

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA.

PORTARIA Nº 182, DE 08 DE NOVEMBRO DE 1994.

Aprova as Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico da Doença de Newcastle

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA, no uso da atribuição que lhe confere o artigo 78, inciso VII do Regimento Interno da Secretaria, aprovado pela Portaria Ministerial nº 212, de 21 de agosto de 1992, resolve:

Art. 1º Aprovar as Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico da Doença de Newcastle, em anexo.

Art. 2º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, revogando-se as disposições em contrário.

TÂNIA MARIA DE PAULA LYRA

ANEXO

NORMAS PARA CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE NEWCASTLE E DIFERENCIAL

1. DO CREDENCIAMENTO

Para efeito de credenciamento e monitoramento serão obedecidas as determinações constantes das Portarias da Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária/SNAD nº 53 de 20 de maio de 1991 e da Divisão de Laboratório Animal/DLA nº 01 de 14 de agosto de 1991 e demais normas e instruções substitutivas e/ou complementares que vieram a ser baixadas por este Ministério.

2. MATERIAL

2.1. Sistema hospedeiro

2.1.1. Ovos: Devem ser utilizados ovos embrionados com 8 (oito) a 11(onze) dias de incubação, do tipo SPF ou, na impossibilidade, oriundos de granjas com sorologia negativa para os vírus da doença de Newcastle e da gripe aviária.

2.1.2. Pintos: Devem ser utilizados pintos com 1 (um) dia de idade, nascidos de ovos SPF.

2.1.3. Frangos: Dever ser utilizados frangos com 6 (seis) semanas, nascidos de ovos SPF.

2.2. Antígenos padrões

2.2.1. Doença de Newcastle: Os antígenos devem ser preparados em ovos embrionados SPF com 8 a 11 dias de incubação, inoculados pela via alantóica, a partir de amostras de referência (cepa LaSota ou Ulster 2C), autorizada pela Coordenação Geral de Laboratório Animal (CGLA) e inativados.

2.2.2. Gripe Aviária: Os antígenos devem ser preparados em ovos embrionados SPF com 8 a 11 dias de incubação, inoculados pela via alantóica, a partir de amostras de referência, autorizada pela CGLA.

Para a prova de imunodifusão deve ser utilizado vírus concentrado ou extrato de membrana cório-alantóide dos ovos infectados.

2.3. Soros padrões

2.3.1. Doença de Newcastle

2.3.1.1. Positivos: Os soros padrões positivos devem ser obtidos de aves do tipo SPF, vacinadas com a cepa padrão avirulenta.

2.3.1.2. Negativos: Os soros padrões negativos devem ser obtidos de aves do tipo SPF.

2.3.2. Gripe aviária

2.3.2.1. Positivos: Para os laboratórios de referência os soros padrões devem ser preparados em cabras, frente aos antígenos H e N.

Como alternativa para os laboratórios de diagnóstico podem ser empregados soros policlonais.

2.3.2.2. Negativos: Os soros padrões negativos devem ser obtidos de aves do tipo SPF.

2.4. Hemácias a 1%: As hemácias para a realização dos testes devem ser obtidas em aves sem organismos patogênicos específicos (SPF) ou na impossibilidade, de aves controladas regularmente e que tenham se apresentadas isentas de anticorpos do vírus da doença de Newcastle.

2.5. Amostras a serem testadas: As amostras para isolamento e identificação do vírus devem ser obtidas de aves vivas ou após necrópsia de animais sacrificados ou daqueles que morreram com sintomas clínicos sugestivos da doença de Newcastle.

2.5.1. Doença de Newcastle

2.5.1.1. Aves vivas

- Swab de cloaca
- Swab de traquéia
- Fezes frescas

2.5.2. Aves Necropsiadas

Coletar assepticamente, isolado ou em pool:

- Baço
- Cérebro
- Coração
- Fezes
- Fígado
- Humor aquoso
- Intestino
- Proventrículo
- Pulmão
- Sacos aéreos
- Swab oro-nasal
- Tonsilas cecais

3. RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS

3.1. As amostras devem ser coletadas em PBS, pH 7.2, contendo antibióticos nas concentrações de:

ANTIBIÓTICOS (p/ml de PBS)	AMOSTRAS			
	SUABES		FEZES	ÓRGÃOS
	NASAL	CLOACA		
Penicilina	2000U	10000U	10000U	2000U

Estreptomicina	2mg	10mg	10mg	2mg
Gentamicina	50µg	250µg	250µg	50µg
Fungizona	1000U	5000U	5000U	1000U

3.2. As amostras deverão estar devidamente identificadas, refrigeradas e acondicionadas em caixas isotérmica.

3.3. As amostras deverão estar acompanhadas de um formulário de coleta devidamente preenchido, conforme modelo estabelecido pela Coordenação de Programa Sanitário - CPS, do Departamento de Defesa Animal - DDA.

3.4. As amostras serão registradas em livro próprio conforme modelo indicado pela Coordenação Geral de Laboratório Animal - CGLA.

3.5. As amostras destinadas a sorologia deverão estar resfriadas ou preferencialmente congeladas. Não serão aceitas amostras de sangue total ou com presença de coágulo.

3.6. As amostras recebidas deverão ser obrigatoriamente divididas em 2 (duas) alíquotas e identificadas, uma como prova e outra como contra-prova.

3.7. A targeta de identificação da contra-prova, conforme modelo indicado pela CGLA, será preenchida e lacrada juntamente com as amostras para contraprova; o lacre será plástico, numerado e inviolável.

4. CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM

4.1. As amostras destinadas a exames virológicos, deverão ser mantidas sob refrigeração, até seu processamento.

4.2. As amostras destinadas a sorologia deverão ser mantidas congeladas a - 20°C, até o seu processamento.

4.3. Após a emissão do resultado as amostras deverão ser mantidas congeladas a -20°C, por um período de 30 (trinta) dias.

5. IDENTIFICAÇÃO CONFIRMATÓRIA

Os vírus hemaglutinantes isolados, acompanhado do respectivo relatório de isolamento, deverão ser remetidos ao laboratório de referência indicado pela CGLA com vistas à sua identificação e caracterização completas e à realização do diagnóstico diferencial.

6. SEGURANÇA BIOLÓGICA

Decorrido o prazo de 30 (trinta) dias da emissão de resultado as amostras serão destruídas com a observância dos critérios e normas de segurança biológica.

7. MÉTODOS

7.1. Isolamento viral

7.1.1. Inoculação em ovo embrionado do tipo SPF, de 8 a 11 dias ou, alternativamente ovos embrionados oriundos de granjas com sorologia negativa para os vírus da doença de Newcastle e da peste aviária

7.2. Titulação antigênica

7.2.1. Teste de Hemoaglutinação (HA)

7.3. Identificação antigênica

7.3.1. Inibição da Hemoaglutinação (HI)

7.4. Índices de patogenicidade

7.4.1. Tempo médio de morte de embriões (TME)

7.4.2. Índice de patogenicidade intracerebral (IPIC)

7.4.3. Índice de patogenicidade intravenosa (IPIV)

7.5. Sorologia

7.5.1. Inibição da Hemoaglutinação (HI)

7.5.2. Ensaio Imuno Enzimático (ELISA)

7.6. Somente poderão ser utilizadas metodologias previamente aprovadas pela CGLA.

8. DOS RESULTADOS E RELATÓRIOS

Toda a documentação referente a livro de registro, laudo de resultado e relatórios deverá ser arquivado por um período de cinco anos.

8.1. Os resultados dos exames deverão ser emitidos em formulário próprio, segundo modelo estabelecido pelo CGLA, e de acordo com o fluxograma determinado.

8.1.1. RESULTADO NEGATIVO: Enviar FAX ou outro tipo de comunicação imediata, para o Médico Veterinário requisitante:

8.1.2. RESULTADO POSITIVO: Enviar FAX ou outro tipo de comunicação imediata, para:

- O Médico Veterinário requisitante;
- Ao Comitê Estadual de Sanidade Avícola (CESA)
- Ao Departamento de Defesa Animal (DDA), em Brasília.
- Ao laboratório de referência, indicado pela CGLA.

8.2. Todo laboratório credenciado deverá encaminhar até o quinto dia útil do mês subsequente, relatório das atividades mensais, em formulário próprio, segundo modelo estabelecido pela CGLA, ao CESA e à CGLA.

9. REALIZAÇÃO DOS EXAMES NA CONTRA-PROVA

9.1. A realização de contra-prova somente será efetuada no laboratório que realizou o exame.

9.2. A solicitação deverá obedecer ao prazo máximo de 8 dias a contar da data do recebimento do resultado.

9.3. A contra-prova será solicitada ao CESA, e este o encaminhará ao laboratório que realizou o exame.

9.4. O Médico Veterinário requisitante do exame obriga-se a pessoalmente, ou por seu representante, a acompanhar, assistido ou não por técnicos de sua confiança, aos exames que serão realizados na contra-prova.

9.5. Cabe ao técnico indicado pelo Médico Veterinário requisitante do exame apenas assistir, fiscalizar e observar a exatidão do resultado dos exames.

9.6. É obrigatória a comunicação ao CESA, da data e horário da realização do exame da contra-prova,

podendo o técnico daquele Serviço assistir, fiscalizar e observar a exatidão do resultado.

9.7. A ausência do representante do CESA, não constitui óbice para a realização do mesmo, desde que tenha sido observado o disposto no item 10.6.

9.8. Após a realização do exame, será lavrada uma ata assinada pelos interessados presentes, onde constará o resultado desse exame e a descrição de todo método analítico nele utilizado.

9.9. A desistência do Médico Veterinário requisitante do exame, ou seu representante, mediante declaração escrita, ou a sua ausência na realização do exame da contra-prova, importará no preavalecimento do resultado obtido no primeiro exame.

9.10. Os custos decorrentes da solicitação e realização da contra-prova correrão por conta do solicitante.

10. DO LABORATÓRIO

10.1. O laboratório deve possuir instalações e equipamentos adequados para a realização do Diagnóstico da Doença de Newcastle e responsável técnico e substituto deste, devidamente habilitado pela CGLA para a realização do Diagnóstico.

10.2. As instalações devem fazer parte da mesma base física do laboratório e atender às normas de segurança biológica.

10.3. Somente poderá assinar o formulário de resultado do exame e o relatório mensal o responsável técnico ou seu substituto.

11. INSTALAÇÕES, EQUIPAMENTOS E MATERIAIS.

Para efeito de credenciamento e monitoramento, o laboratório será vistoriado, devendo atender as exigências quanto a:

11.1. Instalações

11.1.1. Protocolo

O protocolo deverá ser constituído de dois ambientes distintos:

11.1.1.1. Recepção: Onde serão recebidos, registrados E identificados os materiais a serem examinados. Deverá ter pessoal próprio que procederá a conferência do material, observando a exatidão dos dados de remessa e o estado de conservação

11.1.1.2. Escritório: Estrutura responsável pela emissão dos laudos de resultado devendo ser obrigatoriamente independente da sala de recepção

11.1.2. Virologia

Neste local as amostras serão processadas, incluindo-se sua divisão em amostras de exame e contra-prova e a realização dos exames de isolamento viral, titulação Ag, identificação Ag e sorologia.

11.1.3. Apoio Técnico

11.1.3.1. Meios e Soluções: Este setor estará encarregado do preparo de meios e soluções.

11.1.3.2. Biotério: Este setor estará encarregado da criação de animais de laboratório a serem utilizados nas provas diagnósticas e da coleta de sangue para a realização dos exames.

11.1.3.3. Infectório: Este setor estará encarregado do abrigo e manutenção dos animais que estão sendo

utilizados nas provas diagnósticas e na obtenção de soro imune.

11.1.3.4. Lavagem e Esterilização: Este setor atenderá o laboratório procedendo a desinfecção, lavagem, montagem, esterilização e estocagem do material procedente dos setores de exame, infectório, meios e soluções.

11.2. Equipamentos

11.2.1. Protocolo

11.2.1.1. Recepção

- Mesa com superfície resistente a desinfetantes
- Refrigerador

11.2.1.2. Escritório

- Arquivo com chave
- Máquina de escrever
- Sistema informatizado

11.2.2. Virologia

- Agitador de tubos
- Balança semi-analítica
- Balança para tarar tubos
- Banho-maria regulável
- Carrinho de laboratório (opcional)
- Centrífuga refrigerada
- Congelador a -20°C
- Cuba com água sanitária
- Dispensador de pipetas
- Estufa bacteriológica
- Fluxo laminar vertical ou câmara asséptica de 25 e 50 ml
- Pipetas automáticas de 25 e 50ml
- Refrigerador (+4 a +8°C)
- Botijão de nitrogênio (opcional)
- Microplacas com fundo em U com 96 poços

11.2.3. Apoio Técnico

11.2.3.1. Meios e Soluções

- Agitador magnético com e sem placa aquecedora
- Balança analítica (opcional)
- Balança semi-analítica
- Carrinho de laboratório (opcional)
- Congelador a -20°C
- Deionizador (opcional)
- Destilador
- Dispensador de pipetas
- Refrigerador (+4 a +8°C)
- Potenciômetro
- Espectrofotômetro

11.2.3.2. Biotério

- Incubadora/nascedouro (opcional)
- Gaiolas

11.2.3.3. Infectório

- Autoclave

- Sistema de incubação com temperatura regulável

11.2.3.4. Lavagem e Esterilização

11.2.3.4.1. Desinfecção

- Autoclave
- Carrinho de laboratório (opcional)

11.2.3.4.2. Lavagem

- Depósito para água destilada e/ou água deionizada
- Cuba para água sanitária
- Destilador
- Deionizador (opcional)
- Sistema para enxágue de material
- Sistema para ferver material (vidraria, etc.)
- Lavador de pipetas

11.2.3.4.3. Montagem

- Estante para secagem do material
- Mesa para montagem do material

11.2.3.4.4. Esterilização

- Autoclave
- Carrinho de laboratório (opcional)
- Forno de esterilização

11.2.3.4.5. Estocagem

- Refrigerador
- Congelador
- Estantes e/ou armários

12. DO RESPONSÁVEL TÉCNICO E SEU SUBSTITUTO

Para efeito de credenciamento e monitoramento, o responsável técnico e seu substituto serão submetidos a avaliação técnico-científica, pela CGLA.

13. DO CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO

13.1. Após aprovação dos responsáveis técnicos na avaliação técnico-científica, e atendimento às exigências de instalações, equipamentos e materiais na vistoria, o laboratório será credenciado.

13.2. O monitoramento se fará, utilizando os procedimentos de envio de material para check-test e realização de vistorias técnico-administrativas.

13.3. Poderão ser enviados para check-test materiais como amostra de swabs de traquéia e cloaca, de fezes, de órgãos de eleição, e de soros sanguíneos.

13.4. O monitoramento também poderá ser realizado por técnicos do CGLA a partir do processamento das amostras retidas para contra-prova.

14. DISPOSIÇÕES GERAIS

14.1. Somente deverá ser liberado resultado definitivo e conclusivo para o Diagnóstico da Doença de Newcastle ou Gripe Aviária.

14.2. As técnicas e as soluções a serem utilizadas para o Diagnóstico da Doença de Newcastle e diferencial para a Gripe Aviária estão descritas nos Anexos I e II, respectivamente. Outras metodologias

poderão ser utilizadas desde que previamente aprovadas pela CGLA.

14.3. Onde não existir CESA suas atribuições serão de responsabilidade da DFAARA.

14.4. Os laboratórios credenciados deverão, em prazo a ser estabelecido pela CGLA, implantar o sistema de informatização utilizando programas definidos pela CGLA.

14.5. O laboratório credenciado que não cumprir esses procedimentos terá o credenciamento, para o Diagnóstico Oficial da Doença de Newcastle, suspenso por tempo determinado ou cancelado, por ato desta Secretaria.

ANEXO I

DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS

DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE NEWCASTLE E DIFERENCIAL PARA GRIPE AVIÁRIA - INFLUENZA AVIÁRIA

1. Metodologia

1.1. Doença de Newcastle

1.1.1. Isolamento

1.1.1.1. Preparo do inóculo: As amostras devem ser preparadas a partir de uma suspensão 10 a 20% (peso/volume), em PBS (Solução Salina Tamponada), pH

7.2, adicionada de uma solução de antibióticos.

As amostras de tecidos devem ser trituradas em gral estéril, previamente refrigerado e deixadas em repouso durante 1 a 2 horas, a 4°C e centrifugadas a 1.000 x g, durante 10 minutos a 4°C, sendo recolhido o sobrenadante, que deverá ser mantido sob refrigeração até o momento do uso.

As amostras de fezes devem ser homogeneizadas e deixadas em repouso de 1 a 2 horas, a 4°C e centrifugadas a 1.000 x g, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante deve ser mantido a 4°C, até o momento do uso.

1.1.1.2. Inoculação: A suspensão de fezes ou de tecido deve ser inoculada na cavidade alantóica em, no mínimo, 5 ovos embrionados, preferentemente SPF ou, alternativamente de ovos embrionados de granjas com sorologia negativa para a doença de Newcastle, com 8 a 11 dias e incubados a 37°C, durante 7 dias.

Os ovos contendo embriões mortos, agonizantes e aqueles remanescentes, ao cabo do período, devem ser coletados e colocados a 4°C, para evitar hemorragias por ocasião da coleta do líquido alantóico.

O líquido alantóico é testado no tocante a sua atividade hemaglutinante (HA).

Devem ser realizadas mais 2 passagens daqueles líquidos alantóicos que se revelarem negativos ao teste de HA.

1.1.1.3. Titulação do antígeno

1.1.1.3.1. Hemaglutinação (HA)

1.1.1.3.2. Líquido alantóico: O líquido alantóico deverá ser clarificado por centrifugação a 1.000 x g a 4°C, durante 10 minutos e a sua capacidade hemaglutinante avaliada frente a hemácias.

1.1.1.4. Teste:

Colocar 25 ml de PBS, pH 7.2, em 2 fileiras de cavidades de uma placa de 96 cavidades, do tipo em U.
Colocar 25 ml do antígeno (líquido alantóico) nas duas primeiras cavidades das fileiras testes.
Diluir, com auxílio de microdiluidores, a partir das primeiras cavidades das fileiras testes (1:2 até 1:4096).
Colocar, em todas as cavidades, 25 ml de uma suspensão de hemácias a 1% (v/v) em PBS, pH 7.2.
Agitar e deixar a placa 4°C, durante 30-45 minutos.

Fazer a leitura.

NEGATIVO - Onde houve a formação de botão.
Não ocorreu a hemaglutinação.

POSITIVO - Onde não houve a formação de botão.
Ocorreu a hemaglutinação.

1.1.1.5. Unidade hemoaglutinante: Uma unidade hemaglutinante (1 UHA) corresponde a maior diluição do líquido alantóico onde ocorreu a hemaglutinação total.

Para a prova de HI devem ser usadas 4 UHA.

Exemplo: 1 UHA - Diluição 1,512
 $4 \text{ UHA} = 512/4 = 1,28$

1.1.1.6. Controles

1.1.1.6.1. Hemácias a 1%: Realizar controles de hemácias colocando 25 ml do diluente (PBS pH 7.2) e 25 ml da suspensão de hemácia a 1% em duas cavidades da placa.

OBS - A leitura da prova somente deverá ser realizada se for observada a formação de botão (ausência de hemaglutinação).

1.1.2. Identificação antigênica

1.1.2.1. Inibição da hemaglutinação:

Colocar 25 ml de PBS, pH 7.2, em 2 fileiras de cavidades de uma placa de 96 cavidades, do tipo em U.
Colocar 25 ml de soro teste nas duas primeiras cavidades das fileiras testes.
Diluir, com auxílio de microdiluidores, a partir das primeiras cavidades das fileiras testes, até a diluição desejada.

Adicionar 25 ml do antígeno, contendo 4 UHA a todas as cavidades das fileiras testes.

Hemogeneizar e deixar em repouso por 30 minutos, a 4°C.

Colocar, em todas as cavidades, 25 ml de uma suspensão de hemácias de aves a 1% (v/v) em PBS, pH 7.2.

Agitar e deixar a placa a 4°C, durante 30-45 minutos. Fazer a leitura.

NEGATIVO - Onde não houve a formação de botão.
Ocorreu a hemaglutinação.

POSITIVO - Onde houve a formação de botão. Não ocorreu a hemaglutinação.

1.1.2.1.1. Controles

1.1.2.1.1.1. Soro: Realizar controle duplo, usando:
25 ml de soro teste na menor diluição.
25 ml de PBS, pH 7.2.
25 ml de hemácia a 1%.

OBS - Não deverá ocorrer hemaglutinação.

Caso ocorra o soro deverá ser adsorvido com uma suspensão de hemácia a 50% (v/v).

1.1.2.1.2. Antígeno: Realizar controle duplo, usando:

25 ml do antígeno com 4 UHA.

25 ml de PBS, pH 7.2.

25 ml de hemácia a 1%.

OBS - Deverá ocorrer hemaglutinação

1.1.2.1.3. Hemácias: Realizar controle duplo, usando:

50 ml de PBS, pH 7.2.

25 ml de hemácia a 1%

OBS - Não deverá ocorrer hemaglutinação

1.1.3. Índices de patogenicidade

1.1.3.1. Tempo Médio de Morte de Embriões (TME)

Após realizar diluições decimais, na faixa de 10^{-6} a 10^{-9} do líquido alantóico infectivo, em solução salina, inocular 0,1 ml, de cada diluição, de, no mínimo 5 ovos embrionados SPF, de 8-11 dias de idade, pela via alantóica e incubar os ovos a 37°C.

Deixar uma amostra do mesmo líquido alantóico na geladeira, por 8 horas e depois inocular 0,1 ml, de cada diluição em, no mínimo, 5 ovos da mesma idade e incubar a 37°C.

Observar os ovos durante sete dias, duas vezes por dia.

Registrar o tempo de morte dos embriões.

A dose letal mínima é a maior diluição que mata todos os embriões.

TME é um tempo médio, em horas, para a dose letal mínima matar os embriões e se classifica em:

VELOGÊNICA - Menos de 60 horas para matar.

MESOGÊNICA - Entre 60 e 90 horas para matar.

LENTOGÊNICA - Mais de 90 horas para matar.

1.1.3.2. Índice de Patogenicidade Intracerebral (IPIC)

A partir do líquido alantóico infectivo, com título HA maior que 24, diluído a 1:10 em salina isotônica estéril, inocular 0,05 ml, pela via intracerebral, em 10 pintos SPF, de um dia de idade.

Examinar os pintos, diariamente, por 8 dias, anotandose o resultado:

- pintos saudáveis = 0

- pintos doentes = 1

- pintos mortos = 2

Decorridos àquele tempo calcular o índice médio do período.

Amostras do vírus da enfermidade de Newcastle mais virulenta (velogênicas) este índice se aproxima de 2.0 enquanto nas cepas lentogênicas este índice se aproxima de 0.0.

1.1.3.3. Índice de patogenicidade Intravenosa (IPIV) Este índice é calculado a partir de inóculos intravenosos em frangos SPF, com seis semanas de idade.

São inoculados 10 frangos, pela via intravenosa, com 0,1 ml do líquido alantóico, com título HA maior que 24, diluído a 1:10 em salina isotônica estéril.

Observam-se os frangos durante 10 dias consecutivos e anota-se o resultado:

- frangos normais = 0
- frangos doentes = 1
- frangos paralíticos = 2
- frangos mortos = 3

O IPIV é o resultado da média das anotações sendo consideradas

- lentogênicas e algumas mesogênicas quando o IPIV se aproxima do zero,
- velogênicas quando o IPIV se aproxima de 3,0.

Os índices encontrados devem ser avaliados de acordo com os dados epidemiológicos e o tipo de vacinação regional considerando que naquelas regiões onde são aplicadas vacinas oriundas de vírus lentogênico, os índices de valores acima de 0,7 significam processos infecciosos, o que sugere doença no campo.

EXEMPLO:

Sinais clínicos	Dias após inoculação (total de aves)										Total	Resultado
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Normal	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12 X 0	0
Doente	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6 X 1	6
Paralítico	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6 X 2	12
Morto	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76 X 3	228

Índice = Resultado médio por ave e por observação = 246 dividido por 100
= 2,46

1.1.4. Sorologia: A realização de testes sorológicos se destina, principalmente, ao monitoramento do estado imunitário de plantéis vacinados.

Em áreas sem programas de vacinação pode ser usado como diagnóstico, visto que, dificilmente, as reações positivas serão inespecíficas.

Os testes mais aplicados são o HI e o ELISA. No HI, títulos de inibição de 4 UHA com soros diluídos a 1:8 ou mais podem ser observados, no diagnóstico positivo.

Soros de aves que não sejam galinhas podem aglutinar hemácias, o que torna necessário a adsorção desses soros com as hemácias a serem utilizadas no teste.

Controles com soros de referência, positivos e negativos, devem, obrigatoriamente, serem, incluídos na prova.

1.2. Gripe aviária.

1.2.1. Isolamento

1.2.1.1. Preparo do inóculo: As amostras devem ser preparadas a partir de uma suspensão 10 a 20% (peso/volume), em PBS (Solução Salina Tamponada), pH

7,2, adicionada de uma solução de antibióticos, conforme descrito no item 3.1 do anexo, Normas para credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico da doença de Newcastle e diferencial.

As amostras de tecidos devem ser trituradas em gral estéril, previamente refrigerado e deixadas em repouso de 1 a 2 horas, a 4°C e centrifugadas a 1.000 x g, durante 10 minutos a 4°C, sendo recolhido o sobrenadante, que deverá ser mantido sob refrigeração até o momento do uso.

As amostras de fezes devem ser homogeneizadas e deixadas em repouso de 1 a 2 horas, a 4°C e centrifugadas a 1.000 x g, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante deve ser mantido a 4°C, até o momento do uso.

1.2.1.2. Inoculação: A suspensão de fezes ou de tecido deve ser inoculada na cavidade alantóica em, no mínimo, 5 ovos embrionados SPF ou, na impossibilidade, ovos de granjas com sorologia negativa para a gripe aviária, com 8 a 11 dias e incubados a 37°C, durante 7 dias.

Os ovos contendo embriões mortos, agonizantes e aqueles remanescentes, ao cabo do período, devem ser coletados e colocados a 4°C, para evitar hemorragias por ocasião da coleta do líquido alantóico. O líquido alantóico é testado no tocante a sua atividade hemaglutinante (HA).

Devem ser realizadas mais duas passagens daqueles líquidos alantóicos que se revelarem negativos ao teste de HA.

1.2.1.3. Titulação do antígeno

1.2.1.3.1. Hemaglutinação

1.2.1.3.2. Líquido alantóico: O líquido alantóico deverá ser clarificado por centrifugação a 1.000 x g a 4°C, durante 10 minutos e a sua capacidade hemaglutinante avaliada frente a hemácias.

1.2.1.4. Teste: Colocar 25 ml de PBS, pH 7.2, em 2 fileiras de cavidades de uma placa de 96 cavidades, do tipo em U.

Colocar 25 ml do antígeno (líquido alantóico) nas duas primeiras cavidades das fileiras testes.

Diluir, com auxílio de microdiluidores, a partir das primeiras cavidades das fileiras testes (1:2 até 1:4096).

Colocar, em todas as cavidades, 25 ml de uma suspensão de hemácias a 1% (v/v) em PBS, pH 7.2.

Agitar e deixar a placa em temperatura ambiente (+ 22°C) por 45 minutos ou a 4°C, durante a noite (+ 18 horas).

Fazer a leitura.

NEGATIVO - Onde houve a formação de botão.

Não ocorreu a hemaglutinação.

POSITIVO - Onde não houve formação de botão.

Ocorreu a hemaglutinação.

1.2.1.5 Unidade Hemaglutinante Uma unidade hemaglutinante (1UHA) corresponde a maior diluição do líquido alantóico onde ocorreu a hemaglutinação total.

Para a prova de HI devem ser usadas 4 UHA.

Exemplo: 1 UHA = Diluição 1/512

4 UHA = 512,4 = 1/128

1.2.1.5. Controles

1.2.1.5.1. Hemácias: Realizar controles de hemácias

colocando 25 ml do diluente (PBS pH 7.2) e 25 ml da suspensão de hemácia a 1% em duas cavidades da placa.

OBS - A leitura da prova somente deverá ser realizada se for observada a formação de botão (ausência de hemaglutinação).

1.2.2. Inibição da hemaglutinação: Colocar 25 ml de PBS, pH 7.2, em 2 fileiras de cavidades de uma placa de 96 cavidades, do tipo em U.

Colocar 25 ml do soro teste nas duas primeiras cavidades das fileiras testes.

Diluir, com auxílio de microdiluidores, a partir das primeiras cavidades das fileiras testes, até a diluição desejada.

Adicionar 25 ml do antígeno, contendo 4 UHA a todas as cavidades das fileiras testes.

Homogeneizar e deixar em repouso por 30 minutos, em temperatura ambiente (+ 22°C).

Colocar, em todas as cavidades, 25 ml de uma suspensão de hemácias a 1% em PBS, pH 7.2.

Agitar e deixar a placa em temperatura ambiente (+ 22°C) por 45 minutos ou a 4°C, durante a noite (+ 18 horas).

Fazer a leitura.

NEGATIVO: Onde não houve a formação de botão.

Ocorreu a hemaglutinação.

POSITIVO: Onde houve formação de botão.

Não ocorreu a hemaglutinação.

1.2.2.1. Controles

1.2.2.1.1. Soro

Realizar controle duplo, usando:

25 ml do soro teste na menor diluição.

25 ml de PBS, pH 7.2.

25 ml de hemácia a 1%.

OBS: Não deverá ocorrer hemaglutinação. Caso ocorra, o soro deverá ser adsorvido com uma suspensão de hemácia a 50% (v/v).

1.2.2.1.2. Antígeno

Realizar controle duplo, usando:

25 ml de antígeno com 4 UHA.

25 ml de PBS, pH 7.2.

25 ml de hemácia a 1%.

OBS: Deverá ocorrer hemaglutinação

1.2.2.1.3. Hemácias

Realizar controle duplo, usando:

50 ml de PBS, pH 7.2.

25 ml de hemácia a 1%.

OBS: Não deverá ocorrer hemaglutinação

1.2.3. Imonudifusão: O teste de imunodifusão é empregado para detecção do vírus influenza pela demonstração da presença de nucleocapsídeo comum a todos os membros do gênero A. O antígeno, empregado na prova, é o vírus concentrado, a partir do líquido alantóico, ou o extrato de membrana corioalantóide de ovos embrionados infectados.

1.2.3.1. Preparo do antígeno

1.2.3.1.1. Líquido alantóico: O líquido alantóico é concentrado pela precipitação da partícula viral pelo ácido clorídrico.

Adicionar ao líquido alantóico solução de ácido clorídrico 0,1 N até o pH atingir 4.0.

Colocar a mistura em banho de gelo durante 60 minutos.

Clarificar por centrifugação a 1.000 x g, durante 20 minutos, a 4°C.
Desprezar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em tampão glicinasarcosil.

1.2.3.1.2. Membrana corioalantóide: Retirar a membrana corioalantóide dos ovos infectados e lavar em PBS, pH 7.2.

Triturar a membrana (3 membranas fornecem cerca de 1 ml de antígeno).

Congelar e descongelar 3 vezes.

Centrifugar a 700 x g, durante 20 minutos a 4°C.

Recolher o sobrenadante e inativar.

O antígeno pode ser usado imediatamente ou após a incubação a 37°C, durante 36 horas, para total inativação.

Estocar a -10°C.

1.2.3.1.3. Teste: Preparar o ágar Noble, agarose ou ágar purificado a 0,9%.

Distribuir em lâminas de microscópio ou placas de Petri.

Usar furador com 4 mm de diâmetro e com 4 mm de distância.

Distribuir o antígeno suspeito na cavidade central e os soros controles positivo e negativo nas cavidades externas.

Incubar em câmara úmida, em temperatura ambiente.

Ler após 24 e 48 horas.

ANEXO II

FORMULAÇÃO E PROCEDIMENTOS TÉCNICOS PARA A PREPARAÇÃO DE REAGENTES E SOLUÇÕES

1. A.C.D. (Ácido cítrico-Citrato de sódio-Dextrose)

Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 11,26 g

Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 4,00 g

Dextrose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 11,00 g

Água destilada q.s.p. 1.000 ml

Diluir na ordem. Autoclavar a 115°C por 10 minutos.

2. Ácido clorídrico 0,1 N

Ácido clorídrico (HCl) 3,646 ml

Água destilada q.s.p. 1.000 ml

3. Alsever

Dextrose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 20,50 g

Cloreto de sódio (NaCl) 4,20 g

Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,55 g

Citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 8,00 g

Água destilada q.s.p. 1.000 ml

Diluir na ordem. Autoclavar a 115°C por 10 minutos.

4. P.B.S. (Solução Salina Tamponada) pH 7,2

Fosfato monopotássico (KH_2PO_4) 2,587 g

Fosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 8,494 g

Cloreto de sódio (NaCl) 8,5 g

Água destilada q.s.p. 1.000 ml

Diluir na ordem. Autoclavar a 115°C por 10 minutos.

5. Salina 0,85%

Cloreto de sódio (NaCl) 8,5 g

Água destilada q.s.p. 1.000 ml

Autoclavar a 115°C por 10 minutos.

6. Tampão Glicina-Sarcosil

Lauril Sarcosinato de Sódio a 1% tamponado a pH 9,0 com glicina 0,5 M.

7. Gel a 0,9%

Ágar Noble ou Agarose 0,9 g

Tampão Borato 100 ml

Aquecer em banho-Maria ou vapor fluente até a completa fusão do ágar.

8. Tampão Borato

Cloreto de sódio (NaCl) 2 g

Água destilada 1000 ml

H₃PO₃ 9 g

Diluir na ordem. Autoclavar a 115°C por 10 minutos.

D.O.U., 11/11/1994