Revista Brasileira de Buiatria

COLHEITA E ENVIO DE AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE DOENÇAS DE RUMINANTES

COLLECTION AND SENDING OF SAMPLES FOR LABORATORY DIAGNOSIS OF RUMINANT DISEASES

Claudia Del Fava[1], Simone Miyashiro[1], Alexandre Lopes Gomes[1], Liria Hiromi Okuda[1]

1 Instituto Biológico (IB), Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, Vila Mariana, São Paulo, SP - CEP:04014-900.

Autor para correspondência: claudia.fava@sp.gov.br

Revista Brasileira de Buiatria
Exames Complementares,
Volume 4, Número 2, 2021

ISSN 2763-955X

DOI:10.4322/2763-955X.2021.019

Associação Brasileira de Buiatria

RESUMO

Para estabelecer o diagnóstico de distintas enfermidades em ruminantes é imprescindível a colheita adequada dos materiais de animais vivos e/ou mortos. Objetiva-se orientar os médicos veterinários nos procedimentos de colheita de materiais clínicos e de necropsia, acondicionamento e envio para o diagnóstico laboratorial microbiológico, parasitológico, toxicológico e anatomopatológico. É fundamental que as amostras sejam encaminhadas com a ficha de requisição das análises laboratoriais totalmente preenchida, direcionando para a provável enfermidade que possa estar associada ao histórico clínico e epidemiológico. Para facilitar o leitor, as principais doenças foram agrupadas nos seguintes sistemas orgânicos: reprodutor, nervoso, osteoarticular, pele e mucosas, respiratório, digestivo, circulatório e linfático. Com esses cuidados, será maior o sucesso na identificação do agente suspeito, e na impossibilidade disso ocorrer, permitirá a investigação de outras causas.

Palavras-chave: anatomopatológico, microbiológico, parasitológico, qualidade, toxicológico.

ABSTRACT

To establish the diagnosis of different diseases in ruminants, it is essential to guide veterinarians in the procedures for collecting, identifying, packaging, and sending samples of clinical and necropsy materials for microbiological, parasitological, toxicological, and anatomopathological laboratory diagnosis. Samples must be sent with the laboratory analysis request form fully completed, directing to the likely disease that may be associated with the clinical and epidemiological history. To facilitate the reader, the main diseases were grouped into the following organ systems: reproductive, nervous, osteoarticular, skin and mucous membranes, respiratory, digestive, circulatory, and lymphatic. With these precautions, it is expected to obtain greater success in identifying the suspected agent, and if this does not occur, it will allow other causes to be investigated.

Keywords: anatomopathological, microbiological, parasitological, quality, toxicological.

INTRODUÇÃO

A fim de estabelecer o diagnóstico de doenças, vigilância epidemiológica, monitoramento de resposta vacinal e desvendar a *causa mortis* em ruminantes são necessárias análises laboratoriais, sendo imprescindível que o veterinário colha o material mais adequado de animais vivos e/ou mortos. O conhecimento sobre a patogenia da doença suspeita é muito importante para orientar quais materiais serão obtidos.

As amostras devem ser colhidas com cuidado, para se evitar a piora do estresse ou dano ao animal, ou ainda, perigo ao operador. Por exemplo, uma carcaça suspeita de estar infectada com *Bacillus anthracis* não deve ser aberta, podendo-se utilizar para o diagnóstico sangue periférico de uma veia superficial. É importante adotar técnicas de assepsia para evitar contaminação ambiental e cruzada entre amostras. Após a morte, bactérias invadem os tecidos do hospedeiro, interferindo no resultado de análises microbiológicas, portanto, para melhores resultados, tecidos frescos devem ser amostrados sempre que possível. É importante também ressaltar que espécimes obtidos após o uso de antibioticoterapia prejudicam grandemente o sucesso no isolamento bacteriano.

Assim, o objetivo da presente revisão é promover orientações para procedimentos de colheita e envio de amostras de ruminantes para o diagnóstico de doenças.

Instituto Biológico

O Instituto Biológico (Figura 1), órgão da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, realiza diagnóstico de enfermidades animais pela sua equipe técnica multidisciplinar, constituída por técnicos que trabalham em laboratórios especializados em diagnóstico e pesquisa nas áreas de anatomia patológica, virologia, bacteriologia e parasitologia animal.

Vídeo Institucional - Instituto Biológico

Todas as informações sobre exames realizados e detalhes técnicos sobre tipos de análises, amostras e conservação das mesmas estão disponíveis na homepage do Instituto Biológico (clique aqui para acessar).

Atualmente a área de Sanidade Animal do Instituto Biológico conta com 26 escopos acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação (Cgcre) do Inmetro seguindo a ISO IEC 17025: 2017 (CRL 957).

Figura 1. Instituto Biológico, São Paulo, SP. (A) Prédio Central do Instituto Biológico em São Paulo (Foto: J.R. Baldini) e (B) esquema de sua estrutura física.

DOENÇAS DOS RUMINANTES CLASSIFICADAS POR SISTEMAS

Dentre as várias doenças de ruminantes, agrupamos as mais importantes por tipos de alterações com os possíveis grupos de agentes etiológico envolvidos, identificados segundo as cores da legenda a seguir (Figuras 2 a 9):

Reprodutivas	X	Algas
Neurológicas		Bactérias
Musculoesqueléticas		Fungos
Pele e mucosas		Intoxicações
Respiratórias		Priônicas
Gastrintestinais		Parasitas
Circulatório e linfático		Vírus
Glândula mamária		Não Infecciosas

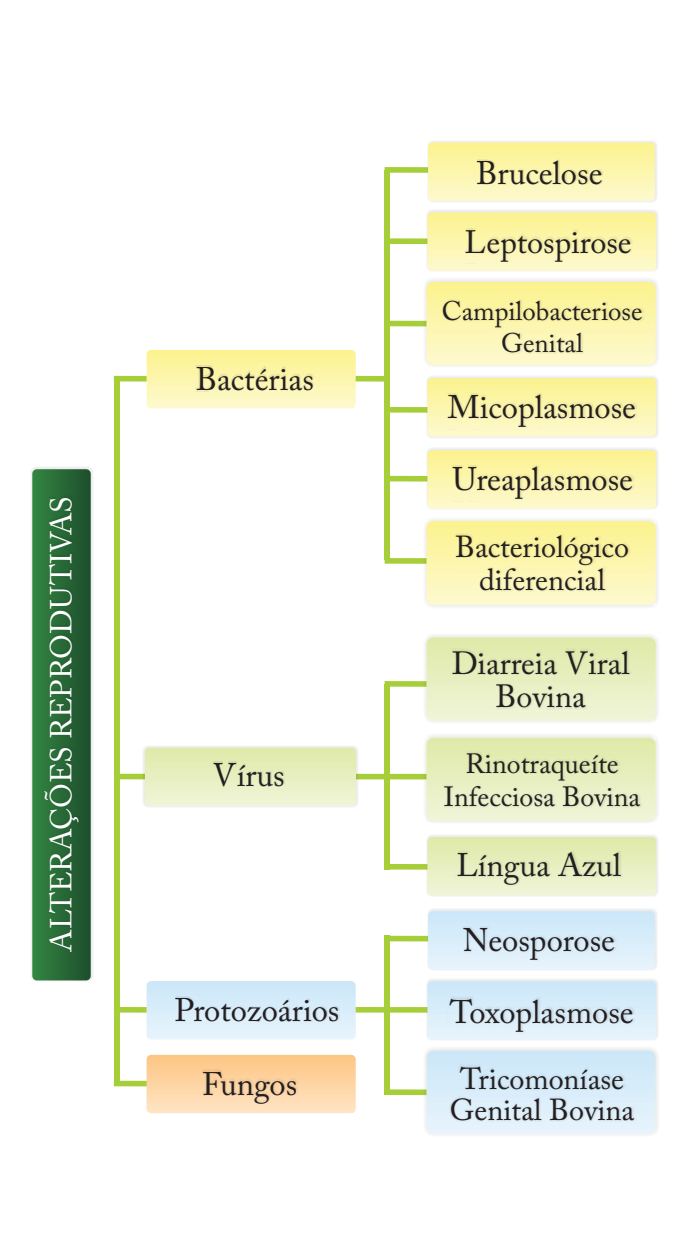


Figura 2. Doenças relacionadas a alterações reprodutivas.

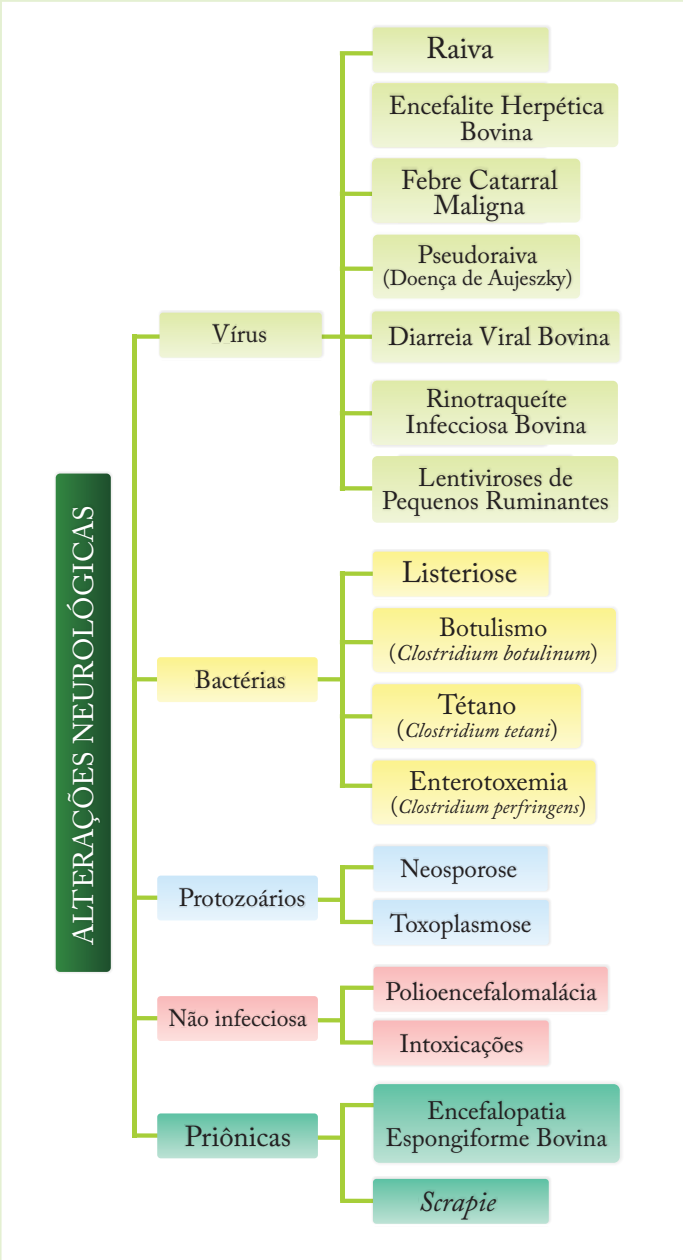


Figura 3. Doenças relacionadas a alterações neurológicas.

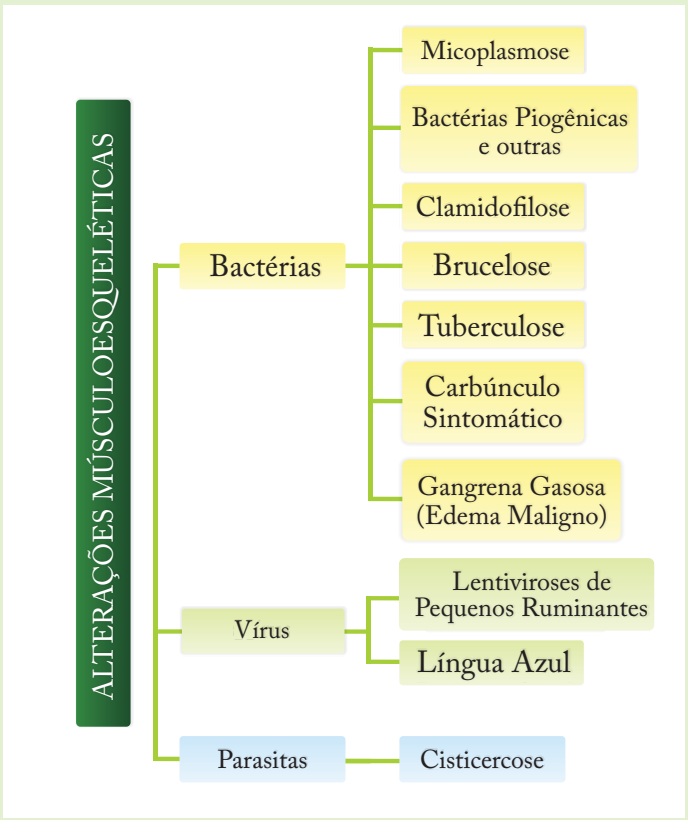


Figura 4. Doenças relacionadas a alterações musculoesqueléticas.

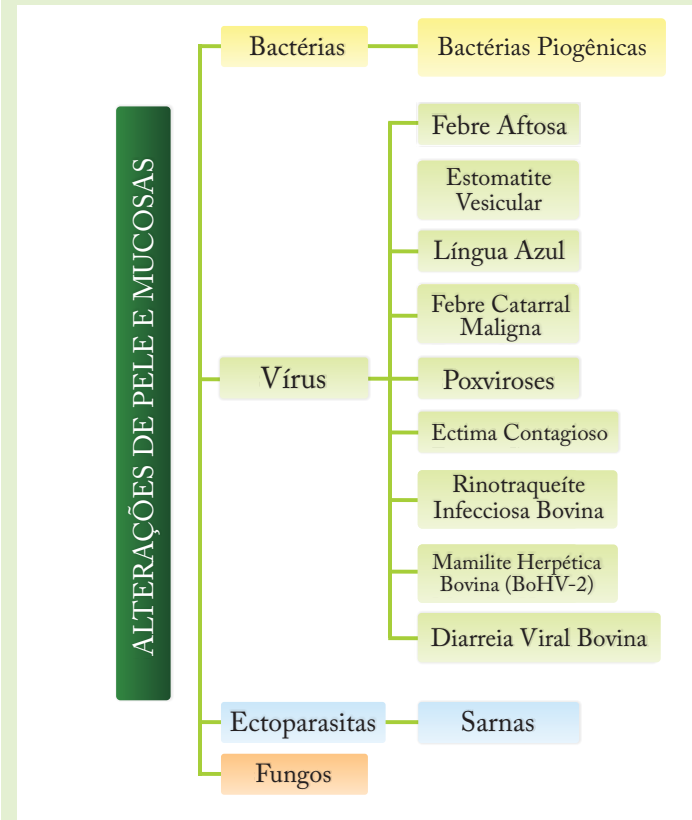


Figura 5. Doenças relacionadas a alterações de pele e mucosas.

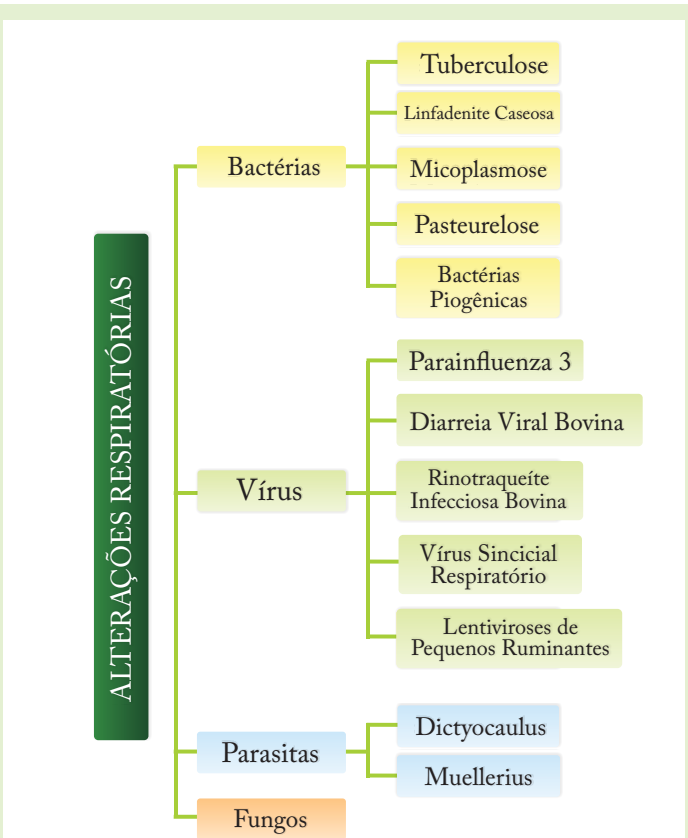


Figura 6. Doenças relacionadas a alterações respiratórias.

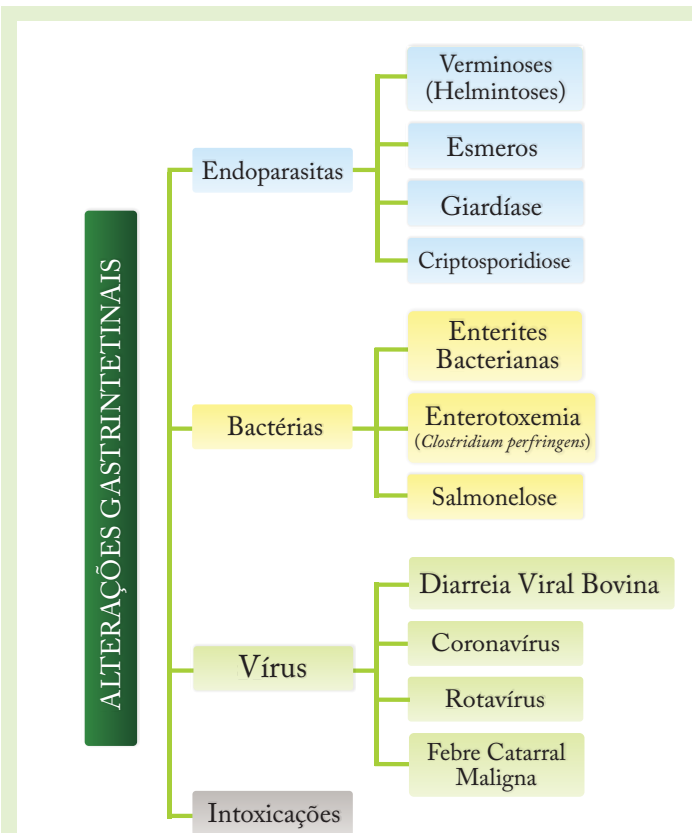


Figura 7. Doenças relacionadas a alterações gastrintestinais.

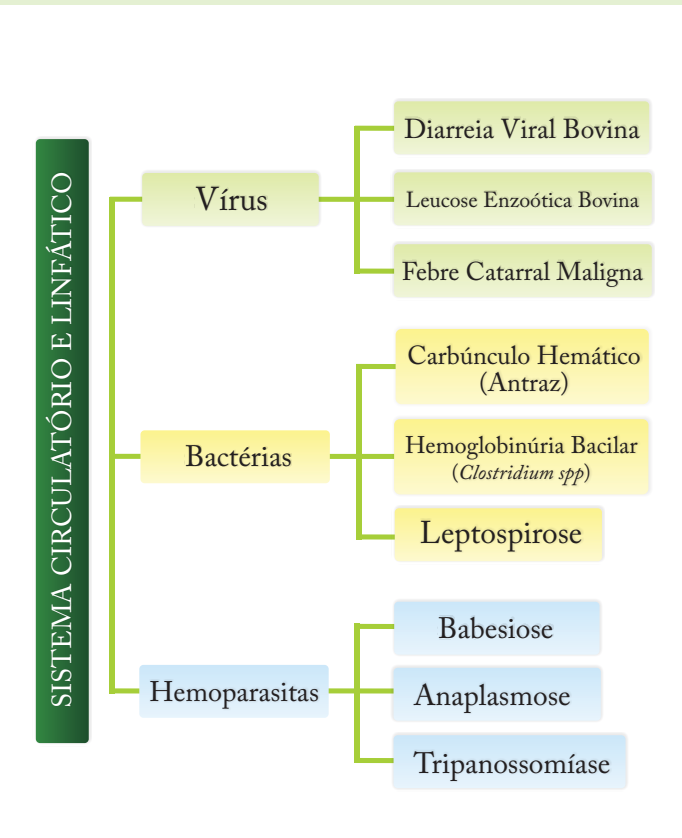


Figura 8. Doenças relacionadas a alterações do sistema circulatório e linfático.

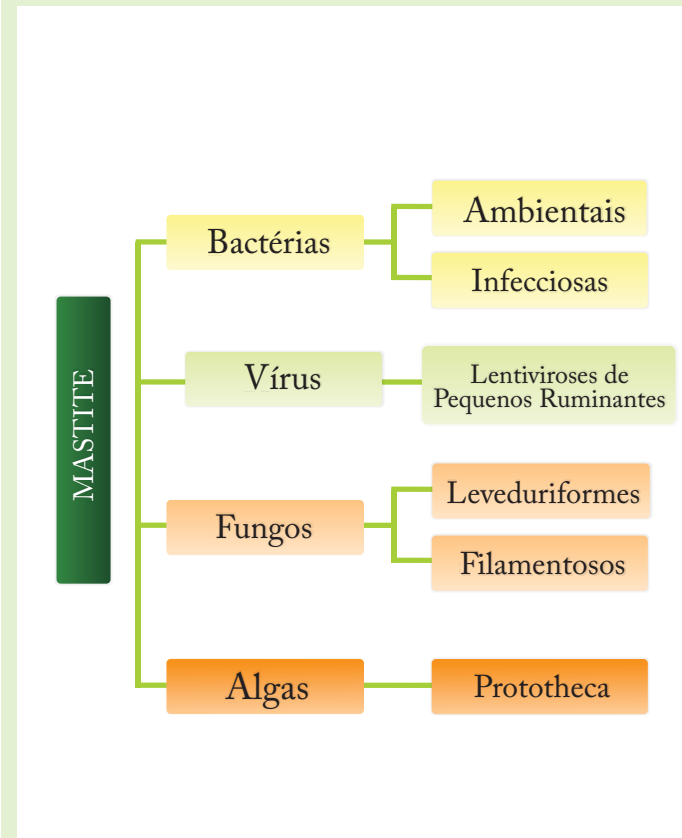


Figura 9. Doenças relacionadas a alterações da glândula mamária.

COLHEITA DE AMOSTRAS

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado a partir de amostras colhidas de animais vivos, tais como suabe (oral, nasal, ocular, vaginal, prepucial), biopsia, punção (articular, linfonodos, abscessos, líquido peritoneal), sangue e soro sanguíneo, leite, fezes, urina, sêmen, líquor, líquido ascítico, lavado traqueal, lavado prepucial, muco esofágico-faríngeo e peças cirúrgicas, bem como amostras de animais que vieram à óbito.

Antes de iniciar a colheita das amostras é necessária a paramentação pessoal (luva, avental, touca, máscara e óculos de proteção) para garantir a biossegurança (técnico, animal, amostra e ambiente).

É fundamental a identificação correta do animal e a data de colheita no tubo de coleta ou frasco/saco de acondicionamento da amostra, para não haver divergência ou contestação, tanto da ficha de requisição de exame solicitado como no resultado. Na ficha de requisição de exames é importante inserir/descrever:

- Dados de identificação completa dos animais amostrados (nome/registro, idade, sexo, raça, data de colheita).
- Informações e problemas observados no rebanho.
- Sintomatologia e lesões macroscópicas.
- Vacinas, antiparasitários e antibióticos utilizados.

Todas essas informações são necessárias para a rastreabilidade do animal, sendo a data da colheita da amostra importante para identificar a condição de saúde do animal naquele momento. No caso de doenças sob controle oficial é obrigatória, porque a legisla-

ção de Defesa Sanitária Animal vigente define o prazo de validade dos exames a partir da data em que foi colhida a amostra.

Diagnóstico Sorológico

A sorologia é um ramo da biologia que estuda os antígenos, os anticorpos e suas interações. O teste sorológico ou reação sorológica é um artifício laboratorial para demonstrar a reação antígeno-anticorpo. Por meio desses testes é possível detectar a presença do agente etiológico (diagnóstico direto) ou dos anticorpos desenvolvidos pós-exposição ao agente (diagnóstico indireto).

Como exemplos de diagnóstico sorológico direto ou identificação sorológica temos a imunofluorescência direta para o diagnóstico de raiva no sistema nervoso central (SNC), detecção da diarreia viral bovina (BVD) por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), a partir de sangue ou plasma ou imunoperoxidase direta, entre outros. Portanto, na identificação sorológica usamos um anticorpo específico padrão para a identificação do patógeno alvo, seja do tecido ou isolado da amostra em cultivo celular.

Para estudos de prevalência epidemiológica, avaliação de resposta vacinal e certificação de rebanhos são aplicadas diversas técnicas sorológicas indiretas, dentre essas se destacam ELISA indireto (febre aftosa, língua azul), vírus neutralização (estomatite vesicular, herpesvírus, BVD), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (toxoplasmose, neosporose), imunodifusão em agar gel (IDGA) (lentivírus de pequenos ruminantes, língua azul) e soroaglutinação (leptospirose, brucelose). A matriz necessária para a pesquisa de anticorpos é o soro sanguíneo e, em casos específicos pode ser utilizado o plasma. O leite é utilizado para o "*ring test*" da brucelose.

Dependendo da doença, a sorologia pareada é recomendada para avaliar animais em fase aguda de infecção. Para tanto é realizada a colheita de soro do animal, com intervalo mínimo de quinze dias, a fim de avaliar a soroconversão, quando se observa o aumento de pelo menos quatro vezes o título de anticorpos.

Quando se trata de avaliar a situação de uma doença na propriedade, pode-se realizar uma amostragem do rebanho, lembrando que é importante colher material de animais sadios e enfermos, de diferentes faixas etárias, sexo e gestantes. Em caso de doenças reprodutivas é importante colher amostra do touro rufião também, pois algumas doenças são transmitidas por contato direto.

Obtenção de sangue e soro sanguíneo

Dependendo do teste diagnóstico requisitado, pode ser solicitado sangue total, plasma ou soro sanguíneo. Quando for necessário sangue total ou plasma para diagnóstico, a colheita deve ser realizada em tubos com anticoagulante (EDTA, citrato de sódio, ou heparina), e se utilizado soro sanguíneo, a colheita deve ser realizada em tubo siliconizado com gel separador ou siliconizado seco (Figura 10). É imprescindível que tubos de colheita e de transporte de amostras tenham a identificação do animal e data de colheita.

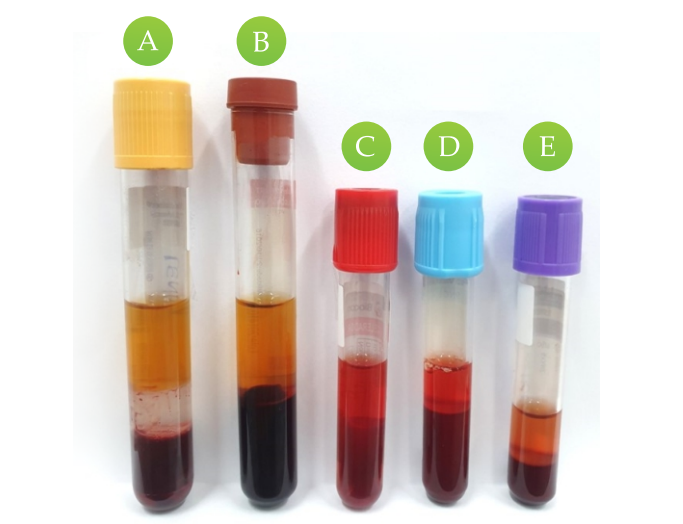


Figura 10. Tubos para colheita de material sanguíneo. (A) Tubo siliconizado com gel separador, (B) siliconizado seco grande, (C) siliconizado seco pequeno, (D) com anticoagulante citrato de sódio e (E) com anticoagulante EDTA.

Figura 11. Sistema de colheita de sangue a vácuo. (A) Agulha e adaptador de agulha ("canhão") para colheita de sangue com sistema a vácuo. Agulha rosqueada e acoplada no adaptador (B) com e (C) sem o protetor. (D) Tubo siliconizado seco grande (9 mL), para obtenção de soro, inserido dentro do adaptador com consequente perfuração de sua tampa de borracha (sistema montado no momento da introdução da agulha no vaso, para a colheita do sangue para o interior do tubo devido ao vácuo). (E) Colheita de sangue em bovino, através da punção da veia jugular externa.

O sangue total pode ser colhido tanto com sistema a vácuo, que utiliza agulha estéril e descartável (Figuras 11), quanto com seringa e agulha estéreis e descartáveis (Figuras 12). A colheita destes materiais deve seguir os padrões básicos de higiene, a fim de evitar problemas de contaminação da amostra, do técnico e inoculação de agentes patogênicos no animal.

As veias jugular externa (Figuras 11 e 12A), mamária e coccígea (Figuras 12B e C) são os locais de colheita mais utilizados. Deve-se realizar a higienização prévia da região antes da punção do vaso sanguíneo.

Para diagnóstico direto (bacteremia, pesquisa de hematozoários, detecção do vírus da BVD e da lín-

Figura 12. Colheita de sangue com seringa e agulha estéreis e descartáveis. (A) Colheita de sangue via punção da veia jugular externa em caprino e veias (B) coccígea e (C) mamária em bovino. (D) Transferência, após a colheita, do sangue para o frasco de transporte.

gua azul, entre outros), utiliza-se sangue total colhido em tubo com anticoagulante (EDTA, citrato de sódio ou heparina). Pode-se utilizar tanto o sistema a vácuo, quanto a seringa e agulha, lembrando que neste último método, o sangue deve ser transferido da seringa sem agulha para o frasco de transporte com anticoagulante, apoiando o orifício da seringa na parede interna do frasco inclinado, pressionando suavemente o êmbolo para evitar hemólise (Figura 12D). O sangue é encaminhado para análise, sob refrigeração.

Para obtenção do soro sanguíneo, o sangue pode ser colhido pelo sistema a vácuo (tubo siliconizado seco ou com gel separador) ou através de seringa e agulha (transferido em tubo siliconizado seco), seguindo as orientações do Quadro 1 e sendo mantido e enviado sob refrigeração (2 a 8ºC).

Salientamos que o tubo de armazenamento de soro sanguíneo deve ser estéril, para evitar contaminações (fúngica, bacterianas), que deterioram o material. Essas contaminações interferem em determinados tipos de análise, principalmente as que utilizam cultivo de células como a vírus neutralização, porque microrganismos podem consumir os nutrientes do meio de manutenção das células, que morrem. Outro ponto importante é que a colheita do soro não pode ser no mesmo período em que foi realizado vermifugação e tratamento tópico para ectoparasitas, pois, o resíduo fica no sangue e pode causar citotoxicidade no cultivo celular, sendo o resultado considerado inconclusivo.

A condição da amostra de soro sanguíneo é de suma importância para a qualidade do exame laboratorial e garantia de um resultado confiável. Assim, deve-se evitar envio de soro sanguíneo hemolisado, pois interfere em muitas provas diagnósticas (Figura 13). A hemólise causa resultado falso positivo nas provas de soroaglutinação para brucelose, dificulta a leitura visual da soroaglutinação microscópica para leptospirose e pode gerar um resultado inconclusivo na reação de virusneutralização, pois a hemoglobina é um produto tóxico para o tapete celular.

Quadro 1: Recomendações para colheita de sangue e obtenção e armazenamento de soro para diagnóstico laboratorial.

Colheita de Sangue	Soro	
	Obtenção	Armazenamento
Sistema a vácuo (*Tubo siliconizado seco*)	Deixar a amostra no tubo, em temperatura ambiente, até a separação do soro do coágulo	Tubo estéril ou microtubo
Sistema a vácuo (*Tubo siliconizado com gel separador*)	Manter o sangue no tubo (30 minutos a 2 horas), seguido de centrifugação (2.000 rpm por 20 minutos)	Manter o soro no próprio tubo
Seringa e agulha	Transferir o sangue da seringa (sem agulha), para tubo siliconizado seco, apoiando o orifício da seringa na parede interna do tubo inclinado, pressionando suavemente o êmbolo para evitar hemólise (Figura 12D). Aguardar o sangue coagular, para o transporte sob refrigeração	Tubo estéril ou microtubo

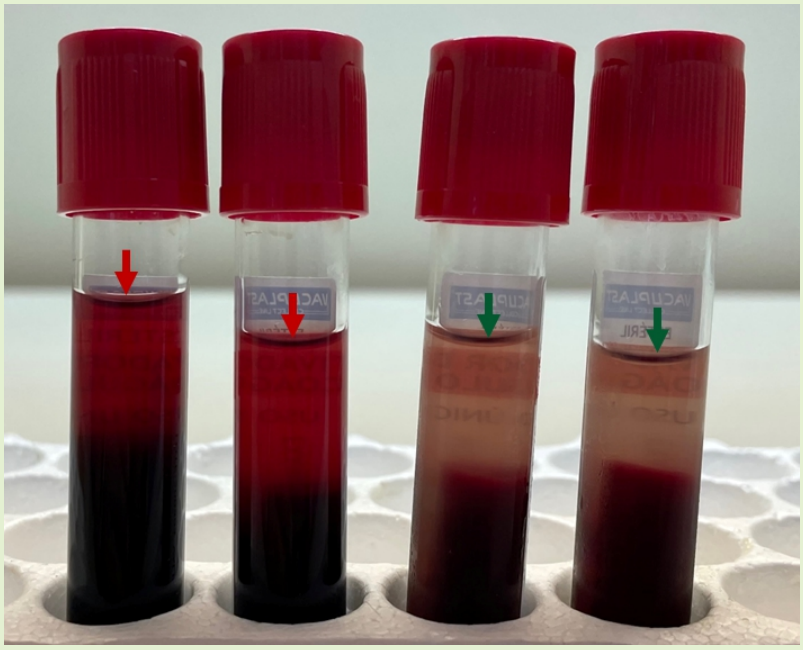


Figura 13. Amostras de soros sanguíneos hemolisados (setas vermelhas) e de boa qualidade (setas verdes) para sorodiagnóstico.

Biopsia

A biopsia pode ser colhida por *punch* ou com tesoura, pinça e bisturi, representando uma parte do tecido macroscopicamente sadio e outra do tecido alterado (Figura 14). Ambas as técnicas de colheita devem ser realizadas com a contenção do animal (física e/ou química), associada a anestesia local, além de todos os cuidados de assepsia e limpeza desde o preparo da região a ser realizada a biópsia à sua cicatrização. Dependendo do local e/ou tamanho do fragmento, recomenda-se a sutura da área retirada, para facilitar a cicatrização, evitar hemorragia e contaminação secun-

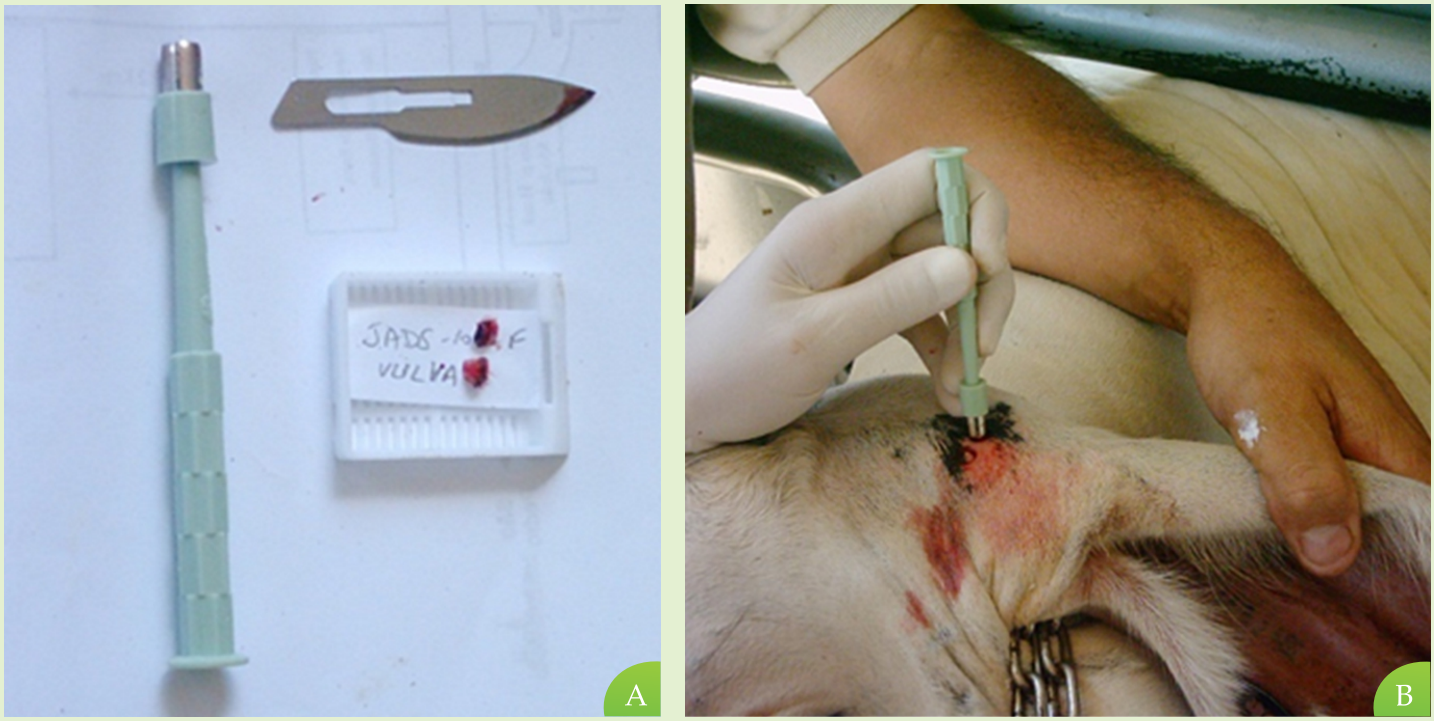


Figura 14. Colheita de amostras para biopsia. (A) Materiais: lâmina de bisturi, *punch* e cassete histológico. (B) Colheita de amostra de pele em bovino com o *punch*.

dária.

De acordo com o teste diagnostico que a amostra for submetida, o fragmento deve ser processado de acordo com o Quadro 2.

Quadro 2: Processamento de amostras de biópsia, segundo o teste diagnóstico.

Diagnóstico	Armazenamento
Isolamento (bactérias, vírus ou fungos)	Refrigerado ou congelado em recipiente estéril
Histopatológico	Fixação em formol 10%
Imunohistoquímica	Fixação em formol tamponado 10% por 48 horas, seguido de armazenamento em álcool etílico 70%

Leite (mastite)

A mastite, inflamação da glândula mamária, além de perdas econômicas, pode determinar o descarte de animais.

Para análise microbiológica é importante obedecer aos processos de assepsia na obtenção do leite para um resultado confiável:

- Desinfecção das mãos (lavagem com sabão e água) e enxágue com solução antisséptica.
- Limpeza do úbere e dos tetos com solução desinfetante para remover toda lama e excrementos.
- Secagem do úbere com papel-toalha (Figura 15A).
- Limpeza da extremidade de cada teto, principalmente o orifício, esfregando um chumaço de algodão ou gaze embebidos em álcool iodado (Figura 15B). Início da limpeza dos locais mais difíceis para os mais fáceis para evitar contato das mãos e braços com os tetos.

Figura 15. Preparo do úbere para colheita de amostras de leite. (A) Secagem do úbere com papel toalha, após limpeza com solução desinfetante e (B) desinfecção da extremidade do teto com algodão embebidos em álcool iodado.

- Secagem dos tetos por alguns segundos antes da colheita.
- Desprezo dos primeiros jatos de leite de cada teto para evitar contaminação por microrganismos comumente presentes no canal do teto. Esses podem ser utilizados para testes de identificação de mastite subclínica.
- Colher pelo menos 10 mL do jato de leite em frasco coletor estéril.
- A extremidade do teto não deve tocar o recipiente e o processo de amostragem deve ser iniciado a partir dos tetos mais próximos para evitar contaminação dos tetos após assepsia.

COLHEITA DE AMOSTRAS *POST MORTEM*

A necropsia é de muito valor, podendo confirmar, refutar, esclarecer, modificar ou estabelecer o diagnóstico. Por vezes, a necropsia é a única forma de se chegar ao diagnóstico correto, e numerosos erros podem ser evitados ou corrigidos se esta for realizada[1].

Durante este procedimento, deve-se trabalhar da forma mais higiênica possível, usar equipamentos de proteção individual (EPI's) como gorro, máscara, óculos, luvas, macacão, avental e botas (Figura 16A). Os instrumentos e materiais de colheita devem estar estéreis (Figura 16B e C).

Na necropsia, primeiramente deve-se realizar a colheita de material para microbiologia/molecular utilizando luvas limpas e materiais estéreis ou higienizados, minimizando a contaminação cruzada pela manipulação de vísceras ou sua retirada da posição anatômica.

A fim de evitar autólise, que mascara lesões macroscópicas e microscópicas e compromete a qualidade microbiológica do material, os fragmentos dos órgãos devem ser colhidos e remetidos ao laboratório o mais rápido possível. Para tanto, o material para análise histopatológica deve ser imediatamente acondicionado em frasco com formol 10%, e o destinado à análise microbiológica/molecular deve ser rapidamente refrigerado ou congelado.

É frequente a falta de envio de algum órgão importante na patogenia da doença para análise microbiológica, parasitológica e de anatomia patológica, o que muitas vezes inviabiliza o diagnóstico. Por exemplo, na solicitação de diagnóstico de:

- *Diarreia* em que não foram colhidos fragmentos de intestino e seu conteúdo para microbiologia, patologia e parasitologia.
- *Síndrome neurológica* em que não foram colhidos cérebro e/ou outros órgãos como fígado e rim, que podem causar quadro nervoso decorrente de insuficiência renal e hepática.

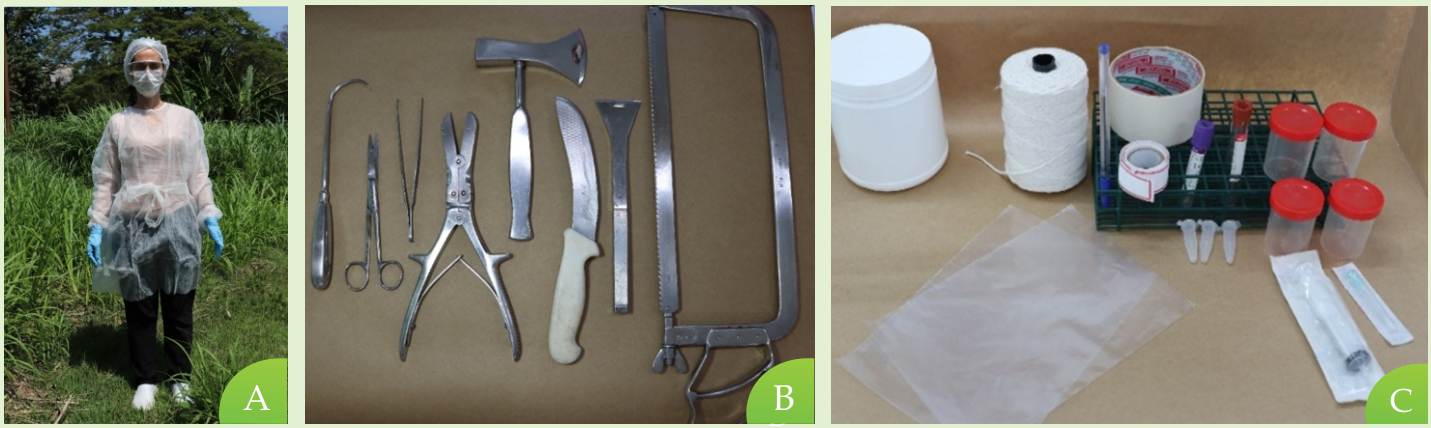


Figura 16. Paramentação e instrumental para realização de necropsia. (A) Médica veterinária paramentada com equipamentos de proteção individual (EPI's), (B) instrumentais cirúrgicos e (C) materiais básicos de colheita, acondicionamento e identificação de amostras.

- *Animal febril* em que não foram colhidos órgãos do sistema linfático (baço e linfonodos), que podem estar reativos em doenças infecciosas.

Portanto, independente da suspeita clínica ou sistema afetado, é imprescindível que, mesmo na ausência de lesões macroscópicas, pelo menos fragmentos dos principais órgãos descritos na Figura 17 (*coração, pulmão, baço, rim, fígado, linfonodos e intestinos*) sejam colhidos e enviados para análise laboratorial, pois a avaliação microscópica permite observar lesões que não são identificadas na macroscopia, e a avaliação conjunta de todos os órgãos é importante para que o patologista conclua o caso. Outros órgãos podem ser colhidos, na dependência do histórico e dos sinais clínicos (*SNC, ovário, útero, testículos, próstata, bexiga, globo ocular, adrenal, pâncreas, pele, bexiga, osso* e *articulação*). Quando o veterinário busca definir a *causa mortis* ou confirmação laboratorial de alguma enfermidade observada, no caso de necropsia de animais jovens e adultos, sugerimos o esquema básico de colheita de amostras a seguir:

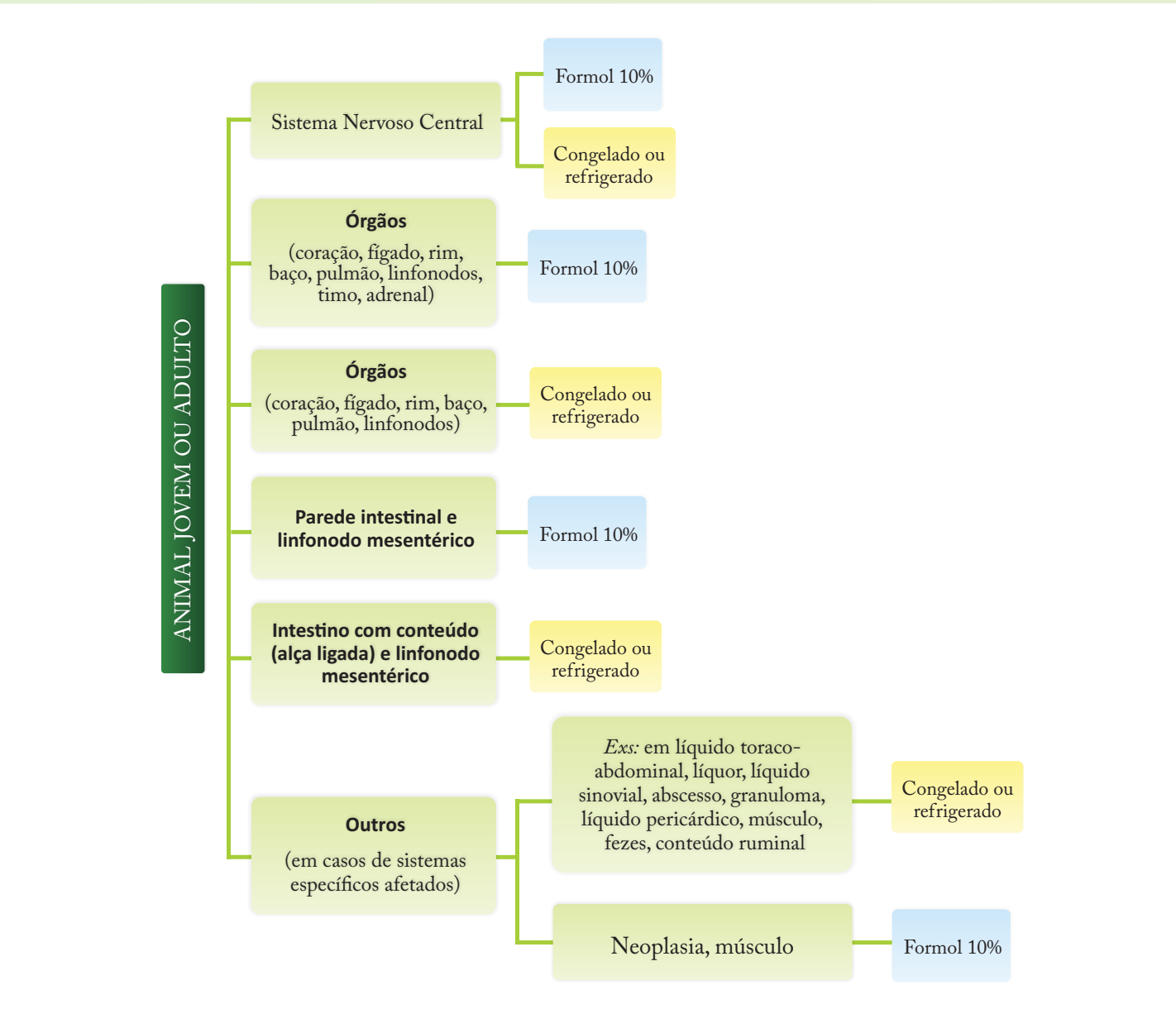


Figura 17. Esquema para colheita básica de amostras para análise laboratorial.

O material para análise microbiológica, parasitológica e molecular deve ser depositado em recipientes estéreis devidamente identificados e mantido refrigerado ou congelado. Amostras obtidas por meio de uma colheita sem higiene e assepsia estarão contaminadas pelo verdadeiro agente causal e por outros microrganismos presentes na carcaça e no meio ambiente, dificultando ou impedindo o isolamento e identificação do verdadeiro agente etiológico.

No caso de isolamento bacteriológico, tanto as bactérias que estão causando a doença quanto os contaminantes irão competir com os nutrientes do meio de cultivo bacteriano, se multiplicando mais rapidamente as menos exigentes e/ou as em maior número, favorecendo seu crescimento em detrimento da mais lenta e mais exigente em cultivo. No caso do isolamento viral em sistema de cultura de células *in vitro*, as bactérias e leveduras contaminantes, além de consumirem o meio de cultura celular irão produzir substâncias tóxicas que matam o tapete celular, inviabilizando o diagnóstico.

O material para análise histopatológica deve ser depositado em frascos plásticos de boca larga com tampa de rosca, devidamente identificados e contendo formol 10%. Se for realizada análise imunohistoquímica, o material deve ser fixado em formol tamponado 10% por 48 horas e depois ser transferido para álcool etílico 70%.

Basicamente, esses são os equipamentos necessários para o (a) médico (a) veterinário (a) realizar uma boa colheita de amostras (Figura 16B e C):

- Pinça, tesoura e bisturi estéreis.
- Facas, afiador, machadinha, arco de serra, costótomo e gancho.
- Frascos coletores e tubos estéreis para amostras que não necessitem de meio de transporte.
- Frascos ou sacos plásticos para colheita de fezes.
- Frascos de plástico de boca larga contendo formol a 10% para análise histopatológica.
- Tubos para colheita de sangue total (com anticoagulante) e soro.
- Suabes estéreis.
- Lâminas de vidro para *imprint* de órgãos e esfregaço sanguíneo.
- Fita esparadrapo ou etiqueta, e caneta esferográfica (identificação das embalagens primárias).
- Caixa térmica com placas de gelo reutilizável para acondicionamento dos potes e tubos.
- Sacos plásticos reforçados para descarte do material *post mortem*.

Não recomendamos o uso de frascos de vidro para armazenamento de órgãos, devido ao risco de quebra durante o transporte.

HISTOPATOLOGIA

Sugere-se que os fragmentos tenham medida aproximada de 3x1x1cm.

A realização da necropsia no menor tempo possível, é uma medida importante para que os órgãos não estejam em processo de autólise avançado no momento da colheita de amostras. Deve-se fixar os tecidos imediatamente em formol 10%, sendo o volume desta substância cerca de dez vezes o volume dos órgãos, e armazenar em frasco plástico de boca larga com tampa bem vedada e identificado (Figura 18).

O congelamento e descongelamento de órgãos antes de sua fixação alteram as estruturas microscópicas, produzindo artefatos que prejudicam a análise histopatológica. Os tecidos colhidos para exame histopatológico devem ser representativos de quaisquer lesões presentes, sendo que cada fragmento deve conter uma transição da parte aparentemente normal e outra anormal do órgão (Figura 19). Pode-se colher de dois a três fragmentos de cada órgão. Como dito anteriormente, as amostras devem ser depositadas num container de plástico com boa vedação.

Em casos em que seja importante a distinção

Figura 18. Fixação em formol 10% de fragmentos de (A) sistema nervoso central e (B) outros órgãos (tamanho de aproximadamente 3x1x1cm), utilizando pote de plástico, com boca larga e tampa de rosca.

dos tecidos quanto à sua localização anatômica (linfonodo mediastínico, pré-escapular, mesentérico etc.) e lateralidade (rim direito ou esquerdo), solicita-se o envio do(s) mesmo(s) em frasco separado com sua identificação.

Os tecidos podem ser fixados pelo responsável da colheita antes de remeter ao laboratório. Em média, pequenos fragmentos fixam em um a dois dias, enquanto um hemisfério cerebral pode demorar até uma semana. Após fixados, podem ser enviados em frasco plástico bem vedado (embalagem primária), com um volume menor de formalina para o seu transporte. Deve-se embalar com saco plástico o frasco de formol, a fim de evitar vazamento.

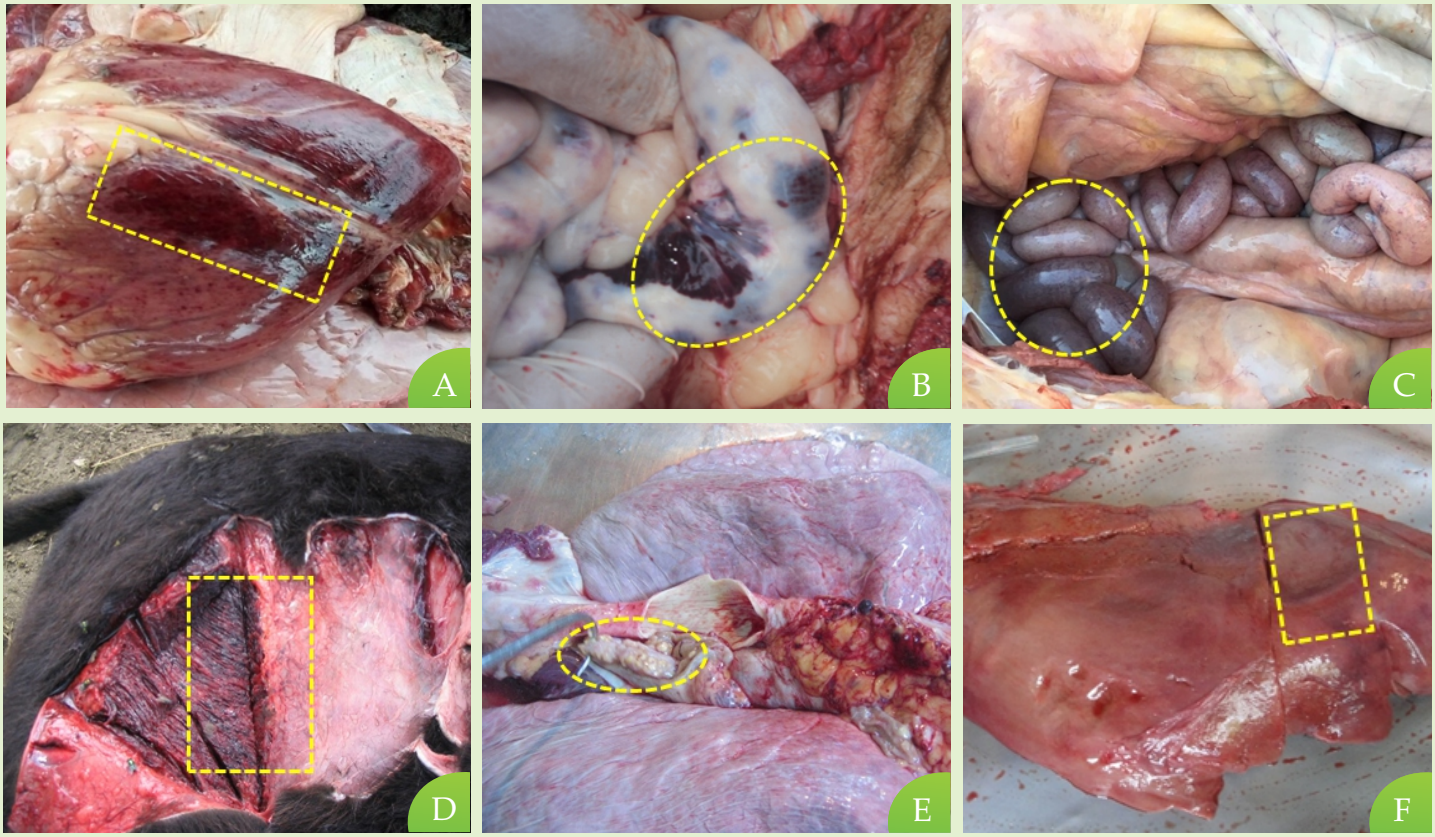


Figura 19. Exemplos de tecidos com alterações macroscópicas, que devem ser colhidos para a análise laboratorial. (A) Coração com focos hemorrágicos, (B) necrose multifocal intestinal, (C) necrose intestinal, (D) músculo necrosado com formação de gás no subcutâneo, (E) linfadenomegalia caseosa e (F) necrose hepática.

A colheita de amostras para exame histopatológico deve seguir os passos descritos na Figura 20.

Figura 20: Descrição das etapas para colheita de amostras destinadas ao exame histopatológico. Além destes órgãos, porções anatômicas aqui não citadas e que apresentem alteração macroscópica devem ser colhidas (ex: testículo, ovário, útero, neoplasia, pâncreas, globo ocular, entre outros).

MICROBIOLOGIA

Qualquer agente suspeito deve ser mencionado no formulário de requisição, pois alguns patógenos requerem condições específicas para seu cultivo (ex: bactérias anaeróbias, salmonela, listeria, micobactérias, micoplasmas, entre outros) que não são utilizadas na maioria dos laboratórios a não ser que o patógeno seja citado. As técnicas baseiam-se no crescimento/visualização dos organismos viáveis ou na detecção do material genético e proteínas desses patógenos.

Alguns protocolos podem permitir a realização de *pool* de vários tecidos de um indivíduo, mas para a maioria é preferível que cada tecido seja colhido separadamente em recipientes identificados e estéreis para o transporte. Amostras de intestino e placenta nunca devem ser misturadas com outros tecidos, devendo ser alocados em recipientes individuais (Figura 21).

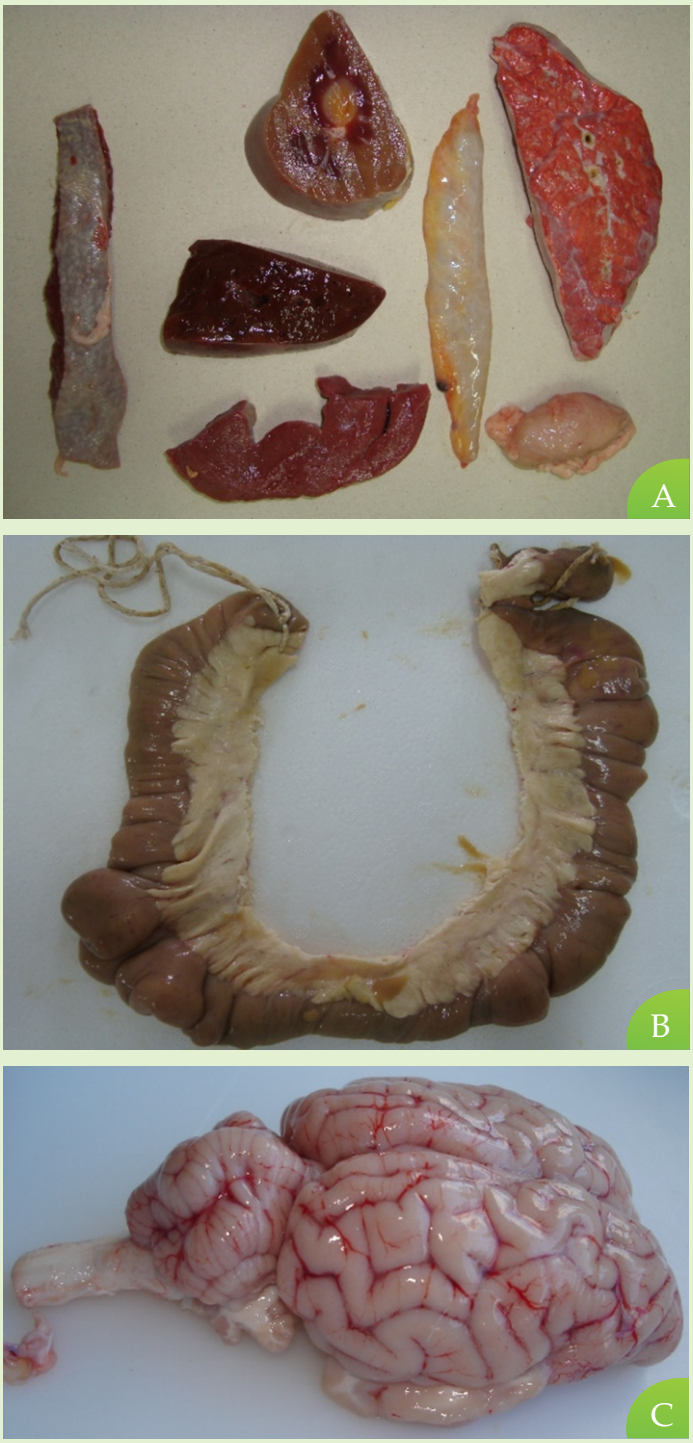


Figura 21. Colheita de amostras para realização de ensaios microbiológicos. (A) Fragmentos de órgãos enviados para análises microbiológicas com dimensões próximas de 5x2x2 cm, (B) segmento intestinal ligado, aproximadamente 20 cm, preenchido com conteúdo e (C) sistema nervoso central.

Tecidos (Figura 21) e fluidos e ou secreções (Figura 22A), para a maioria dos ensaios microbiológicos, podem ser congelados antes do envio, mas prefere-se refrigeração se as amostras puderem ser rapidamente despachadas para o laboratório nas próximas 24 horas pós-colheita. Nunca enviar para o laboratório a amostra dentro de seringa, e muito menos dentro da seringa com agulha, porque o conteúdo pode vazar, além do que o manipulador da amostra pode se ferir com a agulha. É necessário transferir a amostra para um tubo de coleta estéril (Figura 22).

A colheita de secreções presentes em mucosa conjuntival, nasal, oral, prepucial, vaginal, retal, conduto auditivo, abscesso, vesícula, pele e feridas em geral fornecem um material rico para o diagnóstico diferencial, possibilitando a pesquisa microbiológica e caracterização do agente causal. É importante ressaltar que dependendo da suspeita clínica, os suabes devem ser acondicionados em meios de transporte específicos (Figura 23) como indicado no Quadro 3.

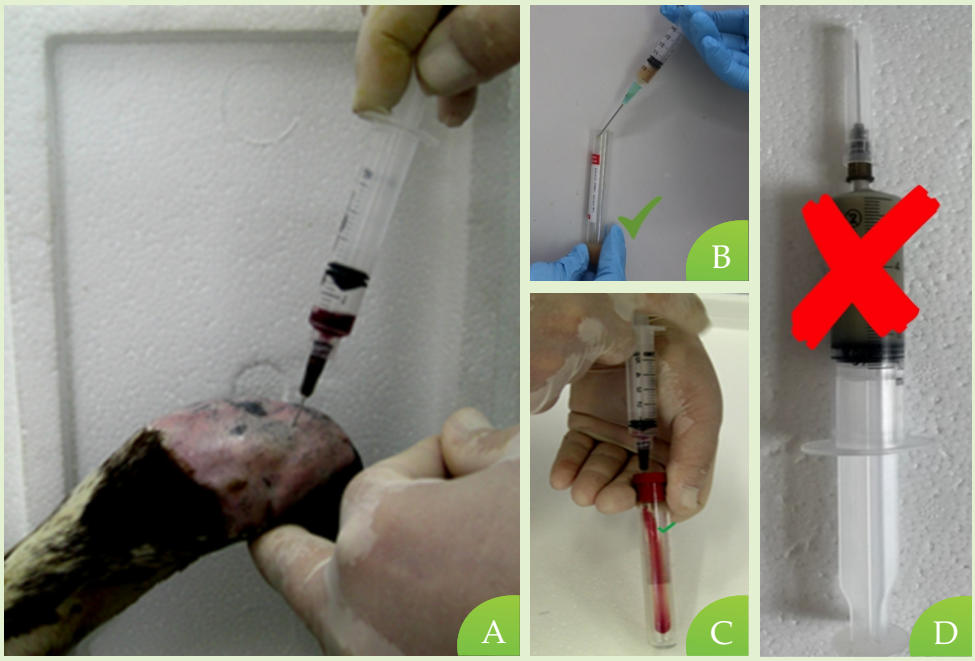


Figura 22. Fluidos e/ou secreções colhidos com agulha e seringa estéreis e descartáveis, transferidos para um tubo identificado e estéril para transporte e diagnóstico microbiológico. (A) Punção articular em caprino. (B e C) Transferência de fluídos para tubo estéril para transporte (correto) e (D) manutenção de amostra em seringa com agulha (errado).

Quadro 3: Meio de transporte indicado de acordo com a suspeita clínica.

Suspeita clínica	Meio de transporte
Bactérias	BHI, Tioglicolato, Stuart, ou meio Cary-Blair
Micoplasmose	A3xB ou meio Frey
Trichomonose Genital Bovina	Lactopep (suabe prepucial e vaginal e lavado prepucial)
Vírus	Essencial Mínimo (MEM) ou soro fisiológico estéril

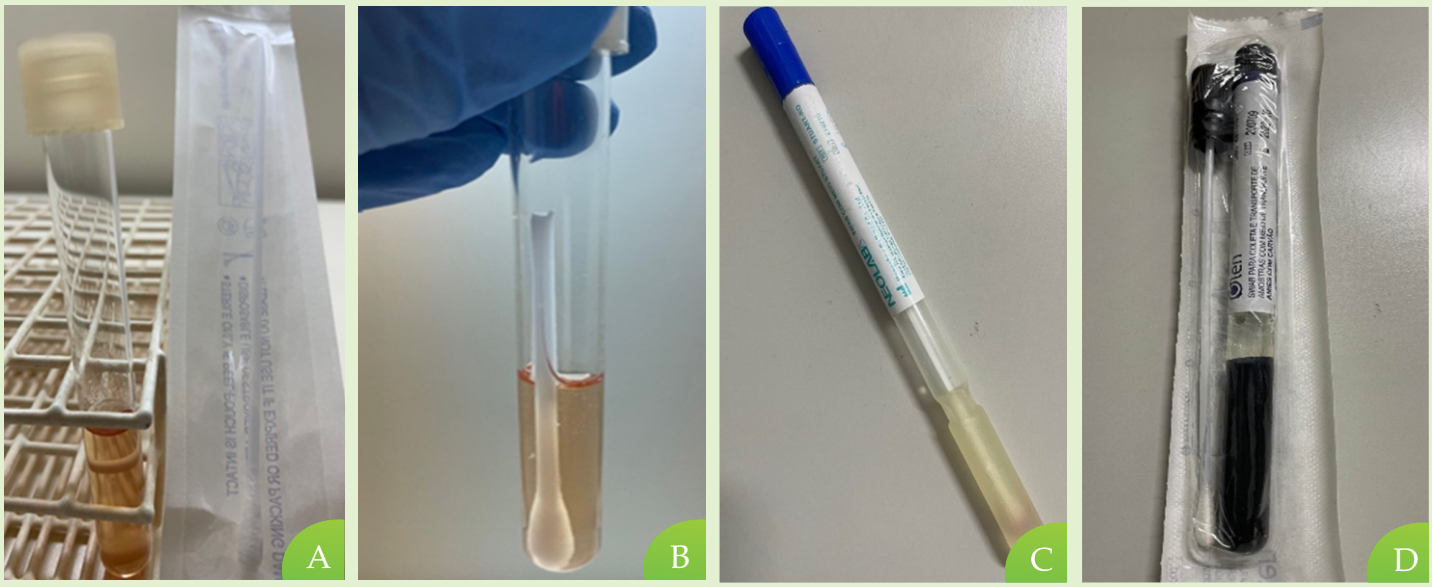


Figura 23. Material para colheita de amostras de suabes com meio de transporte para pesquisa de bactérias. (A) Tubo com meio de transporte Tioglicolato e suabe estéril com haste de plástico e ponta de algodão e (B) após a colheita, suabe comercial com haste plástica imerso no meio de transporte. Suabe comercial com haste plástica e (C) meio de transporte Stuart e (D) Cary-Blair adicionado de carvão ativado (para absorção de toxinas).

PARASITOLOGIA

Amostras fecais para análises parasitológicas devem ser refrigeradas em frascos apropriados e encaminhados rapidamente para o laboratório (Figura 24). O congelamento tem pouco impacto nas análises de flotação e sedimentação (ovos por grama/OPG) mas inviabiliza o método Baermann (coprocultura para maturação e eclosão larval) para análise de larvas de nematoides gastrointestinais ou pulmonares.

Ectoparasitos ou nematoides submetidos para identificação devem ser fixados em recipiente contendo álcool 70%.

Para pesquisa de hematozoários, pode ser enviado sangue em tubo com anticoagulante que deve ser refrigerado e enviado imediatamente ao laboratório.

Figura 24. Amostras fecais, armazenadas em frascos, para análise laboratorial.

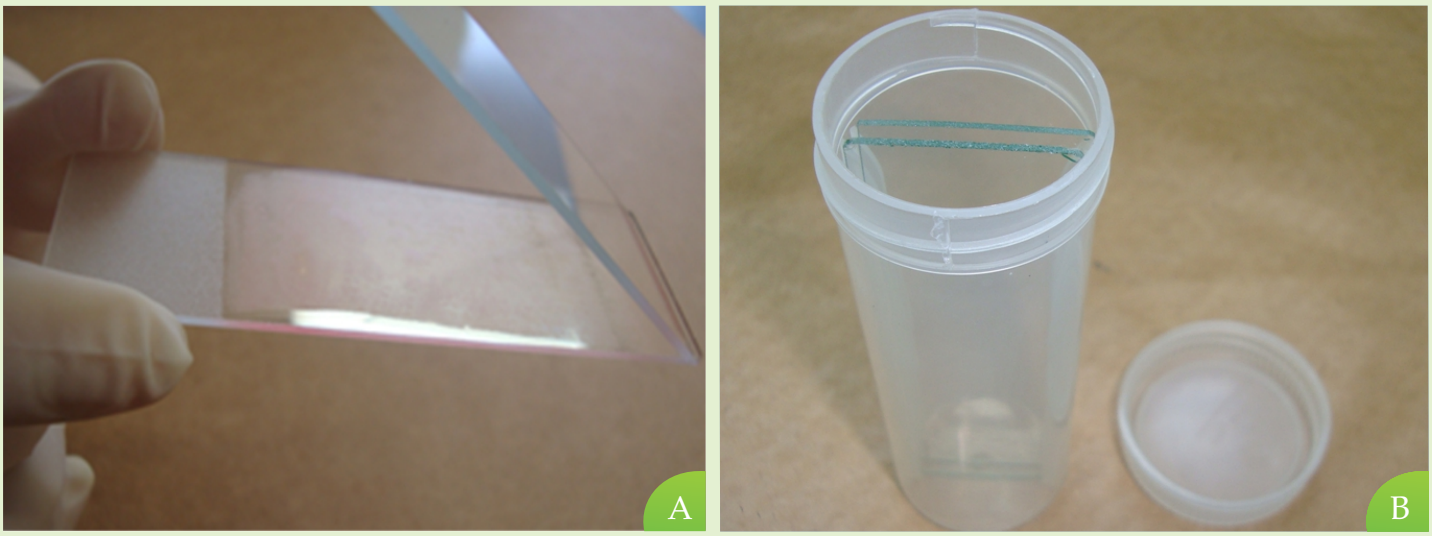


Figura 25. Material de colheita de amostras de esfregaço sanguíneo. (A) Lâmina de esfregaço sanguíneo sendo preparada e (B) frasco de transporte de lâminas.

Indica-se a realização de esfregaços sanguíneos oriundos do sangue imediatamente após a coleta, ou ainda do sangue periférico da margem da orelha ou da cauda. As lâminas devem ser enviadas em frascos de transporte de lâminas (Figura 25).

TOXICOLOGIA

Quando há suspeita de alguma toxina, deve ser solicitado uma análise específica, não há opção de "análise para intoxicação". Uma descrição completa dos achados clínicos e epidemiológicos pode ajudar a diferenciar um quadro de intoxicação de um infeccioso. As amostras para pesquisa de agentes tóxicos geralmente são: *conteúdo estomacal, fígado, rim, sangue total, soro* e *urina*. Em algumas investigações, o diagnóstico requer análise de *alimento* ou *água*.

O Instituto Biológico atualmente não oferece serviços para detecção direta de agentes tóxicos, porém uma análise histopatológica é uma ferramenta auxiliar para indicar um quadro tóxico.

FETO E ANEXOS FETAIS

O feto abortado e a placenta do ruminante consistem em importantíssimo material clínico para o diagnóstico de enfermidades infecciosas e parasitárias da reprodução[2]. Também podem ser enviados natimortos.

A necropsia objetivando o diagnóstico do abortamento deve seguir as recomendações detalhadas na Figura 26, e ilustrado nas Figuras 27 e 28. Os materiais colhidos devem ser acondicionados em frascos estéreis.

Na impossibilidade de se fazer uma necropsia a campo, deve-se enviar o aborto e anexos (cordão umbilical, placenta, cotilédones) em um saco plástico limpo, acondicionar em caixa isotérmica e colocar gelo reciclável para envio ao laboratório de anatomia patológica com a ficha de requisição de exames solicitando a necropsia. Se a logística de colheita e envio for demorada, pode-se congelar o feto antes do despacho, porém o congelamento pode alterar o resultado do exame histopatológico, pois causa artefatos.

O conteúdo abomasal colhido com seringa estéril é um material importante para o diagnóstico diferencial de bactérias (*Brucella* sp.) e protozoários (*Tritrichomonas foetus*) causadores de abortamentos[3]. O líquido torácico, abdominal e ou do saco pericárdico

devem ser colhidos com seringa estéril e são materiais importantes para detecção de anticorpos e/ou antígenos (Figura 28).

Outro órgão chave para o diagnóstico de diversas doenças infectocontagiosas é o timo (Figura 29). Por este se tratar de um órgão linfoide responsável pela maturação de linfócitos (Linfócitos T), torna-se um ambiente favorável para a para a replicação de agentes virais com tropismo para os linfócitos T. Um exemplo é o vírus da BVD.

O sangue e soro sanguíneo maternos são amostras que, em alguns casos, auxiliam no diagnóstico das doenças reprodutivas, visto que possibilita a confirmação sorológica em ambos os indivíduos envolvidos no quadro patológico (mãe e feto), exceto em casos nos quais a fêmea apresenta histórico vacinal, ou quando se trata de alguma enfermidade parasitária (ex: neosporose) e bacteriana (ex: brucelose) em decorrência da flutuação de anticorpos na mãe. Em casos de surtos de abortamento, pode ser realizado um estudo sorológico no

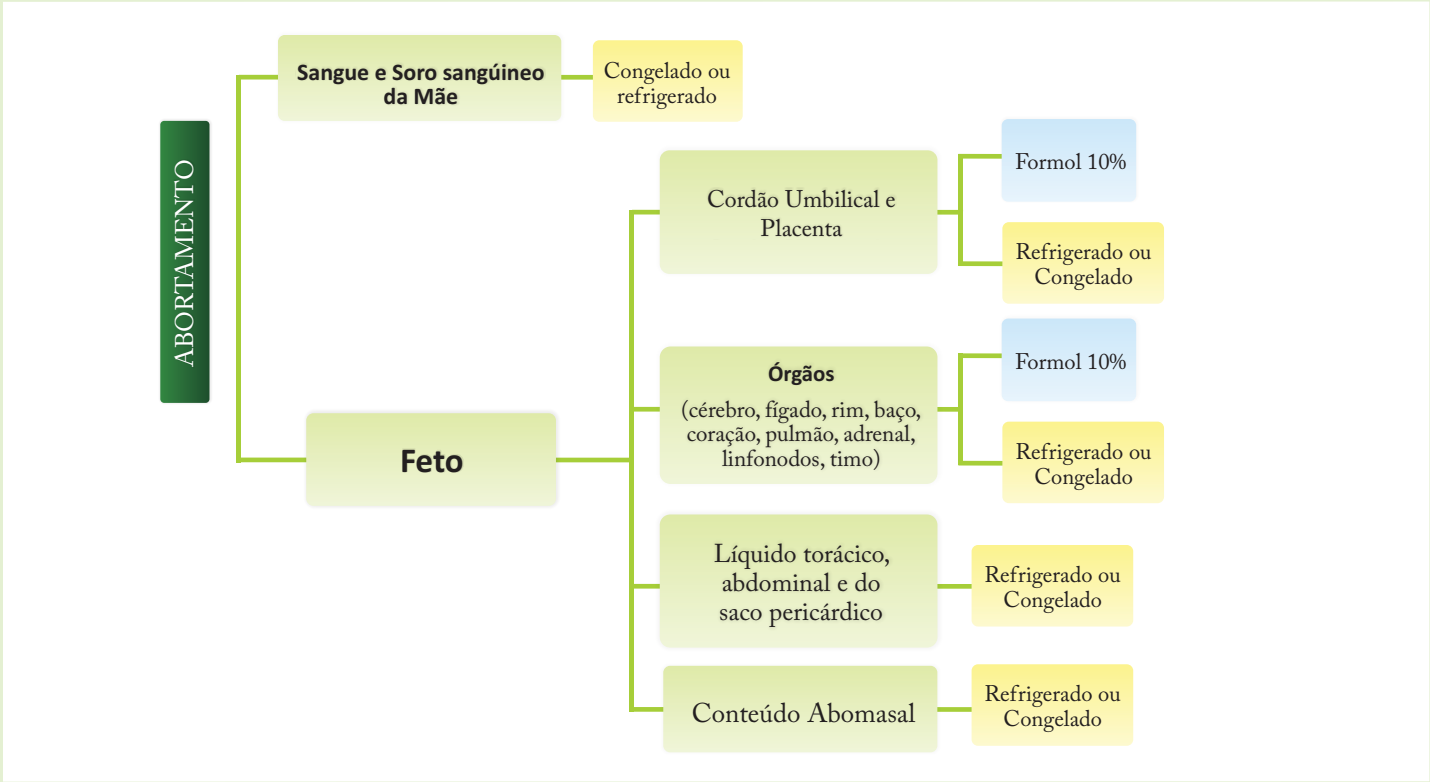


Figura 26. Esquema para colheita básica de amostras em caso de abortamento para análise laboratorial.

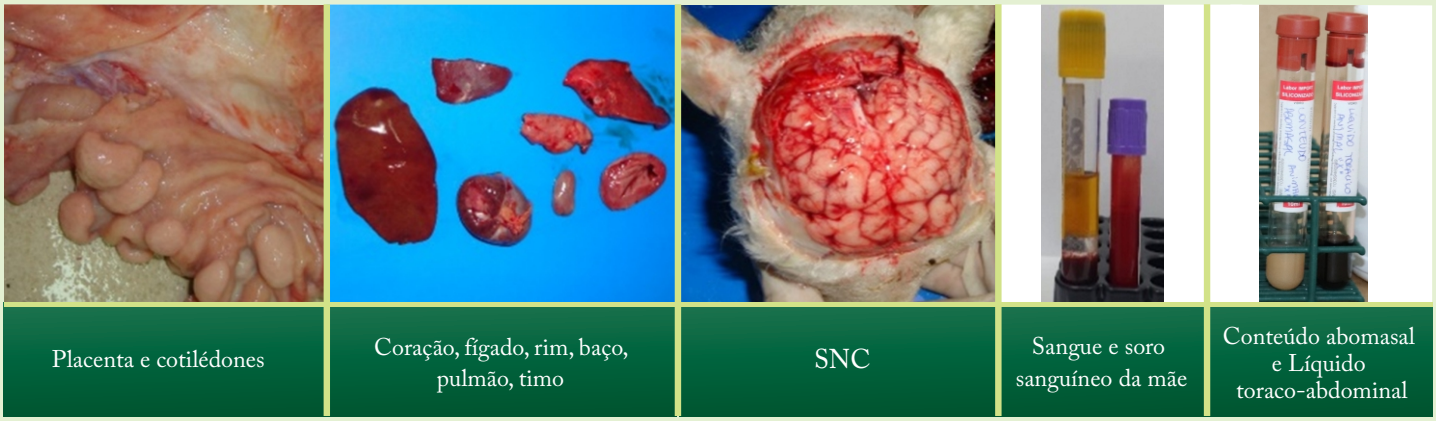


Figura 27. Materiais colhidos em caso de abortamento.

Colheita de conteúdo abomasal
Colher assepticamente com seringa estéril (10mL)

Colheita de líquido torácico
Colher assepticamente com seringa estéril (10mL)

Forma de acondicionamento para envio de amostras para diagnóstico microbiológico/molecular e histopatológico.

Figura 28. Esquema para colheita e envase de materiais fetais.

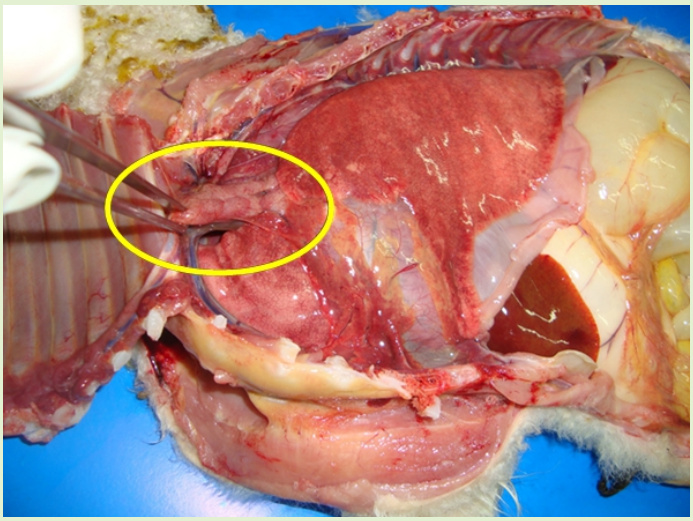


Figura 29. Colheita de timo durante necropsia de cordeiro.

rebanho comparando-se resultados de outras fêmeas que abortaram e não abortaram no mesmo lote.

COLHEITA DE SNC PARA RAIVA, ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS E DIFERENCIAIS

As encefalites e encefalopatias em ruminantes constituem um grupo de enfermidades importantes, geralmente fatais, causando fortes impactos na saúde pública e grandes perdas econômicas no mundo todo. Por meio do diagnóstico diferencial de enfermidades neurológicas que acometem ruminantes é possível auxiliar os órgãos de defesa sanitária na tomada de medidas especificas de combate a essas doenças. A Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) é barreira sanitária ao comércio internacional de animais e subprodutos[4].

O sistema de vigilância sanitária das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET's) (EEB e Paraplexia Enzoótica dos Ovinos/*Scrapie*) no Brasil é realizado conjuntamente ao sistema de vigilância sanitária da raiva animal, fazendo parte do Programa Nacional de Controle da Raiva e Encefalopatia Espongiforme Bovina[5]. Desta forma, bovinos, bubalinos, ovinos e caprinos com sintomatologia nervosa de caráter progressivo deverão ser submetidos ao diagnóstico diferencial para raiva, outras encefalites e EET's. Estas normas visam incrementar medidas de vigilância epidemiológica especificas para manter e preservar a condição de país livre da EEB.

O manual "Procedimentos para vigilância de doenças nervosas em ruminantes a campo - Raiva e encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET's)[6] é a publicação mais recente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que descreve passo a passo como colher, acondicionar e enviar amostras de SNC ao laboratório, atendendo ao Programa

Nacional de Controle da Raiva e Encefalopatia Espongiforme Bovina[5]. Alertamos que todas as normas de vigilância e colheita de material encefálico devem ser constantemente verificadas, pois sofrem atualizações periódicas.

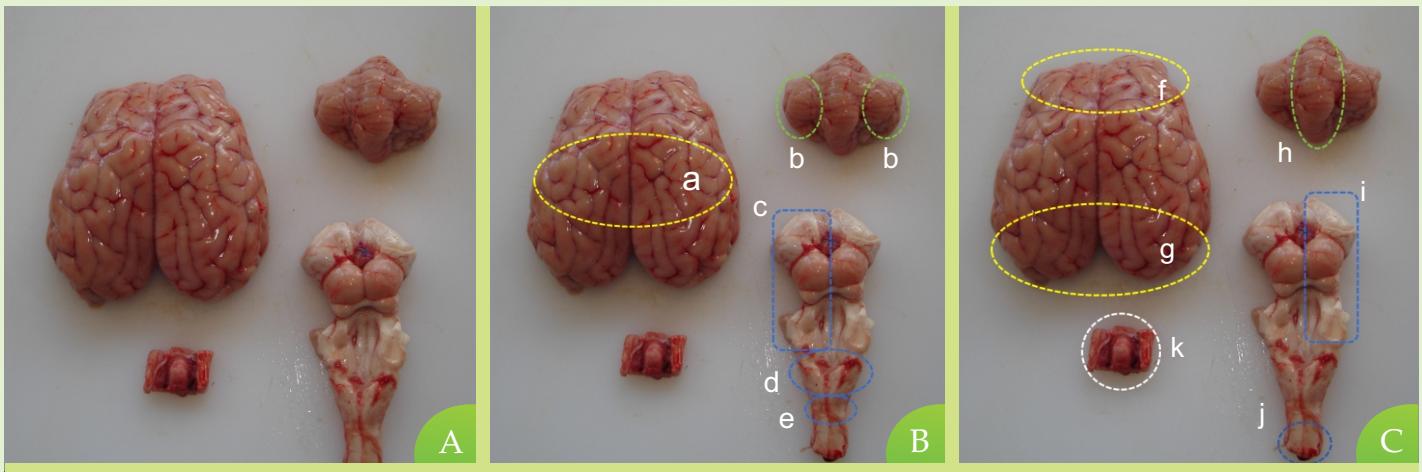
Os principais pontos críticos que prejudicam a avaliação do SNC de animais com síndrome neurológica são a autólise (demora na colheita, envio, baixa refrigeração e/ou má fixação das amostras) e o não envio da porção anatômica mais importante para o diagnóstico das EET´s (óbex refrigerado ou congelado).

É obrigatório o preenchimento do Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica (FORM SN)[7](clique aqui para acessar) , que deve ser enviado protegido por saco plástico fixado do lado externo da embalagem terciária.

A seguir apresentamos as porções anatômicas de SNC para o diagnóstico laboratorial de raiva, EET´s e diferenciais neurológicos (Figura 30)[6]. O veterinário deve enviar ao laboratório de raiva as porções de SNC para o diagnóstico de raiva e EET´s (Figura 30B). Também deve-se fracionar as porções necessárias para os laboratórios que fazem o diagnóstico diferencial neurológico, segundo a Figura 30C.

Além do SNC, outros materiais podem ser utilizados no diagnóstico diferencial de síndromes neurológicas, tais como: conteúdo ruminal para diagnóstico de botulismo e colheita básica de órgãos para outras análises.

O diagnóstico de síndrome neurológica segue um fluxograma (Figura 31). Raiva deve ser sempre a



Colheita de SNC para análise laboratorial

(todas as porções refrigeradas ou congeladas)

Raiva

a - Diencéfalo contendo o hipocampo
b - Fragmento do cerebelo
c - Fragmento do tronco encefálico (sem óbex)
d - Medula espinhal
• EET's
e - Óbex
b - Fragmento do cerebelo

Diferenciais Neurológicos

f - Córtex frontal
g - Córtex occipital
h - Fragmento do Cerebelo (verme cerebelar)
i - Fragmento do tronco encefálico (sem óbex)
j - Fragmento de medula espinhal
k - Rede admirável carotídea, hipófise e gânglios trigêmeos

Figura 30. Colheita de fragmentos de SNC. (A) Diagnóstico de doenças neurológicas, (B) diagnóstico de Raiva e EET's e (C) diagnósticos diferenciais neurológicos.

primeira análise laboratorial a ser realizada no SNC. Se o resultado para essa enfermidade for negativo, o laboratório de raiva deverá separar e enviar para o LANAGRO (Laboratório Nacional Agropecuário) em Pernambuco os fragmentos para o diagnóstico de EET´s de bovinos e bubalinos com idade superior a dois anos, e de pequenos ruminantes acima de um ano. As porções restantes do SNC que não forem utilizadas para raiva e EET`s, bem como outros tecidos, devem ser encaminhadas para os laboratórios que realizam diagnóstico diferencial de síndrome neurológica.

Se a amostra do SNC chegar ao laboratório em até 24 horas após a colheita, deve ser mantido e transportado refrigerado (2 a 8ºC). Se esse período exceder quatro horas, deve ser congelado (-20ºC).

Vídeo - Procedimentos para a abertura do crânio e coleta do SNC

ACONDICIONAMENTO E ENVIO DE AMOSTRAS PARA O LABORATÓRIO

Outro procedimento importante é a utilização de embalagens (primária, secundária, intermediária e terciária) (Figura 32) para o transporte das amostras até o laboratório. A amostra é inicialmente colocada numa embalagem primária apropriada (tubo, frasco coletor etc.), que deve estar envolvida por uma manta absorvente para conter vazamentos. Notar que itens como seringas e containers sem orifícios vendáveis não são apropriados para o transporte. Esse então é acondicionado numa embalagem secundária prevenindo o vazamento da embalagem primária, como por exemplo: saco plástico tipo "*zip lock*" ou um frasco maior (plástico ou metal). No frasco contendo formol 10%, além da utilização de uma tampa com rosca, deve-se reforçar a

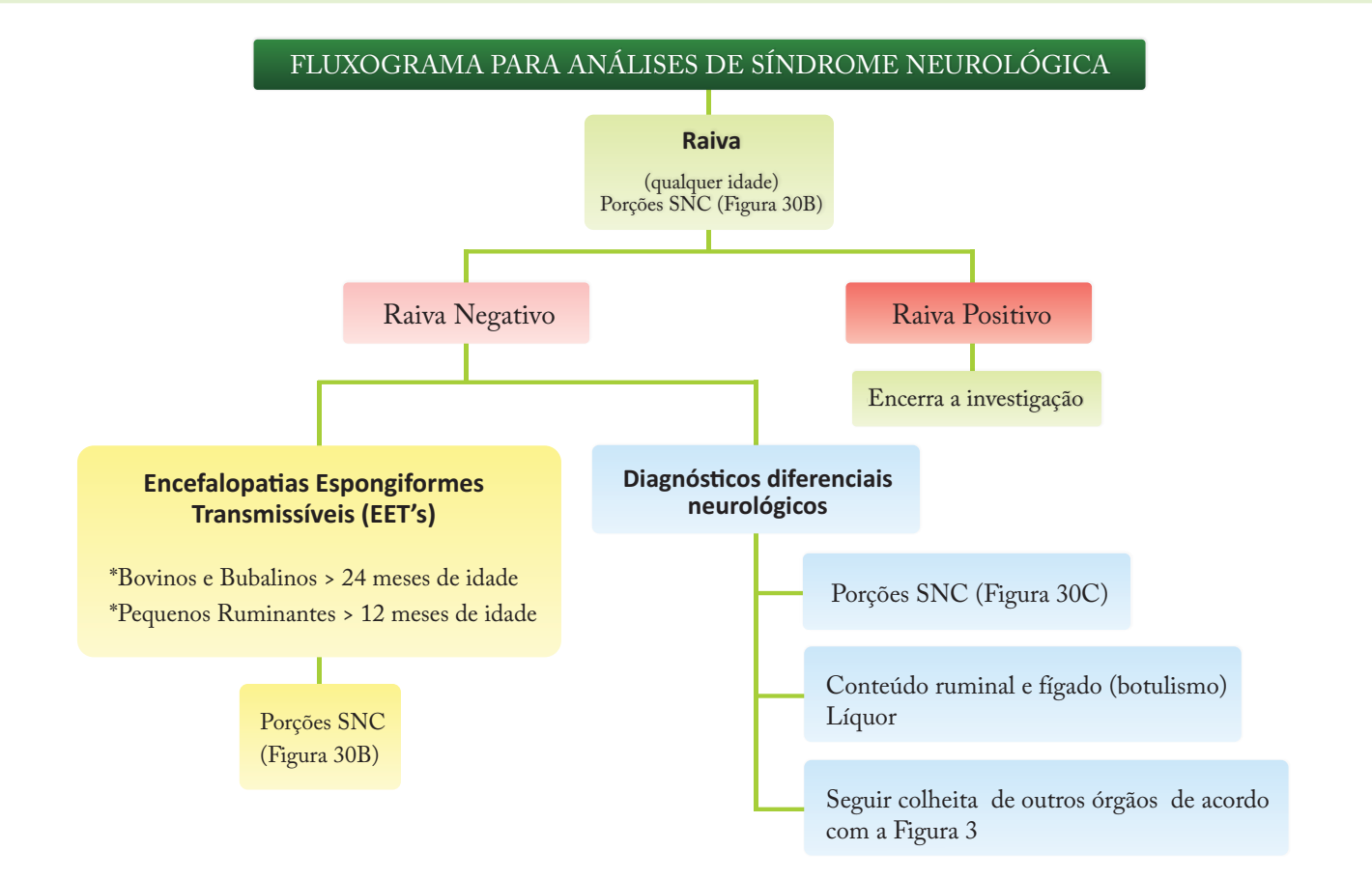


Figura 31. Fluxograma para análise de síndrome neurológica. Diagnóstico de Raiva, Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis e diferenciais.

prevenção de vazamento passando uma fita crepe ou parafilme ao redor da tampa, podendo ainda envolver o frasco com mais um saco plástico (embalagem secundária).

Caneta marcadora a prova d´água deve ser utilizada para identificação dos sacos/tubos e containers, pois o conteúdo e identificação do animal são informações críticas para o laboratório. Posteriormente, o container secundário é colocado numa embalagem isotérmica (embalagem intermediária) que normalmente irá acondicionar unidades refrigerantes (ex: gelo reciclável, gelo seco) assim como materiais para amortecimento (ex: papel toalha, jornal, flocos de isopor) para proteção da amostra. Essas unidades refrigerantes não devem ser colocadas diretamente em contato com as amostras como tubos de sangue total nem com o frasco contendo os tecidos em formol, pois a amostra pode sofrer efeito adverso se congelada durante o trânsito. É importante ressaltar também que não seja utilizado gelo comum, pois derreterá durante o transporte, danificando a qualidade e esterilidade das amostras. A embalagem terciária é uma caixa de papelão devida-

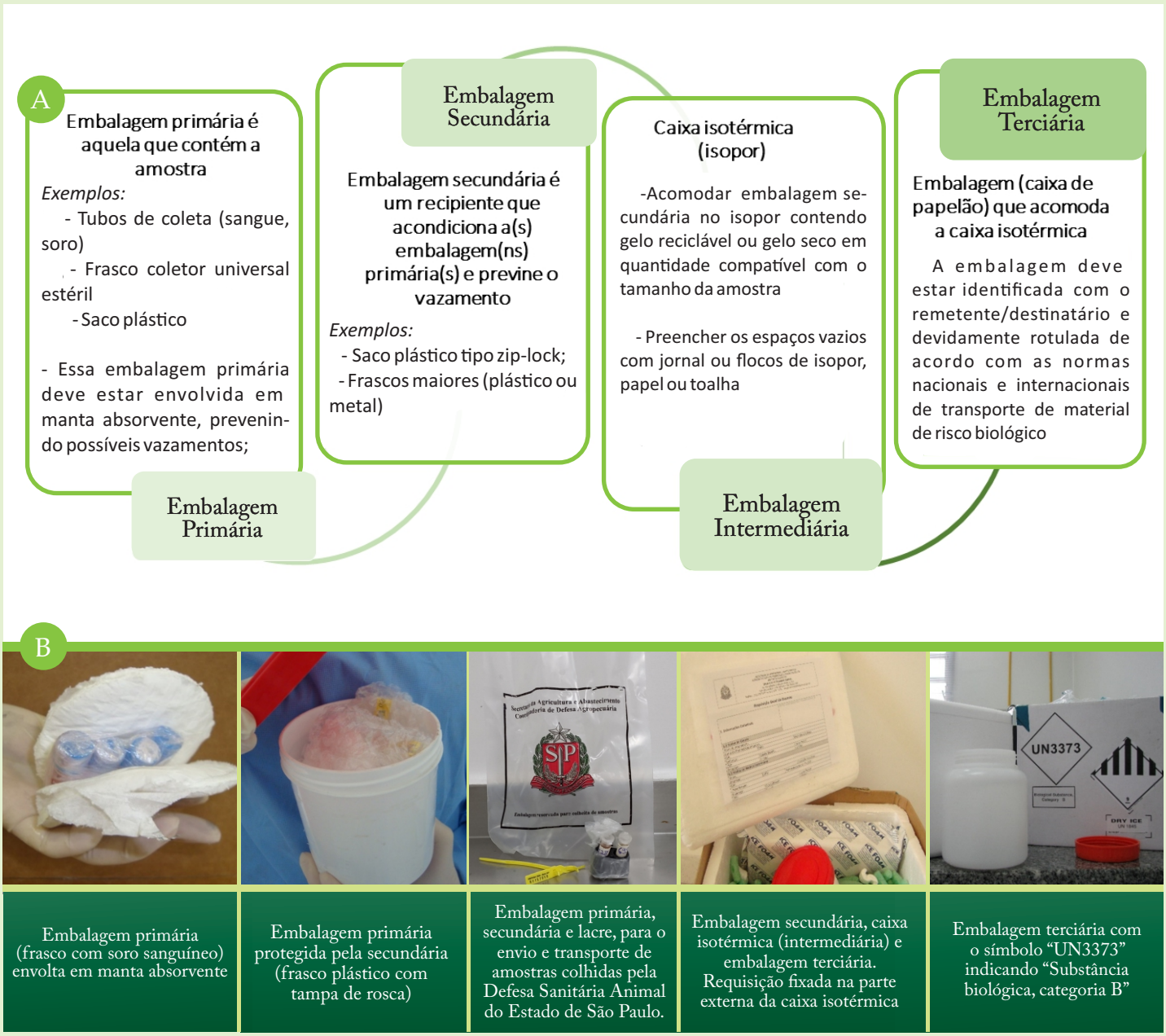


Figura 32. Envio de amostras biológicas. (A) Esquema de composição de embalagens (três barreiras) para transporte de amostras biológicas e (B) exemplos de embalagens primárias, secundárias e terciária.

mente identificada que acondiciona e protege a caixa isotérmica. Se utilizado gelo seco, essa informação deve estar destacada na parte externa da caixa e a tampa não deve ser vedada com fita, pois a liberação de CO_2 pelo gelo seco poderia aumentar a pressão e danificar a embalagem e seu conteúdo. O formulário de requisição das análises deve ser enviado protegido em saco plástico fixado do lado externo da embalagem terciária.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É imprescindível que o material clínico ou de necropsia sejam bem colhido, identificado, acondicionado e encaminhado para análise. As amostras devem ser enviadas com o formulário de solicitação de análise laboratorial totalmente preenchido, direcionando para a provável doença que possa estar associada ao histórico clínico e epidemiológico. Com esses cuidados, espera-se obter maior sucesso na identificação do agente suspeito, e caso isso não ocorra, permitirá que outras causas possam ser investigadas.

MATERIAL COMPLEMENTAR

MAPA/OPASPANAFTOSA. Manual veterinário de colheita e envio de amostras: manual técnico. Rio de Janeiro: PANAFTOSA - OPAS/OMS, 2010. Série de Manuais Técnicos, 13, 218p.

REFERÊNCIAS

1. PEIXOTO, P.V.; BARROS, C.S.L. A importância da necropsia em medicina veterinária. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.18, n.3-4, p.45-46, 1998.

2. DEL FAVA, C. et al. Diagnóstico diferencial de doenças da reprodução em bovinos: experiência do Instituto Biológico. *O Biológico*, v.69, n.2, p.73-79, 2007.

3. GENOVEZ, M.E et al. Isolamentos bacterianos de fetos abortados bovinos examinados no Instituto Biológico de São Paulo, no período de 1985 a 1992. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, v.30, n.2, p.107-112, 1993.

4. OIE - WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Terrestrial Animal Health Code 2021. Disponível em: https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmfile=chapitre_bse.htm.

5. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Controle da Raiva e Encefalopatia Espongiforme Bovina. Atualizado em 18/05/2020. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/prog-nacional-de-controle-da-raiva-dos-herbivoros-e-outras-

encefalopatias>.

6. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Procedimentos para Vigilância de doenças Nervosa em Ruminantes a campo. Raiva e Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis – EET. Sem data. Disponível em: https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/202007/27100642-procedimento-colheita-envio-amostras.pdf

7. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. FORM SN, 2016. Disponível em: https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201803/27113601-pncrh-form-sn-jan2016.pdf