

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.
GABINETE DO MINISTRO

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 41, DE 24 DE NOVEMBRO DE 2006.

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 2º; do Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, e o que consta do Processo nº 21000.004434/2006-52, resolve:

Art. 1º - Aprovar os "Critérios Específicos para o Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico da Brucelose Bovina e Bubalina", na forma dos Anexos I a X à presente Instrução Normativa.

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

LUÍS CARLOS GUEDES PINTO

**ANEXO I - CRITÉRIOS ESPECÍFICOS PARA O CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE
LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE BOVINA E BUBALINA**

ANEXO II - TESTE DO ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO (AAT)

ANEXO III - TESTE DO 2 - MERCAPTOETANOL (2-ME)

ANEXO IV - TESTE DO ANEL EM LEITE (TAL)

**ANEXO V - MODELO DE FORMÚLARIO DE ENCAMINHAMENTO DE AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO
DE BRUCELOSE**

ANEXO VI - MODELO DE NOMEAÇÃO DE PORTADOR

ANEXO VII - MODELO DE REQUERIMENTO DE RETESTE DE EXAME

ANEXO VIII - RELATORIO DE ATIVIDADES OPERACIONAIS DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE

**ANEXO IX - MODELO PARA LIVRO DE REGISTRO DE AMOSTRAS PARA O DIAGNÓSTICO DE
BRUCELOSE**

ANEXO X - MODELO DE ATESTADO DE REALIZAÇÃO DE TESTE DE BRUCELOSE

ANEXO I

CRITÉRIOS ESPECÍFICOS PARA O CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE BOVINA E BUBALINA

Para efeito de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico da brucelose bovina e bubalina, deverão ser obedecidas as determinações constantes desta Instrução Normativa, da Instrução Normativa SDA nº 51, de 27 de junho de 2003 e da Instrução Normativa SDA nº 6, de 8 de janeiro de 2004, ou dos atos que vierem a substituí-las.

1. OBJETIVOS:

1.1. Padronizar os procedimentos adotados por laboratórios de diagnóstico da brucelose bovina e bubalina; e

1.2. Credenciar laboratórios com sistema de garantia da qualidade implantado, em apoio às ações de defesa sanitária animal, instituídas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.

2. APLICAÇÃO

2.1. A presente Instrução Normativa aplica-se aos laboratórios públicos e privados interessados em integrar a Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária no diagnóstico da brucelose bovina e bubalina, que disponham de médico veterinário para responsabilidade técnica e tenham sistema de garantia da qualidade implantado.

3. DEFINIÇÕES:

3.1. Para efeitos desta Instrução Normativa, considera-se:

3.1.1. Serviço de defesa oficial: é o serviço de promoção da saúde animal, prevenção, controle e erradicação de doenças que possam causar danos à produtividade animal, à economia e à sanidade agropecuária, nas Instâncias Central e Superior, Intermediárias e Locais.

3.1.2. Médico veterinário oficial: médico veterinário do serviço de defesa oficial.

3.1.3. Médico veterinário habilitado: profissional do setor privado que recebe habilitação de uma das três Instâncias integrantes do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, para exercer atividades específicas de defesa sanitária animal, na forma definida pelo MAPA como Instância Central de Superior.

3.1.4. Proprietário: qualquer pessoa, física ou jurídica, que seja proprietário de um ou mais bovino ou bubalino.

3.1.5. Rebanho: conjunto de animais criados sob condições comuns de manejo, em um mesmo estabelecimento de criação.

3.1.6. Brucelose: zoonose causada pela *Brucella spp*, caracterizada por causar infertilidade e aborto no final da gestação, afetando principalmente as espécies bovina e bubalina.

3.1.7. Laboratório credenciado: laboratório público ou privado que se submeteu ao processo de credenciamento pela autoridade competente de uma das instâncias do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária e obteve o reconhecimento formal de sua competência para executar análises oficiais, de acordo com o escopo do credenciamento e respectivo sistema da qualidade.

3.1.8. Responsável técnico: médico veterinário responsável por laboratório credenciado que foi submetido a processo de avaliação, aprovado pela autoridade competente de uma das instâncias do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária e que responde tecnicamente pelas atividades do laboratório.

3.1.9. Laboratório de referência: laboratório oficial da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários designado como referência para o diagnóstico da brucelose pelo MAPA, em razão da abrangência do Programa.

3.1.10. Reteste: teste realizado a partir de nova amostra colhida, do(s) mesmo(s) animal(is), nas condições estabelecidas no PNCEBT.

3.1.11. Monitoramento: procedimentos adotados pelo órgão credenciador, para verificar se o laboratório continua atendendo aos requisitos do credenciamento.

4. MATERIAL:

4.1. Antígeno:

4.1.1. Só poderão ser utilizados antígenos (Ag) registrados no órgão competente do MAPA e cujas partidas tenham sido testadas e aprovadas para uso, observado o prazo de validade.

4.1.2. Os Ag devem ser transportados e conservados à temperatura entre +2°C (dois graus Celsius positivos) e +8°C (oito graus Celsius positivos) e ao abrigo da luz solar direta.

4.1.3. Os laboratórios credenciados deverão adquirir os Ag no serviço de defesa oficial da Unidade Federativa de sua localização.

5. AMOSTRAS:

5.1. Amostras a serem testadas:

5.1.1.1. Soro sanguíneo, no mínimo 2 mL, congelado ou resfriado até +8°C (oito graus Celsius positivos); e

5.1.1.2. Leite resfriado entre +2°C (dois graus Celsius positivos) e +8°C (oito graus Celsius positivos).

6. RECEPÇÃO

6.1. As amostras deverão estar devidamente identificadas, conservadas em temperatura de até +8°C (oito graus Celsius positivos) e acompanhadas do formulário de encaminhamento de amostras (Anexo V), devidamente preenchido e assinado pelo médico veterinário habilitado, com sua identificação profissional, ou pelo serviço oficial de defesa sanitária; e

6.1.1. No caso do médico veterinário requisitante não ser portador do material colhido, o mesmo deve nomear um portador conforme modelo do Anexo VI.

6.2. Soros com aspecto de excessiva hemólise, sujidade ou indícios de contaminação bacteriana devem ser desprezados.

6.3. As amostras serão registradas em livro próprio aberto oficialmente, devidamente preenchido, conforme modelo estabelecido no Anexo IX.

6.4. No caso de recebimento de sangue, o mesmo deverá ser centrifugado, e o soro receberá o tratamento dos itens anteriores.

6.5. A amostra a ser testada deverá ser mantida sob refrigeração até a realização da análise ou congelada se a mesma for realizada 48 (quarenta e oito) horas após o recebimento.

7. MÉTODOS:

7.1. Os testes indicados para o diagnóstico da brucelose bovina e bubalina são:

7.1.1. Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), descrito no ANEXO II;

7.1.2. 2-Mercaptoetanol (2-ME), descrito no ANEXO III;

7.1.3. Anel em Leite (TAL), descrito no ANEXO IV; e

7.2. Qualquer alteração ou inclusão de método analítico deverá ser previamente aprovada pelo órgão competente do MAPA.

8. LABORATÓRIO:

8.1. O laboratório deve possuir instalações, equipamentos e fluxo operacional adequados para realização dos testes de diagnóstico da brucelose e responsável(is) técnico(s) devidamente aprovado(s) pelo MAPA.

9. INSTALAÇÕES

9.1. As instalações do laboratório devem fazer parte da mesma base física.

9.1.1. Protocolo: área destinada ao recebimento das amostras, registros, expedição dos resultados e arquivamento.

9.1.2. Sala de exame: área destinada ao processamento das amostras. Deve estar provida de pontos de energia e água suficientes e adequados aos testes executados, possuir bancada, paredes e piso impermeáveis que facilitem a lavagem e desinfecção e condicionador de ar.

9.1.3. Lavagem e Esterilização: área destinada à lavagem do material utilizado na realização dos testes de diagnóstico e autoclavagem das amostras e seus resíduos de descarte. Deve estar provida de pontos de energia e água suficientes e adequados, tanques ou pias. As bancadas, paredes e piso devem ser impermeáveis e resistentes à lavagem e desinfecção.

10. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

10.1. O Laboratório deverá ter, no mínimo, os seguintes equipamentos e materiais:

10.1.1. Protocolo:

- arquivo com chave; e
- máquina de escrever ou microcomputador.

10.1.2. Sala de exame:

- agitador de placas (opcional);
- cuba com solução desinfetante;
- caixa com luz indireta para leitura;
- pipetador automático, preferencialmente, ou përa;
- placas de vidro quadriculadas, com quadriculos de 4,0 X 4,0cm;
- micropipeta de volume variável de 10 (dez) a 100 (cem) µL;
- ponteiras para volumes de 10 (dez) a 100 (cem) µL;
- vidraria de laboratório;
- refrigerador e freezer a - 20°C (vinte graus Celsius negativos) ou refrigerador duplex;
- centrífuga com capacidade mínima para 1.500 RPM (um mil e quinhentas rotações por minuto);
- medidor de pH;
- estufa ou banho-maria para 37°C (trinta e sete graus Celsius);
- capela de exaustão de gases;
- timer ou relógio despertador de minuto;
- misturadores simples ou múltiplos de 5 (cinco) pontas; e
- grades para tubos.

10.1.3. Lavagem e Esterilização:

- autoclave;
- cuba com solução desinfetante; e
- destilador ou deionizador de água.

10.1.4. Reagentes:

- antígenos específicos para cada teste;
- soro e leite controles positivo e negativo;
- solução Salina 0,85% fenicada 0,5%;
- solução Salina 0,85%;
- 2-mercaptoetanol; e
- água destilada.

11. SEGURANÇA BIOLÓGICA:

11.1. O laboratório deverá seguir as normas e procedimentos de biossegurança recomendadas para a realização dos testes de diagnóstico sorológico da brucelose;

11.2. As amostras e seus resíduos deverão ser autoclavados a +121°C (cento e vinte e um graus Celsius positivos), por pelo menos 30 (trinta) minutos, com uma libra de pressão, antes do descarte.

11.3. Deverão ser obedecidas também as Normas de Segurança Ambiental, Sanitária e do Trabalho pertinentes ao funcionamento do laboratório.

12. RETESTE

12.1. A amostra destinada a reteste deverá estar acompanhada de requerimento, assinado por médico veterinário oficial ou habilitado conforme modelo do Anexo VII;

12.2. Para o reteste somente será realizada a prova de 2-ME.

13. RESULTADOS E RELATÓRIOS:

13.1. Os resultados serão expedidos em 03 (três) vias, sendo uma via emitida ao médico veterinário habilitado, requisitante do exame, uma ao órgão estadual de defesa sanitária animal e outra arquivada no laboratório.

13.2. Os resultados dos exames deverão ser emitidos em formulários próprios, segundo modelo do Anexo X e de acordo com o fluxograma determinado:

13.2.1. Resultado POSITIVO ou INCONCLUSIVO: deverá ser comunicado imediata e obrigatoriamente ao Serviço de Defesa Sanitária Agropecuária (SEDESA) da SFA e ao médico veterinário habilitado, requisitante do exame.

13.2.2. Resultado NEGATIVO: será comunicado ao médico veterinário, requisitante do exame.

13.3. Os relatórios de atividades operacionais serão expedidos em 03 (três) vias, sendo uma via emitida à unidade laboratorial do MAPA, responsável pelas atividades de credenciamento de laboratórios de brucelose, uma ao serviço de defesa oficial fornecedor do antígeno e outra arquivada no laboratório.

13.4. Os relatórios deverão ser emitidos mensalmente, segundo modelo do Anexo VIII, e de acordo com os prazos determinados:

13.4.1. Até o 5º (quinto) dia útil do mês subsequente para a unidade laboratorial do MAPA, responsável pelas atividades de credenciamento de laboratórios de brucelose, e para o local do serviço de defesa oficial onde os antígenos foram adquiridos.

13.4.2. Até o 10º (décimo) dia do mês subsequente nas Unidades Federativas onde a distribuição dos antígenos estiver a cargo do serviço estadual de defesa sanitária animal, que encaminhará o relatório ao SEDESA da SFA de sua UF.

13.5. Somente o responsável técnico poderá assinar o formulário de resultado do exame e os relatórios mensais.

14. RESPONSÁVEL TÉCNICO

14.1. Para efeito de credenciamento do laboratório, o responsável técnico será submetido a avaliação de capacitação em um laboratório oficial ou por meio do acompanhamento do ensaio no próprio laboratório, realizados por auditores designados pela autoridade competente de uma das instâncias do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária a distância e a resposta deverá ser encaminhada ao laboratório responsável pelo envio do material, em um prazo máximo de 5 (cinco) dias úteis após o recebimento do teste, em envelope lacrado com AVISO DE POSTAGEM E RECEBIMENTO (AR).

14.2. Para efeito de monitoramento poderão ser realizados exames a distância e a resposta deverá ser encaminhada ao laboratório responsável pelo envio do material, em um prazo máximo de 5 (cinco) dias úteis após o recebimento do teste, em envelope lacrado com AVISO DE POSTAGEM E RECEBIMENTO (AR).

14.3. O responsável técnico só poderá responder por uma unidade laboratorial.

15. DISPOSIÇÕES GERAIS

15.1. Casos omissos na presente Instrução Normativa serão dirimidos pelo MAPA.

ANEXO II
TESTE DO ANTÍGENO ACIDIFICADO TAMPONADO (AAT)
MATERIAL NECESSÁRIO:

antígeno para o AAT;
pipeta de Bang ou Pipetador de 30 µL ou de volume ajustável;
ponteiras;
placas com quadrados de 15 mm (quinze milímetros) delimitados;
misturadores de plástico, vidro ou metal;
caixa com luz indireta para leitura;
soro controle positivo;
soro controle negativo;
agitador de placas (opcional); e
timer ou relógio despertador de minuto.

PRECAUÇÕES NA EXECUÇÃO DO TESTE:

1. A suspensão estoque do antígeno deve permanecer sempre entre 4 e 8°C (quatro e oito graus Celsius), quando não estiver em uso.
2. Em caso de utilização do antígeno para a realização de pequeno número de testes, dividir o antígeno em alíquotas e retirar da geladeira apenas a quantidade a ser utilizada a cada dia para evitar perda de sensibilidade devido ao resfriamento-aquecimento constantes.
3. A temperatura de execução desejável do teste deve ser em torno de 22°C + 4°C, devendo evitar-se temperaturas muito abaixo ou acima deste valor.
4. As placas, misturadores e pipetas devem ser limpos com água corrente logo após o uso. Imergí-los em uma solução de detergente neutro por duas horas ou, de preferência, durante a noite. Em seguida lavá-los em água corrente e na seqüência em água destilada.
Secar em estufa ou à temperatura ambiente.
5. Soros hemolisados devem ser desprezados por poderem apresentar resultados falsos-positivos.
6. Em todas as provas devem ser realizados em paralelo testes dos soros controle positivo e negativo.

TÉCNICA:

1. Equilibrar os soros e o antígeno à temperatura de 22°C + 4°C, por pelo menos 30 (trinta) minutos. Caso os soros estejam congelados este período de equilíbrio à temperatura ambiente deve ser maior. Homogeneizar os soros antes de realizar a prova;
2. Preencher os protocolos de prova identificando a localização de cada soro;
3. Ao utilizar o micropipetador de 30 µL ou a pipeta de Bang dotada de uma pêra de borracha, ou outro dispositivo de pipetagem que evite o uso da boca, dispensar 30 µL (ou da marca de 0,04 até 0,01 na pipeta de Bang) de soro por área da placa; depositar essa quantidade sobre a placa de vidro, encostando nela a ponta da pipeta em ângulo de 45° (quarenta e cinco graus);
4. Agitar suavemente o antígeno e colocar 30 µL ao lado do soro, sem ser nele misturado;
5. Misturar, por meio de misturador simples ou múltiplo e com movimentos circulares, o soro e o antígeno de modo a obter um círculo de aproximadamente 2 cm (dois centímetros);
6. Agitar a placa com movimentos oscilatórios, numa freqüência de aproximadamente 30 (trinta) movimentos por minuto, de modo a permitir que a

mistura soroantígeno flua lentamente dentro de cada círculo. A placa deve ser agitada continuamente por 4 min (quatro minutos);

7. Colocar a placa na caixa de leitura com luz indireta e proceder à leitura;
8. Anotar os resultados; e
9. Desconsiderar as reações de aglutinação que vierem a ocorrer após os 4 (quatro) minutos.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

Presença de grumos - REAGENTE;

Ausência de grumos - NÃO-REAGENTE.

ANEXO III TESTE DO 2 - MERCAPTOETANOL (2-ME)

MATERIAL:

antígeno para a soroaglutinação lenta em tubo (SAL);
2 Mercaptoetanol;
solução salina 0,85%;
solução salina fenicada 0,5%;
amostras de soro a testar;
soro controle positivo com título alto;
soro controle positivo com título médio;
soro controle positivo com título baixo;
soro controle negativo;
tubos de 10 x 75 mm ou 10 x 100 mm;
grade para tubos;
pipetas de Bang ou micropipetadores de volume ajustável;
dispensador automático de 1 mL;
dispensador automático de 2 mL;
pipetas de 10 mL;
caixa com luz indireta para a leitura;
estufa a 37°C (trinta e sete graus Celsius); e
vidraria para diluição dos reagentes.

Precauções na execução do teste:

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;
2. Recomenda-se fazer as diluições do antígeno 12 (doze) horas antes do uso;
3. Os antígenos diluídos devem ser conservados sob refrigeração (+4°C a +8°C), podendo ser utilizados por um período de até uma semana;
4. O 2-ME deve ser mantido em frascos de cor âmbar, hermeticamente fechados e sob refrigeração;
5. O 2-ME é tóxico para o ser humano e deve ser manuseado em capela de exaustão;
6. Em cada jornada de trabalho, deve ser incluído pelo menos um soro selecionado, especialmente, com alto conteúdo de anticorpos IgM anti-Brucella e que não contenha IgG detectável pelo teste do 2-ME, bem como outro soro reagente na SAL e 2-ME;
7. Em cada teste serão incluídos também tubos de controle de antígeno, usando-se soros testados positivos de título conhecido e soro negativo; e
8. O Teste do 2-ME é incubado e lido junto com o SAL. Ocasionalmente, o tubo da diluição 1:25 pode estar um pouco opaco na prova do 2-ME, ainda que os tubos subsequentes estejam claros. Isto não deve ser considerado como resultado negativo do teste.

Técnica:

1. Diluir o antígeno para SAL em tubos 100 (cem) vezes em solução salina a 0,85% contendo 0,5% de fenol. Concentração final 0,045%;
2. 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%;
3. Preparar solução de 2-ME a 0,1M misturando-se 7,8 ml de 2-ME a 992,20 mL de solução salina a 0,85% sem fenol, ou volumes menores, proporcionalmente;
4. Para cada amostra de soro a testar, colocar em uma estante, duas fileiras de quatro tubos;

5. Identificar o primeiro tubo de cada fileira com o número correspondente ao soro a testar;
6. A primeira fileira corresponde às quatro diluições do soro do SAL e deve ser marcada com a letra T. A outra fileira, em que se fará o teste do 2-ME, deve ser marcada com a letra M;
7. Com uma pipeta de Bang, dotada de pera de borracha, ou outro dispositivo de pipetagem que evite o uso da boca, carrega-se o soro até passar um pouco da graduação superior. Com um papel absorvente, limpa-se o extremo da pipeta; mantendo-se esta em posição vertical sobre a parede do tubo que contém a amostra, deixa-se escorrer o soro até que o fundo do menisco no interior da pipeta esteja nivelado com a sua graduação superior;
8. Com a pipeta no fundo do primeiro tubo da primeira fileira, deixa-se fluir 0,08 mL de soro. No segundo tubo, deposita-se 0,04 mL, no terceiro, 0,02 mL, no quarto 0,01 mL;
9. Repete-se o procedimento descrito para depositar as mesmas quantidades de soro na segunda fileira de tubos (série do 2-ME);
10. Para todas as amostras de soro, repete-se o procedimento de forma similar, pipetando os soros para cada duas fileiras de tubos adequadamente identificados;
11. Incluir os soros controle positivos com atividade aglutinante conhecida;
12. Incluir o soro controle negativo na prova do 2-ME;
13. Com o dispensador automático de 2 mL ou pipeta de 10mL, agrega-se a cada um dos quatro tubos das fileiras T, 2 mL do antígeno diluído 1:100 (0,045% de células) em solução salina fenicada;
14. Com o dispensador automático de 2 mL (regulado para 1 mL), ou pipeta de 10 mL, agrega-se 1 mL de solução de 2-ME 0,1M (diluído em solução salina sem fenol) a cada um dos tubos das fileiras M;
15. Mistura-se bem, agitando a estante;
16. Deixar as estantes com as amostras em repouso durante 30 (trinta) minutos à temperatura ambiente;
17. Após os 30 (trinta) min, empregando-se outro dispensador automático, ou outra pipeta de 10mL, agrega-se a cada tubo da fileira M, 1 mL do antígeno diluído 1:50 (0,09 % de células) em solução salina (sem fenol);
18. Mistura-se bem, agitando-se a estante;
19. Incubar a 37°C (trinta e sete graus Celsius) por 48h + 3 h;
20. 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);
21. Anotar os resultados. Se houver interesse na determinação do título final de um soro, poderá ser empregado o método de diluições seriadas.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

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

Reação completa - é aquela em que o líquido da mistura soroantígeno aparece translúcido, e a agitação suave não rompe os grumos;

Reação incompleta - é aquela em que a mistura soroantígeno aparece parcialmente translúcida, e uma suave agitação não rompe os grumos;

Reação negativa - é aquela em que a mistura soroantígeno aparece opaca ou turva, e uma agitação suave não revela grumos; e

A interpretação dos resultados da prova é realizada segundo os quadros 1 (um) e 2 (dois).

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	-	-	+	+	+				
100 I	-	-	+	+	+	+			
100	Inc	Inc	+	+	+	+	+		
200 I	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	
200	Inc	Inc	+	+	+	+	+	+	+

+ : positivo

- : negativo

SAL= Teste de soroglutinação lenta

2-ME = Teste do 2-mercaptoetanol

NR - não-reagente

I - reação incompleta

Inc - reação inconclusiva

□ - combinação que não pode ocorrer

QUADRO 2: interpretação da prova do 2-ME para fêmeas não vacinadas e machos com idade superior a 8 (oito) meses

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

+ : positivo

- : negativo

SAL= Teste de soroglutinação lenta

2-ME = Teste do 2-mercaptoetanol

NR - não-reagente

I - reação incompleta

Inc - reação inconclusiva

□ - combinação que não pode ocorrer

ANEXO IV TESTE DO ANEL EM LEITE (TAL)

MATERIAL:

antígeno para o TAL;
amostras de leite a testar;
tubos de 10 x 75 mm ou 10 x 100 mm;
grade para tubos;
pipetas de 1 mL;
micropipetador para 30 µL; e
estufa ou banho-maria a 37°C (trinta e sete graus Celsius) .

PRECAUÇÕES NA EXECUÇÃO DO TESTE:

1. As amostras de leite devem ser mantidas entre +2°C e +8°C por pelo menos 24 (vinte e quatro) horas antes da realização do TAL.
2. A agitação excessiva da amostra de leite quebra os glóbulos de gordura interferindo na formação da camada de creme na superfície do leite.
3. Aquecimento do leite acima de 45°C (quarenta e cinco graus Celsius) diminui a quantidade de anticorpos anti-Brucella sp presentes na amostra.
4. Congelamento ou pasteurização da amostra podem ocasionar resultados falsos-negativos, portanto estas amostras não devem ser utilizadas no TAL.
5. Leite ácido, leite recentemente coletado, leite contendo colostro, leite de vacas no período de secagem e leite de vacas com mamite podem apresentar resultados falsos-positivos.
6. O tamanho do rebanho pode influenciar no resultado do teste quando o leite é coletado de latões. Para isto deve-se aumentar a quantidade de leite a ser utilizada no teste em função do tamanho do rebanho, conforme tabela abaixo:

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

7. Em todas as provas devem ser realizados testes em paralelo de amostras de leite controle positivo e negativo.

TÉCNICA:

1. Deixar as amostras de leite e o antígeno à temperatura de 22°C (vinte e dois graus Celsius) + 4°C (quatro graus Celsius) por, no mínimo, 60 (sessenta) minutos;
 2. Misturar bem as amostras de leite;
 3. Colocar 1 mL de leite em tubos 10 x 100 mm. A coluna de leite deve ter, no mínimo, 2 (dois) cm;
- Obs.: Em função do tamanho do rebanho, a quantidade de leite a ser utilizada no teste, (empregando-se a mesma quantidade de antígeno, 30 µL), deve ser aumentada para 2 (dois) ou 3 (três) mL, conforme as recomendações do item 6 das Precauções na Execução do Teste.
4. Adicionar ao leite 30 µL de antígeno;
 5. Tampar o tubo e misturar por inversão várias vezes;
 6. Deixar em repouso por 1 (um) minuto e verificar se a mistura está homogênea. Não deve sobrar antígeno nas paredes do tubo;
 7. Incubar por 1 (uma) hora a 37°C (trinta e sete graus Celsius);
 8. Proceder à leitura; e

9. Anotar os resultados.

Interpretação dos Resultados:

Anel de creme azul e coluna de leite branca ou azulada: REAGENTE; e
Anel de creme branco e coluna de leite azul: NÃO-REAGENTE

ANEXO V
MODELO DE FORMÚLARIO DE ENCAMINHAMENTO DE AMOSTRAS PARA
DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE

Espaço reservado para uso do Laboratório.	
Cond. na recepção: <input type="checkbox"/> Congelada <input type="checkbox"/> Resfriada	Data receb.: ____/____/____
<input type="checkbox"/> Satisf. <input type="checkbox"/> Insatisf.	Recebida por: _____
I – DADOS DO REQUISITANTE	
1. Nome: _____	
2. Registro no CRMV: _____ Documento de Habilitação: _____	
3. Endereço: _____	
Complemento: _____ Bairro: _____	
Município: _____ UF: _____ CEP: _____	
4. Telefone: _____ - _____ Fax: _____ - _____	
5. Correio Eletrônico: _____	
6. Portador: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
II – DADOS DO PORTADOR (CASO NÃO SEJA O REQUISITANTE)	
1. Nome: _____	
2. Registro no CRMV: _____ Documento de Habilitação: _____	
3. Endereço: _____	
Complemento: _____ Bairro: _____	
Município: _____ UF: _____ CEP: _____	
4. Telefone: _____ - _____ Fax: _____ - _____	
5. Correio Eletrônico: _____	
III – DADOS DA AMOSTRA	
1. Data da coleta: ____ / ____ / ____	
2. Motivo do teste: _____	
3. Nº de animais coletados* _____	
4. Origem do Animal: _____	
Propriedade: _____	
Proprietário: _____	
Município: _____	
Localização: _____	
5. Espécie: _____ Raça: _____	
6. Sexo: _____ Idade: _____	
7. Animal vacinado: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe Data: ____ / ____ / ____	
8. Aborto na Propriedade: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Não sabe	
9. Provas sorológicas <input type="checkbox"/> Sim Quando: ____ / ____ / ____ Quais: _____	
10. Resultado da sorologia: _____	
11. Histórico: _____	

*No caso de amostras destinadas ao TAL

ANEXO VI
MODELO DE NOMEAÇÃO DE PORTADOR

NOMEAÇÃO DE PORTADOR

Eu, _____, Médico Veterinário CRMV, _____ N° _____
(nome completo) (UF)

Habilitado sob n° _____, nomeio _____
(habilitação) (nome completo)

Portador da C.I. n° _____ como portador de _____

amostras (s) de sangue / leite, coletada (s) e identificada (s) por mim conforme a (s)

Requisições números (s) _____

Local e data: _____, _____ / _____ / _____

Médico Veterinário
Assinatura e carimbo

ANEXO VII
MODELO DE REQUERIMENTO DE RETESTE DE EXAME

REQUERIMENTO DE RETESTE DE EXAME

Ao , Chefe da SFA / Unidade Federativa
(ESPECIFICAR)

Eu, _____, Médico Veterinário CRMV, _____ N° _____
(nome completo) (UF)

Habilitado sob n° _____, venho requerer a abertura de
(habilitação)
processo com vista ao reteste da amostra registrada com n° _____ n° de serie _____
(identificação da amostra)

Laboratório _____, localizado na cidade _____
(nome do laboratório)

JUSTIFICATIVA:

Assinatura do Veterinário / interessado

Data: ___ / ___ / _____

ANEXO VIII
RELATORIO DE ATIVIDADES OPERACIONAIS
DE DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE

MÊS / ANO _____

Laboratório: _____				Veterinário Responsável: _____			
Portaria de Credenciamento: _____				Registro _____ no _____ CRMV:			
Antígeno Brucelose	Lab:	Partida (s):	Validade:	Dose adquirida	Utilizadas:	Perdas:	Estoque

EXAMES REALIZADOS

Proprietário / Propriedade	Município / UF	Tipo de Teste*	Nº animais testados	Nº de negativos	Nº de positivos

- *1 – AAT
- 2 – 2-ME
- 3 – TAL

