DO da solução obtida lisando 0,5mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc em 7,5mL de água destilada.

8.13. Caso seja utilizado papel milimetrado com escala dilog, determinar o índice de hemólise(IH) através da fórmula abaixo:

$$\text{IH} = \% \text{ de hemólise do tubo} / (100 - \% \text{ de hemólise do tubo})$$

8.14. Plotar o volume de  $C_i$  (ordenadas) x % de hemólise (abscissas) em papel milimetrado logx probability ou o volume de  $C_i$  (ordenadas) x IH (abscissas) em papel milimetrado dilog.

8.15. Considerar somente os tubos que apresentarem valores entre 10 % e 90 % de hemólise.

8.16. O gráfico será válido quando dois pontos estiverem à esquerda do valor correspondente a 50 % de hemólise e dois pontos à direita deste valor.

8.17. Determinar os pontos médios entre os dois valores acima de 50 % de hemólise e os dois valores abaixo. Uni-los em uma linha reta.

8.18. Traçar uma reta perpendicular ao eixo das abscissas ligando os pontos 50 % de hemólise (abscissas) e o gráfico obtido acima.

8.19. Determinar o valor correspondente a este ponto nas ordenadas. Este é o volume 1 CH<sub>50</sub> (volume de C<sub>i</sub> diluído capaz de lisar 50 % de eritrócitos sensibilizados).

8.20. Determinar a diluição de uso (DU) do complemento através da fórmula:

$$DU = (0,5 \times \text{diluição utilizada na titulação}) / \text{CH}_{50} \text{ da titulação}$$

8.21. Determinar a inclinação da reta (tangente do ângulo ou coeficiente angular da reta) encontrada na titulação do complemento. A partir de qualquer ponto próximo a extremidade esquerda do gráfico, traçar uma reta de 10 cm de comprimento paralela às abscissas. Medir a distância, em mm, entre esta e o gráfico.

8.22. Quando se utilizar papel log x probabilidade este valor deve corresponder a  $44 \text{ mm} \pm 20 \%$  e, para papel dilog o valor encontrado deve ser de  $20 \text{ mm} \pm 10 \%$ .

8.23. Valores de inclinação fora dos limites estabelecidos não interferem nos testes diagnósticos, no entanto, obtém-se maior reprodutibilidade e repetitividade de resultados quando os critérios acima citados forem atendidos.

## 9. Titulação do Ag.

9.1. Realizada em microvolumes, em placas de microtitulação com 96 orifícios.

9.2. Titular o antígeno sempre que um novo lote for utilizado.

9.3. Escolher um soro de título baixo a moderado (de preferência entre 1:50 e 1:100) e diluí-lo a 1:2 (300 µL de soro + 300 µL de tampão de uso).

9.4. Inativá-lo em banho-maria a  $58^{\circ}\text{C} + 2^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.

9.5. Preparar uma suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc.

9.6. Diluir a HL de acordo com o título encontrado para a prova, em um volume final de 3 mL e sensibilizar os eritrócitos.

9.7. Preparar as diluições do antígeno para SAL de acordo com a tabela 5, a seguir.

Tabela 5: Diluições do Ag.

Diluições do Ag	Ag (µL)	Ag 1:100 (µL)	Tampão de uso (mL)	Volume final (mL)
1:100	100	-----	9,90	10,0

1:200	-----	1000	1,00	2,0
1:300	-----	600	1,40	2,0
1:400	-----	500	1,50	2,0
1:600	-----	500	2,50	3,0
1:800	-----	500	3,50	4,0
1:1.200	-----	300	3,70	4,0

9.8. Preparar uma diluição do complemento 5 C<sub>i</sub>H<sub>50</sub>, de acordo com o título recomendado para uso em prova e diluí-la para 2,5 C<sub>i</sub>H<sub>50</sub> e 1,25 C<sub>i</sub>H<sub>50</sub>. 9.9. Recomenda-se preparar 3mL da diluição 5 C<sub>i</sub>H<sub>50</sub> e 0,5mL das demais.

9.10. Distribuir 25μL de tampão de uso em todas os orifícios, exceto nos sombreados, de acordo com a tabela 6, a seguir:

Tabela 6: Esquema de distribuição dos reagentes na placa de microtitulação.

Linhas	Diluições do Ag	Colunas										
		01	02	03	04	05	06	07	08	10	11	12
		Diluições do soro							PC	CAC Ag / CH <sub>50</sub>		
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128		5,0	2,5	1,25
A	1:100								00			
B	1:200								25			
C	1:300								50			
D	1:400								75			

E	1:600								100			
F	1:800											
G	1:1.200											
H	CAC S											

CAC S: controle anticomplementar do soro; PC: padrões de cor; CAC Ag: controle anticomplementar do antígeno; Coluna 09: não é utilizada.

9.11. Colocar 25µL de soro inativado e diluído a 1:2 nas colunas 01 e 02, da linha A até aH.

9.12. Com pipetador multicanal, diluir o soro em diluições duplas a partir da coluna 02 até a coluna 07, nas linhas A até G, desprezando os 25µL restantes. A linha H deverá conter apenas as diluições 1:2 e 1:4. Desprezar os 25µL restantes do orifício 2H.

9.13. As colunas 10, 11 e 12 recebem mais 25µL de tampão de uso, em lugar do soro, para detectar atividade anticomplementar do Ag.

9.14. Colocar 25µL de antígeno, nas respectivas diluições, nas linhas A até G, nas colunas 01 até 07 e 10 a 12.9.15. Os dois primeiros orifícios da linha H recebem mais 25µL de tampão de uso, em lugar do antígeno, para detectar atividade anticomplementar do soro.

9.16. Colocar 25µL de C<sub>i</sub> contendo 5 CH50 em todas os orifícios contendo soro e, também, na coluna 10, da linha A até a linha G, para controle anticomplementar do Ag.

9.17. Colocar 25µL de C<sub>i</sub> contendo 2,5 CH50 e 1,25 CH50 nas colunas 11 e 12, respectivamente, da linha A até a linha G.

9.18. Agitar a placa por um minuto e incubá-la, tampada, a 37°C + 2°C por 30 minutos.

9.19. Preparar padrões de cor com 0 %, 25 %, 50 %, 75 % e 100 % de hemólise (item 6.9) e distribuir 100µL de cada um na coluna 08.9.20. Adicionar 25µL de eritrócitos sensibilizados em todos os orifícios exceto os da coluna 08;

Agitar a placa por um minuto e incubá-la, tampada, a 37°C + 2°C por 30 minutos com agitação aos 15 minutos.

9.21. Centrifugar a placa a, no máximo, 900 x g por 10 minutos.

9.22. Fazer a leitura observando o grau de hemólise de cada cavidade.

9.23. Determinar a diluição do antígeno com a qual se obtém o maior título do soro. A diluição mais sensível do antígeno é aquela que produz um nível máximo de fixação do C<sub>i</sub> com o antisoro específico.

9.24. No teste, o antígeno é usado com o dobro da concentração ótima para reduzir a ocorrência de prozona.

9.25. A diluição do antígeno escolhida deve mostrar 100 % de hemólise com 5 CH50 e 2,5 CH50 e, no

mínimo, 50 % de hemólise com 1,25 CH50.9.26. No controle anticomplementar do soro, os eritrócitos deverão estar completamente lisados.

9.27. O antígeno pode ser usado por até cinco dias após a diluição, desde que conservado sob refrigeração.

#### 10. Preparo dos padrões de cor (PC).

10.1. Os padrões de cor simulam diferentes graus de hemólise. São usados como um modelo para comparação.

10.2. Preparar uma suspensão de eritrócitos (SE), contendo 0 % de hemólise, diluindo 1mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % em 7mL de tampão de uso.

10.3. Preparar uma solução de hemoglobina (SH), 100 % de hemólise, rompendo 1mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % em 5,6mL em água destilada. Agitar até que todas as células sejam lisadas. Adicionar 1,4mL de tampão veronal 5x concentrado para restabelecer a isotonicidade da solução.

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).

[illegible]

H	CAC S																		
---	-------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

CAC S: controle anticomplementar do soro; PC: padrões de cor.

11.12. Distribuir 25µL 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 25µL 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 25µL restantes.

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

11.15. Distribuir 25µL de C<sub>i</sub> 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 25µL de suspensão de eritrócitos sensibilizados (ES), em todos os orifícios das colunas 01 até 11, inclusive na linha H.

11.19. Distribuir 100µL 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 macro volumes, em paralelo com a prova.

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

12.1.3. Distribuir 50µL de C<sub>i</sub> 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 250µL da suspensão de ES em cada tubo.

12.1.6. Incubar em banho-maria a 37 °C+2°Cpor30minutos, com agitação aos 15 minutos.

12.1.7. Adicionar 1mL 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 0,5mL da suspensão de eritrócitos padronizada a 3 % vc em 7,5mL 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  $C_0$ .

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 <sub>50</sub>	25	25	25	25	---	0
	B	2,5 CH <sub>50</sub>	25	25	25	25	---	Traços
	C	1,25 CH <sub>50</sub>	25	25	25	25	---	+1 à +2
	D	5 CH <sub>50</sub> + ES	50	---	25	25	---	0
	E	Ag + ES	50	25	---	25	---	+4
	F	5 CH <sub>50</sub> + 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  $C_i$  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  $C_i$  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  $\geq 4$  com mínimo de 25% de fixação de complemento.

12.4.4.2. Não Reagente: título  $< 4$ .

12.4.4.3. Reagente:  $\geq 20$  ICFTU/mL.

12.4.4.4. Não Reagente:  $< 20$  ICFTU/mL.