



Instituto Nacional de
Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

MANUAL DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

PCA-001-A

Edição n.º 03 23-07-2024

Página 1 de 6

PROCEDIMENTO DE COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMAIS PARA ANÁLISE DE ADN

LISTA DE RESPONSÁVEIS PELO DOCUMENTO:

	NOME	FUNÇÃO	RUBRICA E DATA
Elaborado	Maria Inês Carolino	Técnico responsável pelo ensaio	
Verificado		Responsável da Qualidade	
Aprovado	Maria Fátima Santos Silva	Responsável Técnico	

LISTA DE DETENTORES DO DOCUMENTO¹:

TIPO	SUPORTE	LOCAL	VÁLIDA ATÉ
Original	Papel/SI	INIAV/UEIS/Laboratório Genética Molecular	Próxima edição
Cópia Eletrónica	SI	Servidores do INIAV	Data da impressão

ALTERAÇÃO (ÕES) Á ÚLTIMA REVISÃO:

¹ Nota: O original da versão anterior é arquivado na pasta de obsoletos.

O original deste documento é válido quando rubricado por todos os responsáveis (ver lista) na 1ª página.

- PROIBIDA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTES DOCUMENTOS SEM AUTORIZAÇÃO DO EMISSOR -

-Certifique-se que está a utilizar a última versão válida deste documento -



Instituto Nacional de
Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

MANUAL DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

PCA-001-A

Edição n.º 03 23-07-2024

Página 2 de 6

PROCEDIMENTO DE COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMAIS PARA ANÁLISE DE ADN

ÍNDICE

1. OBJETIVO	3
2. ÂMBITO.....	3
3. REFERÊNCIAS	3
4. RESPONSABILIDADES	3
5. SIGLAS E DEFINIÇÕES.....	3
6. ADVERTÊNCIAS.....	4
7. PROCEDIMENTO	4
8. MODELOS	6
9. ANEXOS	6

O original deste documento é válido quando rubricado por todos os responsáveis (ver lista) na 1ª página.

- PROIBIDA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTES DOCUMENTOS SEM AUTORIZAÇÃO DO EMISSOR -

-Certifique-se que está a utilizar a última versão válida deste documento -



Instituto Nacional de
Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

MANUAL DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

PCA-001-A

Edição n.º 03 23-07-2024

Página 3 de 6

PROCEDIMENTO DE COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMAIS PARA ANÁLISE DE ADN

1. OBJETIVO

Este Manual pretende descrever os principais procedimentos na colheita de amostras de origem animal das espécies bovina, ovina, caprina, suína ou equina, *in vivo* ou *post mortem*, para posterior análise genética através da determinação do perfil de ADN

2. ÂMBITO

Este manual foi elaborado no âmbito das atividades desenvolvidas no Laboratório de Genética Molecular do Polo de Investigação da Fonte Boa (LGM), e destina-se a todas as entidades que procedam à colheita de amostras de animais para análise genética através do perfil de ADN.

3. REFERÊNCIAS

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.01_COLLECTION_DIAG_SPECIMENS.pdf

<http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.pdf>

Decreto-lei n.º 241/90 de 25 de Julho Portaria n.º 760/91 de 6 de Agosto

Decreto-lei n.º 244/2000 de 27 de Setembro Circulares n.º 44 e 45 da DGV/DSSA de 5 de Julho de 2002

4. RESPONSABILIDADES

A colheita e envio de amostras para o laboratório é da responsabilidade do cliente (entidade que solicita a análise). O envio para análise de amostras inadequadas ou mal acondicionadas pode colocar em causa o resultado analítico. Desta forma, para a adequada análise do perfil de ADN e da identificação do animal é fundamental garantir a correta recolha e integridade das amostras. Deverá ser assegurado que não existe conspurcação de material ou tecidos, trocas ou misturas do tubo/identificação/animal aquando da recolha. Este tipo de erro não pode ser detetado pelo Laboratório, que se limita a analisar as amostras que lhe chegam, e dará resultados tendo em conta a identificação efetuada no momento da recolha.

O laboratório reserva o direito de rejeição das amostras para análise, em caso de insuficiência de quantidade, falta de integridade e/ou falta de requisitos de conservação ou entregas fora do horário de funcionamento.

Todos os dados relacionados com as amostras são considerados confidenciais.

5. SIGLAS E DEFINIÇÕES

Amostra – Qualquer fluido ou fragmento de tecido biológico do qual é possível extrair ADN

LGM – Laboratório de Genética Molecular

INIAV – Instituto Nacional de Investigação, Alimentação e Veterinária

ADN – Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Àcido etilenodiaminotetracético

O original deste documento é válido quando rubricado por todos os responsáveis (ver lista) na 1ª página.

- PROIBIDA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTES DOCUMENTOS SEM AUTORIZAÇÃO DO EMISSOR -

-Certifique-se que está a utilizar a última versão válida deste documento -

PROCEDIMENTO DE COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMAIS PARA ANÁLISE DE ADN

6. ADVERTÊNCIAS

Durante todo o procedimento de colheita e acondicionamento das amostras, devem ser tomadas as precauções elementares de assepsia (uso de luvas, bata, máscara, calçado apropriado), visto tratar-se de um procedimento suscetível de causar infeção no homem.

O material descartável utilizado na colheita deverá ser considerado lixo biológico e eliminado de acordo com a legislação vigente.

7. PROCEDIMENTO

O Laboratório de Genética Molecular pode fornecer informação crucial para a identificação animal. No entanto, só o poderá fazer se as amostras forem de boa qualidade, em quantidade suficiente, colhidas adequadamente e acompanhadas pela respetiva informação e documentação devidamente preenchida de forma legível.

Tipo de amostra: É possível extrair e isolar o ADN a partir de diversos tipos de tecido biológico (sangue, pêlo, carne, cartilagem, osso, sémen, etc.).

7.1. SANGUE

O sangue é a amostra de eleição para as várias análises genéticas. Recomenda-se a colheita de sangue por punção numa veia periférica, para tubos com anticoagulante (EDTA) (NÃO utilizar heparina), tendo o cuidado de não exceder 2/3 da capacidade do tubo (10 ml). Homogeneizar o sangue, devagar, invertendo o tubo várias vezes.

Utilizar sempre uma agulha nova por cada animal amostrado.

O sangue total mantém-se estável para análise de ADN a temperatura ambiente durante 24 horas. Caso não seja possível o pronto envio dos sangues para o Laboratório, as amostras deverão ser refrigeradas (2 a 8° C) até 48 horas após a colheita ou congeladas a -18° C.

Identificação das amostras

As amostras devem ser identificadas individualmente com rótulo/etiqueta onde conste o número de ordem e/ou o número de identificação animal (SIA). A correspondência entre o número de ordem referenciado no tubo e o número de SIA (Número oficial de identificação animal) é efetuada na documentação que acompanha as amostras (requisição de análises/folha de campo), e deve ser também enviada em formato digital ao laboratório, para evitar possíveis erros de introdução manual dos dados. Todos os animais que constem da folha de campo deverão ter correspondência entre o número de ordem e o tubo de sangue.

O conjunto das amostras deve ser colocado num suporte pela mesma ordem das folhas de campo e enviado para o laboratório. As amostras devem ser entregues rolhadas e acondicionadas em suporte/grelha de forma a evitar qualquer derrame do seu conteúdo até à chegada ao Laboratório. Amostras não identificadas serão automaticamente eliminadas na receção do material.

Material

- Seringa / tubo de vácuo e agulha, descartável, próprio para colheita de sangue;
- Etiquetas;
- Caneta de tinta resistente à água;
- Suportes para os tubos de sangue;
- Caixa térmica estanque e respetivos termoacumuladores;



O original deste documento é válido quando rubricado por todos os responsáveis (ver lista) na 1ª página.

- PROIBIDA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTES DOCUMENTOS SEM AUTORIZAÇÃO DO EMISSOR -

-Certifique-se que está a utilizar a última versão válida deste documento -

 <p>iniov Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.</p> <p>MANUAL DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS</p>	PCA-001-A
	<p>Edição n.º 03 23-07-2024</p> <p><i>Página 5 de 6</i></p>
PROCEDIMENTO DE COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMAIS PARA ANÁLISE DE ADN	

7.2. PÊLO

As amostras de pêlo são sem dúvida mais fáceis de recolher, de preservar e de transportar. No entanto há que ter alguns cuidados:

- Usar luvas descartáveis, para cada animal, de forma a minimizar possíveis contaminações entre animais.
- Verificar se os pêlos estão secos e limpos, livres de fezes, produtos químicos, etc.
- Procurar pêlos grossos e difíceis de remover. Recomendamos que sejam utilizados pêlos da cauda ou crina/topete/marrafa.
- Recolher 10 a 20 pêlos com raiz de cada animal, com o auxílio de um alicate ou pinça.

ATENÇÃO: NUNCA CORTE OS PÊLOS COM UMA TESOURA

- Verifique se os pêlos contêm BULBO (RAÍZ) intactos.
- Colocar separadamente em envelopes de papel, devidamente identificado, e armazenar à temperatura ambiente. Use um envelope para cada amostra/animal.
- Manter vários envelopes numa caixa de cartão com sílica gel para ajudar a manter as amostras secas.

Material

- Luvas;
- Alicate ou pinça;
- Envelopes;

7.3. SÉMEN em Palhinha

1. Identificar as palhetas;
2. Colocar a palheta inteira num saco plástico e fechar bem;
3. Manter em gelo até o envio ao laboratório ou refrigerada e mantida a 2-8°C até a extração do ADN

Material

- Caixa térmica estanque e respetivos termoacumuladores;

7.4. TECIDOS

Para as análises genéticas disponíveis no LGM, 1 a 2 g ou 1 cm² de tecido são suficientes. No entanto, esta quantidade vai depender do tipo de tecido que é recolhido para análise. Na maior parte dos casos, quer o animal esteja vivo ou morto, uma pequena parte da orelha é a melhor opção.

Para a recolha e acondicionamento da amostra deve usar-se sempre um frasco de boca larga, que possa ser bem rolhado. A melhor maneira e mais barata forma de preservar amostras de tecido é imergi-las em etanol. As amostras de tecido preservadas desta forma podem ser mantidas à temperatura ambiente.

O original deste documento é válido quando rubricado por todos os responsáveis (ver lista) na 1ª página.

- PROIBIDA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTES DOCUMENTOS SEM AUTORIZAÇÃO DO EMISSOR -

-Certifique-se que está a utilizar a última versão válida deste documento -

 <p>MANUAL DE PROCEDIMENTOS TÉCNICOS</p>	PCA-001-A
	<p>Edição n.º 03 23-07-2024</p> <p><i>Página 6 de 6</i></p>
PROCEDIMENTO DE COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE ANIMAIS PARA ANÁLISE DE ADN	

Após a colheita, a amostra deve ser imediatamente submersa em etanol, devendo ter-se o cuidado de colocar primeiro o etanol e só depois a amostra, e vedar bem a tampa do copo/tubo com papel parafilm, para evitar entornar. Rotular o tubo apropriadamente.

É também muito importante evitar contaminação entre amostras. Sendo assim, para cada recolha de amostra deve ser utilizado um bisturi esterilizado.

Material

- Luvas;
- Copos de colheita, descartáveis, esterilizados, com tampa de rosca vedante;
- Bisturi;
- Etanol;



7.5. FTA cards (FTA Classic Card Whatman Inc., USA)

Os cartões FTA oferecem uma alternativa para o transporte de amostras sem risco biológico e são conservadas à temperatura ambiente, para serem usadas posteriormente em testes de análises moleculares.

Através de uma gota de sangue num papel FTA, os ácidos nucleicos são fisicamente retidos nestes cartões e estabilizados para o armazenamento à temperatura ambiente. Além disso, a amostra fica protegida da presença de agentes inibidores, oxidação, danos por raios UV e de ataques bacterianos ou por fungos.

7.6. ENVIO DAS AMOSTRAS PARA O LABORATÓRIO / REQUISITOS DA DOCUMENTAÇÃO

As amostras devem ser acompanhadas de um impresso devidamente preenchido (folha de requisição de análises) e da cópia da folha de campo, que deverá integrar as seguintes informações:

- Tipo de análise requerida ao Laboratório;
- Marca oficial ou código da exploração/Nome do produtor ou criador;
- Espécie animal /raça
- Número de ordem,
- Número de identificação animal (SIA, NIN)
- Sexo
- Data de nascimento
- Número SIA/NIN do Pai
- Número SIA/NIN da Mãe
- Data da colheita
- Responsável pela colheita;

8. MODELOS

Folha de requisição de análises do LGM (Mod. 01/02) e Mod.BRG-GMA-RNE 01/01 (3.2024)

9. ANEXOS

Não aplicável

O original deste documento é válido quando rubricado por todos os responsáveis (ver lista) na 1ª página.

- PROIBIDA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTES DOCUMENTOS SEM AUTORIZAÇÃO DO EMISSOR -

-Certifique-se que está a utilizar a última versão válida deste documento -