



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Secretaria de Defesa Agropecuária

Departamento de Saúde Animal e Insumos Pecuários

Coordenação-geral de Sanidade Animal

Coordenação de Animais Terrestres

Divisão de Sanidade das Aves

**MANUAL DE COLHEITA, ARMAZENAMENTO E
ENCAMINHAMENTO DE AMOSTRAS**

Programa Nacional de Sanidade Avícola

**BRASÍLIA
MAPA
2020**

@2020 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Todos os direitos reservados. Permitida a reprodução parcial ou total desde que citada a fonte e que não seja para a venda ou qualquer fim comercial. A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é do autor.

1° edição: Ano 2020

Elaboração e informações:

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Secretaria de Defesa Agropecuária

Departamento de Saúde Animal e Insumos Pecuários

Endereço: Esplanada dos Ministérios, Bloco D – 3° andar, Sala 322-A

CEP: 70043-900

Brasília – DF

Tel: (61) 3218 – 2780 / 3218 -2782 / 3218-3039

e-mail: pnsa@agricultura.gov.br



SUMÁRIO

1.Introdução	3
2.Tipo de suabe utilizado para a colheita de amostras	4
3.Colheita e acondicionamento de material	4
Item 1. Colheita e acondicionamento de soro- instruções gerais	5
Item 2. Colheita e acondicionamento de órgãos- instruções gerais.....	5
Item 2.1. Colheita e acondicionamento de soro- instruções adicionais para salmonelas.....	5
Item 2.2. Colheita e acondicionamento de soro- instruções adicionais para influenza aviária e doença de Newcastle	5
Item 2.3. Colheita e acondicionamento de soro- instruções adicionais para laringotraqueíte infecciosa aviária	6
Item 3. Colheita e acondicionamento de ovos bicados- instruções gerais.....	6
Item 4. Colheita e acondicionamento de suabes - instruções gerais.....	6
Item 4.1. Colheita e acondicionamento de suabes - instruções adicionais para salmonelas	6
Item 4.2. Colheita e acondicionamento de suabes - instruções adicionais para micoplasmas ...	6
Item 4.3. Colheita e acondicionamento de suabes - instruções adicionais para influenza aviária, doença de Newcastle e laringotraqueíte infecciosa aviária	6
Item 5. Colheita e acondicionamento de fezes frescas e mecônio - instruções gerais	7
4. Meios de transporte	7
Item 1. Meios de transporte para salmonelas	7
Item 2. Meios de transporte para micoplasmas	8
Item 3. Meios de transporte para influenza aviária, doença de Newcastle e laringotraqueíte infecciosa aviária	8
5. Manutenção da cadeia de frio	8
Item 1. Manutenção da cadeia de frio - instruções adicionais para salmonelas e micoplasmas .	9
Item 2. Manutenção da cadeia de frio - instruções adicionais para influenza aviária, doença de Newcastle e laringotraqueíte infecciosa aviária	9
6. Encaminhamento de amostras	10
7. Considerações finais	10



1. INTRODUÇÃO

O objetivo deste manual é orientar o Serviço Veterinário Oficial na colheita, armazenamento e encaminhamento de amostras destinadas ao diagnóstico das doenças contempladas no Programa Nacional de Sanidade Avícola- PNSA, originárias dos atendimentos de vigilância ativa e passiva.

Considerando que a confiabilidade dos ensaios realizados para o diagnóstico laboratorial das doenças animais é criticamente dependente da qualidade e adequação das amostras colhidas para análise, vimos por meio deste reforçar e atualizar as orientações sobre os tipos de materiais a serem empregados para a colheita de amostras que se destinam ao diagnóstico das doenças contempladas no PNSA, assim como sobre a importância do acondicionamento e manutenção da cadeia de frio durante o processo de transporte de amostras.

Tais orientações se fazem necessárias a fim de se evitar a possibilidade de detecção de inadequações em materiais encaminhados aos laboratórios pelo Serviço Veterinário Oficial (SVO), para o diagnóstico das doenças contempladas no PNSA. Dentre as inadequações que podem ser encontradas, destacam-se as seguintes:

- ✓ Acondicionamento das amostras em meios de transporte inadequados para as análises solicitadas;
- ✓ Encaminhamento de amostras sem meio de transporte;
- ✓ Evidência de hemólise, lipemia ou contaminação bacteriana em amostras de soro;
- ✓ Encaminhamento de amostras em estado de decomposição;
- ✓ Temperatura inadequada para as análises solicitadas;
- ✓ Utilização de material inadequado para colheita de amostras (suabes de madeira, por exemplo).
- ✓ Envio de material inadequado para a análise solicitada

Inadequações como as mencionadas inviabilizam a realização dos ensaios, levando ao descarte das amostras encaminhadas e, conseqüentemente, trazendo prejuízo às ações de Defesa Sanitária Animal.



2. TIPO DE SUABE UTILIZADO PARA A COLHEITA DE AMOSTRAS

De acordo com referências internacionais (Fereidouni et al., 2012; Spackman et al., 2013; Takeuti et al., 2017), os suabes mais adequados para colheita de amostras destinadas aos ensaios moleculares e convencionais, em ordem de desempenho, são:

- ✓ Suabes de nylon flocado;
- ✓ Suabes de espuma de poliuretano;
- ✓ Suabes de poliéster não flocado (ex.: Dracon), todos com haste plástica quebrável; e
- ✓ Suabes de rayon com haste plástica.

Os 3 primeiros suabes, devido a características inerentes aos produtos e técnicas utilizados para sua confecção, permitem a rápida absorção e fácil liberação das células aderidas a sua superfície. Na impossibilidade de utilização de um destes 3 primeiros tipos de suabes, pode-se optar pelo uso dos suabes de rayon com haste plástica.

Na produção dos tradicionais suabes de algodão com haste de madeira são utilizadas substâncias que podem interferir seriamente no desempenho dos testes laboratoriais empregados, prejudicando a sensibilidade dos mesmos e podendo gerar resultados falso-negativos. Portanto, suabes de algodão, suabes alginatados e suabes com haste de madeira não devem ser empregados, sendo considerados inadequados para análise e rejeitados.

3. COLHEITA E ACONDICIONAMENTO DE MATERIAL

COMO FAZER?

Durante o processo de colheita de amostras, deve ser dada especial atenção à contenção e ao acondicionamento dessas, incluindo a adoção de medidas de segurança biológica que visam evitar a contaminação do meio ambiente e a exposição de outros animais e seres humanos a materiais potencialmente infecciosos, além de prevenir a contaminação cruzada entre amostras. O acondicionamento de amostras em materiais inadequados oferece risco à saúde do pessoal envolvido na embalagem, transporte e manipulação laboratorial das amostras, em virtude da possibilidade de extravasamento do conteúdo por quebra de frascos ou insuficiente vedação da tampa.

Não se recomenda a utilização de frascos do tipo “coletor universal”, uma vez que esses não possuem vedação adequada, nem a utilização de frascos de vidro, uma vez que pode haver quebra dos recipientes durante o transporte, expondo o pessoal envolvido com a manipulação do material a acidentes. Portanto, o envio de amostras nesses materiais deve ser evitado.

As amostras devem ser lacradas com lacres plásticos numerados e invioláveis, além de embaladas de forma a seguirem os parâmetros e regras relativos ao manuseio e transporte de amostras biológicas, sempre visando o cumprimento das normas de biossegurança e bioproteção. Para tanto, recomenda-se fortemente a utilização de sistema de tripla embalagem padronizada pela **International Air Transport Association (IATA Packing Instruction I 650)**.

ITEM 1: Colheita e acondicionamento de soro - instruções gerais



As amostras de soro devem ser acondicionadas individualmente em frascos ou microtubos plásticos inquebráveis. Não encaminhar amostras de soro em frascos quebráveis ou seringas.

Quando forem colhidas amostras de soro de mais de uma espécie de ave, é importante que a identificação da espécie seja inserida no frasco.

Amostras de soro lipêmicas, hemolisadas e contaminadas devem ser descartadas na origem.

Quando possível, colher de 3 a 5% a mais de amostras de soro para compensar aquelas que possam vir a ser descartadas.

Não encaminhar amostras de sangue total ao laboratório. Frascos, microtubos ou seringas contendo sangue total são descartados.

ITEM 2: Colheita e acondicionamento de órgãos - instruções gerais

Os órgãos devem ser encaminhados em fragmentos de 3 a 4 cm³ para cada órgão, sendo esta quantidade suficiente para o diagnóstico das doenças. Não é recomendado o encaminhamento de órgãos inteiros.

Os órgãos devem ser enviados em *pools* por sistemas orgânicos, sem que sejam misturados no mesmo *pool* órgãos de sistemas diferentes (ex.: *pool* de órgãos do sistema digestório, *pool* de órgãos do sistema respiratório, *pool* de órgãos do sistema respiratório, etc.).

Recomenda-se a utilização de sacos para amostragem estéreis, com fechamento em fio de aço inox revestido ou similar, ou uso de frascos ou tubos plásticos inquebráveis com fechamento hermético, como do tipo Falcon.

Os órgãos podem ser encaminhados aos laboratórios em meios de transporte, refrigerados ou congelados, conforme orientações específicas para cada agente, detalhados nos itens 3 (Meios de Transporte) e 4 (Manutenção da Cadeia de frio).

ITEM 2.1: Colheita e acondicionamento de órgãos - instruções adicionais para salmonelas

Para amostras destinadas ao diagnóstico de salmonelas, recomenda-se o encaminhamento de uma quantidade aproximada de 8 gramas por *pool* de órgãos.

Para o diagnóstico dos sorovares contemplados no PNSA os órgãos de eleição são: fígado, baço, ovários e ovidutos e tonsilas cecais. Os órgãos podem ser agrupados separadamente em *pools* de até 5 aves.

ITEM 2.2: Colheita e acondicionamento de órgãos - instruções adicionais para influenza aviária e doença de Newcastle

Para influenza aviária e doença de Newcastle devem ser colhidos os seguintes materiais, dando preferência à colheita de fragmentos de áreas com lesões macroscópicas:

- ✓ *Pool* de órgãos do sistema digestório: fragmentos de intestino delgado e de ceco com tonsilas cecais;
- ✓ *Pool* de órgãos do sistema respiratório: fragmentos de traqueia e de pulmões; e
- ✓ *Pool* de órgãos do sistema nervoso: fragmentos de cérebro e de cerebelo.

ITEM 2.3: Colheita e acondicionamento de órgãos - instruções adicionais para laringotraqueíte infecciosa aviária

Para amostras destinadas à pesquisa do vírus da laringotraqueíte infecciosa aviária por técnicas de biologia molecular (PCR ou qPCR) ou isolamento viral, recomenda-se que não sejam encaminhadas ao laboratório as cabeças inteiras.



A necropsia deve ser realizada na propriedade e os fragmentos dos órgãos de eleição (traqueia, pulmão e gânglios trigêmeos) devem ser encaminhados preferencialmente em tubos plásticos.

ITEM 3: Colheita e acondicionamento de ovos bicados - instruções gerais

Os ovos bicados devem ser acondicionados em *pools* de no máximo 30 ovos bicados/*pool*.

As amostras devem ser enviadas refrigeradas e sem meio de transporte.

ITEM 4: Colheita e acondicionamento de suabes - instruções gerais

Os suabes devem ser mantidos úmidos, acondicionados em frascos ou tubos plásticos inquebráveis, com boa vedação para minimizar a ocorrência de acidentes e o risco de exposição humana a agentes infecciosos, e conter o meio de transporte recomendado.

ITEM 4.1: Colheita e acondicionamento de suabes - instruções adicionais para salmonelas

Para a colheita de suabes de cloaca, recomenda-se que sejam feitos *pools* de até 50 suabes de cloaca em com 1 ml de meio de transporte por suabe.

Para colheita de suabes de arrasto ou propés, umedecer previamente a superfície de colheita com água peptonada tamponada a 1% ou solução fisiológica. Deve-se garantir que todas as áreas do galpão sejam amostradas, de modo que cada metade dos suabes de arrasto ou propés represente cerca de 50% da superfície da instalação. Após a colheita, os propés (virados ao contrário para não remover o material aderido) e suabes de arrasto devem ser colocados em saco plástico ou outro recipiente devidamente identificado e, preferencialmente, contendo meio de transporte. O material utilizado para suabe de arrasto também poderá ser utilizado para suabe de fundo de caixa realizado no alojamento de pintinhos.

A partir da mesma amostra pode ser feita a análise para todos os sorovares de salmonelas contemplados no PNSA, portanto, não é necessário o envio de alíquotas separadas para cada um dos agentes.

ITEM 4.2: Colheita e acondicionamento de suabes - instruções adicionais para micoplasmas

Para o diagnóstico de micoplasmas recomenda-se que sejam feitos *pools* de até 2 suabes de traqueia em 3 ml de meio de transporte.

A partir da mesma amostra pode ser feita a análise para todas as espécies de micoplasmas contempladas no PNSA, portanto, não é necessário o envio de alíquotas separadas para cada um dos agentes.

ITEM 4.3: Colheita e acondicionamento de suabes - instruções adicionais para influenza aviária, doença de Newcastle e laringotraqueíte infecciosa aviária

Os suabes de traqueia ou orofaríngeos são os materiais de eleição para detecção de influenza aviária em aves de produção, enquanto os suabes cloacais são os preferenciais para detecção em aves aquáticas. Tendo em vista as particularidades de cada espécie e de cada ensaio laboratorial empregado, sugere-se que sempre sejam colhidos suabes de cloaca e de traqueia, independente da espécie a ser amostrada.

Amostras oriundas de aves silvestres ou migratórias, aquáticas ou não, devem ser acondicionadas, preferencialmente, de forma individual, uma vez que estas espécies podem albergar mais de um subtipo viral e a formação de *pools* contendo material de mais de uma ave pode inibir a detecção de um ou mais subtipos.



Os suabes podem ser acondicionados individualmente (1 suabe de traqueia ou de cloaca/microtubo) ou em *pools*, com meios de transporte.

Para vigilância ativa, os *pools* devem ser constituídos por, no máximo, 10 suabes/*pool* excetuando a vigilância ativa em sítios de aves migratórias. Para a vigilância passiva, os *pools* deverão ser de, no máximo, 5 suabes/*pool*.

No momento da constituição dos *pools* é importante que seja mantida a proporção de 1 suabe/ml de meio de transporte e que os suabes de cloaca e de traqueia sejam agrupados separadamente.

ITEM 5: Colheita e acondicionamento de fezes frescas e mecônio - instruções gerais

Para a colheita de fezes frescas (preferencialmente cecais) e mecônio, as amostras devem ter aproximadamente um grama cada e devem ser acondicionadas em *pools* de no máximo 300 amostras/*pool*.

As amostras devem ser colhidas em diferentes pontos distribuídos ao longo do galpão, enviadas refrigeradas e sem meio de transporte.

4. MEIOS DE TRANSPORTE

Os suabes devem ser sempre acondicionados em meio de transporte, uma vez que a detecção do ácido nucleico e/ou a recuperação do microrganismo podem ser prejudicadas se os suabes forem mantidos e transportados secos.

Adicionalmente, é importante atentar-se para o tipo e a proporção de meio de transporte a ser utilizado para a colheita e transporte das amostras. Dessa forma, devem ser atendidas as especificações dos meios para cada tipo das doenças contempladas pelo PNSA, além de se manter a proporção adequada de suabes/ml de meio de transporte.

Os meios de transporte devem ser adicionados nos frascos ou tubos plásticos de modo a recobrir totalmente os órgãos colhidos.

A seguir estão os meios de transportes a serem utilizados para as doenças contempladas pelo PNSA, ressaltando-se que outros meios podem ser utilizados mediante prévia consulta e aprovação do DSA.

QUAL MEIO UTILIZAR?

ITEM 1: Meios de transporte para salmonelas

- ✓ Água peptonada tamponada 1%; ou
- ✓ Solução fisiológica.

ITEM 2: Meios de transporte para micoplasmas

- ✓ Caldo Frey

ITEM 3: Meios de transporte para influenza aviária, doença de Newcastle e laringotraqueíte infecciosa aviária

- ✓ Meio MEM (Meio Essencial Mínimo);
- ✓ Caldo BHI (*Brain Heart Infusion*);



- ✓ Caldo TPB (Caldo Triptose Fosfato Tamponado); ou
- ✓ Meio de transporte universal para vírus (*Universal Transport Medium* - UTM ou *Viral Transport Medium* - VTM).

Todos os meios devem conter antibióticos e devem ser formulados de acordo com o Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle.

Em casos de investigação de suspeitas prováveis de influenza aviária ou doença de Newcastle em que os meios de transporte preconizados não estejam disponíveis, os suabes poderão, excepcionalmente, ser acondicionados em solução salina tamponada com fosfato (PBS pH 7 - 7.2) ou em solução salina para lentes de contato (solução simples, não desinfetante). Como os resultados dos testes laboratoriais podem ser alterados pelo uso dessas soluções, salienta-se que as mesmas só devem ser utilizadas em casos excepcionais e sua utilização deve ser claramente informada nos documentos de encaminhamento das amostras.

Os suabes não devem ser encaminhados sem meio de transporte, pois a falta de umidade pode levar à inativação dos agentes a pesquisar. Suabes que cheguem secos ao laboratório são considerados inadequados para análise e rejeitados.

5. MANUTENÇÃO DA CADEIA DE FRIO

COMO FAZER?

A manutenção da cadeia de frio do momento da colheita ao processamento do material no laboratório é um ponto crítico do processo. Portanto, é imprescindível que a temperatura de armazenamento das amostras seja mantida desde a origem e durante todo o transporte. Variações de temperatura no decorrer deste processo podem levar à inativação dos agentes infecciosos que se deseja pesquisar, com consequente obtenção de resultados falso-negativos. Do ponto de vista prático, se um determinado material é mantido sob refrigeração (2 a 8°C) na origem, a mesma temperatura deverá ser mantida durante todo o transporte.

A quantidade e tipo de material refrigerante a ser utilizado depende do tipo de embalagem que será utilizada, do tempo de trânsito da amostra, da quantidade de material que precisa ser refrigerado, da temperatura desejada durante o transporte e da estação do ano.

Em virtude da complexidade envolvida no processo, não é possível estabelecer proporções de acumuladores de frio em função da quantidade de material a ser transportado. No entanto, alguns cuidados podem ser tomados a fim de minimizar a ocorrência de rejeições por condições inadequadas de conservação.

As amostras devem ser enviadas ao laboratório no menor lapso de tempo possível. Períodos prolongados de armazenamento, especialmente em temperaturas inadequadas, podem levar à inativação dos agentes a serem pesquisados.

Nunca devem ser utilizados congeladores de refrigeradores domésticos para o armazenamento dos materiais. É preferível manter o material sob refrigeração ou em gelo seco.

Evitar ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento.

Quando a distância a ser percorrida pelo material for grande e este puder ser mantido congelado, dar preferência à utilização de gelo seco. Neste caso, deve-se tomar o cuidado de utilizar



embalagem dupla a fim de que o gelo seco não entre em contato direto com as amostras. Lembramos que o transporte de gelo seco possui regulamentações específicas e estas precisam ser observadas.

Quando for necessária a utilização de acumuladores de frio (como gel eutético ou gel refrigerante), não é aconselhado que estes entrem em contato direto com as amostras, pois isso pode levar ao congelamento indesejado de parte do material. A fim de evitar este problema, recomenda-se a utilização de separadores isotérmicos (placas de isopor, por exemplo), que têm por função manter o material refrigerante afastado das amostras e auxiliar no isolamento térmico.

No momento do acondicionamento dos acumuladores de frio dentro da caixa de transporte, é importante que a maioria deles seja colocado na parte de cima, pois o ar frio desce. Segundo informações encontradas na literatura, quando a capacidade isolante da embalagem de transporte não for boa sugere-se colocar 30% dos acumuladores na parte de baixo e 70% deles na parte superior da caixa.

Os espaços vazios dentro da caixa devem ser preenchidos (com papel ou isopor, por exemplo) a fim de evitar a movimentação do material nela contida e auxiliar no isolamento térmico.

Atentar para o fato de que existem gelos recicláveis específicos para manutenção da refrigeração ou do congelamento. Sendo assim, a utilização do produto equivocado pode comprometer a qualidade das amostras.

COMO ACONDICIONAR?

ITEM 1: Manutenção da cadeia de frio – instruções adicionais para salmonelas e micoplasmas

Amostras destinadas ao diagnóstico bacteriológico, incluindo as amostras de soro, devem ser mantidas sob refrigeração (2 a 8°C) por, no máximo, 72h (considerando aqui o período de trânsito ao laboratório). Não encaminhar amostras congeladas.

ITEM 2: Manutenção da cadeia de frio – instruções adicionais para influenza aviária, doença de Newcastle e laringotraqueíte infecciosa aviária

Amostras destinadas ao diagnóstico virológico podem ser mantidas sob refrigeração (2 a 8°C) por até 96h (considerando aqui o período de trânsito ao laboratório) ou congeladas a -80°C ou temperaturas inferiores se houver necessidade de armazenamento por períodos superiores a 72h.

A manutenção de suabes e órgãos a -20°C não é indicada, pois os vírus da doença de Newcastle e da influenza aviária são sensíveis a esta temperatura. Amostras de soro podem ser mantidas sob refrigeração (2 a 8°C) ou congeladas (-20°C).

6. ENCAMINHAMENTO DE AMOSTRAS

COMO FAZER?

É recomendável que o transporte do material ao laboratório não ultrapasse 2 dias. Sendo assim, a utilização de serviços de transporte rápido é a forma mais adequada de encaminhamento.

Evitar, salvo para as colheitas de amostras de suspeita provável de doenças de notificação obrigatória, realizar as remessas de material ao laboratório durante os finais de semana e feriados, pois o tempo de trânsito nestes casos pode ser ainda maior, aumentando o risco de perda e/ou extravio do material. Mas quando necessário o encaminhamento dessas amostras ao LFDA -SP, o laboratório deverá ser comunicado com a maior brevidade possível. Para tanto, solicita-se que seja



encaminhado e-mail aos endereços avi.lfda-sp@agricultura.gov.br e rec.lfda-sp@agricultura.gov.br contendo as seguintes informações mínimas:

- ✓ Data da chegada do material;
- ✓ Horário estimado de chegada;
- ✓ Tipo e quantidade de amostras que estão sendo encaminhadas; e
- ✓ Quando possível, uma cópia do FORM-IN e do FORM-LAB devem ser anexadas ao e-mail.

Em casos excepcionais, o LFDA-SP poderá realizar a retirada de amostras de suspeitas prováveis no aeroporto de Viracopos, quando não for possível despachar o material para entrega diretamente no laboratório. Nesses casos, o SVO deverá informar, adicionalmente, o número do conhecimento aéreo e colocar em cópia o endereço sag.lfda-sp@agricultura.gov.br. Ressalta-se que as companhias aéreas possuem regras próprias e horários definidos para liberação das remessas. Sendo assim, o responsável pelo envio das amostras deverá se informar previamente sobre o horário em que a remessa estará disponível para retirada por um representante autorizado do LFDA-SP. Essa informação também deverá ser repassada ao Laboratório nos endereços eletrônicos informados anteriormente.

Contatos telefônicos para comunicação de encaminhamento emergencial de amostras podem ser feitos em um dos números a seguir, mesmo fora do horário de expediente: (19) 3254-2329 / (19) 3254-2452 / (19) 3253-1461 / (19) 3253-2388 / (19) 3253-7630.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso das análises laboratoriais está diretamente relacionado à qualidade do material colhido e encaminhado. Sendo assim, cabe ao profissional de campo a responsabilidade pela manutenção da integridade e qualidade das amostras desde a colheita até a remessa ao laboratório. Portanto, recomenda-se fortemente que o Serviço Veterinário Oficial disponha de materiais e serviços adequados para a colheita, armazenamento e o envio de amostras aos laboratórios, preservando todas as condições ideais e orientações repassadas por este documento.