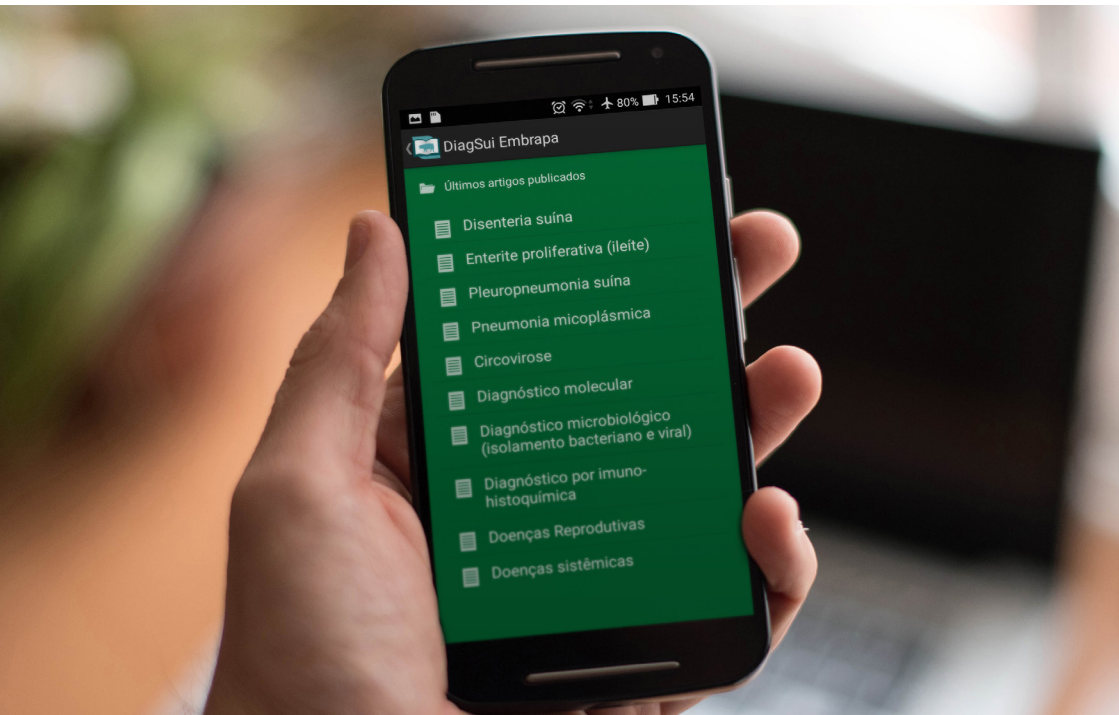


DiagSui Embrapa - Diagnóstico Laboratorial na Clínica de Suínos



ISSN 0101- 6245

Junho, 2016

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Suínos e Aves
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 178

DiagSui Embrapa - Diagnóstico Laboratorial na Clínica de Suínos

Marcos Antônio Zanella Morés

Nelson Morés

João Xavier de Oliveira Filho

Geordano Dalmédico

Autores

Embrapa Suínos e Aves
Concórdia, SC
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves

Rodovia BR 153 - KM 110
89.700-991, Concórdia-SC
Caixa Postal 321
Fone: (49) 3441 0400
Fax: (49) 3441 0497
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê de Publicações da Embrapa Suínos e Aves

Presidente: Marcelo Miele
Secretária: Tânia M.B. Celant
Membros: Airton Kunz
Ana Paula A. Bastos
Gilberto S. Schmidt
Gustavo J.M.M. de Lima
Monalisa L. Pereira
Suplentes: Alexandre Matthiensen
Sabrina C. Duarte

Coordenação editorial: Tânia M.B. Celant
Revisão técnica: Jalusa D. Kich, Janice R.C. Zanella e Vitor H. Grings
Revisão gramatical: Lucas S. Cardoso
Editoração eletrônica: Vivian Fracasso
Fotos da capa: Lucas S. Cardoso

1ª edição

Versão eletrônica (2016)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Suínos e Aves**

DiagSui Embrapa: diagnóstico laboratorial na clínica de suínos. / Marcos Antônio Zanella Morés, Nelson Morés, João Xavier de Oliveira Filho e Geordano Dalmédico. - Concórdia : Embrapa Suínos e Aves, 2016.
36 p.; 21 cm. (Documentos / Embrapa Suínos e Aves, ISSN 01016245; 178).

1. Sanidade animal. 2. Diagnóstico clínico. 3. Exames laboratoriais. 4. Necropsia. 5. Software - Aplicativo. 6. Suíno. I. Título. II. Série. III. Morés, Nelson. IV. Oliveira Filho, João Xavier de. V. Dalmédico, Geordano.

CDD. 636.40896

©Embrapa 2016

Autores

Marcos Antônio Zanella Morés

Médico-veterinário, mestre em Ciências Veterinárias, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

Nelson Morés

Médico-veterinário, mestre em Patologia, pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

João Xavier de Oliveira Filho

Médico-veterinário, doutor em Ciências Veterinárias, Nova Mutum, MT

Geordano Dalmédico

Bacharel em Sistemas de Informação, especialização em Ciência da Computação - Ciência da Informação, analista da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

Sumário

Introdução	7
Seleção do(s) suíno(s) para necropsia e colheita de amostras para diagnóstico de problemas clínicos	8
Eutanásia.....	9
Necropsia.....	9
Colheita de amostras (principais quadros clínicos)	10
Definhamento - baixo desenvolvimento.....	10
Doenças do sistema nervoso central.....	11
Diarreia em leitões na maternidade.....	13
Diarreias em animais de creche, crescimento e terminação.....	16
Doenças respiratórias.....	18
Doenças reprodutivas.....	21
Doenças de pele.....	22
Doenças sistêmicas.....	24
Exames laboratoriais	27
Diagnóstico histopatológico.....	27
Diagnóstico microbiológico: isolamento microbiano.....	29
Diagnóstico por imuno-histoquímica (IHQ).....	32
Diagnóstico molecular (PCR, RT-PCR e qPCR).....	33

DiagSui Embrapa - Diagnóstico Laboratorial na Clínica de Suínos

Marcos Antônio Zanella Morés

Nelson Morés

João Xavier de Oliveira Filho

Geordano Dalmédico

Introdução

O auxílio laboratorial no diagnóstico de quadros clínicos é ferramenta chave na suinocultura, pois frequentemente há associações de patógenos causando as doenças e lesões semelhantes provocadas por diferentes agentes, dificultando o diagnóstico clínico e de necropsia. A qualidade dos procedimentos de colheita e remessa das amostras ao laboratório é essencial para o correto diagnóstico. Diante disso, desenvolvemos este aplicativo onde são fornecidas orientações para a colheita de material para diagnóstico laboratorial, além de informações básicas sobre os principais testes disponíveis aos técnicos de campo.

As orientações para colheita de amostras para diagnóstico dos problemas sanitários podem ser acessadas de duas maneiras:

- Em função dos principais sinais clínicos observados (respiratório, entérico, nervoso, entre outros).
- Ou por doença (circovirose, influenza, pleuropneumonia, ileíte, dentre outras).

Na seção de exames laboratoriais estão descritas as características mais importantes dos principais testes laboratoriais utilizados para o apoio ao diagnóstico na suinocultura, onde também há orientações sobre a colheita de amostras para estes testes, além de alguns pontos importantes para a interpretação dos resultados.

Seleção do(s) suíno(s) para necropsia e colheita de amostras para diagnóstico de problemas clínicos

A escolha do(s) suíno(s) para necropsia e colheita de amostras é ponto crítico para o sucesso no diagnóstico laboratorial de um problema clínico. Considerar os seguintes pontos:

- Escolher de dois a três animais que estão apresentando os sinais clínicos agudos do quadro a ser diagnosticado. Em caso com suspeita de doença infecciosa, principalmente as respiratórias, nervosas e sistêmicas, utilizar o termômetro para selecionar animais em estado febril (acima de 40 °C).
- Não utilizar animais refugos para colheita (Figura 1); se o problema for refugagem, dar preferência para animais no início do quadro clínico.
- Quando o objetivo for realizar exame bacteriológico, não se deve selecionar animais medicados com antimicrobianos via parenteral.
- Animais mortos naturalmente devem ser necropsiados, porém a colheita de amostras para exame pode ser realizada somente se a morte for recente (até duas horas) e não houver alterações *post-mortem*.



Foto: Nelson Morés/Embrapa

Figura 1. Os três animais menores são exemplos de leitões que não devem ser selecionados para colheita de amostras, pois estão em estado caquético, crônico.

Eutanásia

A publicação “Orientações para eutanásia de suínos em granjas pelo método de eletrocussão”, encontrada no link abaixo, disponibiliza as principais informações sobre a eutanásia em suínos.

<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1000339/1/final7341.pdf>

Necropsia

A publicação “Guia prático de necropsia de suínos”, encontrada no link abaixo, fornece informações úteis sobre a técnica de necropsia em suínos.

<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/119148/1/Guia-de-Necropsia-Final.pdf>

Outra publicação auxiliar para necropsias de suínos é encontrada no link abaixo. Este artigo apresenta alguns achados normais de necropsia que podem ser confundidos com lesões, achados sem significado clínico e alterações *post mortem*.

<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v33n10/10.pdf>

Colheita de amostras (principais quadros clínicos)

Definhamento - baixo desenvolvimento

Sinais clínicos: baixo desenvolvimento, definhamento (Figura 2), com ou sem sinais respiratórios ou entéricos.

Foto: Nelson Morés/Embrapa

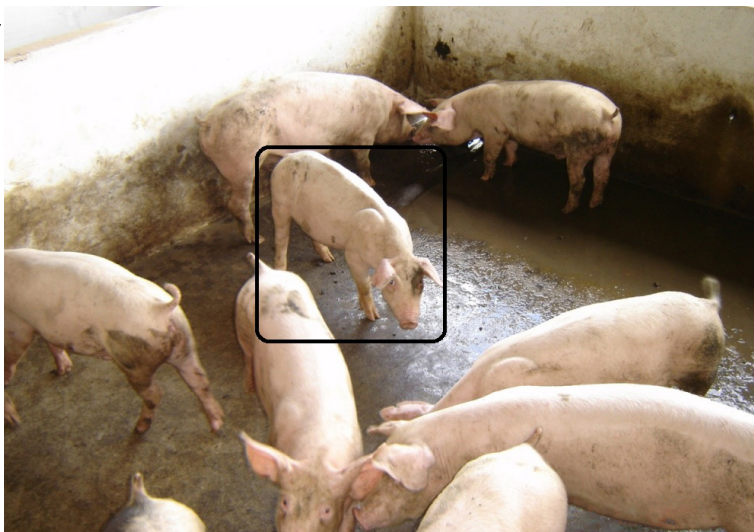


Figura 2. Animal definhado (em destaque).

Causas mais frequentes: circovirose, micotoxicoses, síndrome da falha no desenvolvimento peri-desmame (PFTS), doenças respiratórias ou entéricas crônicas.

Amostras a serem colhidas e exames a serem solicitados:

1. Exame microbiológico (bacteriologia, virologia, reação da polimerase em cadeia (PCR)):

- Linfonodos (inguinal superficial e mesentérico), pulmão (se tiver lesões), intestinos (em casos com diarreia) e exsudatos das serosas (se presentes), colhidos em sacos plásticos (tecidos) ou com suabes/seringas (exsudatos) e enviados refrigerados ao laboratório.

2. Exame histopatológico e de imuno-histoquímica:

- Linfonodos (mesentéricos e inguinais superficiais), fígado, baço, rim, pulmão, jejuno, íleo e cólon, colhidos em formol 10 % tamponado.

Observação: se outros tecidos apresentarem lesões macroscópicas, devem-se incluir porções destes para histopatologia.

Doenças do sistema nervoso central

Sinais clínicos: incoordenação, movimentos de pedalagem, convulsões, opistótono e morte súbita.

Causas mais frequentes: *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, doença do edema, doença de Aujeszky, intoxicação por sal...

Amostras a serem colhidas e exames a serem solicitados:

1. Exame microbiológico (bacteriologia, virologia, PCR):

- Suabe das meninges (Figura 3) ou líquido cefalorraquidiano colhido com seringa estéril.
- Em casos de suspeita viral*, colher porções do cérebro em sacos plásticos.
- Estas amostras devem ser enviadas refrigeradas ao laboratório.

Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa

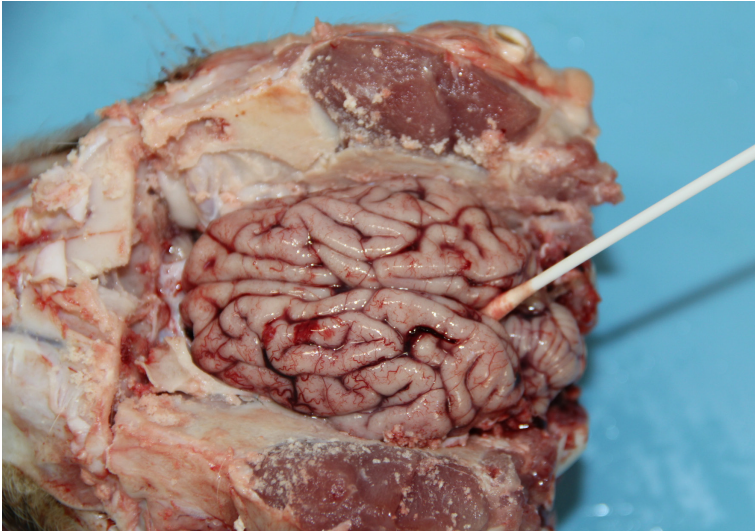


Figura 3. Colheita de suabe do cérebro.

2. Exame histopatológico e de imuno-histoquímica:

- Porções do cérebro (córtex, cerebelo, ponte, tálamo e mesencéfalo)*, colhidas em formol 10 % tamponado.

Observações: em casos de suspeita de doença do edema, colher amostras de intestino delgado (10 cm de jejuno ou íleo) para isolamento bacteriano (pesquisa de *E. coli* produtora de toxina *Stx2e*). Nestes casos, incluir também amostras de estômago, coração e intestino delgado para histopatologia.

*Alternativamente, pode-se cortar o cérebro no sentido longitudinal e colocar metade em formol (com cortes transversais incompletos) (Figura 4) e a outra metade enviar para exame microbiológico.

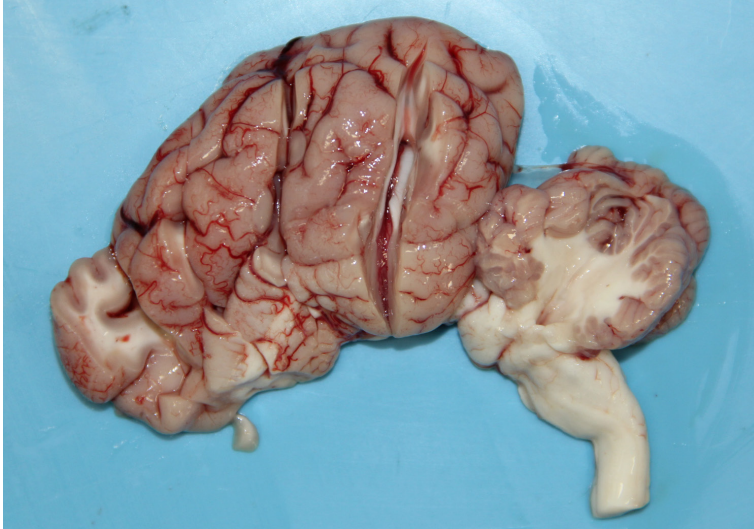


Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa

Figura 4. Metade do cérebro com cortes transversais para histopatologia.

Diarreia em leitões na maternidade

Sinais clínicos: diarreia e desidratação, com ou sem mortalidade ou de-finhamento dos leitões.

Agentes mais comuns: *E. coli*, *Clostridium perfringens*, Rotavírus, *Isospora suis*, *Clostridium difficile*.

Amostras a serem colhidas e exames a serem solicitados:

1. Exame microbiológico (bacteriologia, virologia, PCR):

- Alças intestinais, porções de 10 cm amarradas nas extremidades (Figura 5), colhidas em sacos plásticos (Figura 6) da seguinte maneira:
 - Um fragmento de jejuno.
 - Um fragmento de íleo.
 - Um fragmento de cólon.

Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa



Figura 5. Colheita de intestino para exame microbiológico.

Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa



Figura 6. Acondicionamento de intestino para exame microbiológico.

Observação: os três fragmentos podem ser acondicionados no mesmo saco plástico e devem ser enviados refrigerados ao laboratório. A localização das diferentes partes do intestino pode ser observada na Figura 7.

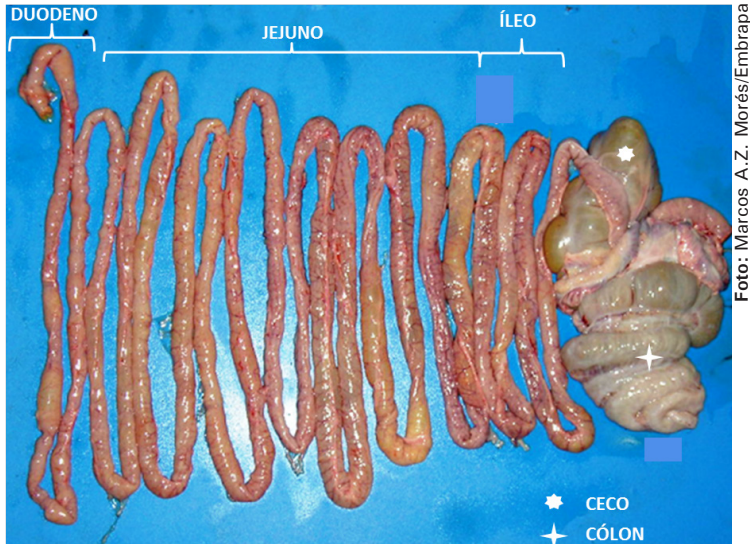


Figura 7. Esquema das partes do intestino.

2. Exame histopatológico e de imuno-histoquímica:

- Porções de 2 cm de comprimento (Figura 8) das alças intestinais colhidas em formol 10 % tamponado, das seguintes regiões:
 - Dois fragmentos de jejunum.
 - Dois fragmentos de íleo.
 - Dois fragmentos de cólon.

Observação: na coleta, dar preferência para áreas com lesões macroscópicas de hiperemia, espessamento ou necrose, quando observadas.

Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa



Figura 8. Colheita de intestino para exame histopatológico.

Diarreias em animais de creche, crescimento e terminação

Sinais clínicos: diarreia com ou sem sangue e com ou sem mortalidade e definhamento dos leitões.

Agentes mais comuns: *E. coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira* sp. e *Salmonella* sp.

Amostras a serem colhidas e exames a serem solicitados:

1. Exame microbiológico (bacteriologia, PCR):

- Alças intestinais, porções de 10 cm amarradas nas extremidades (Figura 5), colhidas em sacos plásticos (Figura 9) da seguinte maneira:
 - Um fragmento de jejunó.
 - Um fragmento de íleo.
 - Um fragmento de cólon.

Observação: os três fragmentos podem ser acondicionados no mesmo saco plástico e devem ser enviados refrigerados ao laboratório. A localização das diferentes partes do intestino pode ser observada na Figura 7.



Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa

Figura 9. Amostra de intestino para exame microbiológico.

2. Exame histopatológico e de imuno-histoquímica:

- Porções de 2 cm de comprimento das alças intestinais (Figura 8) colhidas em formol 10 % tamponado, das seguintes regiões:
 - Dois fragmentos de jejuno.
 - Dois fragmentos de íleo.
 - Dois fragmento de ceco.
 - Dois fragmento de cólon.

Observação: se forem observadas áreas com lesões macroscópicas (hiperemia, espessamento ou necrose), colher as amostras preferencialmente nestes locais.

Doenças respiratórias

Sinais clínicos: dispneia, hipertermia e apatia, com ou sem tosse.

Agentes mais frequentes: *Mycoplasma hyopneumoniae*, vírus Influenza, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Haemophilus parasuis*.

Amostras a serem colhidas e exames a serem solicitados:

1. Exame microbiológico (bacteriologia, virologia, PCR):

- Exsudatos de pleura ou pericárdio (quando presentes) colhidos com suabes (nesse caso enrolar a fibrina no suabe) ou seringas (Figura 10).
- Lesões pulmonares colhidas em sacos plásticos (Figuras 11 e 12), individualmente, por animal
- Estas amostras devem ser enviadas refrigeradas ao laboratório.

2. Exame histopatológico e de imuno-histoquímica:

- Lesões pulmonares colhidas em formol 10 % tamponado (Figura 13).

Observações:

- Em casos com suspeita de circovirose, incluir amostras de linfonodos mesentéricos e inguinais para histopatologia e imuno-histoquímica.
- Em casos cursando com dificuldade respiratória superior e surto de espirros, incluir amostras de cornetos para histopatologia.
- Nos casos com presença de exsudatos nas serosas, colher material em mais de um local (pericárdio, pleura e peritônio) para aumentar a chance de isolamento bacteriano.
- Não colher amostras das serosas de animais com serosite crônica (adesões firmes de pleura e pericárdio). Neste estágio, os agentes causadores não estão mais presentes.

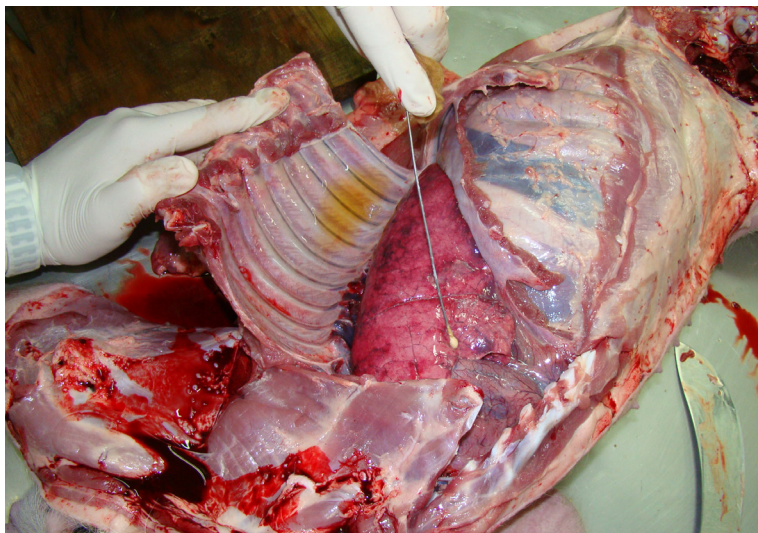


Foto: Nelson Morés/Embrapa

Figura 10. Colheita de exsudato da pleura com suabe.

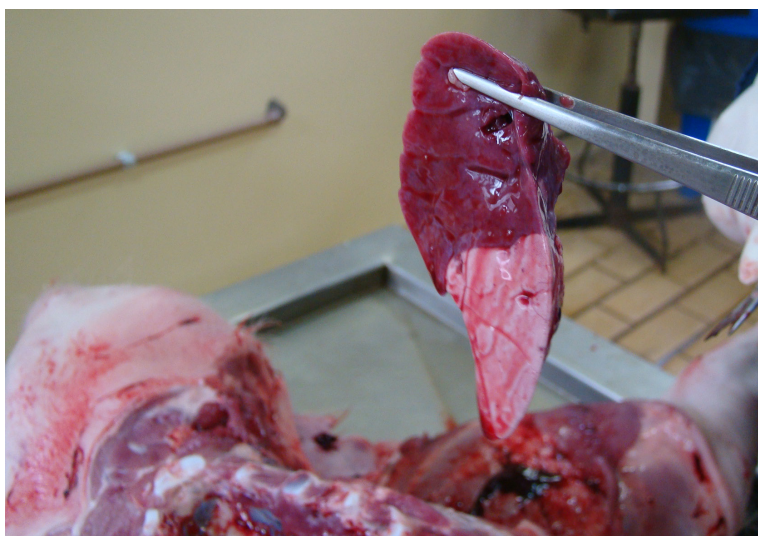


Foto: Nelson Morés/Embrapa

Figura 11. Colheita de pulmão para exame microbiológico.

Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa



Figura 12. Amostra de pulmão para exame microbiológico.

Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa



Figura 13. Amostras para histopatologia.

Doenças reprodutivas

Sinais clínicos: abortos, leitões mumificados (Figura 14), natimortos, retornos ao cio, falsa gestação e nascimento de leitões fracos.

Causas infecciosas mais frequentes: parvovirose, circovirose, erisipela, leptospirose, brucelose, septicemias virais ou bacterianas.



Foto: Nelson Morés/Embrapa

Figura 14. Fetos mumificados.

Amostras a serem colhidas e exames a serem solicitados:

1. Exame microbiológico (bacteriologia, virologia, PCR):

- Fragmentos de diversos órgãos dos fetos (pulmão, coração, fígado e rim) colhidos em sacos plásticos estéreis.
- Líquidos fetais (torácico) colhidos com auxílio de seringas estéreis.
- Estas amostras devem ser enviadas refrigeradas ao laboratório.

Observação: se não houver líquido suficiente, pode-se refrigerar ou congelar os tecidos e depois de um dia coletar o líquido que irá fluir do tecido.

2. Exame sorológico (pesquisa de anticorpos):

- Líquidos fetais (torácico) colhidos com auxílio de seringas.

Observação: a presença de anticorpos neste material indica infecção intrauterina.

3. Exame histopatológico e de imuno-histoquímica:

- Fragmentos de pulmão, coração, rim, fígado.

Observação: outras informações sobre causas infecciosas de doenças reprodutivas podem ser acessadas no link: www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/920348/causas-infecciosas-de-problemas-reprodutivos-na-producao-de-suinos.

Doenças de pele

Sinais clínicos: alterações na pele, com ou sem outros sinais clínicos.

As alterações mais frequentes na pele são: cor, presença de exsudatos, espessamento, crostas com escamações, nódulos, pápulas, pústulas, úlceras, vesículas e necrose.

Causas mais frequentes: Epidermite exsudativa (*Staphylococcus hyicus*) (Figura 15), piodermite por *Streptococcus* sp., dermatite por Circovírus suíno Tipo 2 (PCV2), lesões abrasivas por traumas ou pelo piso das instalações, sarna (*Sarcoptes scabiei* var. suis), erisipela (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) (Figura 16), Seneca Valley vírus (SVV), deficiência nutricional (deficiência de vitamina A e zinco) e picada de insetos.

Observação: em casos com presença de vesículas, especialmente no focinho e coroa do casco, deve-se suspeitar das doenças vesiculares dos suínos e, neste caso, o serviço oficial de defesa sanitária animal deve ser imediatamente informado.



Foto: Nelson Morés/Embrapa

Figura 15. Leitão com epidermite exsudativa.



Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa

Figura 16. Lesões de erisipela.

Amostras a serem colhidas e exames a serem solicitados:

1. Exame microbiológico (Isolamento ou PCR de bactérias, vírus e fungos):

- Aspiração do conteúdo de vesículas, pústulas ou abscessos intactos utilizando seringas estéreis e encaminhar refrigerado ao laboratório. Cultura de feridas abertas (erosões e úlceras).
- No caso de lesões necróticas na epidermite exsudativa, retirar a escarra com uma pinça ou bisturi e colher suabe umedecido da ferida subjacente.
- Estas amostras devem ser enviadas refrigeradas ao laboratório.

2. Exame direto

- Raspado profundo de pele, principalmente do interior do pavilhão auricular, para identificação de ectoparasitas (*Sarcoptes scabiei* variedade *suis*).
- Estas amostras devem ser enviadas refrigeradas ao laboratório.

3. Exame histopatológico

- Fragmentos de pele abrangendo uma porção lesionada e uma normal, colhido em formol tamponado 10 %.
- Fragmentos de diversos órgãos (pulmão, coração, fígado, rim, baço e linfonodos) colhidos em formol tamponado 10 %, se houver suspeita de doenças sistêmicas.

Doenças sistêmicas

Sinais clínicos: letargia, prostração, anorexia, dispneia, cianose (Figura 17), mortes súbitas, sinais nervosos, febre (temperatura retal > 40 °C), diarreia e aumento de volume nas articulações. Estes sinais são bem variáveis, sendo que alguns podem estar presentes e outros não.



Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa

Figura 17. Animal com sinais de doença sistêmica.

Possíveis causas: salmonelose, circovirose, erisipela, doença de Glasser, septicemia por *Streptococcus* sp, peste suína clássica ou leptospirose aguda.

Observação: no caso de suspeita de peste suína clássica, o serviço veterinário oficial deve ser imediatamente notificado, mesmo antes da colheita de materiais para exames.

Amostras a serem colhidas e exames a serem solicitados:

1. Exame microbiológico (bacteriologia, virologia, PCR):

- Fragmentos de diversos órgãos (pulmão, linfonodos, fígado e baço) colhidos em sacos plásticos estéreis.
- Coleta do cérebro (suabe ou fragmento) em casos de sinais nervosos ou de morte súbita.
- Quando presentes, colher exsudatos inflamatórios com auxílio de seringas (Figura 18) ou suabes estéreis.

- Em casos cursando com diarreia, colher alças intestinais (porções de 10 cm amarradas nas extremidades) em sacos plásticos estéreis.
- Estas amostras devem ser enviadas refrigeradas ao laboratório.

Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa



Figura 18. Colheita de exsudato articular na face externa da articulação do jarrete.

2. Exame histopatológico e de imuno-histoquímica:

- Fragmentos de pulmão, coração, rim, fígado, baço e linfonodos.
- Cérebro, em casos com sinais nervosos ou mortes súbitas.
- Em casos cursando com diarreia, colher porções de 1 a 2 cm de alças intestinais dos locais com alterações macroscópicas.
- Estas amostras devem ser colhidas e fixadas imediatamente em formol 10 % tamponado para envio ao laboratório.

Observação: outros tecidos devem ser colhidos sempre que forem observadas alterações macroscópicas.

Exames laboratoriais

Diagnóstico histopatológico

Princípio: observação de lesões microscópicas nos tecidos. Não é indicado para monitoramentos, apenas para análise de animais apresentando sinais clínicos.

Muitas vezes, o exame histopatológico não é confirmatório, porém direciona para os possíveis processos patológicos envolvidos: causa viral, bacteriana ou tóxica, orientando a realização de outros exames.

É um exame fundamental para a interpretação de outros resultados laboratoriais.

Quando associado à imuno-histoquímica ou hibridização *in situ*, pode fornecer diagnóstico conclusivo.

Colheita das amostras: colhem-se os tecidos nos quais os agentes suspeitos causam lesões, colocando-os diretamente e imediatamente em um fixador de tecidos. O mais utilizado é o formol a 10 % tamponado, conforme a seguinte formulação:

Para um litro de formol 10 %:

- Formol comercial (37 a 40 %).....100 mL
- Fosfato de potássio monobásico.....4,0 g
- Fosfato de potássio dibásico.....6,5 g
- Água destilada.....900 mL

A utilização de formol tamponado é especialmente importante para testes de imuno-histoquímica.

Cuidados na colheita:

- Coletar os tecidos o mais rápido possível após a eutanásia e colocá-los imediatamente no fixador, evitando alterações autolíticas.
- Coletar porções de tecido com espessura máxima de 1 cm, para melhor fixação (Figura 19).
- A proporção de formol/tecido deve ser de 9:1 (Figura 20).
- Não se deve refrigerar o material em formol. Manter e enviar ao laboratório em temperatura ambiente.
- Utilizar frascos de boca larga, como recipientes para as amostras.
- Ter o cuidado para não lesionar os tecidos, pressionando-os com pinças ou raspando-os com facas ou outros instrumentos.
- Diferentes tecidos de um mesmo animal podem ser colocados no mesmo frasco, porém amostras de animais diferentes devem ser colocadas em frascos separados.

Foto: Marcos A. Z. Morés/Embrapa

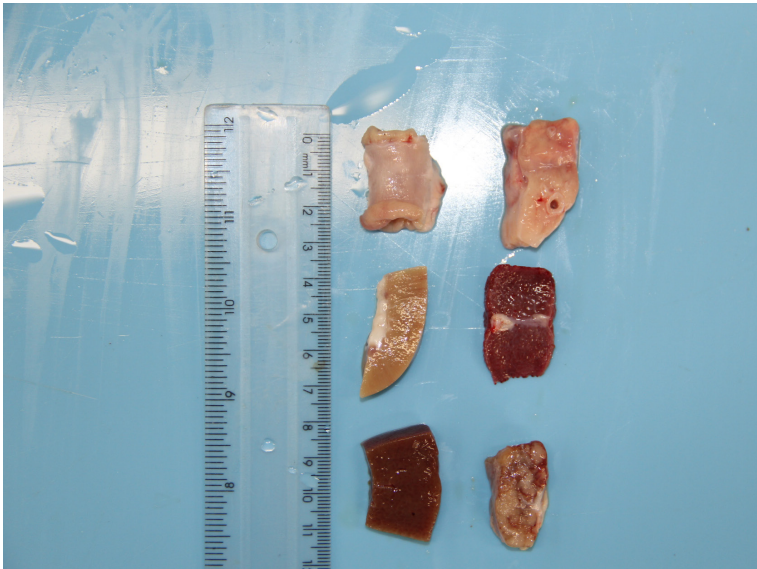


Figura 19. Tamanho dos tecidos para histopatologia.

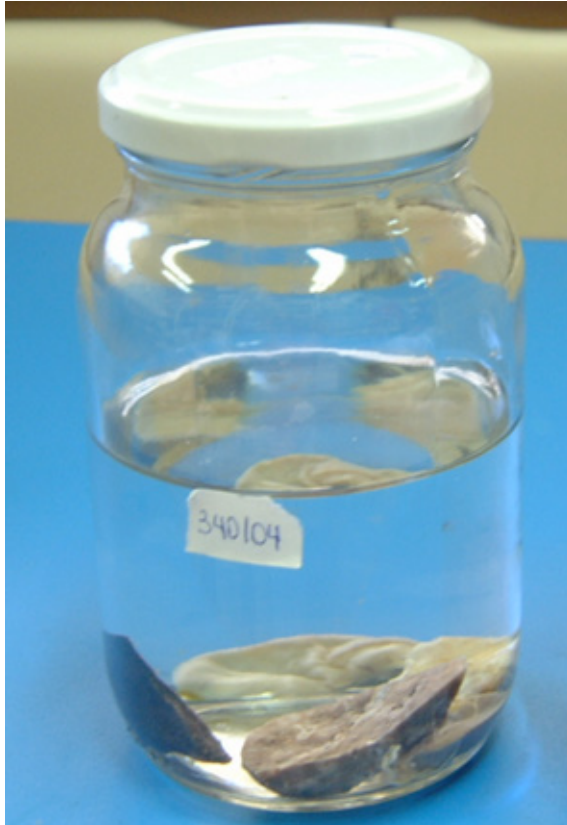


Foto: Nelson Morés/Embrapa

Figura 20. Proporção correta de formol/tecido.

Diagnóstico microbiológico: isolamento microbiano

Princípio: Isolamento e identificação de agentes infecciosos viáveis envolvidos no processo patológico. O isolamento de bactérias permite a realização de exames de sensibilidade antimicrobiana como antibiogramas ou concentração inibitória mínima (CIM) para direcionar o tratamento a campo.

Colheita das amostras: os animais de escolha para colheita de amostras são aqueles no curso agudo da doença e, no caso de suspeita de bactéria, animais que não estejam recebendo tratamento antimicrobiano, principalmente pela via parenteral.

Colher os tecidos sempre dando preferência aos locais onde existem lesões macroscópicas (espessura de aproximadamente 5 x 5 cm para órgãos parenquimatosos) (Figura 21) e 10 cm de comprimento para intestinos. Acondicioná-los diretamente e imediatamente em recipiente estéril (saco plástico) sob refrigeração (4 °C).



Foto: Marcos A. Z. Morés/Embrapa

Figura 21. Colheita de pulmão com lesão para microbiologia.

Alças intestinais devem ser amarradas nas extremidades (Figura 8).

Em casos com presença de líquido alterado (turvo e/ou com fibrina) nas cavidades (exsudatos de pleura, pericárdio, articulações, líquido cefaloraquidiano - em caso de sintoma nervoso), colher o líquido com o auxílio de seringa e agulha estéreis ou suabes (Figura 22).

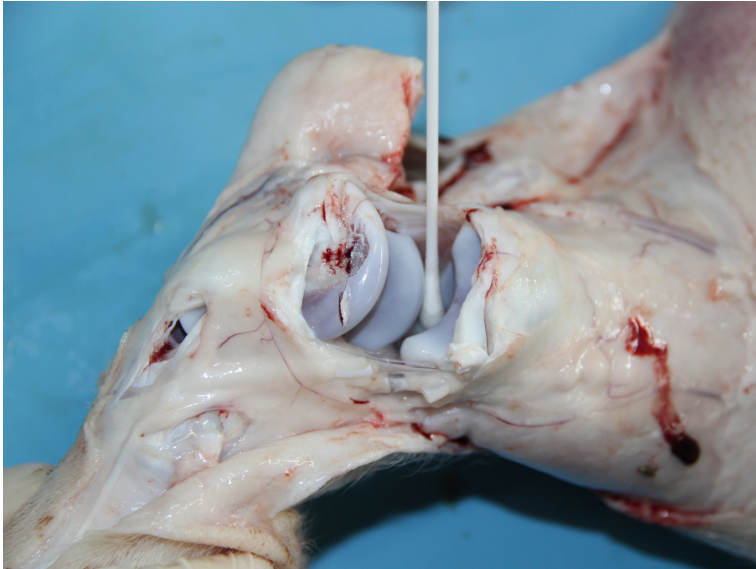


Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa

Figura 22. Colheita de suabe de articulação.

Na colheita de suaves, enrolar a fibrina no suabe ou utilizar meios de transporte específicos para os agentes de interesse.

O tempo entre colheita e processamento da amostra não deve ultrapassar 48 horas.

Cuidados na colheita e envio ao laboratório:

- Para evitar contaminações, sempre priorizar a colheita de amostras destinadas para isolamento bacteriano.
- Evitar o envio de órgãos inteiros, pois prejudica a conservação dos mesmos.
- Utilizar caixa de isopor e gelo gel reciclável suficiente para manter o ambiente refrigerado (4 °C). Nunca congelar as amostras. O espaço vazio que por ventura sobrar na caixa deve ser preenchido com jornal ou papel amassado para manter melhor a temperatura e o material organizado.

Cuidados na interpretação dos resultados: isolamento de bactérias normais da microbiota de alguns tecidos (por exemplo, *E. coli* e *Clostridium perfringens* do intestino; *Haemophilus parasuis* ou *Streptococcus suis* do pulmão ou tonsilas, dentre outros) não é garantia de que o agente isolado desses locais seja o causador do problema. Nestas situações, é necessário associar o diagnóstico bacteriológico com outros exames laboratoriais (por exemplo, patológico) ou realizar ensaios adicionais de tipificação ou pesquisa de fatores associados à virulência (por exemplo, pesquisa de fímbrias de *E. coli*).

Diagnóstico por imuno-histoquímica (IHQ)

Princípio: utilizando anticorpos específicos, o teste identifica antígenos em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina (reação antígeno/anticorpo). O teste pode ser utilizado para pesquisa de antígenos de agentes infecciosos (Figura 23) ou antígenos celulares específicos. Não é indicado para monitoramentos, apenas para análise de animais apresentando sinais clínicos.

Em suinocultura, é mais utilizado para agentes infecciosos de difícil isolamento, como PCV2, *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira* sp. e *Mycoplasma hyopneumoniae*.

É um teste complementar e sempre associado à histopatologia, porque permite relacionar diretamente a presença do agente etiológico com as lesões.

Colheita das amostras: para imuno-histoquímica, são utilizadas as mesmas amostras enviadas ao laboratório para exame histopatológico, das quais serão preparadas novas lâminas para este teste. Portanto, as orientações para colheita são as mesmas descritas para o exame histopatológico.

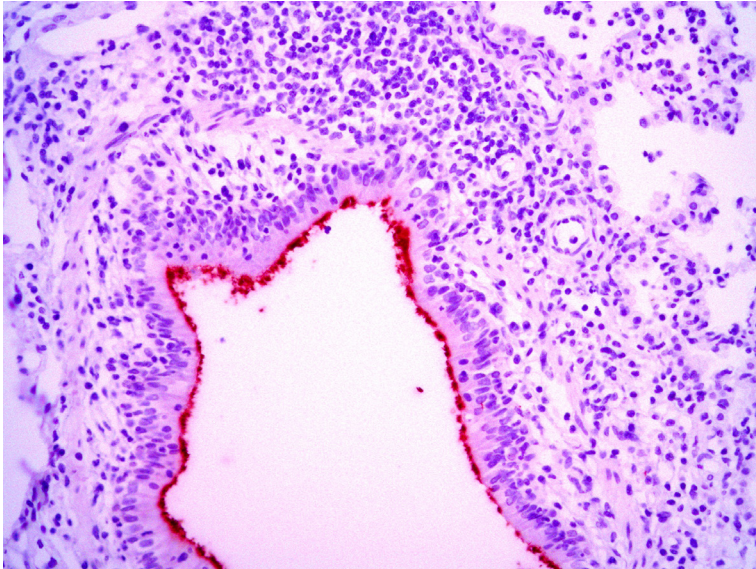


Foto: Marcos A.Z. Morés/Embrapa

23. IHQ positiva para *Mycoplasma hyopneumoniae* (marcação positiva em vermelho).

Cuidados na interpretação dos resultados: em lesões crônicas, muitas vezes o antígeno (vírus ou bactéria) pode não estar mais presente nos tecidos. Neste caso, o resultado da IHQ vai dar negativo, mesmo na presença de lesões compatíveis com a infecção. Este fator é crítico principalmente para agentes virais como Influenza e Rotavírus. Por esta razão, é sempre importante a colheita de amostras de animais na fase aguda do quadro clínico.

Diagnóstico molecular (PCR, RT-PCR e qPCR)

Princípio: detecção do material genético (DNA ou RNA) específico de um agente etiológico (bactéria, fungo, vírus ou protozoário) presente na amostra (tecido, fluído e excreta).

Estas técnicas permitem apenas a identificação do material genético na amostra pesquisada e não a sua viabilidade. São importantes para detecção de microrganismos de difícil crescimento *in vitro* (por exemplo, vírus, micoplasmas, espiroquetas e bactérias intracelulares como *Lawsonia intracellularis*).

As técnicas moleculares podem ser utilizadas para diagnóstico de problemas clínicos quando associadas com outros exames como a histopatologia, ou para identificação de portadores para monitoramento de animais em quarentena, estudos de dinâmica da infecção em rebanhos e doenças exóticas, entre outros.

Definições:

- **PCR:** Reação em Cadeia pela Polimerase (objetivo: detectar DNA).
- **RT-PCR:** Reação de transcriptase reversa, seguida de uma reação de PCR (objetivo: detectar RNA).
- **qPCR:** Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (objetivo: detectar e/ou quantificar DNA em tempo real).
- **RT-qPCR:** Reação de transcriptase reversa, seguida de uma reação de PCR em Tempo Real (objetivo: detectar e/ou quantificar RNA).
- **Multiplex PCR:** Detecção de mais de um alvo na mesma reação. Pode ser utilizado para detectar, ao mesmo tempo, mais de um agente, diferentes sorotipos ou diferentes fatores de virulência, por exemplo.

Colheita das amostras: normalmente, os procedimentos são os mesmos indicados para a colheita de materiais para isolamento microbiológico. Os animais de escolha para colheita de amostras são aqueles no curso agudo da doença.

Colhem-se os tecidos com lesões, colocando-os diretamente e imediatamente em recipiente estéril (saco plástico) e sob refrigeração (4 a 8 °C).

Observação: pode ser o mesmo material destinado ao exame microbiológico (bacteriológico ou virológico).

Tamanho da amostra:

- **Tecidos:** tamanho aproximado de 5 a 10 cm.
- **Sangue, líquidos e secreções:** aproximadamente 1 mL, colhido com seringa e agulha novas ou com auxílio de suabes. É sempre importante fazer contato prévio como o laboratório, pois a quantidade de material necessária pode variar de acordo com a técnica.
- **Fezes:** 5 g.

Para pesquisa de agentes virais, deve-se utilizar suabes sintéticos (draccon ou rayon). Neste caso, os suabes devem ser armazenados em meio de transporte de vírus (meio de cultura ou solução salina de fosfatos - PBS suplementado com antibióticos, antimicóticos e albumina sérica bovina fração V; OIE 2010). Como alternativa, pode ser utilizado como meio de transporte apenas solução salina (pH: 6,00).

Cuidados na colheita:

- Juntamente com o material para exame bacteriológico, deve ser o primeiro material a ser colhido para evitar contaminação da amostra.
- Evitar o envio de órgãos inteiros, porque prejudica a conservação.
- Utilizar caixa de isopor e gelo gel reciclável para manter o ambiente refrigerado para o transporte das amostras.
- Na colheita de sangue total, utilizar EDTA como anticoagulante. Nunca utilizar heparina, porque inibe as reações de PCR.
- Para detecção de DNA (PCR ou qPCR), as amostras podem ser congeladas para o envio ao laboratório.
- Para detecção de RNA (RT-PCR ou RT-qPCR), enviar o material refrigerado, nunca congelar as amostras. O tempo entre a colheita do material e a entrada no laboratório deve ser de no máximo 48 horas.

Cuidados na interpretação: detecção de microrganismos normais da microbiota de alguns tecidos, por exemplo:

- *E. coli* e *Clostridium perfringens* do intestino.
- *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* do pulmão/tonsilas.
- PCV2 em linfonodos ou outros tecidos.

A detecção destes microrganismos nestes tecidos não é garantia de que este seja o agente causador do problema. Nestas situações, é necessário associar o diagnóstico molecular com outros ensaios laboratoriais (por exemplo, patológico), ou realizar ensaios adicionais de tipificação (por exemplo, pesquisa de fímbrias de *E. coli*).

Embrapa

Suínos e Aves

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

