



**SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA  
COORDENAÇÃO GERAL DE APOIO LABORATORIAL  
LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO – LANAGRO/SP**

**NOTA TÉCNICA N.º 016/06**

**Em 22 de novembro de 2006.**

### **TÍTULO**

**Alteração nos meios de transporte para coleta de material para diagnóstico virológico da Doença de Newcastle e Influenza Aviária**

#### **1. Antecedentes:**

A Instrução Normativa nº 32, de 13 de maio de 2002, que rege as Normas Técnicas de vigilância para a Doença de Newcastle e Influenza Aviária, preconiza (item 3.1 do Capítulo VIII) a utilização de PBS pH 7,2, com antibióticos, como meio de transporte para amostras de suabes de cloaca, suabes de traquéia, órgãos e fezes, para fins de diagnóstico laboratorial da Doença de Newcastle e Influenza Aviária. Já o Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle, versão 1.0, de junho de 2006, preconiza em seu capítulo 5.4, a utilização do meio de transporte MEM (“Minimal Essential Medium”) acrescido de soro fetal bovino e solução de antibióticos. Tal divergência tem causado confusão, especialmente no caso da remessa de amostras provenientes dos abatedouros em atendimento à Instrução Normativa nº 17, de 07 de abril de 2006.

#### **2. Componente Técnico:**

A experiência recente do LANAGRO/SP com o diagnóstico virológico de Influenza Aviária e Doença de Newcastle e o treinamento de alguns de seus técnicos em laboratórios de referência internacional nos EUA e Canadá têm demonstrado que o PBS pH 7,2 com antibióticos não constitui o meio ideal para transporte de amostras visando a pesquisa de vírus hemaglutinantes. Além disso, o volume de meio preconizado no Plano de Contingência também não é o ideal.

#### **3. Análise**

Assim sendo, o LANAGRO/SP preparou uma lista com três opções de meios que poderão ser utilizados para transporte de amostras de órgãos, suabes cloacais e suabes traqueais para fins de diagnóstico laboratorial da Doença de Newcastle e Influenza Aviária, baseados em informações obtidas em laboratórios de referência para a OIE para estas enfermidades. Tais meios poderão ser utilizados tanto para isolamento viral como para o diagnóstico molecular (RT-PCR e Real Time RT-PCR).

#### **4. Conclusão**

Solicitamos que seja publicada, com a máxima urgência, uma regulamentação que harmonize a legislação vigente no tocante aos meios de transporte utilizados para coleta de amostras para diagnóstico laboratorial da Doença de Newcastle e Influenza Aviária. Os meios propostos pelo LANAGRO/SP estão em anexo e são os mesmos que constarão no Manual de Coleta de Amostras para diagnóstico da Doença de Newcastle e Influenza Aviária que está sendo preparado pela CGAL.

## **ANEXO – PROCEDIMENTO PARA COLETA DE AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIÁRIA**

### **Suabes de cloaca e traquéia**

Escolher 2 a 3 aves com início de sintomas e 1 a 2 aves ainda saudáveis. Usar um suabe de cloaca e um de traquéia para cada ave. Introduzir um suabe na cloaca da ave, raspando bem suas paredes internas. Para o suabe de traquéia, puxar a língua da ave e introduzi-lo profundamente em sua garganta. Podem ser coletados suabes de traquéias de aves necropsiadas. Colocar cada suabe em um microtubo criogênico de 2 ml com tampa de rosca e anel de vedação de borracha contendo 1 ml do meio de transporte e fechar bem o frasco. Identificá-los com o tipo de suabe, número do lote e outras informações cabíveis, juntar os frascos coletados de um mesmo lote e colocar imediatamente em saco plástico. Fechar bem o saco e colocar em caixa de isopor com gelo seco ou reciclável ou em tanque contendo nitrogênio líquido. Nunca misturar no mesmo frasco suabes de traquéia e suabes de cloaca.

### **Necropsia e coleta de órgãos**

Coletar cada ave separadamente, nunca misturando órgãos de aves diferentes. Coletar material de 3 a 5 aves doentes em fase aguda da doença por cada lote, podendo ser incluídas aves recentemente mortas desde que sem evidência de autólise dos órgãos.

Remover fragmentos dos órgãos conforme grupos determinados por tipo de sistema, ou seja, digestivo, respiratório e nervoso, separadamente. Colocar fragmentos dos órgãos, não maiores que 3 cm, em tubos/frascos plásticos descartáveis de capacidade para 15 ml com tampa de rosca contendo 5 ml do meio de transporte. Fazer 3 “pools”: sistema digestivo (intestino delgado com pâncreas e ceco com tonsilas cecais), sistema respiratório (pulmão e traquéia) e sistema nervoso (cérebro).

## **Formulação dos meios de transporte**

### **Opção 1: Meio de cultivo celular MEM (“Minimal Essential Medium”) com 10% de soro bovino (ou 10% de soro fetal bovino) e com concentração 0,5X de solução de antibióticos.**

Fórmula:

- 850 ml meio de cultura de células MEM estéril.
- 100 ml soro fetal bovino (ou soro bovino) estéril.
- 50 ml solução 10X de Antibióticos estéril (preparado conforme tabela abaixo).

Distribuir 1 ml por frasco (microtubo criogênico de 2 ml com tampa de rosca e anel de vedação de borracha estéreis) e congelar até o momento de uso. Para coleta de órgãos distribuir 5 ml em tubos/frascos plásticos descartáveis de capacidade para 15 ml com tampa de rosca e estéreis.

### **Opção 2: Meio BHI (“Brain Heart Infusion”) com solução 0,5X de antibióticos.**

Fórmula:

- Infusão de cérebro: 200g
- Infusão de coração: 250g
- Peptona proteose: 10g
- Dextrose: 2g
- Cloreto de sódio: 5g
- Fosfato dissódico: 2,5g

Hidratar em 1000 ml de água deionizada e acertar o pH para  $7,4 \pm 0,2$ . Autoclavar ( $121^{\circ}\text{C}/15\text{min}$ ). Adicionar 50 ml da solução 10X de antibióticos estéril a 950 ml do caldo BHI estéril. Distribuir 1 ml por frasco (microtubo criogênico de 2 ml com tampa de rosca e anel de vedação de borracha estéril) e congelar até o momento de uso. Para coleta de órgãos distribuir 5 ml em tubos/frascos plásticos descartáveis de capacidade para 15 ml com tampa de rosca e estéreis.

### **Opção 3: Caldo Triptose Fosfato Tamponado com solução 0,5X de antibióticos.**

Fórmula:

- Triptose: 20g
- Dextrose: 2g
- Cloreto de sódio: 5g
- Fosfato dissódico: 2,5g

Hidratar em 1000 ml de água deionizada e acertar o pH para  $7,3 \pm 0,2$ . Autoclavar ( $121^{\circ}\text{C}/15\text{min}$ ). Adicionar 50 ml da solução 10X de antibióticos estéril a 950 ml do caldo Triptose Fosfato Tamponado estéril. Distribuir 1 ml por frasco (microtubo criogênico de 2 ml com tampa de rosca e anel de vedação de borracha estéreis) e congelar até o momento de uso. Para coleta de órgãos distribuir 5 ml em tubos/frascos plásticos descartáveis de capacidade para 15 ml com tampa de rosca e estéreis.

### Solução 10x de Antibióticos

Antibiótico	Concentração final de uso na amostra	Concentração/ml na solução 10X	Para 100 mL de solução 10X
Penicilina G potássica	10.000 UI/ml	100.000 UI/ml	10.000.000 UI
Estreptomicina	5.000 µg/ml	50.000 µg/ml	5.000.000 µg
Gentamicina	1.000 µg/ml	10.000 µg/ml	1.000.000 µg
Kanamicina sulfato	650 µg/ml	6.500 µg/ml	650.000 µg
Amphotericina B	10 µg/ml	100 µg/ml	10.000 µg
PBS-Dulbeco	Ajustar volume final para 100ml com PBS-Dulbeco estéril		

#### Fórmula PBS-Dulbeco:

- Cloreto de sódio: 8g
- Cloreto de potássio: 0,2g
- Cloreto de cálcio: 0,1g
- Fosfato de sódio dibásico: 1,03g
- Fosfato de potássio monobásico: 0,2g
- Cloreto de magnésio: 0,1g

Hidratar em 1000 ml de água deionizada. Autoclavar (121°C/15min) e estocar a 4°C.