



# INSTITUTO BIOLÓGICO

**Importância da colheita de  
amostras visando o  
diagnóstico diferencial.  
Situação atual – visão do  
laboratório**

Dezembro de 2009  
São Paulo – SP



SECRETARIA DE AGRICULTURA  
E ABASTECIMENTO



***EDVIGES MARISTELA PITUCO***

*Médica Veterinária  
Centro de P & D de Sanidade Animal*

***pituco@biologico.sp.gov.br***



# CICLO DO EXAME DE LABORATÓRIO

	PROCEDIMENTOS	FREQUÊNCIA DE ERROS
Pré-analítico	Exame clínico ↓ Preparo do animal ↓ Obtenção da amostra	60-70%
Analítico	↓ Exame laboratorial	20-30%
Pós-analítico	↓ Avaliação do resultado pelo Médico Veterinário	10



# OBJETIVO DO LABORATÓRIO

**Assegurar que todas as etapas do ciclo do exame sejam cumpridas sem erros significativos nos resultados**

**Materiais tenham representatividade e mantenham a integridade de composição e funcionalidade**

**A gestão da qualidade pré-analítica deve basear-se em treinamento de pessoal, padronização dos procedimentos e registro das atividades.**

**Não existe materiais de controle como na fase analítica**

**O laboratório define os critérios de rejeição das amostras**



# CONTROLE DE QUALIDADE

## Objetivos

Programa efetivo de Controle da Qualidade e Garantia da Qualidade - **garantir** exatidão, fidelidade e reprodutibilidade das informações liberadas.

Sistema capaz de:

- ▶ **Avaliar** todas as etapas do processo pré-analítico, analítico e pós-analítico.
- ▶ **Identificar** possíveis falhas → ações corretiva → **melhoria** da qualidade.



# CONTROLE DE QUALIDADE

## Amostras Adequadas

- ▶ Normas de colheita, transporte e armazenamento das amostras
  - \* Como preencher a requisição do exame (informações do animal, da suspeita clínica e uso de medicamentos, data e hora)
  - \* Preparo do animal
  - \* Quantidade mínima de amostra
  - \* Momento ideal da colheita (fase aguda e antes da administração de antibióticos)



# CONTROLE DE QUALIDADE

## Amostras Adequadas

- \* Local apropriado de colheita do material.
- \* Meios conservantes para transporte, quando aplicável.
- \* Necessidade de manuseio e transporte especial.
- \* Tempo e temperatura para transporte (armazenar a 4°C, quando aplicável, ou Temperatura Ambiente).
- \* Identificação da amostra: nome ou n° do animal, material, data e identificação do profissional da colheita.



# CONTROLE DE QUALIDADE

- ▶ Critérios de rejeição de amostras:
  - \* Amostras sem identificação (número do frasco deverá corresponder ao número do formulário).
  - \* Amostras visivelmente contaminadas.
  - \* Meio de transporte inadequados.
  - \* Tempo excessivo de transporte.
  - \* Temperatura de transporte inadequada.
  - \* Frascos quebrados e vazamento da amostra.



# CONTROLE DE QUALIDADE

- ▶ Quando houver rejeição de amostra:
  - notificar o requisitante imediatamente
  - manter a amostra, por no mínimo, 48 horas (a pessoa envolvida no procedimento de colheita e a ação corretiva devem ser documentados)



# Diagnóstico Diferencial

- Sistema respiratório
- Pele e Mucosas
- Sistema reprodutor e urinário
- Sistema nervoso central (SNC)
- Sistema gastrintestinal
- Sistemas circulatório e linfático
- Sistema osteoarticular



## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

### CENTRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE SANIDADE ANIMAL (CPDSA)

## TRIAGEM ANIMAL

Amostras diferentes sistemas (13 laboratórios)



Lab. Viroses  
Bovídeos



Lab. de Doenças  
de Suínos



Lab. Doenças  
Bacterianas da  
Reprodução



Lab. Anatomia  
Patológica



# Diagnóstico

- Exame do animal
- Testes laboratoriais
  - Pesquisa direta do agente (Isolamento viral, PCR, Microscopia eletrônica etc.
  - Teste sorológicos

## Recomendação

- Contato prévio antes de colher a amostra
- Escolha correta do exame
- Seguir o protocolo de preparo do animal

## IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA



**TRANSPONDER**



**BRINCO**

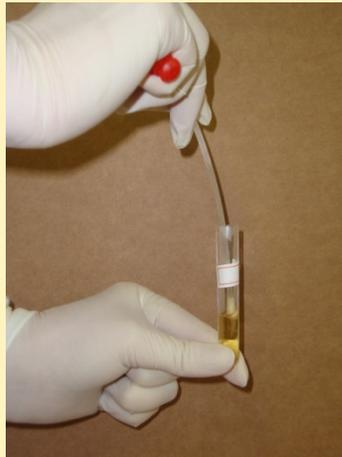


**Registrar o número de identificação do animal no recipiente de colheita em esparadrapo com caneta esferográfica.**

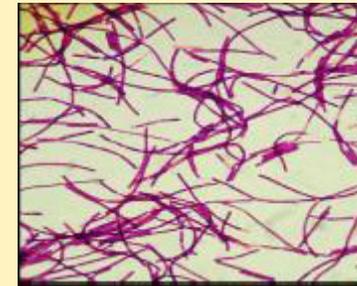


# **SISTEMA RESPIRATÓRIO**

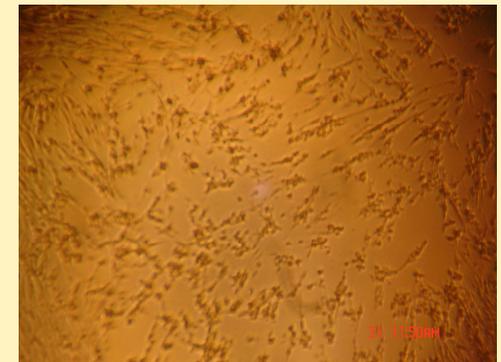
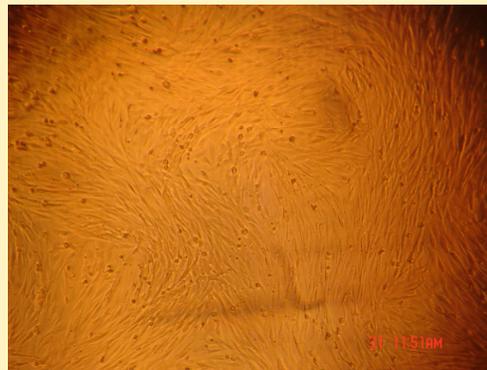
# Diagnóstico Diferencial



## Pesquisa direta de bactéria



## Pesquisa direta de vírus



# Diagnóstico Diferencial



**Lesões caseosas em pulmão**

**a) Pesquisa direta do agente  
– fragmentos de tecido  
refrigerado**



**b) Histopatológico - formol  
tamponado 10% (volume de  
formol, pelo menos, 10 vezes  
maior que o volume de tecido  
a ser fixado).**



### Principais doenças do sistema respiratório e espécies acometidas

DOENÇAS	ESPÉCIES ACOMETIDAS				
					
Tuberculose ( <i>Mycobacterium bovis</i> ) e outras micobacterioses	X	X	X	X	X
Linfadenite caseosa	-	-	X	X	-
Pleuropneumonia contagiosa (Micoplasmose, Actinobacilose)	X	X	X	X	X
Pneumonia causada por agentes piogênicos	X	X	X	X	X
Doença de Aujeszky	-	X	-	-	-
Rinite atrófica ( <i>Bordetella bronchiseptica</i> e <i>Pasteurella multocida</i> ) 	-	X	-	-	-
Infuenza	X	X	X	X	X
Vírus Sincial Respiratório	X	-	-	-	-
Mormo	-	-	-	-	X
Rinopneumonite equina	-	-	-	-	X
Arterite viral equina	-	-	-	-	X

# PELE E MUCOSAS



# DIAGNÓSTICO

**Material a ser encaminhado:  
suspeita de doença vesicular**



<b>Pesquisa do Agente</b>		<b>Pesquisa de anticorpos (sorodiagnóstico)</b>
<b>Líquido da Vesícula</b>		
<b>Epitélio ou Crosta</b>		<b>Soro</b>



INSTITUTO BIOLÓGICO

# LESÕES

# BOVINOS



Salivação intensa



Lesão língua

# BOVINOS



Desprendimento do epitélio da língua e gengiva

# BOVINOS



Lesão de 10 dias. Perda das papilas, indentação e proliferação de tecido fibroso

# BOVINOS

## Vesículas nos espaços interdigitais e bandas coronárias das patas



Lesão de 5 dias,  
observar granulação



A borda da vesícula é  
friável e desprende-se  
facilmente



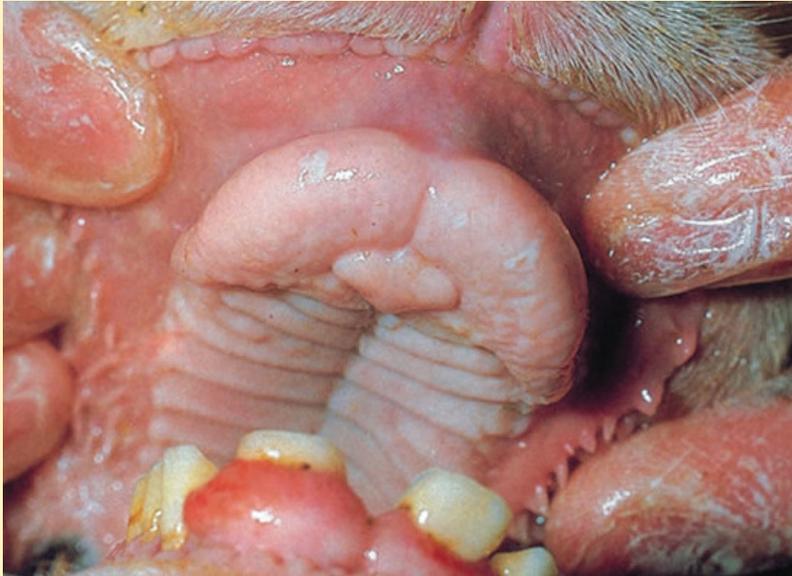
Perda do casco

# BOVINOS



Vesículas de um dia, não rompidas ainda, observar coalescência

# OVINO



Boca vesículas não rompidas com um dia. Notar aparência embranquecida e brilhante



Lesão com dois dias na almofada dentária e gengiva superior

# OVINO



Lesão com dois dias sobre a almofoada dentária



Um dia mais tarde, notar rápida perda da definição das bordas da lesão

# OVINO



Casco com vesícula de um dia, não rompida, ao longo da banda coronária



Lesões de dois dias no espaço interdigital e ao longo da banda coronária no casco de um ovino. Notar embranquecimento e inchaço

# OVINOS



**Lingua azul**



**Ectima contagioso**

# ZOONOSES

- 👤 **Estomatite vesicular**
- 👤 **Variola bovina**
- 👤 **Pseudovariola bovina**
- 👤 **Ectima contagioso**



# SUINOS



**A claudicação é o primeiro sinal clínico observado**

# SUINOS

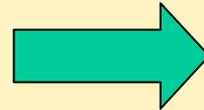


Lesão de 8 dias

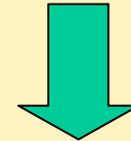


Lesão de 9 dias

# DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

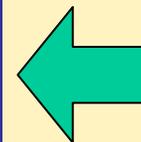


**Colheita de material**  
**(profissional habilitado)**



**Análises:**  
**Pesquisa direta do agente e indireta (anticorpos)**

**Doenças de mucosas 3 unidades MAPA e 3 Estaduais**



**Enviar para laboratório habilitado**

# Meios e materiais para colheita





# MATERIAL PARA PESQUISA DIRETA DO VÍRUS

- Conteúdo de vesícula
- Epitélio, cerca de 2 g (mínimo 1 g)

Material infectante deverá ser manipulado apenas em laboratórios que atendem as normas internacionais de biossegurança

APENAS LABORATÓRIOS LANAGRO/MAPA

# AMOSTRAS DE EPITÉLIO EM LIQUIDO DE VALLÉE





# MEIOS PARA CONSERVAÇÃO DE AMOSTRAS (LÍQUIDO DE VALLÉE)

**GLICERINA FOSFATADA - pH 7,2-7,6. Acrescentar antibiótico (20 mg de ENROFLOXACINA e 5 mg de ANFOTERICINA B por litro de meio).**



pH ácido = amarelo  
pH alcalino = vinho  
pH adequado = rosado



## **COLHEITA DE MATERIAL PARA A PESQUISA DO VÍRUS EM ANIMAIS PORTADORES**

**Em ruminantes convalescentes ou suspeitos de febre aftosa na ausência de sinais clínicos, colher líquido esofágico-faríngeo (Probang)**



**COPO COLETOR “PROBANG”**



# AMOSTRAS DE LÍQUIDO ESOFÁGICO -FARÍNGEO (LEF)

**Obtido por raspado da mucosa esofágico-faríngea (Probang).**

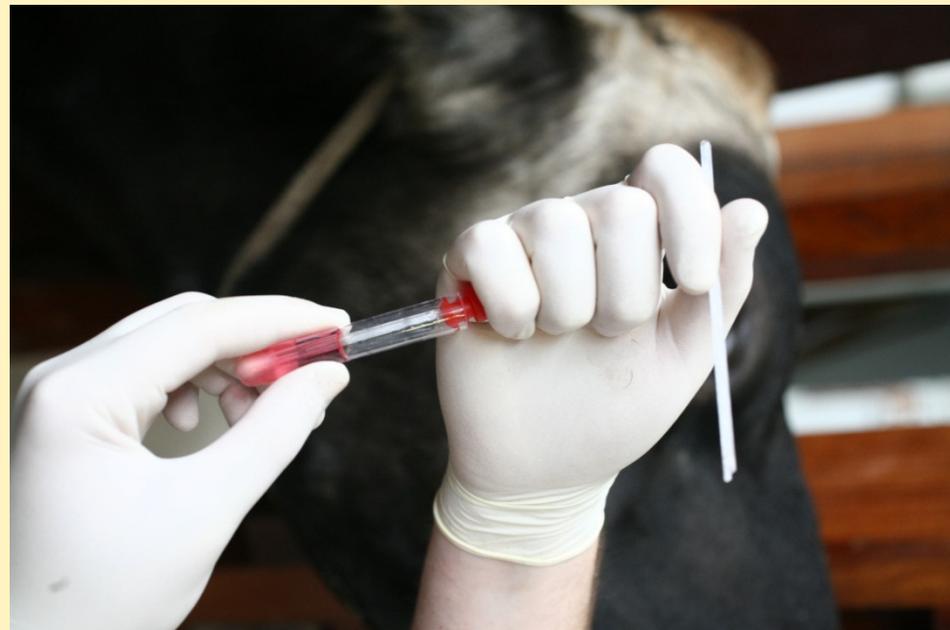
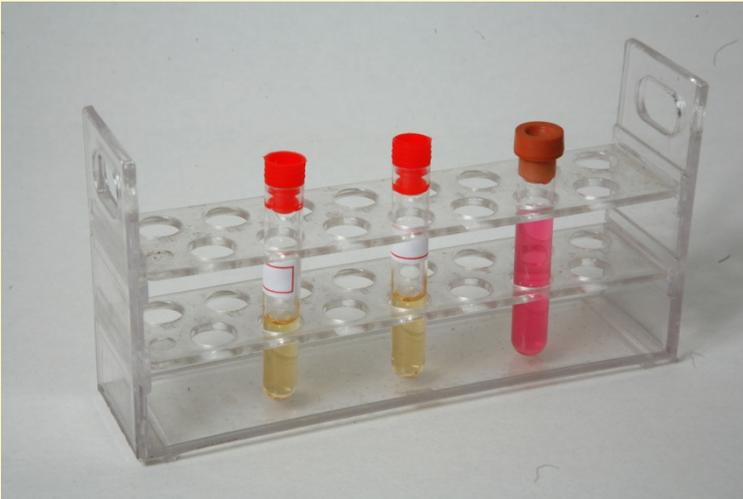
**Volume de muco (ideal 15mL, mínimo 5 mL) diluído em igual volume de meio Eagle com antibiótico, pH 7,2-7,6.**





# PELE E MUCOSAS E EXSUDATO (SECREÇÕES)

**Obtido com uso de suabe**





# COLHEITA E TRANSPORTE

- Procedimentos de biossegurança durante colheita e transporte (colocar todo material utilizado em desinfetante e dar a esse destinação adequada).

**Desinfetar externamente o recipiente da amostra (Hidróxido de sódio 2%, Carbonato de sódio 4%, Ácido acético 2% ou Ácido Cítrico 0,2%)**

# BIOSSEGURANÇA





# PESQUISA DE ANTICORPOS

## MATERIAL – SORO

- Demonstrar ausência de infecção
- Determinar a prevalência em estudos soropidemiológicos
- Avaliar a resposta humoral após vacinação e desafio
- Ações de vigilância
- Raras situações, a sorologia pode ser utilizada como ferramenta de diagnóstico definitivo (doenças exóticas ou reagentes com marcador para diferenciar infectado de vacinado)

AMOSTRAS PAREADAS – verificar soroconversão

- 1ª amostra - colhida na fase aguda da doença
- 2ª amostra - 20 a 30 dias após



# FEBRE AFTOSA

## MÉTODOS PARA DIFERENCIAÇÃO DE ANIMAIS INFECTADOS DOS VACINADOS

Baseiam-se na detecção de anticorpos contra proteínas não estruturais do vírus, indicativos de atividade viral em animais sem sintomas clínicos.

**IDGA – VIAA – Antígeno recombinante**

**ELISA 3ABC**

**EITB - imunoeletrotransferência**



# FORMULÁRIO DE LEITURA-EITB

## CONTROLES

LVB		9
CP 2 (positivo)		10
CP1 (cut off)		11
NEGATIVO		12

SOROS		GEL Azul 0527/03	3 ABC	3 D	2 C	3 B	3 A	RES.
FBO 107/07	731		X	X	X	X	X	R
	723		X	X	X	X	X	R
	727		X	X	X	X	X	R
FBO 108/07	Bela Aliança			X	X			NR
	Diálogo		X	X	X	X	X	R
	Julk		X	X	X	X	X	R
	Licor			X	X		X	NR
	Pilar 36				X			NR
	NR 18920/5		X	X	X	X	X	R
	Ure		X	X	X		X	I4 → R
	Xumi		X	X	X	X	X	R
FBO 106/07	1730		X	X	X	X		I4 → R
	004 CP1							
	008 CP2							

## Principais doenças de pele e mucosas e espécies acometidas

DOENÇAS	ESPÉCIES ACOMETIDAS				
					
Febre aftosa	X	X	X	X	-
Estomatite vesicular	X	X	X	X	X
Língua azul	X	-	X	X	-
Varíola/vaccínia (orthopoxvirus)	X	X	X	X	X
Pseudovaríola	X	-	-	-	-
Ectima contagioso	-	-	X	X	-
Rinotraqueite infecciosa bovina/ vulvo vaginite postular infecciosa	X	-	-	-	-
Diarréia viral bovina	X	-	-	-	-
Doença Vesicular do suíno	-	X	-	-	-
Exantema Vesicular do suíno	-	X	-	-	-



# **SISTEMA REPRODUTOR**



# **SISTEMA REPRODUTOR**

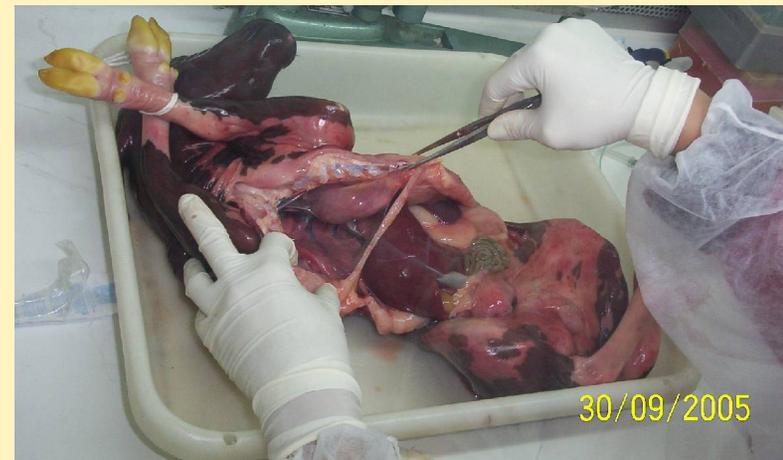
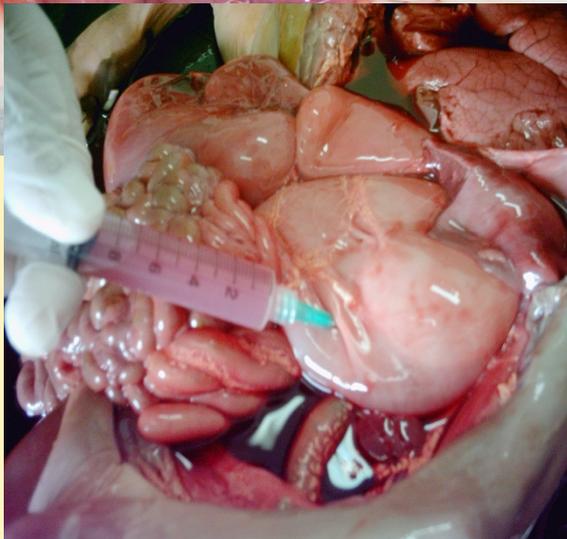
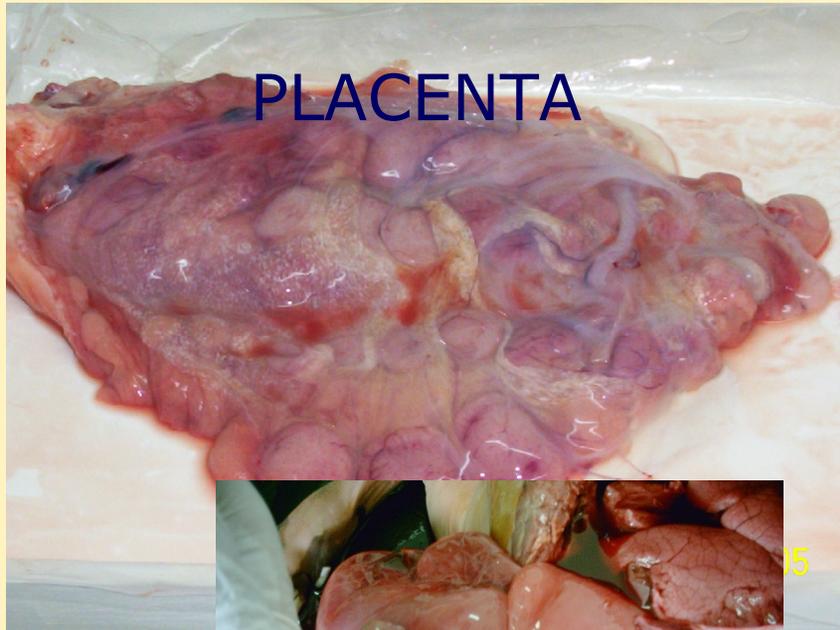
## **MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO**

### **FETO ABORTADO**

- Conteúdo gástrico: 5-10 mL colhidos com seringa estéril (vedar envergando a agulha e travar o embolo com esparadrapo)
- Fluidos corporais (líquido tóraco-abdominal)
- Fragmentos de órgãos (pulmão, fígado, rins, baço, encéfalo) e placenta

# SISTEMA REPRODUTOR

## DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL



# SISTEMA REPRODUTOR

## TECIDOS PARA DIAGNÓSTICO



⇒ Parte refrigerado

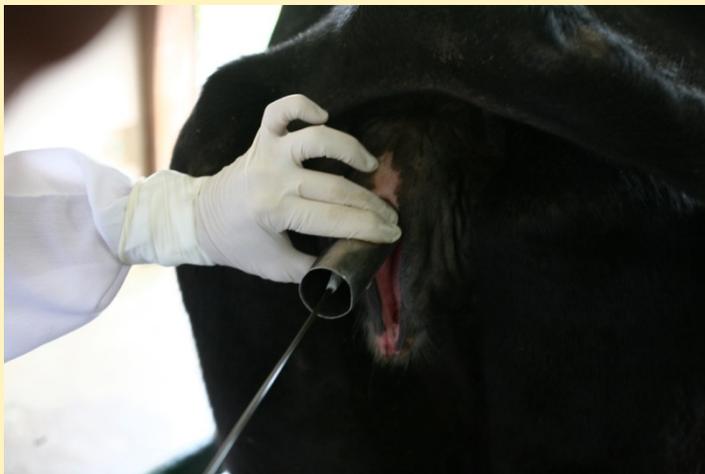
⇒ formalina 10%

# SUABE CERVICOVAGINAL

O período ideal para colheita de muco vaginal é nos dias subsequentes ao estro (evitar colheita logo após a cópula). O uso de espéculo é fundamental para obtenção de amostra de muco cervicovaginal de boa qualidade



Submergir o suabe em 2 mL de Eagle (vírus), outro em tioglicolato de sódio ou BHI (*Campylobacter* spp), A3xB (*Mycoplasma* spp), Cary Blair (outras bactérias) 10 mL de Lactopep (0,5 g de Lactopep para 10mL salina 0,85%)





# LAVADO PREPUCIAL

**Antes da colheita manter o touro em repouso sexual de 07 a 10 dias.**

**Evitar contaminação do muco com urina.**

**São necessárias no mínimo 3 colheitas com intervalo de 7 dias, mantendo-se o repouso sexual.**



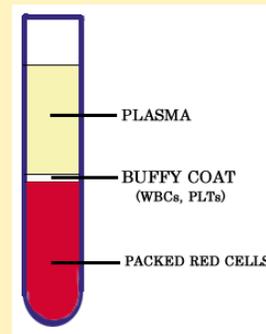
**Lavado prepucial para pesquisa de  
Tritrichomonas foetus**

# SISTEMA REPRODUTOR

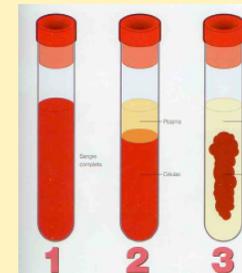
- Sêmen



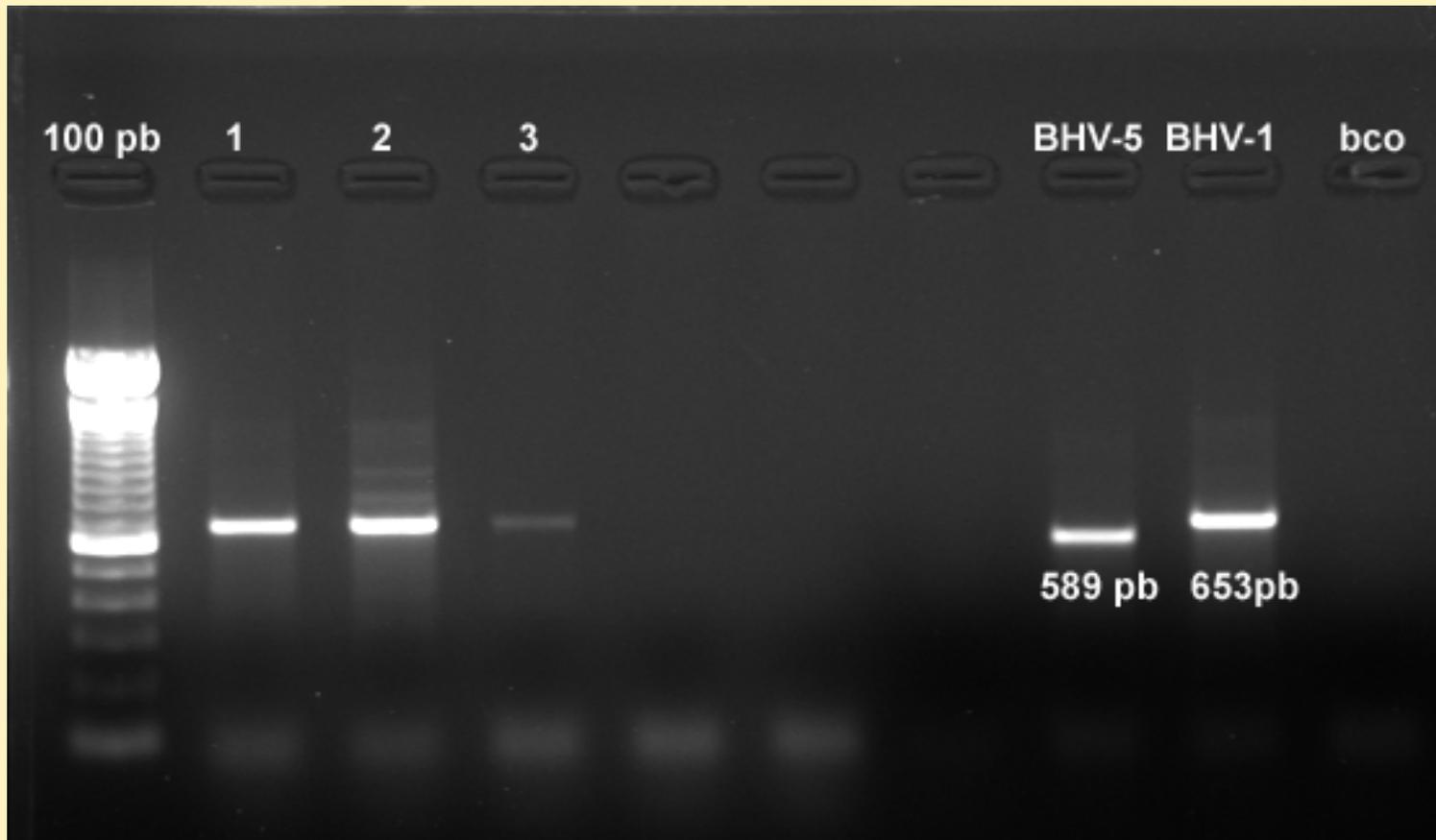
- Sangue total



- SORO SANGUINEO

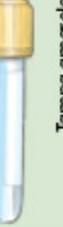


## DIFERENCIAL PCR MULTIPLEX



Materiais: fetos, sêmen, órgãos e embriões.

### TUBOS PARA COLHEITA DE SANGUE

EXAMES	PRODUTO FINAL	PREPARO	TUBOS	TUBOS COM ANTICOAGULANTE			TUBOS SEM ANTICOAGULANTE	
				EDTA K2 DIPOTÁSSICO	EDTA K2 DIPOTÁSSICO COM GEL SEPARADOR	HEPARINA	TUBO SILICONIZADO	TUBO SILICONIZADO COM GEL SEPARADOR
Isolamento Biologia Molecular	Sangue total Plasma Anel de Leucócitos	Centrifugação	 Tampa lilás					
Isolamento Biologia Molecular	Sangue total Plasma Anel de Leucócitos	Centrifugação	 Tampa branca					
Exames bioquímicos	Sangue total Plasma	Centrifugação	 Tampa verde					
Pesquisas de anticorpos Isolamento	Coágulo Soro	Repouso 30 a 60 min.	 Tampa vermelha					
Pesquisas de anticorpos	Coágulo Soro separado por Gel	Centrifugação até 30 min. após a colheita	 Tampa amarela					

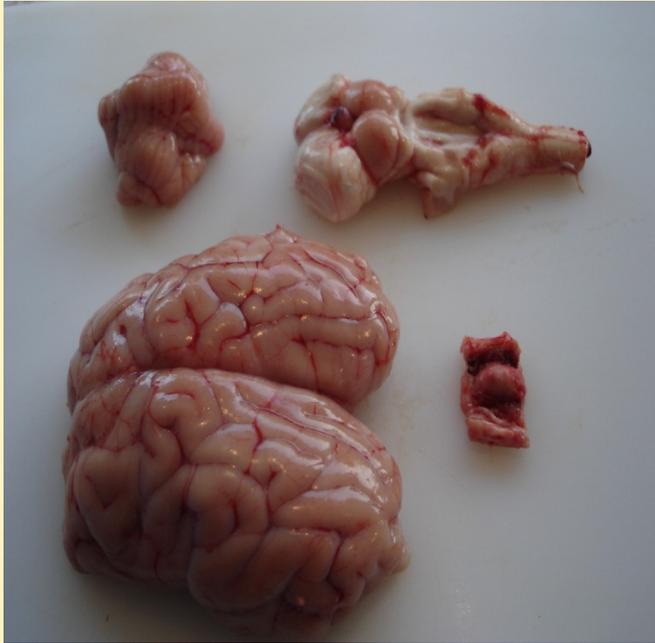
### Principais doenças do sistema reprodutor e urinário e espécies acometidas

DOENÇAS	ESPÉCIES ACOMETIDAS				
					
Brucelose	X	X	X	X	X
Leptospirose	X	X	X	X	X
Campilobacteriose Genital	X	-	-	-	-
Micoplasmose	X	X	X	X	X
Neosporose	X	-	X	X	X
Toxoplasmose	X (raro)	X	X	X	X
Tricomoniase Genital Bovina	X	-	-	-	-
Rinotraqueite infecciosa bovina/ Vulvo vaginite postular infecciosa	X	-	-	-	-
Diarréia viral bovina	X	-	-	-	-
Parvovirose	-	X	-	-	-
Doença de Aujeszky	-	X	-	-	-
Peste suína clássica	-	X	-	-	-
Síndrome Reprodutiva e Respiratória dos Suínos (SRRS)	-	X	-	-	-
Circovirose	-	X	-	-	-
Clamidiose	X	-	X	-	-
Arterite viral equina	-	-	-	-	X
Aborto equino por herpesvirus	-	-	-	-	X



# **SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

## MATERIAL FIXADO EM FORMOL



# MATERIAL REFRIGERADO





INSTITUTO BIOLÓGICO



### Principais doenças do sistema nervoso central e espécies acometidas

DOENÇAS	ESPÉCIES ACOMETIDAS				
					
Raiva	X	X	X	X	X
Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB)	X	-	-	-	-
Scrapie	-	-	X	-	-
Encefalite Herpética Bovina	X	-	-	-	-
Febre Catarral Maligna	X	-	-	-	-
Doença de Aujeszky (Pseudorraiva)	X	X	-	-	-
Listeriose	X	-	X	X	X
Botulismo	X	X	X	X	X
Intoxicações (arsênico, chumbo, organofosforados, carbamatos e plantas tóxicas)	X	X	X	X	X
Encefalite Herpética equina	-	-	-	-	X
Encefalomielite equina do leste, oeste e venezuelana	-	-	-	-	X
Polio-encefalomalácia	X	-	X	X	-
Leucoencefalomalácia equina	-	-	-	-	X

# Requisição de exames

Ficha informativa da propriedade com dados sanitários, clínicos, zootécnicos e outros

## Pontos importantes no preenchimento da Requisição de Exames

**INFORMAÇÕES MÍNIMAS NECESSÁRIAS PARA REMESSA DE AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO**

Nome da Propriedade: \_\_\_\_\_  
 Nome do Proprietário: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_ Cidade/Estado: \_\_\_\_\_  
 CEP: \_\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_  
 Caixa Postal: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_  
 Fone: \_\_\_\_\_

**Dados do Médico Veterinário**

Nome: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_ E-mail: \_\_\_\_\_  
 Fone: \_\_\_\_\_  
 Endereço para envio do resultado: \_\_\_\_\_ Cidade/Estado: \_\_\_\_\_  
 CEP: \_\_\_\_\_

**Dados das Amostras**

Sistemas afetados:  Sistema nervoso central  Infecções vasculares  
 Infecções de mucosa e pele  Infecções ósteo-articulares  
 Infecções gastrintestinais  Infecções do aparelho respiratório

Finalidade do exame:  Confirmação de diagnóstico e vigilância  Monitoramento  
 Movimentação  Outra: \_\_\_\_\_  
 Requisito certificação/revalidação

**Tipo de Amostras:**

Soro  Sangue Total - Anticoagulante:  EDTA  Outro: \_\_\_\_\_  
 Biópsia - Especificar: sítio da lesão/tácido \_\_\_\_\_  
 Conteúdo gástrico  Fezes  Sêmen  Secreção: \_\_\_\_\_  
 Órgãos: \_\_\_\_\_  
 Embrão  Feto  Fluido cavitário  Placenta/cotilédono  
 Outras - \_\_\_\_\_  
 Especificar: \_\_\_\_\_

**Informações Complementares:**

Informações Clínicas:  
 (descrever objetivamente os achados clínicos mais significativos)

Dados epidemiológicos relevantes:  
 (área endêmica de alguma doença infecciosa, pessoas envolvidas etc)

**Formulário detalhado de colheita**

Identificação da amostra	Identificação do animal	Espécie	Idade	Sexo	Tipo de amostra	Principal sistema afetado

Data da colheita: \_\_\_\_\_ Data do envio: \_\_\_\_\_  
 Responsável pela colheita: \_\_\_\_\_

### 1 - Identificação do remetente da amostra.

1.1 Nome completo (sem abreviações) e endereço do responsável pelo encaminhamento da amostra. Deverá constar um número de telefone para casos de emergência.

1.2 O responsável pelo preenchimento do formulário e envio da amostra deverá ser um profissional devidamente habilitado para trabalhar com materiais de risco biológico.

### 2 - Localização da propriedade.

2.1 Nome completo (sem abreviações) e endereço do proprietário do animal suspeito.

2.2 Nome completo da propriedade ou estabelecimento onde foi colhida a amostra.

2.3 Localização que facilite o acesso à propriedade citada.

### 3 - Descrição do animal suspeito, rebanho e da amostra.

3.1 Informar a data da colheita, nome ou número do animal suspeito, idade, sexo, raça e espécie.

3.2 Preencher a finalidade do exame (ex. confirmação de diagnóstico, movimentação, monitoramento). Em caso de confirmação de diagnóstico, descrever quais os sinais clínicos apresentados pelo animal, e a data provável de início da doença e em caso de necropsia, descrever os achados mais significativos.

**Para confirmação de diagnóstico deve-se preencher uma requisição de exames para cada animal**

3.3 Informar o número de animais existentes na propriedade, quantos animais apresentaram sinais clínicos semelhantes e quantos vieram a óbito (informar vacinação, vermifugação).

3.4 Informar quais amostras foram remetidas e conservante utilizado.

### 4 - Informações complementares

Esse espaço é reservado para qualquer outra informação que o técnico considere pertinente (suspeita de zoonoses informar se há pessoas envolvidas, etc.)



# REMESSA DE MATERIAL

## Potencialmente infectante

As embalagens de material biológico referente a espécime diagnóstico devem ser identificadas com: Nome, endereço e telefone do remetente e do destinatário. Telefone para emergências Número do documento para o conteúdo (UN 3373), material biológico, Categoria B.

**CUIDADO FRÁGIL**  
**ENTREGA URGENTE**

Remetente: \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_  
Código Postal: \_\_\_\_\_  
Telefone/Fax: \_\_\_\_\_  
Email: \_\_\_\_\_

**Em caso de emergência, entrar em contato com o remetente. A embalagem interna somente deverá ser aberta em laboratórios autorizados.**



# REMESSA DE MATERIAL

**Recipiente primário** (contém a amostra) – envolver em manta absorvente.

**Recipiente secundário** - acondicionar o recipiente da amostra dentro de outro recipiente resistente (pode ser lata de leite em pó, achocolatado).

**Recipiente terciário** - acomode o recipiente secundário dentro da caixa isotérmica (isopor).



Afixar na parte externa da tampa do isopor a requisição de exame



Preencha o espaço vazio com enchimentos macios (flocos de isopor, jornal, papel toalha)



***“... agora eu lhe pergunto, Professor,  
é difícil conciliar teoria e vida, aquilo  
que se aprende nos livros e a vida que  
se vive no dia-a-dia?....***

**JORGE AMADO, *A tenda dos  
milagres*, 1969**

**MUITO OBRIGADO**





# Obrigado pela atenção





**Med. Vet. Edviges Maristela Pituco**

**Pesquisador Científico VI**

**APTA/Instituto Biológico/Centro de Pesquisa e  
Desenvolvimento de Sanidade Animal**

**Fone/Fax 11-50871786 11-50871765**

**[pituco@biologico.sp.gov.br](mailto:pituco@biologico.sp.gov.br)**

**<http://www.biologico.sp.gov.br/>**