

Boletim Fepagro

20

NOVEMBRO 2011

ISSN 0104-9089

BOLETIM TÉCNICO DA
FUNDAÇÃO ESTADUAL DE
PESQUISA AGROPECUÁRIA
Secretaria da Agricultura,
Pecuária e Agronegócio
Rio Grande do Sul - Brasil



Manual de Coleta e Remessa de Amostras para **DIAGNÓSTICO** Laboratorial Veterinário

Alexander Cenci
Alexandre de Carvalho Braga
Benito Guimarães de Brito
Cristine Cerva
Fabiana Quoos Mayer
Fernando Sérgio Castilhos Karam
João Ricardo de Souza Martins
José Antônio Simões Pires Neto
Júlio César de Almeida Rosa
Kelly Cristina Tagliari de Brito
Mario de Menezes Coppola
Maurício Gauterio Dasso
Paulo Michel Roehe
Rovaina Laureano Doyle
Sandra Maria Borowski



Secretaria da Agricultura,
Pecuária e Agronegócio



**GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E AGRONEGÓCIO
FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA**

Boletim Técnico

**MANUAL DE COLETA E REMESSA
DE AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO
LABORATORIAL VETERINÁRIO**

Alexander Cenci
Alexandre de Carvalho Braga
Benito Guimarães de Brito
Cristine Cerva
Fabiana Quos Mayer
Fernando Sérgio Castilhos Karam
João Ricardo de Souza Martins
José Antônio Simões Pires Neto
Júlio César de Almeida Rosa
Kelly Cristina Tagliari de Brito
Mario de Menezes Coppola
Maurício Gauterio Dasso
Paulo Michel Roehe
Rovaina Laureano Doyle
Sandra Maria Borowski

PORTO ALEGRE, RS

2011

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - FEPAGRO

Divisão de Comunicação Social

Programa de Editoração e Publicações

Rua Gonçalves Dias, 570 – Bairro Menino Deus

Porto Alegre/RS – CEP 90130-060

Telefone: (51) 3288-8000 Fax: (51) 3233-7607

www.fepagro.rs.gov.br – fepagro@fepagro.rs.gov.br

editoracao@fepagro.rs.gov.br

Comissão Editorial:

Luciano Kayser Vargas – Presidente; André Dabdab Abichequer; Bernadete Rardin; Lia Rosane Rodrigues; Paulo Roehe; Rodrigo Favreto; Simone Linck; Zélia M. de Souza Castilhos.

Divisão de Comunicação Social:

Simone Linck – Coordenadora de Comunicação Social; Fernando Kluwe Dias – Fotógrafo; Gislaine Freitas – Jornalista – MTb 6637; Lia Rosane Rodrigues – Coordenadora do Programa de Editoração e Publicações; Nêmore Arlindo Rodrigues – Bibliotecária – CRB 10/820; Diego Luis Policeno dos Santos – Estagiário de Biblioteconomia; Rafaela dos Santos – Estagiária de Design Gráfico.

Tiragem: 500 exemplares

CATALOGAÇÃO NA FONTE

BOLETIM FEPAGRO, Boletim Técnico da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária / FEPAGRO ; Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio – Porto Alegre, 2011. – ISSN 0104-9089

Conteúdo: n. 20, Cenci, Alexander et al.

CDU 636.09

I Cenci, Alexander ; II Braga, Alexandre de Carvalho ; III Brito, Benito Guimarães ; IV Cerva, Cristine ; V Mayer, Fabiana Quoos ; VI Karam, Fernando Sérgio Castilhos ; VII Martins, João Ricardo de Souza ; VIII Simões Pires Neto, José Antônio ; IX Rosa, Júlio César de Almeida ; X Brito, Kelly Cristina Tagliari de ; XI Coppola, Mário de Menezes ; XII Dasso, Maurício Gautério ; XIII Roehe, Paulo Michel ; XIV Doyle, Rovaina Laureano ; XV Borowski, Sandra Maria XVI Título. 1 Sanidade animal – análises clínicas

REFERÊNCIA

CENCI, A. ; BRAGA, A. de C. ; BRITO, B. G. ; CERVA, C. ; MAYER, F. Q. ; KARAM, F. S. C. ; MARTINS, J. R. de S. ; SIMÕES PIRES NETO, J. A. ; ROSA, J. C. de A. ; BRITO, K. C. T. de ; COPPOLA, M. de M. ; DASSO, M. G. ; ROEHE, P. M. ; DOYLE, R. L. ; BOROWSKI, S. Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico Laboratorial Veterinário. Porto Alegre : FEPAGRO, 2011. Boletim Técnico, n. 20.

Acesse a versão online desta publicação em www.issuu.com/fepagro

Apresentação

O Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), localizado em Eldorado do Sul, RS, e pertencente à Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro), tem como missão maior atuar no desenvolvimento de pesquisas, realizar análises laboratoriais para diagnóstico das principais enfermidades das espécies domésticas de interesse econômico, formar recursos humanos e difundir tecnologias atuando como centro de referência em sanidade animal e saúde pública para o Rio Grande do Sul.

O presente manual tem por finalidade servir de fonte de informação aos Médicos Veterinários que atuam no campo, orientando sobre os procedimentos básicos de coleta e remessa de materiais biológicos para confirmação de suspeitas clínicas e complementaridade do diagnóstico clínico.

Os exames laboratoriais disponíveis abrangem provas bacteriológicas, virológicas, parasitológicas, histopatológicas e moleculares. Os Médicos Veterinários que integram os diferentes laboratórios encontram-se à disposição para auxiliarem em casos de ocorrência de suspeitas de surtos de enfermidades em campo, através de consultas telefônicas ou meio eletrônico.

Corpo Técnico da Fepagro Saúde Animal
Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor

Diretor

Maurício Gauterio Dasso

Laboratório de Bacteriologia

Mario de Menezes Coppola

Laboratório de Biologia Molecular

Cristine Cerva

Fabiana Quoos Mayer

Laboratório de Brucelose

Maurício Gauterio Dasso

Laboratório de Histopatologia

Fernando Sérgio Castilhos Karam

Laboratório de

Leptospirose/Epidemiologia

José Antonio Simões Pires Neto

Laboratório de Parasitologia

João Ricardo de Souza Martins

Rovaina Laureano Doyle

Laboratório de Patologia Suína

Sandra Maria Borowski

Laboratório de Saúde das Aves

Benito Guimarães de Brito

Kelly Cristina Tagliari de Brito

Laboratório de Virologia

Alexandre de Carvalho Braga

Julio Cesar de Almeida Rosa

Paulo Michel Roehle

Meio de Cultura

Valesca dos Santos Gomes

Garantia da Qualidade

Charlotte Alice Sievers Tostes

Controle de Qualidade

Alexandra Medeiros da Silveira


Sumário

I. COLETA E REMESSA DE AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL VETERINÁRIO.....	9
1. COLETA DE AMOSTRAS.....	9
2. CONSERVAÇÃO E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS	10
3. IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS.....	13
4. FORMULÁRIO PARA SOLICITAÇÃO DE EXAMES	14
5. TRANSPORTE DE AMOSTRAS	16
6. REMESSA DAS AMOSTRAS PARA O IPVDF.....	17
6.1 COMO ENVIAR POR EMPRESA TRANSPORTADORA	17
6.2 ENDEREÇO PARA REMESSA DE AMOSTRAS AO IPVDF.....	17
6.3 PAGAMENTO DOS SERVIÇOS PRESTADOS.....	17
6.4 CONTATOS.....	17
II. COLETA DE AMOSTRAS PARA EXAME BACTERIOLÓGICO	19
7. AMOSTRAS PARA EXAME BACTERIOLÓGICO.....	19
7.1 VÍSCERAS.....	19
7.2 SANGUE.....	20
7.3 EXSUDATO E PUS.....	20
7.4 AMOSTRAS DE LEITE PARA DIAGNÓSTICO DE MASTITE BOVINA.....	21
7.5 AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE CARBÚNCULO HEMÁTICO (ANTRAZ).....	22
7.6 AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE LEPTOSPIROSE.....	22

7.7 AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSE.....	23
7.8 AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE	24
7.8.1 EXAME DIRETO (BACTERIOLÓGICO).....	24
7.8.2 EXAME INDIRETO (SOROLÓGICO).....	25
7.8.3 ESPÉCIES ANIMAIS E TESTES SOROLÓGICOS REALIZADOS NO IPVDF PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSE.....	28
8. ANTIBIOGRAMA	29
9. DOENÇAS BACTERIANAS DIAGNOSTICADAS NO IPVDF E AMOSTRAS A SEREM COLETADAS	30
III. COLETA DE AMOSTRAS PARA EXAME VIROLÓGICO	31
10. AMOSTRAS PARA EXAME VIROLÓGICO.....	31
11. TESTES SOROLÓGICOS	32
12. COLETA PARA DOENÇAS VIRAIS.....	33
12.1 ÓRGÃOS E TECIDOS.....	33
12.2 AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE RAIVA	34
12.2.1 CUIDADOS NA COLETA.....	34
12.2.2 INSTRUÇÕES PARA COLETA.....	34
12.3 SECREÇÕES	35
12.4 SANGUE.....	36
12.5 SORO	36
13. DOENÇAS VIRAIS DIAGNOSTICADAS NO IPVDF, TESTES REALIZADOS E MATERIAIS A SEREM ENVIADOS	39
14. FÓRMULAS.....	40

IV. COLETA DE AMOSTRAS PARA EXAME PARASITOLÓGICO	41
15. AMOSTRAS PARA EXAME PARASITOLÓGICO	41
15.1 ENDOPARASITOS	41
15.2 ECTOPARASITOS.....	43
15.3 HEMOPARASITOS.....	45
16. FÓRMULAS.....	46
V. COLETA DE AMOSTRAS PARA EXAME HISTOPATOLÓGICO.....	47
17. AMOSTRAS PARA EXAME HISTOPATOLÓGICO.....	47
18. COLETA DE AMOSTRAS QUANDO A SUSPEITA FOR INTOXICAÇÃO.....	49
18.1 INTOXICAÇÃO POR PLANTAS	49
18.1.1 COLETA DA PLANTA PARA IDENTIFICAÇÃO	50
18.2 INTOXICAÇÃO POR FUNGOS.....	51
18.3 INTOXICAÇÃO POR PRODUTOS QUÍMICOS	51
VI. COLETA DE AMOSTRAS PARA O LABORATÓRIO DE PATOLOGIA SUÍNA	52
19. AMOSTRAS PARA O LABORATÓRIO DE PATOLOGIA SUÍNA....	52
19.1 DOENÇAS BACTERIANAS DIAGNOSTICADAS NO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA SUÍNA DO IPVDF	53
VII. COLETA DE AMOSTRAS PARA O LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR	54
20. AMOSTRAS PARA O LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	54
VIII. COLETA DE AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS DAS AVES.....	56
21. AVES VIVAS OU MORTAS	57

22.	ÓRGÃOS.....	58
23.	SUABES.....	59
	23.1 TRAQUEIA.....	59
	23.2 CLOACA.....	59
	23.3 ARRASTO.....	60
24.	SORO.....	60
IX.	COLETA DE AMOSTRAS DE RAÇÃO E FARINHAS DE ORIGEM ANIMAL PARA EXAME MICROBIOLÓGICO.....	62
25.	AMOSTRAS ACONDICIONADAS EM EMBALAGENS INDIVIDUAIS.....	62
26.	AMOSTRAS ACONDICIONADAS EM EMBALAGENS NÃO INDIVIDUAIS.....	62
X.	COLETA DE AMOSTRA DE ÁGUA PARA EXAME DE CONTAMINAÇÃO BACTERIANA.....	64
27.	COLETA DE ÁGUA EM TORNEIRAS E BEBEDOUROS.....	65
	27.1 PROCEDIMENTOS DE COLETA.....	65
28.	COLETA DE ÁGUA EM RIOS, POÇOS, CAIXAS D'ÁGUA E RESERVATÓRIOS EM GERAL.....	68
	28.1 PROCEDIMENTOS DE COLETA.....	68
XI.	COLETA DO ENCÉFALO NA NECROPSIA DE BOVINOS	
29.	RETIRADA DO ENCÉFALO.....	70
30.	COLETA E SELEÇÃO DE AMOSTRAS DO ENCÉFALO PARA VIROLOGIA, BACTERIOLOGIA E HISTOPATOLOGIA.....	70
XII.	REFERÊNCIAS.....	80
XIII.	ANEXO 1 – FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE EXAMES.....	83



I Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico Laboratorial Veterinário

1 Coleta de amostras

Para o diagnóstico laboratorial ser realizado com sucesso, é importante uma boa anamnese, suspeita clínica fundamentada e amostra coletada corretamente.

A qualidade da amostra recebida é essencial para o diagnóstico. A coleta e o transporte inadequados dificultam ou até inviabilizam o isolamento do agente etiológico e, por consequência, o diagnóstico da enfermidade.

Durante a coleta de material biológico, há risco de exposição a agentes potencialmente causadores de doenças ao ser humano, razão pela qual é altamente recomendável que o profissional utilize avental ou macacão, luvas, botas de borracha, óculos de proteção e máscara no momento da coleta.

A coleta deverá ser feita de modo a evitar a contaminação com produtos e outros microrganismos presentes no ambiente ou no próprio animal. Por essa razão, frascos, tubos, seringas, agulhas e demais instrumentais a serem utilizados devem estar estéreis. Quando não for possível a utilização de frascos estéreis, recomenda-se lavá-los com água e desinfetante e fervê-los em água limpa, no mínimo, durante 30 minutos. Amostras contaminadas por produtos ou microrganismos que não estão envolvidos na etiologia da doença dificultam a realização da prova e a interpretação dos resultados.

2 Conservação e acondicionamento das amostras

A forma de conservação depende da amostra e do tipo de exame requerido e será descrita nos capítulos posteriores do manual.

As amostras deverão ser remetidas em condições de biossegurança desde o transporte até a chegada ao Instituto. Para tal, devem ser acondicionadas em um sistema de embalagem tripla:

a) Embalagem primária: compreende a embalagem que comporta a amostra, entrando em contato direto com a mesma. Podem ser frascos, tubo de ensaio ou embalagem plástica sem utilização prévia (exemplo: embalagens para congelamento de alimentos, com fecho).

b) Embalagem secundária: reveste a embalagem primária, deve ser impermeável e vedada, de modo a evitar vazamentos, garantindo maior segurança (Figura 1).

c) Embalagem terciária: recebe o conjunto (embalagem primária dentro da secundária) e deve ser um recipiente isotérmico à prova de água (exemplo: caixa de isopor íntegra).

No caso de envio de amostras refrigeradas, no interior da embalagem terciária deve ser colocado gelo reciclável ou água congelada dentro de garrafas plásticas, para evitar acúmulo de água. Para aumentar a durabilidade do gelo, adicionar sal à água na proporção de 5 colheres de sopa por litro de água. O gelo precisa estar em quantidade suficiente para garantir a refrigeração do material. Na Figura 2 estão demonstrados alguns tipos de gelo reciclável.

Gelo seco também pode ser utilizado e é particularmente recomendado para amostras visando o isolamento de vírus. Nesse caso, as amostras embaladas, como acima descritas, devem ser dispostas

em uma embalagem terciária (caixa de isopor) ampla, para permitir a colocação de gelo seco suficiente para manter o material congelado até a chegada ao laboratório. Nitrogênio líquido igualmente pode ser utilizado, porém, nesse caso, faz-se necessário um recipiente especial.

Folhas de jornal podem ser usadas para separar o gelo reciclável dos frascos de coleta e preencher espaços vazios, conforme a Figura 3. A tampa da embalagem terciária deve ser lacrada com fita adesiva.

Os recipientes e embalagens devem ser desinfetados externamente com solução antisséptica, como álcool iodado ou hipoclorito de sódio, a fim de evitar a contaminação de indivíduos que irão manipular esses objetos durante o transporte e recepção do material.

Amostras acondicionadas incorretamente e conservadas de forma inadequada inviabilizam o diagnóstico.



Figura 1 – Tipos de embalagens primárias dentro das secundárias:
(A) Tubos tipo “ependorf” dentro de embalagem plástica com nó;
(B) Tubos com tampas-rosca, dentro de caixa plástica tampada.



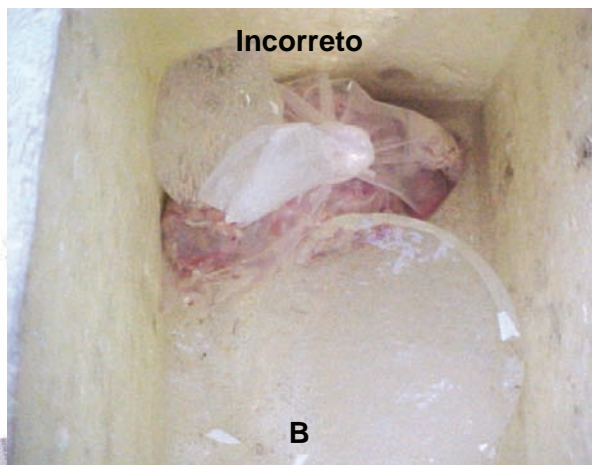
Figura 2 – Alguns tipos de gelo reciclável, disponíveis no comércio, e gelo em garrafas plásticas para conservação da amostra.

Correto



A

Incorreto



B

Figura 3 – **(A) Correto:** Tubos de vidro com tampas de borracha (embalagem primária), dentro de caixa plástica tampada (embalagem secundária), no interior de caixa de isopor (embalagem terciária), com gelo reciclável e folhas de jornal. **(B) Incorreto:** Amostra em embalagem plástica rompida pelas pedras de gelo soltas na caixa de isopor.

3 Identificação das amostras

É necessário que os frascos e embalagens, contendo as amostras, sejam corretamente identificados com etiquetas resistentes (exemplo: esparadrapo) e informações legíveis. Não deverão ser utilizadas canetas para retroprojektor ou similares. A identificação deverá estar no frasco de coleta e não na tampa.

No lado externo da caixa em que são transportadas as amostras, fixar o formulário de solicitação de exames (ver item 4 deste capítulo) e rótulo de risco biológico, como demonstrado nas Figuras 4 e 5.



Figura 4 – (A) Caixa de isopor (embalagem terciária) para transporte das amostras, com a tampa lacrada. Rótulo de identificação de risco biológico e formulário de solicitação de exames fixados no lado externo. (B) Detalhe apresentando formulário de solicitação de exames no interior de embalagem plástica e de envelope de papel, fixado no lado externo da caixa.


<p>DESTINATÁRIO: INSTITUTO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS DESIDÉRIO FINAMOR PROTOCOLO TÉCNICO Estrada do Conde, n.º 6000 – Bairro Sans Souci Eldorado do Sul – RS – Brasil – CEP 92990-000 FONE: 51 3481 3711</p>	
<p>REMETENTE: IDENTIFICAÇÃO: _____ ENDEREÇO: _____ CIDADE: _____ UF: _____ CEP _____ - _____ TELEFONE PARA CONTATO: _____</p>	
<p>RESPONSÁVEL TÉCNICO PELO ENVIO DO MATERIAL: MÉD. VETERINÁRIO: _____ CRMV: _____ TELEFONES PARA CONTATO: FIXO: _____ CELULAR: _____ E-MAIL: _____</p>	<p>RISCO BIOLÓGICO Em caso de contato ou derramamento, comunicar imediatamente o Médico Veterinário responsável pelo envio da amostra.</p>


Figura 5 – Rótulo de identificação de risco biológico que está disponível no IPVDF e no site do Instituto: www.ipvdf.rs.gov.br.

4 Formulário para Solicitação de Exames

Todas as amostras encaminhadas para realização de exames precisam estar acompanhadas do formulário de solicitação de exames, fornecido pelo IPVDF, disponível no site www.ipvdf.rs.gov.br e apresentado no Anexo 1 deste manual.

No momento do recebimento, será verificado o adequado preenchimento do formulário, sendo que não serão processadas pelo IPVDF amostras cuja falta de informações comprometam a emissão do laudo diagnóstico.

No formulário, devem ser preenchidos os dados referentes à espécie animal, tipo e quantidade das amostras, conservação das mesmas, data da coleta, modo de transporte (rodoviário, aéreo), suspeita clínica e exames solicitados. Além desses, são solicitados dados do cliente, proprietário e veterinário responsável.



Importante que, no histórico do animal, sejam relatadas informações como sexo, idade, vacinação e vermifugação, tratamentos realizados, sinais clínicos (início e duração dos mesmos), descrição das lesões, alimentação recebida, provável ingestão de plantas tóxicas. Em caso de surtos, incluir o número de animais doentes, número de mortos e o tempo decorrido entre a morte e a coleta das amostras.

Informações incompletas e preenchimento inadequado do formulário podem comprometer a realização do exame laboratorial e o diagnóstico.

O Formulário para Solicitação de Exames, ou outro formulário específico (ex.: raiva, certificação de granjas), deverá ser protegido por uma embalagem plástica e afixado, obrigatoriamente, no lado externo da caixa (embalagem terciária), evitando contato com as amostras.

5 Transporte das amostras

Para transporte, as amostras devem estar sempre acondicionadas em embalagens triplas (ver item 2 deste capítulo) e devidamente identificadas com o rótulo de risco biológico e o formulário de solicitação de exames fixados.



6 Remessa das amostras para o IPVDF

6.1 Como enviar por empresa transportadora

O IPVDF dispõe de serviço de coleta na Estação Rodoviária de Porto Alegre e em garagens de empresas transportadoras terrestres e aéreas. Para utilizar esse serviço, é necessário que seja feito contato prévio com o Setor de Protocolo Técnico, pelo telefone (51) 3481 3711 (ramais 213 e 214), informando a data e horário da remessa das amostras, previsão de chegada, bem como o número do conhecimento de transporte de mercadorias da empresa pela qual foi remetida.

6.2 Endereço para remessa de amostras ao IPVDF

As amostras enviadas diretamente ao Instituto deverão ser entregues no Setor de Protocolo Técnico do IPVDF ou remetidas para o seguinte endereço:

INSTITUTO DE PESQUISAS VETERINÁRIAS

DESIDÉRIO FINAMOR

PROTOCOLO TÉCNICO

Estrada do Conde, n.º 6000 – Bairro Sans Souci

Eldorado do Sul – RS – Brasil – CEP 92990-000

6.3 Pagamento dos serviços prestados

O custo dos exames é obtido através de contato com o Setor de Protocolo Técnico ou pelo site www.ipvdf.rs.gov.br.

Os pagamentos pelos serviços prestados pelo IPVDF poderão ser efetuados diretamente no Setor de Protocolo Técnico ou através de depósito bancário, em conta informada por este setor.

Quando o pagamento for feito através de depósito bancário, o comprovante deste deverá ser encaminhado ao Setor de Protocolo Técnico, através do fax (51) 3481 3711 (ramal 205) ou e-mail protocolo@ipvdf.rs.gov.br.

Não será aceito material remetido a cobrar, ou cujo recolhimento acarrete algum ônus à Instituição. O IPVDF somente comunicará os resultados dos exames após a comprovação do pagamento pelos serviços prestados.

Os resultados são emitidos pelo IPVDF através de laudos remetidos via correio, e-mail ou fax.

6.4 Contatos


Telefone: (51) 3481 3711

Fax: (51) 3481 3711 (ramal 205)

E-mail: **protocolo@ipvdf.rs.gov.br**

contato@ipvdf.rs.gov.br

“Fale conosco”, no site www.ipvdf.rs.gov.br.



II Coleta de Amostras para Exame Bacteriológico

7 Amostras para exame bacteriológico

O isolamento de bactérias patogênicas em laboratório depende do envio correto das amostras, de acordo com a suspeita clínica, período de tempo após a morte do animal, forma de coleta, temperatura e acondicionamento e tempo da remessa do material até o laboratório.

Os procedimentos para coleta de amostras para exame bacteriológico são descritos a seguir neste capítulo.

As amostras para exame bacteriológico precisam ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8 C, imediatamente após a coleta. Amostras de soro sanguíneo podem ser congeladas.

É importante que a coleta, acondicionamento, identificação e remessa das amostras sigam as recomendações básicas descritas nos itens de 1 a 6 do capítulo I deste manual.

7.1 Vísceras

Para a realização do exame bacteriológico, podem ser coletados fragmentos dos órgãos, não sendo necessário o envio de órgãos inteiros. O fragmento deve conter a porção que apresenta alterações macroscópicas, quando estas existirem.

A coleta deve ocorrer de forma mais asséptica possível, durante a necropsia, para evitar a presença de microrganismos contaminantes que podem interferir no isolamento do agente etiológico. Além disso, a carcaça e os órgãos não devem estar em estado de autólise. As amostras devem ser remetidas sob refrigeração, preferencialmente em até 48 horas após a coleta, acondicionadas individualmente em frascos estéreis ou em sacos de plástico resistentes e de tamanho apropriado.

7.2 Sangue

Antes da coleta, deve ser feita antissepsia do local, com álcool 70%. O sangue deve ser coletado por punção da veia jugular ou coccígea com seringa e agulha estéreis. O conteúdo deve ser transferido para tubos ou frascos estéreis e remetido sob refrigeração, preferencialmente em até 24 horas após a coleta. Não adicionar anticoagulante, pois pode interferir no isolamento bacteriológico.

7.3 Exsudato e pus

Conforme o tipo de lesão e a região afetada, coletam-se esses materiais com seringa e agulha ou “swabs” estéreis.

Se o exsudato ou pus for coletado por punção do abscesso, a superfície da lesão e a região ao redor da mesma devem ser descontaminadas com solução antisséptica, como álcool iodado ou PVPI (povidone iodo). O conteúdo da seringa deve ser transferido para tubos ou frascos estéreis.

No caso de secreção ocular, nasal ou genital, os “swabs” estéreis devem ser densamente envolvidos com material infeccioso e acondicionados individualmente em tubos e remetidos sob refrigeração, preferencialmente em até 24 horas após a coleta.



7.4 Amostras de leite para diagnóstico de mastite bovina

Para evitar a contaminação da amostra para o diagnóstico, deve-se, antes da coleta, desprezar os primeiros 3 ou 4 jatos de leite e realizar a antissepsia dos tetos com álcool 70%, iniciando pelos quartos mais distantes em relação ao operador e, após, o restante dos quartos mamários, para evitar que ocorra a recontaminação durante a limpeza.

O leite deve ser coletado em frascos ou tubos estéreis, em um volume de aproximadamente 10 ml. Podem ser enviadas amostras de leite de tanque ou de cada animal. As amostras de cada quarto mamário deverão ser coletadas em recipientes individuais, conforme demonstrado na Figura 6, pois a causa da infecção pode não ser a mesma. É recomendável que, durante a coleta, o tubo permaneça aberto o menor tempo possível.

Os frascos devem conter a identificação do quarto mamário coletado, de acordo com o seguinte código:

AD - Teto anterior direito AE - Teto anterior esquerdo
PD - Teto posterior direito PE - Teto posterior esquerdo

As amostras devem ser remetidas sob refrigeração, preferencialmente em até 24 horas após a coleta.



Figura 6 - Amostras de leite em tubos com rótulo de identificação.


7.5 Amostras para diagnóstico de carbúnculo hemático (Antraz)

Quando ocorrer suspeita desta doença, não é recomendável a realização da necropsia, para evitar a disseminação dos esporos da bactéria no ambiente e a contaminação dos demais animais do rebanho. Além disso, sendo uma zoonose, a bactéria ou seus esporos podem vir a contaminar humanos por inalação ou lesões cutâneas.

Pode-se coletar sangue da veia jugular ou auricular após a morte do animal, com seringa e agulha estéreis, e transferir para tubo de ensaio. Essas amostras devem ser enviadas sob refrigeração.

7.6 Amostras para diagnóstico de leptospirose

O material de eleição para diagnóstico sorológico de leptospirose é o soro sanguíneo, que deve ser límpido, não hemolisado, sem coágulo



e enviado congelado ao laboratório. Caso seja de interesse o acompanhamento da evolução dos títulos de anticorpos, podem ser coletadas amostras de soro do mesmo animal, com intervalo de 15 a 20 dias entre as coletas (amostras pareadas).

Para isolamento do agente, podem ser enviados fetos, natimortos e urina. A velocidade de processamento do material para isolamento de *Leptospira sp.* é crucial, de forma que a remessa deve ser comunicada ao IPVDF para evitar atrasos no processamento das amostras. Urina, para tentativa de isolamento, não deve exceder o intervalo de duas horas entre a coleta e a chegada ao laboratório.

Para isolamento de *Leptospira sp.*, a amostra não pode ser congelada em hipótese alguma.

7.7 Amostras para diagnóstico de tuberculose

As amostras de origem animal para diagnóstico de tuberculose são linfonodos ou partes de órgãos e tecidos procedentes de matadouro sob inspeção sanitária e de necropsias realizadas.

Para avaliar melhor as lesões dos órgãos e tecidos, efetuar cortes durante a inspeção ou necropsia. Coletar preferencialmente linfonodos do trato respiratório: mediastinais (anteriores, posteriores e ventrais), bronquiais (esquerdo, direito, dorsal ou médio) e pulmonares. Observar a pleura e o tecido pulmonar por palpação, a fim de constatar áreas com lesões nodulares. Verificar presença de lesões tuberculosas nos linfonodos mesentéricos e no fígado. Inspeccionar ainda os linfonodos da cabeça e os cervicais.

Coletar os fragmentos, logo após a morte do animal. Retirar somente a lesão de aspecto caseoso, evitando resíduos, como, por exemplo, sangue e outros líquidos. É importante coletar parte do tecido lesado e parte do tecido normal de uma mesma peça, perfazendo um total de até 200 gramas. As amostras para diagnóstico bacteriológico de tuberculose deverão ser acondicionadas conforme o item 7.1 deste

capítulo. Enviar também parte da amostra em solução de formol a 10 % para exames histopatológicos, seguindo as instruções descritas no capítulo V.

O tempo técnico para isolamento de tuberculose pode variar de 60 a 90 dias.

7.8 Amostras para diagnóstico de brucelose

Todas as amostras enviadas para diagnóstico de brucelose devem estar acondicionadas no sistema de embalagem tripla, descrita no item 2 do capítulo I.

7.8.1 Exame direto (bacteriológico)

A amostra ideal para o isolamento de *Brucella sp.* é o proveniente do aborto. Entre os materiais de eleição, destacam-se:

- **Feto e anexos fetais**

O feto pode ser enviado inteiro. Se for mediante necropsia efetuada no próprio estabelecimento, coletar pulmão, linfonodo bronquial, baço, fígado, “swab” retal e líquido do abomaso. No caso de membranas fetais, escolher aqueles cotilédones que apresentem aspecto anormal, com perda da cor e do brilho característico; eles deverão ser cuidadosamente manipulados (usar luvas e máscaras especiais com pelo menos 95% de eficiência), em função da alta concentração de bactérias presentes.

- **Exsudato vaginal**

A eliminação de *Brucella abortus* pode durar várias semanas após o parto ou aborto. O exsudato vaginal deve ser coletado mediante o uso de “swabs” especiais ou pipetas de inseminação. Existem “swabs” comerciais com meio de transporte que mantêm as bactérias viáveis por períodos mais prolongados.



- **Leite**

Para coleta, seguir os mesmos procedimentos descritos no item 7.5 sobre amostras de leite para diagnóstico de mastite bovina.

- **Animais necropsiados ou coleta em matadouro**

Os materiais de escolha para isolamento de *Brucella sp* são os componentes do sistema retículo-endotelial. Os linfonodos mais importantes são os supramamários, parotídeos, retrofaríngeos, ilíacos internos e pré-escapulares, além do baço. Nas fêmeas, cotilédones, útero e úbere são também recomendados. Nos machos, além do baço e linfonodos, são também úteis para isolamento, testículos, próstata, epidídimo e vesículas seminais.

Para o exame histopatológico, podem ser remetidas amostras dos mesmos linfonodos ou órgãos indicados acima, com ou sem lesões macroscópicas, conforme as instruções descritas no capítulo V.

7.8.2 Exame indireto (sorológico)

- **Soro**

A coleta de sangue para a obtenção de soro visando à realização dos testes para o diagnóstico de brucelose, além de ser mais simples, oferece menor risco de contágio ao profissional, se comparada com a coleta de material para o exame bacteriológico.

O material para a coleta deve ser constituído de tubos que contenham vácuo (sem anticoagulante) e siliconizados, para facilitar a retração do coágulo, com agulhas individuais e descartáveis. Tubos e agulhas convencionais também podem ser utilizados; apresentam, porém, o inconveniente de aumentar o risco de contaminação biológica na manipulação.

As etapas da coleta exigem o cumprimento de algumas normas que podem ser assim resumidas:

a) A amostra de sangue coletada deve cobrir no mínimo 50 % da capacidade de um tubo de 10 ml. Na Figura 7 está exemplificada a coleta de sangue da veia caudal de um bovino;

b) Para obter um soro adequado, os tubos com sangue devem ser mantidos à temperatura ambiente por, no mínimo, 2 ou 3 horas, ao abrigo da luz, até que ocorra a coagulação sanguínea. Após a separação do coágulo, transferir o soro para um frasco estéril. Não usar frascos ou tubos úmidos, pois pode ocorrer hemólise do sangue. Na Figura 8 está representada uma amostra de soro ideal e uma imprópria, hemolisada;

c) O soro deve ser conservado refrigerado e enviado o quanto antes ao laboratório, evitando-se, assim, a deterioração da amostra. Em caso de demora no envio (mais de 72 horas), deve-se congelar o soro e enviar sob refrigeração;

d) Os tubos devem ser identificados de modo que o número corresponda ao especificado no Formulário de Solicitação de Exames, preenchido conforme as recomendações do item 4 do capítulo I;

e) É necessário constar no formulário dados referentes à situação relativa à vacinação (data da vacinação).



Figura 7 - Coleta de sangue de bovino da veia caudal.

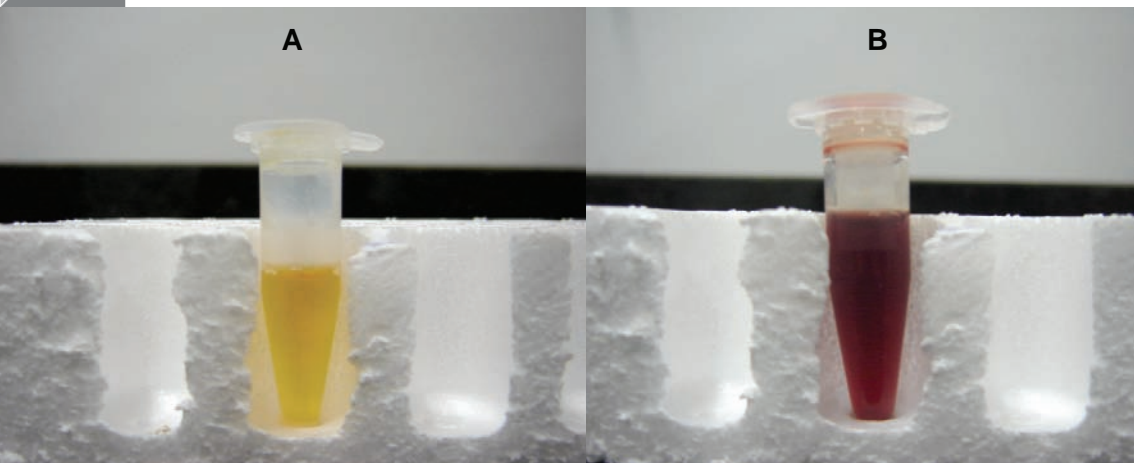


Figura 8 – (A) Amostra de soro ideal. **(B)** Amostra de soro imprópria (soro hemolisado).

• Leite (para o Teste do Anel em Leite)

A coleta correta da amostra é fundamental para a obtenção de resultados confiáveis. As amostras devem ser coletadas de mistura de leite em resfriador ou tanque de expansão. É preciso misturar o leite para homogeneizá-lo de forma que o creme não se separe. A agitação suave do leite no recipiente de coleta é imprescindível para uma boa homogeneização da gordura.

O leite deve ser coletado utilizando-se como conservante o formol a 1 %, ou o cloreto de mercúrio a 2 %, na proporção de 1 ml de conservante para cada 10 ml de leite. A amostra de leite deve ser refrigerada e enviada ao laboratório.

A prova pode ser afetada pelos seguintes fatores: amostra de leite mal homogeneizada, contendo excesso ou falta de gordura; excessivos: aquecimento, tempo de armazenamento, temperatura e agitação. Amostras armazenadas a 4 °C, durante até duas semanas, podem ser usadas para o teste, já que não há perdas nos títulos de anticorpos, sucedendo o contrário com o aumento de temperatura.

A prova pode apresentar resultados falso-positivos nas seguintes situações:

- Alteração do leite como consequência de mastites que originam a presença de proteínas, células e bactérias não habituais, que dificultam a leitura da prova;
- Presença de colostro;
- Utilização de leite fresco, ou seja, quando o teste é realizado no mesmo dia da coleta. Em geral, essa situação desaparece após a refrigeração do leite.

7.8.3 Espécies animais e testes sorológicos realizados no IPVDF para diagnóstico de brucelose

ESPÉCIE	TESTE REALIZADO	PROVA COMPLEMENTAR
Bovina Bubalina Caprina Equina Suína	Antígeno Acidificado Tamponado	2-Mercaptoetanol
Ovina Canina	Imunodifusão em Gel de Ágar Imunodifusão em Gel de Ágar e Antígeno Acidificado Tamponado	- 2-Mercaptoetanol



8 Antibiograma

Quando os animais doentes submetidos ao tratamento com antibióticos não se recuperam como esperado, é conveniente realizar um antibiograma, que possibilita a escolha de antibióticos efetivos contra o agente bacteriano causador da infecção.

Para determinar a sensibilidade do agente frente a um grupo de princípio-ativo de antimicrobianos, é necessário o isolamento da bactéria em laboratório a partir de amostras coletadas de animais doentes.

9 Doenças bacterianas diagnosticadas no IPVDF e amostras a serem coletadas

DOENÇA	AMOSTRAS
CLOSTRIDIOSES HEPÁTICAS E MIONECROSES	Fragmentos de fígado, baço e rim No caso de mionecroses, enviar também exsudato da tumefação muscular e fragmentos do músculo com a lesão
CARBÚNCULO HEMÁTICO (ANTRAZ)	Sangue
MASTITE BOVINA	Leite
PNEUMONIAS	Fragmento do pulmão, contendo a área com a lesão
CERATO CONJUNTIVITE INFECIOSA BOVINA	Líquido conjuntival de animais na fase inicial da doença antes do aparecimento das lesões da córnea, coletado com “swabs” estéreis
LEPTOSPIROSE	Soro sanguíneo, fetos, natimortos e urina
TUBERCULOSE	Linfonodos do trato respiratório: mediastinais, bronquiais e pulmonares
BRUCELOSE	Exame bacteriológico: fetos e anexos fetais, exsudato vaginal, leite, linfonodos, baço. Fêmeas: cotilédones, útero e úbere. Machos: testículos, próstata, epidídimo e vesículas seminais. Exame sorológico: soro sanguíneo, leite

No caso de necessidade de diagnóstico de outras doenças bacterianas não contempladas neste manual, entrar em contato com o Laboratório de Bacteriologia pelo telefone (51) 3481 3711 (ramal 223) ou pelos e-mails bacteriologia@ipvdf.rs.gov.br, brucelose@ipvdf.rs.gov.br e leptospirose@ipvdf.rs.gov.br.



III Coleta de Amostras para Exame Viroológico

10 Amostras para exame virológico

O laboratório de virologia do IPVDF realiza o isolamento viral, a detecção antigênica e a avaliação sorológica (pesquisa de anticorpos específicos) para algumas viroses importantes à saúde animal.

É importante que a coleta, acondicionamento, identificação e remessa das amostras sigam as recomendações básicas descritas nos itens de 1 a 6 do capítulo I deste manual.

Durante a fase aguda da doença, período em que geralmente ocorre a viremia, a chance de detecção do vírus é maior. Nesta fase, busca-se identificar diretamente o agente viral ou seus antígenos. Assim, o melhor material para o isolamento do vírus ou para a detecção antigênica é aquele coletado no início da enfermidade, quando estão presentes os sinais clínicos. A coleta deve ser efetuada no animal vivo, ou logo após a sua morte, e a amostra enviada o mais breve possível ao laboratório.

Para o isolamento viral e a detecção antigênica, as amostras a serem coletadas podem ser fragmentos de órgãos ou tecidos, secreções, fezes e sangue.

11 Testes sorológicos

O exame sorológico é outra importante ferramenta de diagnóstico laboratorial. Na maioria das infecções, a resposta imune humoral do hospedeiro torna-se detectável após a fase aguda, geralmente 3 a 4 semanas depois do início dos sinais clínicos. Esta resposta pode ser detectada através da pesquisa de anticorpos específicos.

Se houver interesse em detectar a evolução dos níveis de anticorpos no animal (por exemplo, para confirmar a suspeita de determinado vírus em doença aguda recente), podem ser coletadas amostras pareadas de soro, uma durante a fase aguda da doença e outra 3 a 4 semanas após a primeira coleta. A suspeita é confirmada se houver aumento igual ou superior a quatro vezes o título de anticorpos detectados entre a primeira e a segunda amostra.

Para analisar o desenvolvimento de anticorpos no soro de um mesmo animal, após a administração de uma vacina, estes anticorpos podem ser titulados em amostras seriadas, isto é, coletadas em sequência. Para tanto, os soros podem ser coletados no dia da vacinação (dia zero) e subsequentemente nos dias 30, 60 e 90, ou ainda mais adiante, caso exista interesse em acompanhamento mais prolongado.



12 Coleta para doenças virais

As amostras devem ser acondicionadas, **separadamente**, em frascos estéreis. Os frascos e as embalagens devem estar bem vedados para evitar extravasamento do material.

Cada amostra deve ser corretamente identificada, com rótulos resistentes e letras e números legíveis.

Os materiais específicos a serem coletados para cada tipo de teste que se deseja solicitar estão descritos no item 13.

12.1 Órgãos e tecidos:

- a) Coletar os órgãos de animais com quadro clínico compatível ao da suspeita, após o sacrifício ou logo em seguida da morte, de forma mais asséptica possível, não devendo ser utilizados instrumentos com os quais se fez a necropsia;
- b) Existindo a suspeita clínica, na realização da necropsia, coletar inicialmente os órgãos alvo de escolha para a doença em questão, e posteriormente o restante. O item 13 indica os órgãos recomendados para o diagnóstico das doenças virais;
- c) Os órgãos podem ser coletados inteiros. Se for necessário seccionar, o fragmento a ser submetido deve incluir o tecido com a lesão;
- d) Para conservação de órgãos e tecidos, utiliza-se a refrigeração. Em caso de demora no envio (mais de 72 horas), pode-se congelar o material e enviá-lo sob refrigeração;
- e) Não é recomendável o congelamento de amostras para o **isolamento viral**, a não ser em temperaturas muito baixas (por exemplo, gelo seco ou nitrogênio líquido), pois temperaturas de 0 a -40 °C podem inativar alguns vírus;

f) Para o isolamento viral, existe a possibilidade de conservação de amostras em preservativos com glicerina tamponada, conhecidos como líquido de Bedson ou líquido de Vallée (vide fórmulas no item 14 deste capítulo), mantidos refrigerados. Estes preservativos são muito eficazes, pois têm atividade bactericida e preservam os vírus. No Formulário de Solicitação de Exames, deve ser informado qual o preservativo utilizado;

g) Formol, glutaraldeído, álcoois ou outros produtos químicos **não** devem ser utilizados para a remessa de amostras para diagnóstico virológico, pois estas substâncias inativam os vírus.

12.2 Amostras para diagnóstico de raiva

12.2.1 Cuidados na coleta:


a) Uma vez que as amostras para exame de raiva representam claro risco à saúde humana, o uso de equipamentos de proteção individual (luvas, avental, macacão, botas, óculos de proteção e máscara) é muito importante no momento da coleta;

b) Na coleta de morcegos, muito cuidado ao coletar animais vivos, pois eles podem eventualmente reagir e morder a pessoa ao serem capturados, causando a necessidade de tratamento pós-exposição. Para este tipo de coleta, é fundamental o uso de luvas grossas. Na indisponibilidade de luvas, coletar o morcego com o auxílio de uma caixa ou vidro, de forma a evitar o contato direto com o animal;

c) Profissionais de campo devem ser previamente imunizados contra a raiva.

12.2.2 Instruções para coleta:

a) Coletar encéfalo do animal suspeito. No capítulo XI está descrita a coleta de encéfalo na necropsia de bovinos;



b) No caso de morcego, enviá-lo inteiro ao laboratório, de preferência morto;

c) As amostras devem ser conservadas refrigeradas e em embalagens hermeticamente fechadas. Em caso de demora no envio (mais de 72 horas), pode-se congelar o material;

d) Encéfalo de bovino não deve ser congelado. O congelamento prejudica o exame diferencial de Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), feito através da histopatologia.

12.3 Secreções

a) Secreções para isolamento viral devem ser coletadas com “swabs” sem alginato de sódio, uma vez que esta substância inativa alguns vírus;

b) Os “swabs” devem ser colocados em frascos ou embalagens estéreis e mantidos refrigerados, enviados em embalagem tripla;

c) Se for inevitável o congelamento das amostras, utilizar gelo seco ou nitrogênio líquido, quando se desejar o **isolamento viral**, pois temperaturas de 0 a -40 °C podem inativar alguns vírus;

d) Para o isolamento viral, existe a possibilidade de conservação destas amostras em preservativos com glicerina tamponada, conhecidos como líquido de Bedson ou líquido de Vallée (vide fórmulas no item 14 deste capítulo), mantidos refrigerados. Estes preservativos são muito eficazes, pois têm atividade bactericida e preservam os vírus. No Formulário de Solicitação de Exames, deve ser informado qual o preservativo utilizado;

e) Formol, glutaraldeído, álcoois ou outros produtos químicos **não** devem ser utilizados para a remessa de amostras para diagnóstico virológico, pois estas substâncias podem inativar os vírus;

f) A amostra deve ser remetida ao laboratório o mais breve possível, já que as secreções são coletadas, geralmente, para isolamento viral ou detecção antigênica.

12.4 Sangue

a) Para coleta de sangue, o local da punção deve ser desinfetado e devem ser utilizados materiais estéreis, como seringas e agulhas ou tubos de “vacutainer” com anticoagulante;

b) Se forem utilizados, para o envio de sangue, frascos de antibióticos ou de outros quimioterápicos, deve-se ter o cuidado de realizar lavagem adequada, com detergente e água corrente, antes de fervê-los, pois os produtos contidos nos frascos podem tornar o sangue tóxico para o teste realizado, inviabilizando o diagnóstico. Estes frascos não são recomendáveis;

c) A amostra deve conter, aproximadamente, 1 ml de sangue para cada teste solicitado;


d) Para conservação de sangue, utiliza-se a refrigeração, **nunca o congelamento**;

e) O sangue deve ser remetido ao laboratório em **até 24 horas**.

12.5 Soro

a) Para se obter o soro deve-se coletar o sangue, com material estéril;

b) Se forem utilizados, para envio de soro, frascos de antibióticos ou de outros quimioterápicos, deve-se ter o cuidado de realizar lavagem adequada, com detergente e água corrente, antes de fervê-los, pois os produtos contidos nos frascos podem tornar o soro tóxico para o teste realizado, inviabilizando o diagnóstico. Estes frascos não são recomendáveis;



c) Os tubos ou seringas, contendo o sangue, precisam permanecer à temperatura ambiente (à sombra), para que ocorra a separação entre o soro e o coágulo, o que se consegue mais facilmente mantendo o tubo inclinado;

d) Separar o coágulo do soro, transferindo este último, cuidadosamente, para um novo tubo estéril;

e) Se o soro não for separado do coágulo, durante o transporte, o sangue poderá hemolisar, inutilizando a amostra;

f) O soro deve ter aparência límpida, de coloração amarelo claro e sem turbidez (Figura 9);

g) A amostra deve conter 0,5 ml de soro para cada teste solicitado;

h) O soro deve ser conservado refrigerado e, em caso de demora no envio (mais de 72 horas), pode-se congelá-lo e enviá-lo sob refrigeração;

i) **Nunca** congelar amostras de soro contendo coágulo, pois ocorrerá hemólise, tornando o soro impróprio para o exame;

j) Para amostras pareadas de soro, a primeira pode ser congelada e enviada ao laboratório juntamente com a segunda, que deverá ser coletada de 3 a 4 semanas após a primeira. As amostras precisam estar bem identificadas em relação à data da coleta e ao animal coletado.

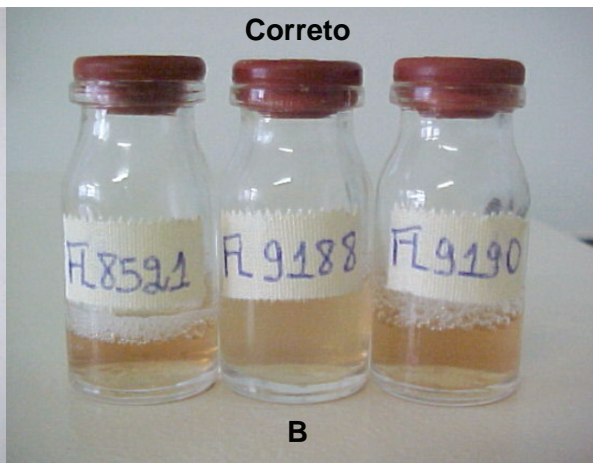


Figura 9 – (A) Frascos de antibiótico, sem lavagem e desinfecção corretas, contendo soro hemolisado. **(B)** Frascos lavados e esterilizados, corretamente identificados, contendo soro translúcido.

13 Doenças virais diagnosticadas no IPVDF, testes realizados e materiais a serem enviados

DOENÇA	PROVA	AMOSTRA PARA COLETA
DOENÇA DE AUJESZKY	ELISA 2SN 1IV	9Soro 9Soro Pulmão, baço, rim, encéfalo de animais doentes
PARVOVIROSE SUÍNA	4IHA	9Soro
PESTE SUÍNA CLÁSSICA	5ELISA	9Soro
NEWCASTLE	5ELISA	9Soro
INFLUENZA AVIÁRIA	5ELISA	9Soro
DIARREIA VIRAL BOVINA (BVD)	1IV 5ELISA	Sangue total, lesões de mucosas, soro, fezes, fragmentos de órgãos, placas de Peyer do intestino 9Soro
IBR / IPV / IPB (BHV-1)	5ELISA 2SN 1IV	9Soro 9Soro Lesões vesiculares nas mucosas, pulmão, baço, rim, "swabs" nasais e conjuntivais, feto e tecidos fetais
MAMILITE POR HERPESVÍRUS (BHV-2)	1IV	Lesões vesiculares na glândula mamária
ENCEFALITE BOVINA POR HERPESVÍRUS (BHV-5)	2SN 1IV	9Soro Encéfalo
LÍNGUA AZUL	6IDGA	9Soro
LEUCOSE BOVINA	6IDGA	9Soro
8 ENCEFALITE EQUINA	7IVIC	Encéfalo
HERPESVÍRUS EQUINO TIPO-1	1IV	Encéfalo, pulmão, tecidos fetais
8 RAIVA	3IF 7IVIC	Cabeça/Encéfalo Cabeça/Encéfalo

1IV = isolamento viral em cultivo celular

2SN = prova sorológica de soroneutralização, qualitativa ou quantitativa (titulação)

3IF = detecção antigênica por imunofluorescência

4IHA = prova sorológica de inibição da hemaglutinação

5ELISA = prova sorológica de ELISA para detecção de anticorpos

6IDGA = prova sorológica de imunodifusão em gel de ágar

7IVIC = isolamento viral com inoculação em camundongo (prova biológica)

8Zoonoses = doenças transmissíveis ao homem

9 Em caso de quadro clínico, recomenda-se amostras pareadas

14 Fórmulas

Fórmula do Líquido de Bedson

<i>Água Destilada Deionizada</i>	475 ml
<i>Glicerina neutra</i>	500 ml
<i>Fosfato Dissódico (Na₂HPO₄)</i>	5,27 g
<i>Fosfato Monopotássico (KH₂PO₄)</i>	2,02 g


Técnica: misturar a glicerina na água e acrescentar os fosfatos. Ajustar o pH a 7,5 - 7,6 com o próprio fosfato tanto dissódico quanto monopotássico. Esterilizar em autoclave, 115 °C, 15 minutos.

Fórmula do Líquido de Vallée:

<i>Fosfato Monopotássico (KH₂PO₄)</i>	0,9 g
<i>Fosfato Bipotássico (K₂HPO₄)</i>	1,15 g
<i>Água Destilada Deionizada</i>	500 ml
<i>Glicerina neutra</i>	500 ml

Técnica: dissolver os fosfatos na água e, em seguida, adicionar a glicerina. Ajustar o pH a 7,6 com NaOH. Esterilizar em autoclave, 115 °C, 15 minutos.

No caso de solicitação de outro exame virológico que não esteja descrito no manual, contatar o Laboratório de Virologia, pelo telefone (51) 3481 3711 (ramais 220 e 238) ou por e-mail virologia@ipvdf.rs.gov.br



IV Coleta de Amostras para Exame Parasitológico

15 Amostras para exame parasitológico

É importante que a coleta, acondicionamento, identificação e remessa das amostras sigam as recomendações básicas descritas nos itens de 1 a 6 do capítulo I deste manual.

15.1 Endoparasitos

a) Para contagem de ovos e pesquisa de oocistos em fezes:

Recomenda-se coletar um mínimo de 20 g de fezes, diretamente do reto do animal. Pode-se utilizar, por exemplo, uma luva de toque que serve de embalagem quando invertida após a coleta da amostra.

Para preservação, o material deve ser mantido refrigerado até chegar ao laboratório ou em formol a 10 % na proporção de uma parte para quatro de fezes (considerar que o formol pode alterar a morfologia dos protozoários e larvas) ou, ainda, em MIF (mertiolato, iodo, formol), cuja fórmula encontra-se no item 16 deste capítulo.

As amostras devem ser embaladas em sacos plásticos amarrados nas extremidades ou em frascos de plástico/vidro tampados, identificadas individualmente. Enviar ao laboratório sempre sob refrigeração.

b) Para contagem e identificação de parasitos adultos:

Órgãos suspeitos de conter helmintos, como abomaso e intestino, devem ter as extremidades ligadas, para se evitar perda de conteúdo, e ser enviados ao laboratório sob refrigeração ou congelados.

As demais vísceras devem ser embaladas em sacos plásticos devidamente identificados, preservadas sob refrigeração ou congeladas.

Ao colher helmintos adultos, torna-se importante que eles sejam manipulados sem lacerações, para se evitar alterações morfológicas. Após lavagem (separar sujidades, fezes, sangue), os helmintos devem ser colocados em frascos contendo líquidos adequados para remessa e preservação (Líquido de Raillet: 5 ml de Formol, 2 ml de Ácido Acético e 93 ml de Água Destilada).

c) Pesquisa de anticorpos contra *Toxoplasma sp.*:

Em casos de suspeitas de aborto por toxoplasmose, recomenda-se coletar aproximadamente 5 ml de sangue do animal suspeito em tubos, sem anticoagulante e siliconizados, para facilitar a retração do coágulo, utilizando-se seringa e agulhas estéreis descartáveis. Após a separação do soro, o mesmo deve ser removido para outro frasco, devidamente identificado e tampado, deve ser mantido sob refrigeração e enviado ao laboratório em 24 horas. Se não for possível o envio nesse período, o soro pode ser congelado aguardando remessa posterior nessas condições. Considerar a possibilidade do envio de amostras pareadas.

O Laboratório de Parasitologia Veterinária do IPVDF realiza testes sorológicos para pesquisa de anticorpos contra *Toxoplasma* nas espécies suína, canina, felina, ovina e caprina.



15.2 Ectoparasitos

a) Carrapatos:

- **Para testes carrapaticidas:** Amostras de fêmeas adultas ingurgitadas (teleóginas) devem ser coletadas diretamente dos bovinos, antes de qualquer tratamento carrapaticida (ideal 3 semanas após o último tratamento), e enviadas ao laboratório dentro de 24 horas. Enviar, no mínimo, 100 teleóginas, para que possam ser testados os principais carrapaticidas. Os carrapatos devem ser acondicionados em recipientes limpos, realizando-se pequenas perfurações que permitam a entrada de ar (garrafas plásticas de água mineral, por exemplo). Evitar sempre a exposição a raios solares durante o armazenamento e transporte até o laboratório (Figura 10). Se possível, enviar as amostras em embalagem tripla, conforme capítulo I, porém **sem** gelo.

No caso da propriedade utilizar banheiro de imersão, é importante uma remessa da calda do banheiro em uso, a qual deve ser coletada após a homogeneização da mesma, o que se consegue imediatamente após a passagem de pelo menos 20 bovinos adultos, coletando-se amostras aproximadamente a 1 metro da superfície, em uma garrafa tipo pet (500 ml), por exemplo. Manter e enviar ao laboratório sempre separada das amostras de carrapatos.

É importante que o histórico de utilização de produtos carrapaticidas na propriedade, bem como carrapaticida em uso e demais informações de manejo bovino, constem na ficha de requisição do teste carrapaticida.


- **Para identificação:** Amostras de carrapatos (colhidos em outras espécies de animais) devem ser colocadas em frascos vedados, contendo álcool 70º (preferentemente) ou 96º, e enviadas ao laboratório, com identificação do hospedeiro, local e data de coleta.

b) Sarnas: raspados profundos da lesão, especialmente das bordas, são os mais apropriados para a pesquisa de ácaros causadores de sarna. A coleta deve ser feita da seguinte maneira:

- Fazer uma prega na pele do animal, próxima às bordas da lesão. Caso não apresente lesões, preferir regiões da base da cauda ou orelhas (especialmente no caso de suínos);
- Pingar algumas gotas de óleo (mineral ou de soja) sobre a prega de pele;
- Raspar a prega de pele várias vezes com uma lâmina de vidro ou de bisturi, usada em ângulo de 90° em relação à pele, promovendo escarificação profunda até o aparecimento de pequenos pontos de sangue;
- Colocar o material sobre uma lâmina de vidro e cobrir com outra lâmina de mesmo tamanho, lacrando todas as bordas com fita adesiva ou enrolando as lâminas em filme de PVC até a chegada ao laboratório;
- Conter adequadamente o animal durante a raspagem, para evitar possíveis acidentes por agressões, uma vez que este procedimento pode provocar dor e desconforto/irritação.

c) Piolhos: exemplares para identificação laboratorial devem ser mantidos em frascos lacrados a seco ou imersos em álcool 70^o. Amostras de pêlo ou lã com material suspeito devem ser mantidas em recipientes vedados (placas de Petri com as bordas lacradas por fita adesiva, por exemplo).

d) Larvas de dípteros (moscas): as larvas causadoras de “bernes” e “bicheiras” devem ser colhidas diretamente do animal e podem ser enviadas ao laboratório para identificação em frascos contendo álcool 70^o. Para evitar o escurecimento das larvas em solução conservante, pode-se colocá-las em água fervente e depois transferi-las para a solução.



e) Outros ectoparasitos: moscas, mosquitos, hemípteras (barbeiros) e outros insetos para identificação podem ser mantidos em frascos tampados a seco, com naftalina, evitando-se o contato direto com o espécime (conforme Figura 11) ou imersos em solução conservante, preferentemente álcool 70°.

15.3 Hemoparasitos

a) Esfregaços de sangue: exames para confirmar suspeita de babesiose e anaplasmose bovina podem ser requisitados através de esfregaços finos de sangue, preferencialmente fixados em metanol.

A coleta deve ser feita em extremidades como orelhas ou cauda, coletando-se a primeira gota extravasada após a perfuração da pele com agulha estéril. Para formar o esfregaço, distende-se suavemente a gota de sangue sobre uma lâmina para microscopia com o auxílio de outra lâmina. Logo a seguir, com rápidos movimentos, agita-se a lâmina no ar, de modo que a secagem do esfregaço aconteça o mais rápido possível. A lâmina pode ser identificada com o auxílio de um lápis comum e remetida ao laboratório devidamente protegida, preferentemente após fixação em álcool metílico.

Alternadamente, uma pequena amostra de sangue (2 a 5 ml), coletada com anticoagulante (ACD ou EDTA, por exemplo), mantida sob refrigeração, pode ser enviada ao laboratório para a pesquisa de hemoparasitas.

b) Vísceras: fragmentos de baço, fígado, coração, rim e cérebro (suspeita de babesiose cerebral) devem ser colhidos durante a necropsia, embalados em recipientes ou sacos plásticos devidamente vedados, e enviados ao laboratório em embalagem tripla como descrito no item 2 do capítulo I.

c) Soros: devem ser enviados sob refrigeração ou congelados para a pesquisa de anticorpos contra *Babesia sp.* e *Anaplasma marginale*. Utiliza-se sorologia especialmente para estudos epidemiológicos, avaliações de estabilidade ou instabilidade enzoótica dos rebanhos bovinos e acompanhamento de animais imunizados contra babesiose e anaplasmose.

16 Fórmulas

SOLUÇÃO MIF

Água destilada..... 250 ml
Mertiolato Nº 99 a 1:1000.....200 ml
Formol.....25 ml
Glicerina.....5 ml

ÁLCOOL 70°:

Álcool 96° (comercial).....750 ml
Água250 ml

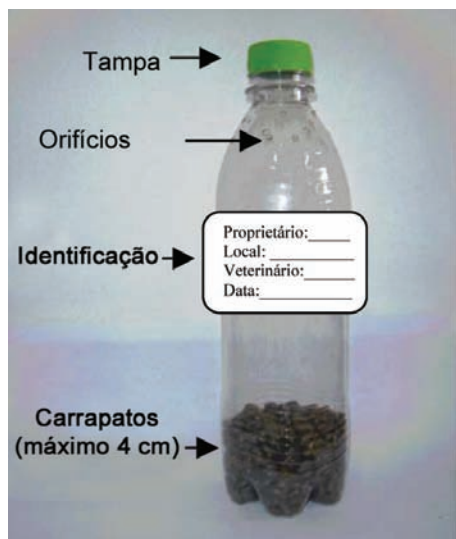


Figura 10 - Embalagem correta para envio de carrapatos para testes carrapaticidas.

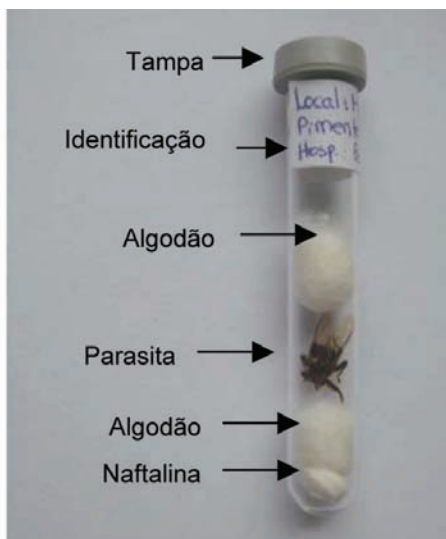


FIGURA 11 - Forma correta de envio de ectoparasitos (insetos) a seco para identificação.

Em caso de dúvidas, entrar em contato com o Laboratório de Parasitologia, pelo telefone (51) 3481 3711 (ramal 236) ou pelo e-mail parasitologia@ipvdf.rs.gov.br.

V Coleta de Amostras para Exame Histopatológico

17 Amostras para Exame Histopatológico

Os tecidos para exame histopatológico devem ser colhidos na necropsia logo após a morte, para se evitar autólise, e não podem ser congelados. Devem ser remetidos em solução fixadora de **formol a 10 %**. Os fragmentos precisam ser delgados (máximo de 1 centímetro de espessura) e devem estar **imersos** na solução na proporção de 1 parte de tecido para 10 partes de formol (Figura 12).

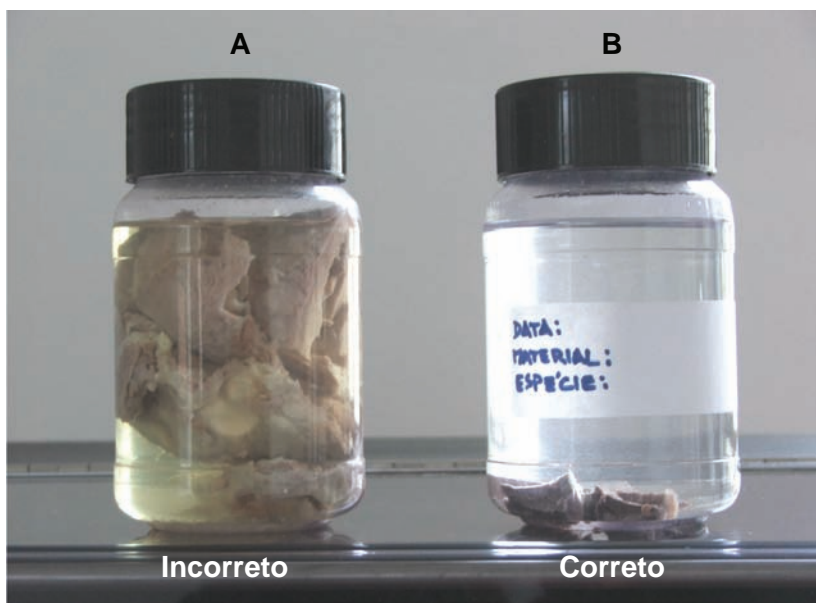


Figura 12 – (A) Frasco contendo excesso de tecido em relação à quantidade de formol e (B) Proporção adequada de tecidos e formol e frasco identificado corretamente.

O material deve conter, sempre que possível, porções do tecido lesado e do tecido normal adjacente. Deve-se colocar uma camada de algodão na parte superior do frasco quando forem coletados tecidos que flutuam, como no caso do pulmão, evitando-se que alguma porção não fique imersa no formol.


Os frascos necessitam ter boca larga, evitando a dificuldade do laboratorista para retirar o tecido fixado do recipiente. Cada frasco deve ser bem vedado e estar identificado de forma legível, acompanhado do Formulário para Solicitação de Exames, demonstrado no Anexo 1.

É importante que a coleta, acondicionamento, identificação e remessa das amostras sigam as recomendações básicas descritas nos itens de 1 a 6 do capítulo I deste manual.

Caso haja necessidade de exame bacteriológico e/ou virológico, também, devem ser remetidas porções de material conservado sob refrigeração, sem serem fixados no formol.

Fórmula do formol a 10 %

Formaldeído (35 – 40 %) (= formalina comercial) 100 ml
Água de torneira..... 900 ml



18 Coleta de amostras quando a suspeita for intoxicação

Para o diagnóstico de intoxicação, é fundamental que o material enviado seja acompanhado de **informações** que incluam espécies atingidas, idade dos animais, sintomas, curso clínico, achados de necropsia, região, localização e lotação de animais na propriedade, bem como as condições em que costuma ocorrer a manifestação clínica da doença.

Em muitas intoxicações, o diagnóstico definitivo é fornecido pela histopatologia.

18.1 Intoxicação por plantas

Para a grande maioria das intoxicações com plantas, além da história clínica e necropsia, a histopatologia é de extrema importância e, muitas vezes, determinante para o diagnóstico. Neste caso, **sempre devem ser enviadas** amostras de fígado, sistema nervoso central, rim, miocárdio, pulmão e, quando houver envolvimento do trato gastrointestinal, amostras do rúmen e retículo mais próximas ao cárdia, bem como partes lesadas do tubo digestivo. É aconselhável também o envio de bexiga, vesícula biliar, baço e fragmentos de qualquer outro órgão e/ou tecido com lesões macroscópicas, devidamente identificados, sendo que a remessa deve ser feita da mesma forma como descrita anteriormente para exame histopatológico.

No Rio Grande do Sul, as plantas responsáveis por cerca de 50 % das intoxicações em bovinos são do gênero *Senecio* (maria mole) e as mais frequentes na epidemiologia da doença são *S. brasiliensis* (Figura 13) e *S. seloi* (Figura 14).



Figura 13 – *Senecio brasiliensis*.



Figura 14 – *Senecio selloi*.

Dentre outras plantas, variando entre regiões, são importantes também: *Ateleia glazioviana* (timbó), *Pteridium aquilinum* (samambaia), *Nierembergia veitchii*, *Baccharis coridifolia* (mio-mio), *Cestrum* spp. (coerana), *Lantana* spp., *Amaranthus* spp. (caruru), *Enterolobium* spp. (timbaúva), *Halimium brasiliense*, *Solanum fastigiatum* (jurubeba), *Ammi majus*, *Xanthium cavanillesii* (carrapicho), *Manihot* spp. (mandioca brava), *Prunus* spp. (pessegueiro bravo) e *Mascagnia* sp.

18.1.1 Coleta da planta para identificação

As amostras de plantas devem ser colocadas entre jornal e papelão. Na parte interna, colocam-se dados como nome popular da planta, local da coleta (além do município e região, informar se foi encontrada em mato, banhado, etc.); época de ocorrência; se é uma árvore, arbusto, cipó etc.; ocorrência de flores (época, cor, forma) e de frutos (forma, tamanho); data, nome e telefone do coletor. Esse material deve ser prensado ou atado com cordão. Se for curto o espaço de tempo entre a coleta e a remessa do material, as plantas podem ser colocadas em sacos plásticos individuais com os dados correspondentes.



18.2 Intoxicação por fungos

Intoxicações por fungos como *Fusarium moniliforme* (leucoencefalomalácia equina), *Ramaria flavo-brunnescens* (mal do eucalipto), *Claviceps paspali* (mal do melador), dentre outros, podem ter a histopatologia como auxílio importante no diagnóstico. O material a ser enviado, além da história clínica, deve seguir a mesma orientação descrita na suspeita de planta tóxica.

18.3 Intoxicação por produtos químicos

Intoxicações por produtos à base de organofosforados, carbamatos, ureia, etc. podem, também, ter a histopatologia como auxiliar no diagnóstico. O material a ser enviado segue as mesmas recomendações feitas anteriormente, além da história clínica.

Em caso de dúvidas, entrar em contato com o Laboratório de Patologia, pelo telefone (51) 3481 3711 (ramal 223) ou pelo e-mail patologia@ipvdf.rs.gov.br.

VI Coleta de Amostras para o Laboratório de Patologia Suína

19 Amostras para o Laboratório de Patologia Suína

O Laboratório de Patologia Suína realiza a necropsia de suínos, exame macroscópico e bacteriológico.

Quando necessário, exames complementares são realizados, principalmente para estabelecer o diagnóstico diferencial.

É importante que a coleta, acondicionamento, identificação e remessa das amostras sigam as recomendações básicas descritas nos itens de 1 a 6 do capítulo I deste manual.

19.1 Doenças bacterianas diagnosticadas no Laboratório de Patologia Suína do IPVDF

DOENÇA	PROVA LABORATORIAL	MATERIAL A SER ENVIADO
Colibacilose Neonatal	Exame bacteriológico	Alças intestinais, fezes, suabe retal ou leitão em refrigeração
Colibacilose da 3ª semana	Exame bacteriológico	Alças intestinais, fezes, suabe retal ou leitão em refrigeração
Doença do edema	Exame bacteriológico	Alças intestinais, fezes, suabe retal ou leitão em refrigeração
	Exame histopatológico	Encéfalo em formol a 10 %
Enterotoxemia	Exame bacteriológico	Alças intestinais ou leitão em refrigeração
	Exame histopatológico	Fragmentos de alças intestinais em formol a 10 %
Salmonelose	Exame bacteriológico	Alças intestinais, fezes, suabe retal, baço ou leitão em refrigeração
	Exame histopatológico	Fragmentos de alças intestinais (íleo e ceco) em formol a 10 %
Doença de Glasser	Exame bacteriológico	Lesões serofibrinosas, líquido pericárdico, líquido cefaloraquidiano, líquido sinovial, coração, baço, cérebro, fígado, leitão em refrigeração
Pleuropneumonia	Exame bacteriológico	Pulmão, pleura ou leitão em refrigeração
	Exame histopatológico	Pulmão, pleura em formol a 10 %
Pasteurelose pulmonar (<i>Pasteurella multocida</i> tipo capsular A e D)	Exame bacteriológico	Pulmão, pleura ou leitão em refrigeração
Rinite atrófica progressiva	Exame bacteriológico	Suabe nasal, tonsilas (em meio de transporte, sempre que possível) em refrigeração
Meningite estreptocócica	Exame bacteriológico	Encéfalo, suabes de meninge, líquido cefaloraquidiano ou leitão em refrigeração
	Exame histopatológico	Fragmento de encéfalo, incluindo meninge em formol a 10 %
Erisipela	Exame bacteriológico	Baço, líquido sinovial, lesões de pele em refrigeração
Epidermite exsudativa	Exame bacteriológico	Pele, suabes da pele lesionada, rins ou leitão em refrigeração
Artrites	Exame bacteriológico	Suabe da articulação ou líquido sinovial em refrigeração

Em caso de dúvida, entrar em contato com o Laboratório de Patologia Suína, pelo telefone (51) 3481 3711 (ramal 231) ou pelo e-mail suinos@ipvdf.rs.gov.br.

VII Coleta de Amostras para o Laboratório de Biologia Molecular


20 Amostras para o Laboratório de Biologia Molecular

O laboratório atua na realização de análises laboratoriais de DNA e RNA de agentes infecciosos de animais de produção, utilizando técnicas de biologia molecular, mantendo também o foco em atividade de pesquisa.

É importante que a coleta, acondicionamento, identificação e remessa das amostras sigam as recomendações básicas descritas nos itens de 1 a 6 do capítulo I deste manual.

Atualmente, estão sendo realizados os diagnósticos das seguintes enfermidades pela técnica de PCR:

Agente infeccioso
<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Salmonella sp.</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mycobacterium complexo MAC</i>



Os materiais a serem enviados são: sangue com EDTA, leite, outros fluidos e tecidos. Os materiais devem ser enviados sob refrigeração em até 48 horas após a coleta e, depois deste período, enviar congelado.

Dependendo da demanda, há a possibilidade da implantação de diagnóstico molecular para outros microrganismos.

Em caso de dúvida, entrar em contato com o Laboratório de Biologia Molecular, pelo telefone (51) 3481 3711 (ramais 208 e 243), ou pelo e-mail **biologiamolecular@ipvdf.rs.gov.br** .

VIII Coleta de Amostras para Diagnóstico de Doenças das Aves

As principais enfermidades diagnosticadas no Laboratório de Saúde das Aves do IPVDF são:

É importante que a coleta, acondicionamento, identificação e remessa das amostras sigam as recomendações básicas descritas nos itens de 1 a 6 do capítulo I deste manual.

Doenças das Aves
<i>Aspergilose</i>
<i>Botulismo</i>
<i>Colibacilose</i>
<i>Clostridiose</i>
<i>Pasteurelose</i>
<i>Salmonelose</i>
<i>Micoplasmose</i>
<i>Metapneumovirose</i>
<i>Anemia Infecciosa</i>
<i>Doença de Gumboro</i>
<i>Bronquite Infecciosa</i>



21 Aves vivas ou mortas

Tipos de exames: necropsia, bacteriológico, antibiograma, micológico e PCR.

Quando possível, é desejada uma amostragem mínima de 10 aves de 1 dia de idade ou 5 aves adultas por lote.

As aves mortas devem ser encaminhadas sob refrigeração (2-8 °C), o mais rápido possível, evitando o estado de decomposição.

As aves vivas devem ser enviadas em caixas forradas, evitando estresse e/ou morte por temperatura, oxigenação e espaço inadequados.

22 Órgãos

Tipos de exames: bacteriológico, antibiograma, micológico, bioensaios e PCR.

Os órgãos devem ser coletados de forma asséptica, durante a necropsia, para evitar a contaminação do material e interferência no isolamento do agente etiológico. Também não devem estar em estado de autólise.

Coletar amostras de 5 animais do mesmo lote, sendo 3 aves com sintomas e 2 aparentemente saudáveis.

Pode ser coletado cérebro, cerebelo, traqueia, pulmão, sacos aéreos, coração, papo, proventrículo, moela, fígado, baço, timo, pâncreas, rim, bursa, tonsilas cecais, intestinos, ovário, testículo, ossos, nervo ciático e vago.

As amostras devem ser enviadas em embalagens limpas e estéreis sob refrigeração (2-8 °C), em até 24 horas.



23 Suabes

23.1 Traqueia

Tipos de exames: bacteriológico, antibiograma e PCR.

A coleta deve ser realizada com a ave bem imobilizada e observada a introdução do suabe estéril (haste com algodão) no local correto, atentando para a proximidade entre o órgão alvo e o esôfago. É necessário abrir o bico da ave e abaixar a língua da mesma para poder atingir a traqueia. Os suabes estéreis devem ser abertos e seguros pelo cabo onde não há algodão, sendo esfregados com firmeza em toda a circunferência da parede da traqueia, evitando que toquem nas mucosas da boca. Utilizar um suabe por ave e, após a coleta, cortar a extremidade que estava em contato com a mão e mergulhar o restante no frasco que contém o meio de transporte Stuart.

O caldo Frey deve ser utilizado como meio de transporte quando o exame for para PCR para *Mycoplasma*.

Devem ser coletados suabes individuais de 20-30 aves por lote. Utilizar um tubo com meio de transporte para cada suabe coletado. As amostras devem ser enviadas sob refrigeração (2-8 °C), no intervalo máximo de 24 horas.

23.2 Cloaca

Tipos de exames: bacteriológico, antibiograma e PCR.

A coleta deve ser realizada com suabe estéril seguro pelo cabo onde não há algodão, realizando movimentos circulares no orifício da cloaca. Utilizar um suabe por ave e, após a coleta, cortar a extremidade que estava em contato com a mão e mergulhar o restante no frasco que contém solução de água peptonada tamponada estéril.

Devem ser coletados suabes de 20-30 aves por lote, agrupando 10 suabes em cada recipiente. As amostras para isolamento bacteriano e PCR devem ser enviadas sob refrigeração (2-8 °C), no intervalo máximo de 24 horas.

23.3 Arrasto

Tipos de exames: bacteriológico, antibiograma e PCR.

Fazer todo o procedimento utilizando luvas descartáveis estéreis. A coleta deve ser realizada com gaze ou esponja estéril, que serão arastadas pelo galpão para entrarem em contato direto com a cama do aviário. Após o término, colocar o material coletado no frasco contendo solução de água peptonada tamponada estéril.

As amostras para isolamento bacteriano e PCR devem ser enviadas sob refrigeração (2-8 °C), em até 24 horas.

24 Soro

Tipos de exames: SAR e bioensaios.

A coleta do sangue deve ser realizada de maneira asséptica, utilizando material e instrumentos estéreis, conforme descrito nos itens 12.4 e 12.5 deste manual. Não adicionar anticoagulante, para não interferir nos resultados dos exames.

Nas aves adultas, a coleta pode ser realizada por punção cardíaca ou na veia ulnar (asa). Em aves de 1 dia, realizar punção cardíaca ou na veia jugular (decapitação).

O número de amostras mínimo para realização de testes sorológicos é de 25 soros por lote de pontos distintos do galpão.

Observar os itens 12.4 e 12.5 deste manual para o envio das amostras. Os soros enviados para o teste de SAR não podem ser congelados.

Enfermidade	Exames	Amostras
<i>Aspergilose</i>	Isolamento fúngico	Aves e pulmões
<i>Botulismo</i>	Bioensaio em camundongos	Soro, fígado, conteúdo do papo, moela e intestinos
<i>Colibacilose</i>	Isolamento bacteriano	Aves e órgãos afetados (ovário, fígado, coração, sacos aéreos e tecido subcutâneo)
<i>Clostridiose</i>	PCR	Aves e intestinos
<i>Pasteurelose</i>	Isolamento bacteriano	Aves, suabes, fígado, pulmões, traqueia, coração, barbelas, cabeça e ossos longos (fêmur)
<i>Salmonelose</i>	SAR Isolamento bacteriano PCR	Soros, aves, suabes, órgãos afetados (fígado, intestinos, coração, baço e ovário)
<i>Micoplasmose</i>	PCR	Aves, suabe traqueal, traqueia, pulmões e sacos aéreos
<i>Metapneumovirose</i>	PCR	Aves, suabe traqueal, traqueia, pulmões e cabeça
<i>Anemia Infecciosa</i>	PCR	Aves, timo e baço
<i>Doença de Gumboro</i>	PCR	Aves e bursa
<i>Bronquite Infecciosa</i>	PCR	Aves, pulmões, traqueia e rins

Em caso de dúvida, entrar em contato com o Laboratório de Saúde das Aves, pelo telefone (51) 3481 3711 (ramais 248 e 249) ou pelo e-mail aves@ipvdf.rs.gov.br.

IX Coleta de Amostras de Ração e Farinhas de Origem Animal para Exame Microbiológico


Tipos de exames: contagem de mesófilos, contagem de coliformes totais / termotolerantes / *E. coli*, contagem de bolores e leveduras, contagem de estafilococos coagulase positiva, contagem de clostrídio sulfito redutor e pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*.

25 Amostras acondicionadas em embalagens individuais

As amostras devem ser enviadas em quantidade igual ou superior a 200 g, na sua embalagem original, fechada e intacta. Caso na embalagem unitária a quantidade não atinja a recomendada para o envio, coletar várias embalagens unitárias.

26 Amostras acondicionadas em embalagens não individuais

Quando as amostras estiverem contidas em embalagens de grande quantidade, deve-se promover a homogeneização do material a ser analisado antes do início da amostragem. Fazer a coleta de maneira asséptica em porções representativas da massa total para frascos estéreis ou embalagens novas, em quantidade igual ou superior a 500 g.



As amostras devem ser enviadas sob refrigeração (2-8 °C), no tempo máximo de 24 horas. É importante que a coleta, acondicionamento, identificação e remessa das amostras sigam as recomendações básicas descritas nos itens de 1 a 6 do capítulo I deste manual.

Microrganismos	Método de análise
<i>Mesófilos</i>	Contagem
<i>Coliformes Totais / Termotolerantes / E.coli</i>	Contagem
<i>Estafilococos Coagulase Positiva</i>	Contagem
<i>Clostrídio Sulfito Redutor</i>	Contagem
<i>Salmonelose</i>	Isolamento bacteriano PCR
<i>Listéria monocytogenes</i>	PCR
<i>Bolores e Leveduras</i>	Contagem

Em caso de dúvida, entrar em contato com o Laboratório de Saúde das Aves, pelo telefone (51) 3481 3711 (ramal 248) ou pelo e-mail aves@ipvdf.rs.gov.br.

X Coleta de Amostra de Água para Exame de Contaminação Bacteriana

A água é considerada recurso de primeira necessidade para todos os seres vivos. Portanto, a sua salubridade é de grande importância, pois mesmo sendo subterrânea pode ficar exposta a poluentes e contaminantes. A poluição aquática pode ocorrer tanto por substâncias químicas quanto por contaminantes biológicos, os quais podem ser veiculados para o homem ou para os animais, causando doenças. A água para consumo humano e animal deve ser potável, ou seja, isenta de agentes biológicos patogênicos, compostos tóxicos, excesso de substâncias orgânicas e minerais. Uma das formas de controle da qualidade da água é através da análise bacteriológica, que determina o número de bactérias totais e de origem fecal, sendo o grupo coliforme bastante utilizado como indicador de contaminação.

27 Coleta de água em torneiras e bebedouros

A amostragem da água deverá ser realizada em frascos estéreis com volume mínimo de 200 ml. A coleta e o manuseio dos recipientes deverão ser realizados com cuidado, para evitar a contaminação microbiológica da amostra. Os recipientes deverão ser abertos somente no momento da coleta da amostra e pelo tempo necessário para seu preenchimento, devendo ser fechados imediatamente após a coleta.

É importante que a coleta, acondicionamento, identificação e remessa das amostras sigam as recomendações básicas descritas nos itens de 1 a 6 do capítulo I deste manual.

27.1 Procedimentos de coleta:

a) Lavar a torneira no local de saída da água e lavar as mãos para evitar a contaminação:



b) Abrir a torneira, no ponto de coleta, de forma a obter um fluxo baixo e constante de água e deixar escoar a água por dois minutos antes da coleta:



c) Abrir o frasco neste momento e colher a água mantendo o mesmo inclinado para evitar a sua contaminação pelo ar. Manter a tampa virada para baixo e nunca tocar nas suas bordas ou no interior do recipiente:



d) Coletar um volume de amostra que preencha 2/3 do recipiente. Tampar o frasco rápida e firmemente para que se evite a contaminação e o vazamento da amostra durante o transporte ao laboratório:



e) Identificar o recipiente com as seguintes informações, escritas de forma legível:

Tipo de água:
Ponto de amostragem:
Local:
Data e hora da coleta:
Nome do responsável pela coleta:

f) Enviar a amostra ao laboratório imediatamente após a coleta. Ela deve ser enviada em caixa isotérmica, chegando ao laboratório num período máximo de 12 horas após sua coleta. Os recipientes deverão ser acondicionados de forma que os espaços vazios sejam preenchidos com papel amassado, evitando-se que o recipiente se desloque dentro da caixa durante o trajeto. Enviar a amostra em esquema de embalagem tripla, descrita no item 2 do capítulo I. O Formulário para Solicitação de Exames (Anexo 1) e o rótulo de risco biológico (item 3 do capítulo I) devem ser preenchidos e fixados no lado externo da caixa que contém as amostras:

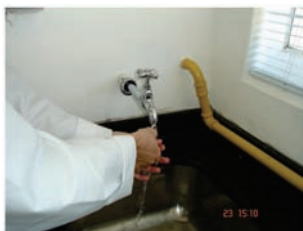


28 Coleta de água em rios, poços, caixas d'água e reservatórios em geral

A amostragem da água deverá ser realizada em frascos estéreis com volume mínimo de 200 ml. A coleta e o manuseio dos recipientes deverão ser realizados com cuidado, para evitar a contaminação microbiológica da amostra. Os recipientes deverão ser abertos somente no momento da coleta da amostra e pelo tempo necessário para seu preenchimento, devendo ser fechados imediatamente após a coleta.

28.1 Procedimentos de coleta:

a) Lavar as mãos e as demais partes do corpo que entrarão em contato com a amostra, para evitar a contaminação:



b) Para facilitar a coleta, amarrar o recipiente com uma corda previamente lavada e desinfetada. Abrir o frasco no momento da coleta. Descer o recipiente abaixo do nível da água, cerca de vinte centímetros de profundidade, evitando o máximo possível a água da superfície:



c) Coletar um volume de amostra que preencha 2/3 do recipiente. Tampar rapidamente o frasco e de maneira firme, para evitar a contaminação e o vazamento da amostra durante o transporte ao laboratório:



d) Identificar o recipiente, que deve conter as informações necessárias, escritas de forma legível, conforme descrito anteriormente no item 27.1.e;

e) Enviar a amostra imediatamente após a coleta ao laboratório, conforme descrito anteriormente no item 27.1.f.

Em caso de dúvidas, entrar em contato com o Laboratório de Saúde das Aves, pelo telefone (51) 3481 3711 (ramal 248) ou pelo e-mail aves@ipvdf.rs.gov.br .


XI Coleta do Encéfalo na Necropsia de Bovinos

Esse capítulo, assim como suas ilustrações, foi reproduzido e/ou adaptado a partir do “Manual de procedimentos para diagnóstico histológico diferencial da Encefalopatia Espongiforme dos Bovinos (BSE)”, de Barros *et al.*, 2001.

A coleta não criteriosa de amostras de cérebro não fixado pode dificultar o exame no laboratório. Quando houver vários animais para necropsia, num surto de uma doença neurológica, o tempo para a retirada do encéfalo pode ser um fator limitante. Nesse caso, selecione alguns animais para o exame neuropatológico. Deve-se coletar o material tentando eliminar ou diminuir ao máximo os danos ao tecido nervoso durante a sua retirada.

29 Retirada do encéfalo

- a)** Através de um acesso ventral, remova a cabeça, desfazendo a articulação atlanto-occipital. Localize o ponto da articulação, colocando o dedo na região e movimentando a cabeça do animal (Figuras 15 e 16). Seccione músculos e ligamentos e faça a extensão da articulação, empurrando o focinho do cadáver para baixo;
- b)** Seccione a pele, longitudinalmente, da nuca ao focinho, rebatendo-a. Remova músculos e tecidos moles;
- c)** Trace uma linha imaginária logo após as apófises supraorbitárias dos ossos frontais, unindo o extremo caudal de um olho ao outro (Figura 17) e, utilizando um escopro e um martelo ou serra, seccione a seguir;



d) Seccione os ossos temporais e o occipital, unindo os extremos da secção anterior ao forame magno;

e) Retire a calota craniana, fazendo tração com um pequeno gancho ou usando o escopro como alavanca;

f) Utilizando tesouras, retire a dura-máter, seccionando a foice do cérebro e o tentório do cerebelo, certificando-se de que a porção de meninges entre o cérebro e o cerebelo tenha sido retirada, para remover o conjunto de forma intacta (Figura 18 e 19);

g) Vire a cabeça do animal de modo que o cérebro fique para baixo e, assim, aproveitando a gravidade, seccione com cuidado a emersão dos nervos cranianos, retirando delicadamente o encéfalo da cavidade craniana;

h) O gânglio do nervo trigêmeo (gânglio de Gasser) deve ser também coletado. O exame desse par de gânglios nervosos do 5º par de nervos cranianos é importante para o diagnóstico de doenças como raiva e doença de Aujeszky. A rede admirável carotídea é retirada com o gânglio e a hipófise: fazem-se dois cortes longitudinais e paralelos, como se estivessem unindo o clinóide cranial com o vértice do rochedo temporal. Posteriormente, secciona-se transversalmente o diafragma hipofisário, cranialmente ao clinóide cranial e posteriormente próximo ao vértice do rochedo temporal. Com uma pinça, retira-se o diafragma hipofisário e, em seguida, o gânglio trigeminal. Em casos de encefalite da febre catarral maligna, os vasos da rede admirável mostram lesão (vasculite) característica. Em casos de raiva e Aujeszky, a inflamação (ganglioneurite) do gânglio do nervo trigêmeo é um achado frequente;

i) Observe com atenção o encéfalo, evitando pressioná-lo, pesquisando lesões macroscópicas como aumento de volume, assimetrias, vascularização, pontos de amolecimento, hemorragias, exsudatos, etc.

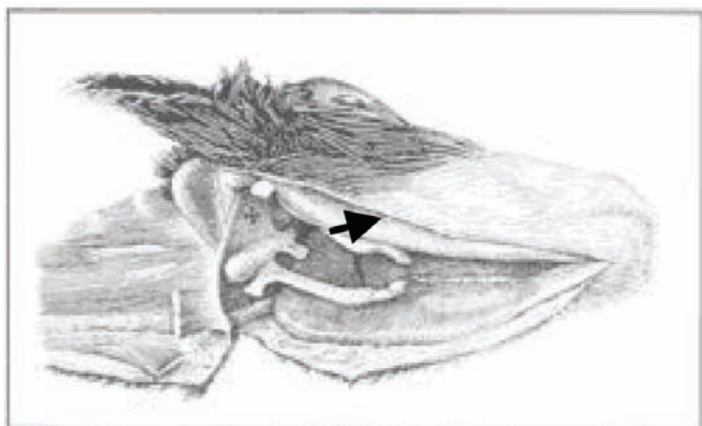


Figura 15 – Remoção da cabeça. A faca é inserida no ponto indicado pela seta (reproduzido de Olafson in: Barros *et al.*, 2001).

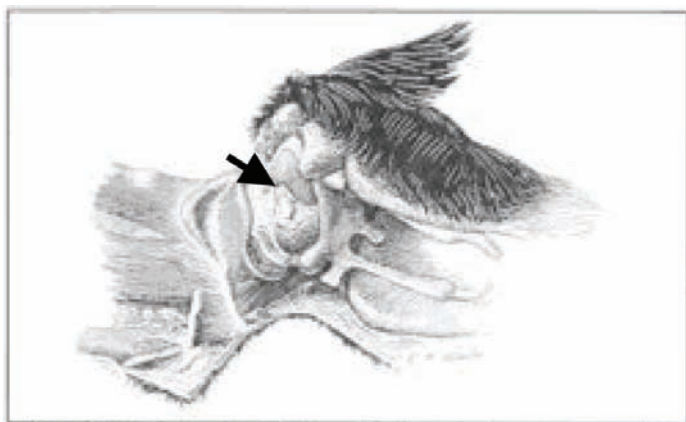


Figura 16 – Remoção da cabeça. A cabeça é separada do resto do cadáver na articulação atlanto-occipital (reproduzido de Olafson in: Barros *et al.*, 2001).

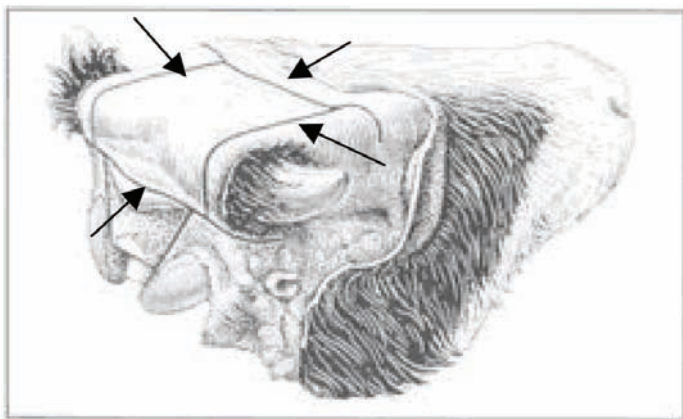


Figura 17 – As linhas marcam os locais onde o crânio deve ser serrado para retirada do cérebro (reproduzido de Olafson in: Barros *et al.*, 2001).

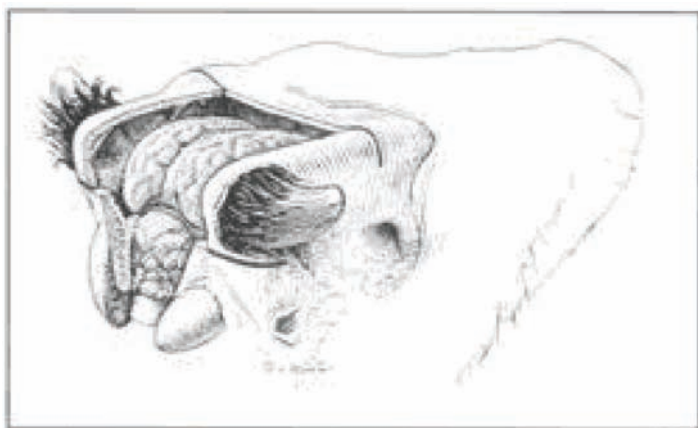


Figura 18 – O cérebro é então exposto com a dura-máter intacta (reproduzido de Olafson in: Barros *et al.*, 2001).

30 Coleta e seleção de amostras do encéfalo para virologia, bacteriologia e histopatologia

A coleta e a seleção de amostras para exames virológicos e bacteriológicos devem ser feitas antes da fixação do encéfalo, da seguinte forma:

a) Inicialmente, remova o cerebelo, seccionando-o ao nível dos pedúnculos cerebelares. Introduza a ponta de uma lâmina no 4º ventrículo pela parte caudal do cerebelo. Seccione rostral e horizontalmente os pedúnculos cerebelares, separando o cerebelo do bulbo num dos lados e, depois, no outro (Figura 20 e 21);

b) Corte na altura do tálamo, separando o tronco encefálico do resto do encéfalo (Figura 22). Ao findar essa operação, você obterá três partes: a) o tronco encefálico, b) o cerebelo e c) o restante do encéfalo (Figura 23);

c) Para obter a **amostra 1**, retire uma fatia sagital (cerca de 0,5 cm) do verme do cerebelo (Figuras 24 e 25);

d) Para obter a **amostra 2**, corte uma fatia transversal fina (cerca de 0,5 cm) do bulbo, no ponto onde o tronco encefálico foi separado da medula espinhal (Figuras 26 e 27);

e) A **amostra 3** é obtida dividindo-se um dos hemisférios cerebrais na altura do quiasma óptico, separando-se a parte rostral do restante (Figura 28);

f) Nesse ponto, as três amostras a serem enviadas para o exame virológico e/ou bacteriológico foram obtidas (Figura 29). Os fragmentos selecionados são adequados para o exame da raiva e para exame de outras doenças causadas no sistema nervoso de bovinos por vírus e bactérias. Essas três amostras devem ser conservadas no refrigera-

dor e remetidas refrigeradas. No entanto, se o tempo entre a coleta e a remessa for maior que 24 horas, é aconselhável congelar essas amostras e enviá-las congeladas, mas nunca fixar em formol;

g) O restante do encéfalo (Figura 30) deve ser fixado em formol, conforme descrito no Capítulo V, e encaminhado ao exame histológico, assim como o bloco de tecidos constituído pela rede admirável carotídea, o gânglio do nervo trigêmeo e a hipófise. Através da histopatologia, pode-se diagnosticar a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE).

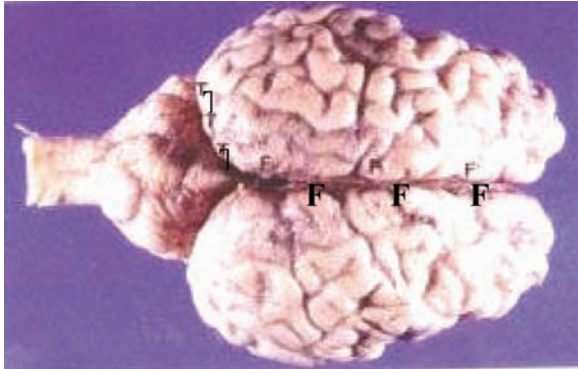


Figura 19 – Tanto quanto possível, o cérebro deve ser removido intacto. As letras mostram os locais onde estão localizados a foixe (F) do cérebro e o tentório (T) do cerebelo.

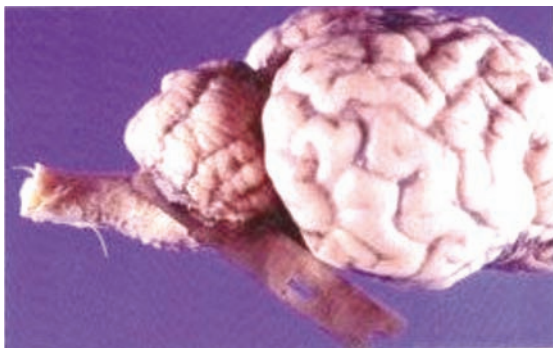


Figura 20 – Introduza a ponta de uma lâmina no 4º ventrículo, pela parte caudal do cerebelo. Corte rostral e horizontalmente os pedúnculos cerebelares, separando o cerebelo do bulbo num dos lados e, depois, no outro.

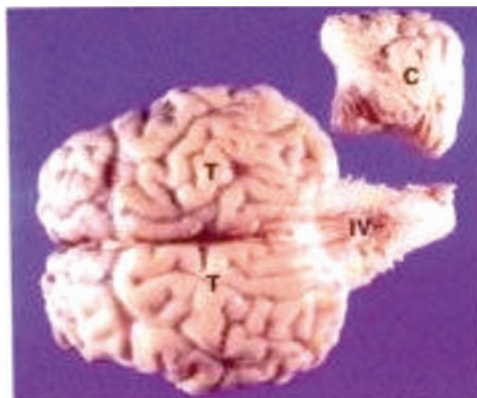


Figura 21 – Ao finalizar a operação descrita na Figura 20, o cerebelo estará completamente separado do encéfalo. Os hemisférios telencefálicos (T), o 4º ventrículo (IV) e o cerebelo (C) estão identificados na figura.

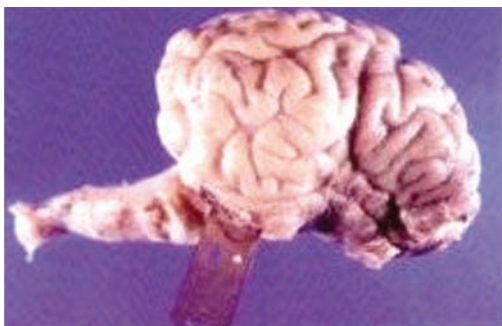


Figura 22 – Separe o tronco encefálico do resto do encéfalo, cortando em ambos os lados, na altura do tálamo, como mostra a figura.



Figura 23 – Ao finalizar a operação descrita na Figura 22, o encéfalo estará dividido em três partes: o tronco encefálico (acima, à direita), o cerebelo (abaixo, à direita) e os hemisférios telencefálicos.



Figura 24 – Para a obtenção da amostra 1, a ser enviada para exames virológicos e/ou bacteriológicos, uma fatia de cerca de 0,5 cm é retirada ao longo do verme do cerebelo.



Figura 25 – Esta fatia (1) deve ser refrigerada ou congelada.



Figura 26 – Para obter a amostra 2, corte uma fatia transversal de aproximadamente 0,5 cm do bulbo, no ponto onde o tronco encefálico foi separado da medula espinhal.



Figura 27 – O fragmento (2) deve ser refrigerado ou congelado e o restante fixado em formol.



Figura 28 – A amostra 3 é obtida dividindo-se um dos hemisférios cerebrais na altura do quiasma óptico, separando-se a parte rostral (3) do restante.



Figura 29 – Estas são as amostras destinadas ao exame virológico e/ou bacteriológico: 1) fatia do cerebelo seccionado ao longo do verme; 2) fatia do bulbo/medula cervical e 3) metade rostral de um dos hemisférios telencefálicos. Esses fragmentos devem ser remetidos refrigerados ou congelados.



Figura 30 – O material mostrado nesta figura é o que resta após a retirada das amostras 1-3 para exames virológicos e/ou bacteriológicos. Este material é formado por todo o tronco encefálico (acima, à esquerda), duas partes do cerebelo (ao centro) e dos hemisférios telencefálicos. Destina-se ao exame histológico e deve ser fixado em formol a 10 %.

Em caso de dúvidas, entrar em contato com o Laboratório de Patologia, pelo telefone (51) 3481 3711 (ramal 223) ou pelo e-mail patologia@ipvdf.rs.gov.br .

XII Referências

- ALTON G.G.; JONES L.M.; ANGUS R.D.; VERGER J.M. **Techniques for the Brucellosis Laboratories**. Paris: INRA, 1988. 190 p.
- BARROS C.S.L.; LEMOS R.A.A.; CAVALLÉRO J.C.M. **Manual de Procedimentos para Diagnóstico Histológico Diferencial da Encefalopatia Espongiforme dos Bovinos (BSE)**. São Paulo: Lemos, 2001. 56 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Manual Técnico do Programa de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal**. Brasília, 2005. 190 p. PNCEBT.
- _____. Laboratório de Apoio Animal/Recife. **Diagnóstico de Doenças dos Animais: Manual de Instruções para Coleta, Conservação e Remessa de Material para Laboratório**. 5. ed. Brasília, 2003.
- FEPAGRO. **Manual de Coleta e Remessa de Materiais para Diagnóstico de Doenças de Animais**. 2. ed. Porto Alegre, 1998. 21 p. Circular Técnica, 6.
- GUERREIRO M.G. *et al.* **Bacteriologia Especial**. Porto Alegre: Sulina, 1984.
- HIRSH D.C.; ZEE Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Koogan, 2003. 446 p.
- HOFFMAN R.P. **Diagnóstico de Parasitismo Veterinário**. Porto Alegre: Sulina, 1987. 156 p.
- HÜBNER S.O.; OLIVEIRA A.P.; FRANCO A.C.; ESTEVES P.A.; SILVA A.D.; SPILKI F.R.; RIJSEWIJK, F.A.M.; ROHE P.M.. Experimental Infection of Calves with a gl, gE, US9 Negative Bovine Herpesvirus Type 5. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford: Elsevier. n. 28, p.187-196, 2005.
- MERIAL. **Manual: Necropsia e Remessa de Material para Laboratório**. Campinas, 2006. 58 p._
- OLIVEIRA S.J. **Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária**. 2. ed. Canoas: Ulbra, 2000. 240 p.



PANAFTOSA. **Instruções para el Envío de Muestras.** Rio de Janeiro, 1998. **Folleto de Información Pública, 5.**

PIANTA C. **Mastite Bovina:** Informações ao Produtor. Porto Alegre: FEPAGRO, 1997. Circular Técnica, 15.

RADOSTITS O.M.; GAY C.C.; BLOOD D.C.; HINCHCLIFF K.W. **Clínica Veterinária.** 9. ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2002. 1735 p.

RIET-CORREA F.; MÉNDEZ M.C.; SCHILD A.L. **Intoxicações por Plantas e Micotoxícoses em Animais Domésticos.** Montevideo: Agropecuaria Hemisferio Sur, 1993. 340 p.

_____; SCHILD A.L.; MÉNDEZ M.C. *et al.* **Doenças de Ruminantes e Eqüinos.** Pelotas: UFPEL, 1998. 651 p.

XIII ANEXO 1

Formulário para Solicitação de Exames



Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio



FORMULÁRIO PARA SOLICITAÇÃO DE EXAMES	Preenchimento sob responsabilidade do IPVDF		
	Protocolo Nº /	Recebido em / /	Rubrica

Cliente: _____

Proprietário: _____

Município de origem das amostras: _____

Caso o cliente não esteja cadastrado no IPVDF ou necessite atualizar o cadastro, preencha o quadro abaixo:

C.N.P.J. / C.P.F.:	I.E. / R.G.:		
Endereço para correspondência:			
Bairro:	Cidade:	UF:	CEP: -
Tel. Fixo:	Tel. Cel:	Fax:	
e-mail:			

Méd. Veterinário responsável pela remessa: _____

Caso o Méd. Veterinário não esteja cadastrado no IPVDF ou necessite atualizar o cadastro, preencha o quadro abaixo:

CRMV/UF:	C.P.F.:	R.G.:	
Endereço para correspondência:			
Bairro:	Cidade:	UF:	CEP: -
Tel. Fixo:	Tel. Cel:	Fax:	
E-mail:			

Identificação das amostras remetidas:

Espécie: _____ Tipo de Material: _____

Data da Coleta: ____ / ____ / ____ Quantidade de Amostras: _____

Conservação durante transporte: _____ Tipo de transporte: _____

Preenchimento pelo Protocolo do IPVDF: Estado de conservação da amostra no recebimento: _____
--

Informações sobre o histórico do animal e/ou suspeita clínica:

Exames solicitados:

Eu, _____ assumo total responsabilidade pelas informações acima prestadas.

_____, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do responsável pelas informações



Secretaria da Agricultura,
Pecuária e Agronegócio



FEPAGRO

Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária

Rua Gonçalves Dias, 570

Porto Alegre/RS - CEP 90130-060

Fone: (51) 3288-8000 Fax: (51) 3233-7607

fepagro@fepagro.rs.gov.br | www.fepagro.rs.gov.br