

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Influência da raça, local de punção da veia e experiência do
manejador sobre avaliação de diferentes métodos de coleta de
sangue em bovinos

Acadêmica: Fabianna Costa da Fonseca

Aquidauna-MS
04/2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Influência da raça, local de punção da veia e experiência do
manejador sobre avaliação de diferentes métodos de coleta de
sangue em bovinos

Mestranda: Fabianna Costa da Fonseca
Orientador: Profº Dr. Dalton Mendes de Oliveira

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia”

Aquidauana-MS
04/2018

F744p Fonseca, Fabianna Costa

Influência da raça, local de punção da veia e experiência do manejador sobre avaliação de diferentes métodos de coleta de sangue em bovinos/Fabianna Costa da Fonseca. Aquidauana, MS: UEMS, 2018. 55f. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Zootecnia – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Dalton Mendes de Oliveira.

1.Coletores de sangue 2.Estresse 3.Contaminação microbológica. I.Título.

CDD 23.ed.636.2

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por me dar forças nos momentos difíceis e a minha família meu bem mais precioso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as minhas conquistas á Deus, meu pai todo poderoso, porque tudo que tenho e sou a ele pertence. Por todas as bençãos e vitórias inimagináveis que o Senhor tem me dado com tanta intensidade. Por estar sempre presente em minha vida me abençoando e me guiando. Por me fortalecer nos momentos difíceis da jornada quando pensei em fraquejar. Obrigada Senhor, por ter cumprido a promessa de que todas as coisas promovem para o bem daqueles que o amam.

À minha família por todo amor, principalmente aos meus pais, Vera e Sidnei, sem o apoio deles não teria condições de chegar a lugar nenhum, pelo incentivo diário, por me ensinarem sorrir mesmo diante de atribulações, a ter esperança sempre, a lutar com garra para alcançar todos os meus sonhos.

As minhas irmãs Ariana e Julliane e meu irmão Luiz obrigada pelo amor e carinho incondicional.

Ao meu namorado Genilson Fernando pela paciência, amor e carinho. Por estar presente e ter sido meu braço direito em todas as etapas desse projeto.

Ao meu orientador Profº Dr. Dalton Mendes de Oliveira, pela oportunidade, paciência, orientação e acolhimento. Por compartilhar seus conhecimentos que foram essenciais na minha formação.

Ao Profº Dr. Marcus Vinicius de Oliveira por toda auxílio, e por sempre estar disposto em ajudar e sanar todas as minhas dúvidas.

Ao Profº Dr. André Luiz Julien Ferraz pela contribuição, por nunca hesitar quando solicitado.

A Profª Dra. Dirce Luz pelo auxílio e orientação na realização das análises microbiológicas.

A minha amiga irmã Franciele da Silva Oliveira pela amizade, companheirismo e contribuição nas análises.

A Médica Veterinária Aracy Garcia Travassos dos Santos pela inestimável auxílio nas coletas a campo.

Aos colegas de profissão Aldair Félix, Evellyn Richelly, Vitória Soares.

A todos meus colegas do grupo GEQUAC (Grupo de Estudos em Avaliação de Carcaças e Qualidade de Carnes), principalmente Cleiton, Waldir e Vande sempre solícitos quando precisei.

À Empresa Brasil CZ Produtos Científicos por todo apoio prestado, em especial ao Dr. Evandro Trachta sempre muito prestativo e atencioso quando solicitado.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Produção Animal no Cerrado-Pantanal pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

À Fundect – Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do estado de Mato Grosso do Sul, pela concessão da bolsa de estudos.

MEU MUITO OBRIGADA!

Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente descansará.

Direi do senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Importância da pecuária para o Brasil.....	2
2.2. Reatividade de bovinos.....	3
2.2. Bem-estar animal durante a coleta de sangue.....	5
2.3. Importância da coleta de sangue.....	6
2.4 Inovação tecnológica na coleta de sangue.....	8
2.4.1. Métodos utilizados na coleta de sangue bovino.....	8
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. Objetivo gerais.....	12
3.2. Objetivo específico.....	12
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	13
 CAPITULO 2-. Influence of the breed, venipuncture and experience of the handler on the evaluation of different methods of bovine blood collection.	 18
ABSTRATC.....	18
1.0INTRODUÇÃO.....	19
2.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1 Procedimento experimentais.....	21
2.2 Avaliação do comportamento animal.....	21
2.3 Análise microbiológica.....	22
2.3.1 Contagem Bacteriana Total.....	23
2.3.2 Confirmação de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.3.2.1 Teste de coagulase.....	24
2.3.2.2 Teste de catalase.....	24
2.3.2.3 Teste de oxidase.....	25

2.3.3 Análise microbiológica para identificação <i>Escherichia coli</i>	25
2.4 Análise estatística.....	25
3. RESULTADO	26
3.1 Comportamento animal durante a coleta de sangue.....	26
3.2 Formações de hematomas após punção venosa.....	26
3.3 Tempo gasto durante a coleta de sangue.....	27
3.4 Variáveis Microbiológicas.....	27
4. DISCUSSÃO.....	28
5. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
TABELAS E FIGURAS.....	34
ANEXOS.....	38

3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ranger da frequência respiratória durante coleta de sangue na jugular. Médias seguidas por letra minúscula ou maiúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas são referentes às diferenças entre métodos de coleta e letras minúscula são referentes a raça.....	36
Figura 2. Médias para os graus de hematomas na veia jugular de bovinos. Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). RG (raça Girolando), RN (raça Nelore), GCE (grupo de manejadores com experiência), GSE (grupo de manjeadores sem experiência).....	37
Figura 3 Contagem Bacteriana Total nas amostras de sangue coletadas na veia coccígea por diferentes coletores.....	38
Figura 4. Crescimento bacteriano de <i>Staphylococcus aureus</i> em amostras de sangue coletada na veia coccígea por diferentes coletores.....	38
Figura 5 Identificação de <i>E. Coli</i> nas amostras de sangue coletadas na veia coccígea por diferentes coletores.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado do Hemograma das amostras de sangue utilizadas nas análises microbiológicas.....	35
Tabela 2. Grau de temperamento (GT) em função dos tratamentos experimentais.....	36
Tabela 3. Ranger da frequência cardíaca durante a coleta de sangue.....	36
Tabela 4. Médias para grau de hematoma na veia coccígea de bovinos.....	37
Tabela 5. Tempo médio em segundos de coleta de sangue em função do local de coleta, métodos e experiência dos manejadores.....	37

RESUMO

Realizou-se este estudo com o objetivo de avaliar influência das raças, por meio da venopunção da veia coccígea e jugular, através da experiência do manejador sobre a avaliação de diferentes métodos de coleta de sangue em bovinos. Nesse sentido, foram realizados testes com três diferentes métodos de coleta, o método Tradicional que consiste em agulha separada do tubo coletor. O segundo método de coleta utilizado foi o Vacutainer onde o tubo coletor é separado da agulha, além disso, possui um adaptador de agulha que auxilia no momento da obtenção do sangue. E terceiro o método Krev também onde a agulha é acoplada no tubo coletor. Foram utilizados animais de dois diferentes grupos genéticos das raças Nelore e Girolando ($\frac{3}{4}$ Holandês e $\frac{1}{4}$ Gir). Foi feita avaliação da reatividade dos animais no tronco de contenção e avaliação do estresse durante a coleta de sangue, através da mensuração da frequência cardíaca e respiratória. Participaram da coleta dois grupos de manejadores, um grupo formado por manejadores com experiência em coleta de sangue e o outro grupo de manejadores formado por pessoas sem experiência na coleta de sangue. Durante a coleta de sangue foi computado o tempo gasto nos diferentes locais de coleta e também foram realizadas avaliações microbiológicas nas amostras de sangue dos diferentes coletores, verificando a contaminação através da Contagem Bacteriana Total, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* nos diferentes tempos (0, 24, 48,72 e 96 horas). Os resultados demonstram diferença significativa na expressão da reatividade durante o procedimento de coleta de sangue, sendo que, os animais Nelore possuem maiores escores de reatividade que os Girolandos. Com relação, ao estresse durante a coleta de sangue não houve diferença estatística entre métodos para a frequência cardíaca durante a punção da veia. Porém, para a frequência respiratória houve efeito de interação entre método e raça. Na formação de hematoma após a punção da veia coccígea e jugular nota-se que o método Tradicional apresentou maior grau de hematoma que o método Krev e Vacutainer. Quanto ao tempo de coleta de sangue, o método Krev apresentou menor tempo de coleta na veia coccígea e jugular. No que se refere as análises microbiológicas nota-se que as amostras de sangue coletadas com o método Krev e Vacutainer apresentou contaminação nula no momento da coleta de sangue.

Palavras-chave: análise sanguínea, bem estar, dispositivos de coleta, inovação tecnológica

96

ABSTRACT

97 The objective of this study was to evaluate the influence of the races, through
98 venipuncture of the vein coccygeal and jugular, through the manager's experience on
99 the evaluation of different methods of blood collection in cattle. In this sense, tests
100 were performed with three different collection methods, an open collecting system
101 also called the Traditional method consisting of a separate needle from the collector
102 tube. And between the closed collection system is the Vacutainer method where the
103 collection tube is separated from the needle, in addition, it has a needle adapter that
104 assists at the time of obtaining the blood. And the Krev method is also a closed
105 collection system where the needle is attached to the collector tube. Animals from
106 two different genetic groups of the Nelore and Girolando breeds ($\frac{3}{4}$ Holstein and $\frac{1}{4}$
107 Gir) were used. The reactivity of the animals in the containment trunk and evaluation
108 of the stress during the blood collection was evaluated through the measurement of
109 heart and respiratory rate. The reactivity of the animals in the containment trunk and
110 evaluation of the stress during the blood collection was evaluated through the
111 measurement of heart and respiratory rate. Two groups of managers participated in
112 the collection, a group of managers with experience in blood collection and the other
113 group of managers who were people with no experience in blood collection. During
114 the blood collection, the time spent at the different collection sites was computed,
115 and microbiological evaluations were also performed on the blood samples from the
116 different collectors, checking the Contamination through Total Bacterial Count,
117 *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* at different times (0, 24, 48, 72 and 96
118 hours). The results demonstrate a significant difference in reactivity expression
119 during the blood collection procedure, and Nelore animals have higher reactivity
120 scores than the Girolando. In relation to stress during blood collection there was no
121 statistical difference between methods for heart rate during vein puncture. However
122 for the respiratory rate there was an interaction effect between method and breed. In
123 the formation of hematoma after puncture of the coccygeal and jugular vein it is
124 noticed that the Traditional method showed a greater degree of hematoma than the
125 Krev and Vacutainer method. Regarding the time of blood collection, the Krev
126 method presented a shorter collection time in the coccygeal and jugular vein.
127 Regarding the microbiological analyzes, it was noticed that the blood samples
128 collected with the Krev and Vacutainer method showed no contamination at the time
129 of blood collection.

130

131 **Keywords:** collection devices, microbiological contamination, stress, reactivity

132

133

134

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A pecuária bovina apresenta inúmeros fatores que interferem no seu desenvolvimento. Dessa forma, para garantir a oferta de produtos de qualidade é fundamental partir de um sistema de produção que considere a saúde dos animais prioridade. De acordo com Souza (2009), além do prejuízo no desempenho do rebanho, tem-se também a perda no rendimento da produção, ocorrência de enfermidades e de parasitas, que quando não controlada, pode potencializar o risco de transmissão de determinadas doenças ao homem.

Dessa forma, ao longo dos anos, inúmeras tecnologias têm surgido com a função de potencializar e aumentar a produção de bovinos sem causar danos ao bem-estar dos animais, complementando assim o diagnóstico clínico das espécies domésticas de interesse econômico.

Entre as ferramentas mais utilizadas a campo para avaliar a saúde dos animais, está o exame laboratorial de sangue, sendo de fundamental importância no diagnóstico de doenças ou até mesmo servindo como uma ferramenta auxiliar para avaliar o estado nutricional de um rebanho como a glicose, concentração de ureia, ferro e colesterol (HDL LDL).

Neste contexto para ter uma produção de bovinos eficiente alguns fatores são importante como o manejo dos bovinos. No campo existem alguns problemas relacionados ao manejo, dentre eles pode-se citar o momento de fazer a coleta de sangue. Para fazer a coleta de sangue em bovinos existem algumas alternativas de método de coleta que pode comprometer ou não os resultados das análises sanguíneas.

A campo utiliza-se algumas técnicas para a coleta de sangue bovinos, como o método de coleta fechado e o método de coleta aberto. O mais antigo e difundido é o método de coleta aberto, também chamado de método Tradicional que consiste em agulha e tubo independentes. No entanto é um método que possuem algumas desvantagens que comprometem a qualidade da amostra e a maior possibilidade ocorrer acidentes com materiais perfurocortantes (ANDRIOLO, et al., 2010).

Entre os métodos fechado tem o sistema de coleta de sangue a vácuo, também chamado de método Vacutainer. Trata-se de um método onde o vácuo é calibrado e a quantidade de anticoagulante é proporcional ao volume do sangue,

além disso, proporciona ao responsável pela coleta de sangue maior segurança durante a punção venosa, porém o método Vacutainer apresenta desvantagem como a perda de vácuo durante a coleta em situação que ocorra o erro na punção da veia sendo necessário fazer a troca de agulha e tubo.

O mais recente método de coleta de sangue fechado desenvolvido para a coleta de sangue bovino é o método Krev, onde a agulha vem acoplada no tubo coletor descartável, não permite a reutilização da agulha e nem do tubo coletor. Possui como vantagem em situação de erro na punção da veia, o tubo só precisa ser novamente dobrado, não havendo, portanto a necessidade de substituição por outro tubo, tendo em vista que a produção deste do vácuo é automática. Neste sentido, realizou-se este estudo com o objetivo de avaliar a influência dos métodos de coleta de sangue em diferentes raças sob a punção da veia coccígea e jugular, de acordo com a experiência dos manejadores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTANCIA DA PECUÁRIA PARA O BRASIL

O agronegócio brasileiro apresenta hoje forte competitividade internacional, e a pecuária é um dos setores mais importante do agronegócio. A pecuária bovina brasileira passou por moderna evolução com avanços tecnológicos dos sistemas de produção e melhora significativa dos índices zootécnicos, como ganhos de peso dos animais, aumento da natalidade, diminuição da mortalidade e diminuição na idade de abate. Concomitantemente á essas melhoria se deu também a evolução na genética dos bovinos, e entre as raças de destaque no Brasil pode-se citar as raças zebuínas que são á base da produção da carne bovina brasileira, sendo assim, de extrema importância para o agronegócio e, conseqüentemente para a economia nacional. Portanto, o rebanho bovino brasileiro é constituído por grande diversidade de raças, porém as raças que originaram da Índia têm papel de destaque na pecuária brasileira. Entre as raça zebuínas bastante exploradas no Brasil pode-se citar Nelore, Gir, Indubrasil, Tabapuã. A explicação para tal sucesso é a notória resistência a ecto e endoparasitas, adaptabilidade ao ambiente tropical, rusticidade,

alta fertilidade fizeram das raças zebuínas as mais exploradas na pecuária brasileira (Oliveira, et al., 2002).

Sendo assim, o cruzamentos de raças zebuínas x raças europeias tornou-se comum com o propósito de aproveitar ao máximo os efeitos de heterose. A utilização de cruzamentos têm por objetivo aumentar a produção, visando a otimização dos efeitos positivos de cada raças, como a rusticidade da raça zebuína e os aspectos produtivos das raças europeias. E entre os cruzamentos mais utilizados na produção leiteira é do zebuíno Gir com o europeu Holandês, considerado a raça leiteira mais importante adaptada às condições climáticas existente no Brasil.

Segundo Salgado et al. (2015), os animais Girolando é responsável por aproximadamente 80% do leite produzido no Brasil, sendo considerado uma opção para aumentar a produtividade de leite no país, por possuírem características ímpares como rusticidade, precocidade e alta produção de leite mesmos em sistemas de baixo níveis tecnológicos, além de ser animais bastante dócil o que facilita durante o manejo (SILVA, et al., 2011).

2.2 REATIVIDADE DE BOVINOS

O temperamento pode ser definido como uma disposição individual existente entre os animais ao reagir a um determinado estímulo. Atualmente o conceito sobre o temperamento é extremamente importante na Zootecnia, pois está diretamente associado à eficiência da produtividade.

No manejo diário dos bovinos quando há o contato social entre homem-animal, estes se tornam mais ambientados, comparativamente aos animais criados em sistemas extensivos. Sendo assim, tais acontecimentos têm influência nas experiências vividas anteriormente, o que ocasiona a capacidade de memória nos bovinos. Diante disso, a interação humana-animal é considerada o ponto chave para a moderna indústria animal, formando o elo do trinômio produtividade, rentabilidade e bem-estar.

Bovinos com comportamento mais reativo causam maiores prejuízos econômicos aos criadores, pois requerem maior tempo na prática de manejo, além disso, causam mais danos às instalações e equipamentos, impactando diretamente nos custos de produção (PEIXOTO et al., 2011). Neste contexto, o medo é um

estado afetivo do sistema neural que surge em resposta a determinada situação de perigo, inconscientemente como resposta e preparando o animal para as diferentes reações naturais de fuga, o que é considerado um estado emocional indesejável em bovinos (ROGAN & LEDOUX, 1996).

Sob tal situação os animais podem sofrer taquicardia, redistribuição sanguínea nas vísceras, no músculo esquelético e cérebro, sendo que, respostas como agressões e fugas são mais evidentes (FERGUNSON & WARNER, 2008). Dessa maneira, o estresse pode ser avaliado e verificado em termos de modificações nos processos comportamentais e fisiológicos, podendo ser um indicativo para o estado de bem-estar do animal.

Ademais, diferenças no temperamento têm base fisiológica, sendo que, os animais mais reativos tem uma ativação das respostas ao estresse mais intensa e duradoura, gerando maiores problemas de bem-estar durante o manejo. Portanto, são considerados sinais de adversidades o afastamento do animal, associado a movimentos mais bruscos das patas, rabo, orelha e cauda, além da ocorrência de defecação e urina (HOTZEL et al., 2009).

Neste contexto, as raças Zebu (*Bos taurus indicus*), a qual se insere animais da raça Nelore, são os que apresentam temperamento mais reativo em comparação as raças taurinas (*Bos taurus taurus*). Em um estudo realizado por Grandin (1997), os animais Nelore que foram submetidos a manejo aversivo, apresentaram níveis de cortisol 2/3 mais elevados. Sendo que, este hormônio causa inibição da atividade do hipotálamo e da hipófise, resultando assim, uma diminuição na produção e secreção do hormônio do crescimento.

Já Sant'Anna et al. (2012), encontraram relações genéticas e fenotípicas desfavoráveis entre o peso de desmama e a velocidade de fuga de animais da raça Nelore. Evidenciando assim, que os animais com velocidade de fuga mais rápida apresentam menor peso ao desmame. Portanto, animais que possuem temperamento agressivo, são mais excitáveis, ingerem menor quantidade de alimentos, são mais agitados, e não se adaptam facilmente as novas instalações, o que dificulta o manejo diário, podendo ocasionar acidentes com os seres humanos (GRANDIN & DEESING, 1998).

Em um estudo feito por Costa et al. (2015), ao avaliarem o perfil hormonal de vacas Girolando com diferentes proporções sanguíneas Holandês x Gir, sendo submetidas à mesma condição ambiental e de manejo, encontraram níveis elevados

de cortisol para $\frac{1}{2}$ Holandês $\frac{1}{2}$ Gir (4,01 $\mu\text{g/dL}$) em comparação aos animais $\frac{3}{4}$ Holandês $\frac{1}{4}$ Gir (2,76 $\mu\text{g/dL}$). Como justificativa a esses resultados, os autores associaram a maior reatividade das fêmeas ao maior grau de sangue Zebu. Para Voisinet et al. (1997), o temperamento dos animais pode ser um indicativo de estresse, dor ou desconforto, e as reações que os animais manifestam podem não ser somente um indicativo de reatividade animal. No entanto, Dirksen et al. (1993), relataram que as manifestações dolorosas podem ser influenciadas pelo hábito, como é o caso das lesões teciduais extensas que os ruminantes podem suportar, sem causar alterações significativas no comportamento. Sendo aconselhável diferenciar os sinais de manifestação de dor e enfermidade em bovinos

De maneira geral, após uma dor aguda como aplicação de um medicamento via intramuscular ou o momento da coleta de sangue, podem ser observadas reações que são expressas por vocalização e mudanças bruscas no temperamento (DIRKSEN et al., 1993).

Neste contexto, a coleta de sangue em bovinos deve ser realizada com cautela e precaução, visando ser um processo rápido e eficiente para que não cause dor e desconforto ao animal.

2.3 BEM-ESTAR ANIMAL DURANTE O PROCEDIMENTO DE COLETA DE SANGUE

O exame laboratorial do sangue é de extrema importância no diagnóstico de patologia em um rebanho bovino. Porém, alguns fatores como nutrição, manejo, assim como as condições de coleta da amostra de sangue (hora, lugar e técnica), e o estresse no momento da coleta, a qual os animais são submetidos podem influenciar na análise correta dos parâmetros sanguíneos.

De acordo com Dirksen et al. (1993), o mais importante é o estresse associado à coleta de sangue, já que o deslocamento dos animais, a contenção prolongada e a dor por material perfurocortante, causam reações neuro-hormonais que fazem com que certos valores hematológicos se alterem em 5 a 15% ou mais. Além disso podem ocorrer alterações nos valores hematológicos pelo garroteamento prolongado da veia puncionada, portanto, durante a obtenção do sangue ocorre um aumento do hematócrito, da hemoglobina e da glicose, enquanto eosinófilo diminui, em razão disso, para uma análise correta dos parâmetros sanguíneos deve-se evitar

ao máximo estressar os animais, para que a coleta de sangue seja livre ou tenha a menor interferência possível de fatores estressantes (DIRKSEN et al., 1993).

Além disso, os métodos de coleta de sangue interferem diretamente nos resultados das análises microbiológicas, já que a contaminação microbiana ocorre frequentemente nos processos empregados durante a coleta de material, haja vista que as condições de assepsia obrigatórias para a coleta de sangue humano (pisos e paredes impermeáveis, laváveis e resistentes às soluções desinfetantes; janelas para evitar a entrada de poeira e ainda protegidas com telas para não haver insetos; etc.) não são obrigatórios e, portanto, não são empregados nas propriedades rurais no manejo com os animais, sendo a maioria das coletas efetuadas em troncos de contenção ou com os bovinos contidos pelo pescoço em lugares desprovidos de assepsia adequada. Estes procedimentos, além de exporem elevados riscos de segurança aos animais e ao homem, ainda podem promover uma intensa contaminação da amostra sanguínea.

2.4 IMPORTÂNCIA DA COLETA DE SANGUE

Para os mamíferos, o sangue possui uma inigualável importância fisiológica, sendo o meio de transporte que realiza as trocas de substâncias entre os diversos sistemas do organismo. Além disso, circula num sistema totalmente fechado através do coração, artérias, capilares e veias, sendo rico em proteínas com elevados teores de aminoácidos, além de vitaminas, sais minerais e água (PADILHA, 2006).

Conforme Swenson (1996), o sangue ajuda a regular a temperatura do corpo, mantendo constantes as concentrações de água e eletrólitos nas células, responsável por regular a concentração dos íons hidrogênio no corpo, além de estar diretamente associado a defesa contra agentes patogênicos.

Desta forma, o sangue é constituído de duas frações combinadas, na proporção de 60 a 70% de plasma e 30 a 40% de células (FILSTROP, 1980). O plasma contém 91,5% de água que serve de solvente das substâncias orgânicas e minerais e ainda de veículo para as células, moléculas e íons. Já a porção celular é composta por glóbulos vermelhos, glóbulos brancos, plaquetas ou trombócitos. De acordo com Swenson (1996), o plasma pode apresentar uma coloração que vai desde o amarelado até incolor, variando de acordo com espécie animal e da sua dieta. Sendo assim, a coleta de sangue é um complemento valioso para o exame

clínico dos animais, obtendo-se respostas fisiológicas do animal, estado nutricional, hormonal e de níveis metabólicos.

Neste contexto, como descreveram Roberto et al. (2010), os animais reagem fisiologicamente a mudanças drásticas de temperatura, alterando o comportamento e a produtividade. Sendo assim, animais criados sob diferentes condições climáticas podem apresentar variações dos elementos constituintes do hemograma, sendo que através da análise sanguínea são fornecidas informações que complementam o diagnóstico de doença.

Em rebanhos leiteiros, monitorar os parâmetros sanguíneos é extremamente interessante para o acompanhamento de cada fase do ciclo produtivo principalmente das vacas leiteiras (CAMPOS et al., 2008). Em vacas leiteiras através da coleta de sangue pode-se acompanhar níveis hormonais e os elementos essenciais que compõe o organismo.

Portanto, no processo de análise sanguínea duas etapas são fundamentais, para se obter um resultado preciso, as fase pré-analítica e pós-analítica, sendo que estas correspondem ao momento da coleta, armazenamento, transporte do sangue e por último a realização dos exames. A primeira etapa pré-analítica é a mais importante e decisiva de uma análise de sangue, onde de acordo com o estudo realizado por Plebani e Carraro (1997), 68% de erros laboratoriais ocorrem nessa fase.

Segundo Bowen e Remaley (2014), o uso inadequado de dispositivos de coleta de sangue pode afetar negativamente a precisão dos resultados dos testes laboratoriais. Sendo a ocorrência de acidentes no momento da coleta um evento comum principalmente na coleta de sangue em animais. Dentre as principais enfermidades, geralmente transmitidas por sangue contaminado de animais doentes ocasionados por vírus, tem-se a Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR), Aftosa (*Aphtovirus*), Raiva (*Lyssavirus*) e o Papiloma (*Papilomavírus*); por bactérias a Brucelose (*Brucellaabortus*) e o Tétano (*Clostridium tetani*); e por protozoários (hematozoários) a Babésia (*Babesia bigemina* e *Babesiabovis*), a Rickettsiose bovina (*Anaplasma marginale*) e a Tripanossomíase (*Trypanosoma vivax*) (SOUZA et al., 2009; BITTAR, 2013).

Ashavaid et al. (2009), monitoraram indicadores de qualidade pré-analítica comparando dois diferentes dispositivos de coleta de sangue, o método vacutainer e o método tradicional (agulha e seringa), e concluíram que o uso do método de

coleta de sangue vacutainer resultou na melhoria da qualidade da amostra pré-analítica. Em suma, os valores dos parâmetros sanguíneos podem estar relacionados também com o método de coleta de sangue (GODDARD et al., 1998; HOPSTER et al., 1999). Assim, entre os testes necessários a se fazer está o teste de contaminação bacteriana nos dispositivos de coleta de sangue. Em pesquisa realizada por Wiwanitkit (2003), com objetivo de estudar a prevalência de contaminação no tubo a vácuo, foram utilizados cem tubos a vácuo com vários aditivos de EDTA, heparina citrato e fluoreto, como resultado observou-se prevalência nula de contaminação bacteriana.

2.5 INOVAÇÃO TECNOLÓGICA NA COLETA DE SANGUE DE BOVINOS

2.5.1 MÉTODOS UTILIZADOS NA COLETA DE SANGUE BOVINO

O sangue é tido como um sistema complexo e relativamente constante em relação a seus constituintes, sendo que, os procedimentos para sua obtenção são conhecidos como punção venosa ou flebotomia. Neste contexto, a coleta de sangue é primordial para uma ampla variedade de pesquisas científicas, e há uma série de métodos utilizados e disponíveis no mercado. Entretanto, a ampla variedade de métodos de coleta de sangue deve ser analisada com atenção, já que pode ser associada a vários problemas, como resultados inconsistentes.

A necessidade de processar a amostra de sangue em menor tempo possível, desde a sua coleta, é outro sério problema que limita o profissional que trabalha no campo (HASKINS, 1977; COLES, 1984). Assim, a possibilidade de manutenção das amostras de sangue sob conservação a baixas temperaturas tem sido objeto de interesse de algumas investigações científicas com a espécie bovina (JAGOS et al., 1977; POULSEN & SURYNEK, 1977; SZENCI & BESSER, 1990; SZENCI et al., 1991). As conclusões desses autores demonstram não haver um consenso a respeito do tempo em que as amostras se mantem viáveis, sendo que as indicações chegam a variar de oito (JAGOS et al., 1977) a vinte e quatro horas (SZENCI & BESSER, 1990) para o sangue venoso de bovinos.

Para fazer uma correta coleta de sangue alguns fatores devem ser considerados como a experiência ou não do flebotomista, assim como o estresse dos animais ou a utilização de métodos inadequados vai estar interferindo no

parametrô s sanguíneo correto. Para Hoff et al. (2000), os métodos de coleta são os principais fatores que influenciam a coleta do sangue, impactando negativamente nas análises sanguíneas.

Atualmente para fazer a coleta de sangue bovino, existe duas técnicas o chamado método de coleta aberto e o método de coleta fechado. O método de coleta aberto com tubo e agulha também chamado de método Tradicional é utilizado há muitos anos a campo. Este método possui como vantagem ser de baixo custo, quando comparado ao método fechado. Porém apresenta risco sanitário devido a maior possibilidade de contato do sangue com o profissional, podendo também ocorrer contaminação da amostra, e consequentemente iminentes erros pré-analíticos. Outros problemas eventuais causados pela utilização do método tradicional é a quebra do frasco de vidro durante o manejo de coleta ou até mesmo durante o manuseio do frasco após a coleta de sangue. Ademais, o risco da reutilização do frasco e principalmente da agulha é outro fator importante pois aumenta o risco de transmissão de doenças entre os animais e até mesmo para pessoas que manuseiam o frasco coletor. Maior possibilidade também de ocorrer hemólise na amostra de sangue, já que a coleta de sangue é efetuada por meio de uma punção da veia com agulha, sendo a amostra de sangue vertida no interior do tubo de ensaio. Andriolo et al. (2010), o método tradicional por se tratar de um sistema aberto de coleta de sangue, o impacto deste com o frasco coletor pode causar formação de microcoágulos, fibrina e hemólise, comprometendo assim a qualidade da amostra. A hemólise (hemo de sangue e lise de quebra) pode ser definida como o rompimento de hemácias que liberam a hemoglobina no plasma, ou seja, é a destruição dos glóbulos vermelhos do sangue por rompimento da membrana plasmática com liberação da hemoglobina e, geralmente ocorre durante a retirada do sangue em consequência do fluido colidir abruptamente com a parede do frasco coletor.

Em um estudo realizado por Ashavaid et al. (2009), comparando a qualidade pré-analítica de dispositivos de coleta de sangue vacutainer com coleta de sangue pelo método tradicional (seringa e agulha), avaliou-se a qualidade das 22.563 amostras de sangue de pacientes. Os autores observaram que o uso do sistema de coleta de sangue evacuado resultou em melhor qualidade de amostra pré-analítica em comparação com a coleta com método tradicional, os resultados mostraram uma redução de aproximadamente 70 vezes na incidência de coagulação,

Com relação aos métodos fechado de coleta de sangue, têm-se o método Vacutainer bastante difundido na área laboratorial. De acordo com Andriolo et al. (2010) em 1943 a Cruz Vermelha Americana, solicitou que uma empresa de materiais hospitalares desenvolvessem coletores de sangue descartáveis e estéreis, e, quando embalados mantivessem estéreis para o uso em campos de guerra. Entre 1950 a 1990 foram utilizados os tubos a vácuo de vidro, atualmente o vidro foi substituído pelo plástico (BOWEN & REMALEY, 2014). Sendo assim, a coleta de sangue pelo método vacutainer é uma técnica recomendada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), organização norte-americana privada, que desenvolve normas para laboratórios clínicos.

Além disso, o método de coleta de sangue Vacutainer em substituição ao Tradicional (seringa e agulha) utilizado por muitos anos a campo, elevou a segurança, bem como a melhoria significativa na qualidade das amostras de sangue enviadas aos laboratórios. Conforme Wiwanitkit (2003), o método vacutainer funciona baseado no princípio básico da mecânica dos fluídos, sendo composto por tubos a vácuo, agulhas de ponta dupla e um suporte ou adaptador de plástico para agulha que são usados em conjunto para obtenção do sangue venoso.

A coleta de sangue no método Vacutainer é um dos métodos mais utilizado atualmente, por inúmeras razões entre as quais a facilidade no manuseio e a quantidade de vácuo calibrado do tubo que é proporcional à quantidade de volume de sangue desejado. Entretanto, o método Vacutainer apresenta algumas desvantagens como dificuldade em encontrar agulhas com espessura adequada para bovinos no mercado, preço elevado da agulha e do tubo coletor, sendo que a venda ocorre somente em caixa com 100 unidades, o que inviabiliza a compra em situações de pouca demanda de material para coleta, já que a data de validade inibe o armazenamento por longos períodos, outra desvantagem é a perda de vácuo durante a coleta de sangue, sendo necessário fazer a troca do tubo e agulha com elevação dos custos.

Atualmente surge no mercado uma nova técnica de coleta de sangue para bovinos, trata-se de um sistema fechado chamado de método Krev, que consiste em tubo feito de material plástico e flexível permite ao ser dobrado um expulsão do ar existente no interior do tubo, gerando assim, um gradiente negativo, que facilita a extração do sangue. Assim caso ocorra erro na punção da veia, o tubo só precisa ser novamente dobrado, não havendo portanto a necessidade de substituição por

outro tubo, haja vista que a produção deste “vácuo” é automática. O fluido é depositado num recipiente estéril, impede a contaminação e fornece uma amostra mais confiável. Possui fundo em formato de bisel que favorece os procedimentos pós-coleta, no âmbito separação das frações plasma, leucócitos/plaquetas e eritrócitos durante o processo de centrifugação.

Além disso, a agulha do coletor é fixa, não havendo possibilidade para reutilização de nenhum componente em outro animal, haja vista que muitas das doenças dos bovinos são oriundas do manejo inadequado de agulhas.

Como desvantagem é a necessidade de utilizar a tampa nas agulhas, podendo ocorrer acidentes por material perfurocortante durante o procedimento de coleta.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a influência das raças, através da venopunção das veias coccígea e jugular, mediante a experiência do manejador sobre avaliação de diferentes métodos de coleta de sangue em bovinos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a reatividade de bovinos de diferentes grupos genéticos em tronco de contenção sobre a coleta de sangue.

Efetuar medições de estresse dos animais no momento da coleta de sangue, através da mensuração da frequência cardíaca e frequência respiratória.

Avaliar as características microbiológicas nas amostras de sangue obtidas nos diferentes tubos coletores visando a identificação de Contagem Bacteriana Total *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

4 . REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANDRIOLO, A.; MARTINS, A. R.; BALLARATI, C. A.; BARBOSA, I. V.; MENDES, M. E.; MELO, M.R.; SUMITA, N. M.; ROMANO, P.; TRINDADE, P. A. Recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso. 2010. Disponível em: www.sbpc.org.br/conteudo.pdf. Acesso em: 25/07/2017.

ASHAVAID, T. F.; DANDEKAR, S. P.; KHODAIJI, S.; SINGH, A. P. Influence of method of specimen collection on various preanalytical sample quality indicators in EDTA blood collected for cell counting. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 356-360, 2009.

BITTAR, J. F. Uniube alerta sobre a tripanossomíase bovina. 2013 Disponível em: <http://www.uniube.br/noticias/alerta-sobre-a-tripanossomiosebovina.html>. Acesso em 23/05/2016.

BOWEN, R. A. R.; REMALEY, A. T. Interferences from blood collection tube componentes on clinical chemistry assays. **Biochemia Medica**, v. 24, n. 1, p. 31-44, 2014.

CAMPOS, R.; LACERDA, L. A.; TERRA, S. R.; GONZÁLES, F. H. D. Parâmetros hematológicos e níveis de cortisol plasmático em vacas leiteiras de alta produção no Sul do Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 5, p. 354-361, 2008.

CENCI, A.; BRAGA, A. C.; BRITO, B. G.; CERVA, C.; MAYER, F. Q.; KARAM, F. S. C.; MARTINS, J. R. S.; SIMÕES PIRES NETO, J. A.; ROSA, J. C. de A.; BRITO, K. C. T.; COPPOLA, M. M.; DASSO, M. G.; ROEHE, P. M.; DOYLE, R. L.; BOROWSKI, S. Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico Laboratorial Veterinário. Porto Alegre : FEPAGRO, **Boletim Técnico**, n. 20, p. 9-80, 2011.

- COLES, E.H. **Patologia clínica veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole, p. 566, 1984.
- COSTA, A. N. L.; FEITOSA, J. V.; JUNIOR, P. A. M.; SOUZA, P. T.; ARAÚJO, A. A. Hormonal profiles, physiological parameters, and productive and reproductive performances of Girolando cows in the state of Ceará-Brazil. **International Journal of Biometeorology**, v. 59, n. 2, p. 231-236, 2015.
- DIRKSEN G.; GRÜNDER H. D.; STÖBER M. Sistema Circulatório. **Exame Clínico dos Bovinos**. 3.ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, p. 114-117, 1993.
- FILSTROP, P. Processes and equipment for protein by products in the meat industry. **Food Tecnology Journal**, n. 10, 1980.
- FERGUSON, D. M.; WARNER, R. D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? **Meat Science**. v. 80, n. 1, p. 12-19, 2008.
- GODDARD, P. J.; GASKIN, G. J.; MACDONALD, A. J. Automatic blood sampling equipment for use in studies of animal physiology. **Animal Science**. v. 66, n. 3, p. 769–775, 1998.
- GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. **Journal of Animal Science**. v. 75, n. 1, p. 249-257, 1997.
- GRANDIN, T.; DEESING, D. Genetics and behavior of domestic animals. **Academic Press**. San Diego-California, p. 250-251, 1997.
- HASKINS, S. C. Sampling and storage of blood for pH and blood gas analysis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 170, n. 4, p. 429-433, 1977.
- HOFF, J.; LVT.; RLAT, G. Methods of blood collection in the mouse. **Lab animal**, v. 29, n. 10, p. 47-53, 2000.

HOPSTER, H.; VAN DER WERF, J. T. N.; ERKENS, J. H. F., BLOKHUIS, H. J. Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. **Journal of Animal Science**. v. 77 n. 3, p. 708–714, 1999.

HÖTZEL, M. J.; GOMES, C. C. M.; MACHADO FILHO, L. C. P. Comportamento de vacas leiteiras submetidas a um manejo aversivo. **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 135-140, 2009.

JAGOS, P.; BOUDA, J.; PRIKRYLOVA, J. The dynamics of the acid-base changes of bovine venous blood in vitro, as depending on time. **Veterinárni Medicína**, v. 22, n.1, p. 257-262, 1977.

OLIVEIRA, G. S. L.; PICHETH, G.; SUMITA, N. M.; SCARTEZINI, M. Controle da qualidade na coleta do espécime diagnóstico sanguíneo: iluminando uma fase escura de erros pré-analíticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 6, p. 441-447, 2009.

PADILHA, A. L. D. **Isotermas de adsorção de umidade de suplemento alimentício rico em ferro hematínico (sangue bovino em pó). Aceitabilidade de alguns produtos enriquecidos**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos / Universidade Federal de Santa Catarina, p. 74, 2006.

PEIXOTO, M. G. C. D.; PIRES, M. F. A.; PEREIRA, M. C.; CARVALHO, M. R. S.; RIBEIRO, G. C.; BRITO, L. F.; VERNEQUE, R. S.; BERGMANN, J. A. G. Integrando o temperamento às características de importância para o melhoramento de bovinos de leite: resultados de um estudo com fêmeas Guzerá. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 40, p. 26-37, 2011.

PLEBANI M.; CARRARO P. Mistakes and stat laboratory: types and frequency. **Clinical Chemistry**. v. 43, n. 1, p. 1348-51, 1997.

POULSEN, J. S. D.; SURYNEK, J. Acid-base status of cattle blood. Sampling and storing. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 29, n. 6, p. 271-283, 1977.

- 637 RISSER W. L.; LEE E. J.; POINDEXTER H. B.; WEST, M. S.; PIVARNIK, J. M.;
 638 RISSER, J. M.; HICKSON, J. F. Iron deficiency in female athletes: its prevalence and
 639 impact on performance. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 20, n. 2, p.
 640 116-121, 1988.
- 641
- 642 ROBERTO, J. V. B.; SOUZA, B. B.; SILVA, A. L. N.; JUSTINIANO, S. V.; FREITAS,
 643 M. M. S.; Parâmetros hematológicos de caprinos de corte submetidos a diferentes
 644 níveis de suplementação no semi-árido paraibano. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 1, p.
 645 127-132, 2010.
- 646
- 647 ROGAN, M. T.; LEDOUX, J. E. Emotion: Systems, cells, synaptic plasticity. **Cell**, v.
 648 85, n. 4, p. 469-475, 1996.
- 649
- 650 SANT'ANNA, A. C.; PARANHOS DA COSTA, M. J. R.; BALDI, F.; RUEDA, P. M.;
 651 ALBUQUERQUE, L.G. Genetic associations between flight speed and growth traits
 652 in Nellore cattle. **Journal Animal Science**, v. 90, n. 10, p. 3427–3432, 2012.
- 653
- 654 SILVEIRA, I. D. B.; FISHER, V.; SOARES, G. J. D. Relação entre o genótipo e o
 655 temperamento de novilhos em pastejo e seu efeito na qualidade da carne. **Revista**
 656 **Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 519-526, 2006.
- 657
- 658 SOUZA, V. F.; SOARES, C. O.; FERREIRA, S. F. Vacinação, a importância das
 659 boas práticas e a prevenção de doenças de interesse em bovinocultura.
 660 **Comunicado Técnico** nº 122. EMBRAPA-CNPGC, Campo Grande/MS, p.15, 2009.
- 661
- 662 SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal-adaptação e meio ambiente**. 5.ed. São
 663 Paulo: Santos, p. 546, 1996.
- 664
- 665 SWENSON, M. J. Propriedades Fisiológicas e Constituintes Químicos e Celulares do
 666 Sangue. In: SWENSON, M. J., REECE, W. O. Dukes. **Fisiologia Animal**
 667 **Domésticos**, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 856- 858, 1996.
- 668

SZENCI, O.; BESSER, T. Changes in blood gas and acid-base values of bovine venous blood during storage. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, n. 4, p. 471-474, 1990.

SZENCI, O.; BRYDL, E.; BAJCSY, C. A. Effect of storage on measurement of ionized calcium and acid-base variables in equine, bovine, ovine, and canine venous blood. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, n. 9, p. 1167-1169, 1991.

VOISINET, B. D.; GRANDIN, T.; O'CONNOR, S. F.; DEESING, J. J. Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 4, p. 892-896, 1997.

WIWANITKIT V. Bacterial contamination in the evacuated blood collection tube: a short report. Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine. **Songkla Medicine Journal**, v. 21, n. 4, p. 245-248, 2003.

Este capítulo seguiu as normas da revista Liverstock Science para fins de submissão do artigo.

CAPÍTULO – 2. Influência da raça, local de punção da veia e experiência do manejador sobre avaliação de diferentes métodos de coleta de sangue em bovinos

F.C.Fonseca^a, M. V. M. Oliveira^a, D. F.Luz^b, D.M.Oliveira^a

^aUniversidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana CEP 37200-000, MS, Brazil

^bUniversidade Federal de Mato Grosso do Sul, Aquidauana CEP 37200-000, MS, Brazil

O objetivo deste estudo foi analisar a influência da raça, local de punção venosa e experiência dos manejadores sobre diferentes métodos de coleta de sangue em bovinos das raças. Os métodos de coleta utilizados foram: TRAD - Método tradicional (punção com agulha reutilizável e armazenamento de sangue em tubo reutilizável estéril); VACU- Método Vacutainer (punção venosa com agulha dupla descartável e armazenamento de sangue em tubo estéril, a vácuo e não reutilizável); KREV- Método de Krev (punção venosa com armazenamento de agulha e sangue em material plástico estéril, ambos descartáveis). Foram utilizados os animais Nelore e Girolando ($\frac{3}{4}$ Holândes x $\frac{1}{4}$ Gir). O tempo de coleta de sangue na veia coccígea e jugular foi medido nos diferentes métodos, e a formação de hematomas após punção venosa também foi observada. Os animais foram submetidos a dois grupos de manejadores, sendo um grupo formado por manejadores sem experiência em coleta de sangue e outro grupo formado por manejadores com experiência. Foram realizadas avaliações da reatividade dos animais no tronco de contenção durante a coleta de sangue, determinadas através de escores, frequência cardíaca e frequência respiratória. A contaminação microbiológica nas amostras de sangue coletadas pelos diferentes métodos foi avaliada, CBT (Contagem Bacteriana Total), *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, em diferentes tempos de incubação (0, 24, 48, 72 e 96 horas). Os resultados indicaram uma diferença significativa na expressão de reatividade, com animais Nelore sendo mais agitados que os animais Girolando. Na avaliação do estresse não houve diferença estatística entre os métodos de frequência cardíaca, entretanto, houve interação ($P < 0,05$) entre raça e experiência. Na frequência respiratória houve efeito de interação entre método e raça. Em relação à formação de hematomas, o método Tradicional causou mais hematomas do que os outros métodos avaliados. Houve diferença no tempo de coleta de sangue, onde o método de Krev apresentou menor tempo gasto na coleta ($P < 0,05$). Os métodos de coleta de sangue Vacutainer e Krev apresentaram resultados similares, com ausência de contaminação no tempo zero. Em

741 contrapartida o método o Tradicional apresentou alta contaminação que
742 potencializou com os demais tempos de incubação.

743 **Palavras-chave:** contaminação microbiológica, dispositivos de coleta, estresse,
744 reatividade

745

746 1. Introdução

747

748 A pecuária bovina possui uma grande importância econômica e social no
749 agronegócio brasileiro, sendo as raças Nelore e Girolando os grupos genéticos mais
750 utilizados para a produção de carne e leite, respectivamente.

751 Neste contexto, a procura pelo aumento da eficiência dos sistemas de
752 produção de bovinos tem direcionado investimentos na pesquisa, com intuito de
753 aumentar a produtividade sem causar danos ao meio ambiente e na manutenção da
754 saúde dos animais. No entanto, os bovinos são inevitavelmente expostos a
755 estresses como vacinação, castração, mistura de lote e manejos no curral.
756 Entretanto, o importante é que os animais sejam expostos ao menor número
757 possível de fatores estressantes, pois os altos níveis afetam as características de
758 interesse econômico, como ganho de peso e a qualidade final da carne produzida.

759 Portanto, utilizar estratégias de manejo que minimize o estresse dos animais
760 pode melhorar o bem-estar promovendo maior rentabilidade ao sistema de
761 produção. Assim, na busca por reduzir esses efeitos durante o manejo, algumas
762 práticas devem ser adotadas a campo, como o treinamento de pessoas envolvidas e
763 o desenvolvimento de tecnologias que minimizem o estresse dos animais,
764 principalmente as associadas as atividades de coleta de sangue, já que este auxilia
765 no diagnóstico de doenças.

766 Entretanto, no processo para a obtenção do sangue alguns fatores podem
767 afetar a qualidade da amostra, como a experiência do flebotomista, o métodos de
768 coleta, o estresse dos animais durante a coleta de sangue e a possível
769 contaminação ambiental das amostras. Neste sentido é importante eliminar os riscos
770 de contaminação ambiental com agentes patogênicos, mantendo a higienização do
771 profissional responsável pela coleta e do local de punção venosa, assim como, a
772 não reutilização de dispositivos destinados a uso único para prevenir a
773 contaminação microbiana.

Um estudo realizado por Cencchi et al. (2011), mostrou que a coleta e o transporte de sangue feito de forma incorreta podem dificultar e muitas vezes inviabilizar o exame, ou seja, a qualidade da amostra é essencial para o correto diagnóstico.

De maneira geral, dentre as técnicas mais difundidas a campo têm-se o sistema aberto e fechado de coleta. Neste sentido, o método de coleta tradicional é classificado como um sistema de coleta aberto com agulha e tubo separados. No entanto, o método Tradicional pode causar erros pré-analíticos comprometendo a qualidade da amostra como, maior probabilidade de coagulação do sangue e maior possibilidade de exposição direta do profissional responsável pela coleta sanguínea (ANDRIOLO et al., 2010). Em suma, por se tratar de um sistema de coleta aberto este método pode propiciar maior contaminação ambiental por microrganismos presentes no ambiente, nas mãos do profissional responsável pela atividade.

Já o método Vacutainer por sua vez, é um sistema fechado de coleta de sangue, portanto mais seguro que o método Tradicional, tendo como vantagem permitir a coleta de várias amostras em apenas uma venopunção, porém é preciso treinamento e habilidade, pois caso ocorra erros durante a punção da veia é necessário realizar a troca de tubo e agulha o que pode inviabilizar a sua utilização.

Em contrapartida, o método Krev aparece como uma alternativa ao método de coleta fechado. Feito de material plástico descartável, onde a agulha é acoplada no tubo coletor não permitindo a reutilização do tubo tampouco da agulha, apresentando característica como a fácil manipulação o que pode propiciar intervalos menores de tempo para a coleta de sangue, o que reduziria o estresse dos animais.

Nesse sentido, os critérios para a escolha da melhor técnica a ser utilizada na coleta de sangue bovino deve ir além dos custos dos métodos, deve-se considerar a facilidade do manuseio do produto que influenciará na habilidade do profissional responsável e na eficiência de coleta. Assim o presente trabalho tem por objetivo avaliar a influência da raça, do local de punção da veia e da experiência do manejador sobre os diferentes métodos de coleta de sangue em bovinos.

2. Material e Métodos

Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (protocolo 007/2016). O experimento foi conduzido no Setor de bovinos de corte e leite da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (Unidade Universitária de Aquidauana/MS) e no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Câmpus de Aquidauana-MS)

2.1 Procedimentos Experimentais

Foram utilizados 25 animais de cada grupo genético, Nelore e Girolando ($\frac{3}{4}$ Holandês x $\frac{1}{2}$ Gir). A cada dois dias os mesmos animais eram submetidos a coleta de sangue por punção venosa realizada em dois locais distintos, sendo veia coccígea e veia jugular, totalizando 1200 coletas de sangue. Participaram da coleta dois grupos de indivíduos, sendo um formado por manejadores com experiência (tem conhecimento da técnica e realiza o procedimento de coleta constantemente) e outro grupo formado por manejadores sem experiência (não tem nenhum conhecimento sobre a técnica de coleta e nunca realizou o procedimento). Previamente a coleta de sangue, foi realizada assepsia do local com papel toalha. Os animais durante a coleta de sangue permaneceram imobilizados em tronco de contenção de madeira e mantidos em local sombreado.

Para realizar os testes comparativos, foram utilizados três métodos de coleta de sangue, sendo que, o calibre da agulha utilizada foi o mesmo para todos os métodos (40-12 mm), bem como o formato bisel trifacetado de corte. Os métodos utilizados foram: Tradicional (TRAD), punção da veia com agulha e armazenamento do sangue em tubo de ensaio plástico estéril, ambos reutilizáveis, com rolha de borracha retirada no momento da coleta; Método Vacutainer (VACU), punção da veia com agulha dupla descartável e armazenamento do sangue em tubo plástico estéril, com vácuo e não reutilizável, com rolha de borracha e tampa plástica vedatória rosqueável; Método Krev (KREV), punção da veia com agulha e armazenamento do sangue em material plástico flexível estéril, ambos descartáveis.

2.2 Avaliação do Comportamento animal

Foram realizadas avaliações de estresse dos animais durante a extração de sangue, por meio de aferições da frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR). A FC foi expressa em número de batimentos por minuto e medida através de estetoscópio, sendo o tempo cronometrado por um período de 30 segundos. Os dados foram multiplicados por dois para obtenção dessa variável em minutos. Já a FR foi obtida pela contagem dos movimentos do flanco dos animais, com auxílio de um cronômetro durante por um período de 30 segundos e multiplicando-se o valor por dois para obtenção dessa variável em minutos.

A formação de hematomas imediatamente após a punção das veias coccígea e jugular foi avaliada de forma subjetivos sendo os escores grau 1- sem hematomas; grau 2- gota de sangue; grau 3- inchaço; grau 4- gota de sangue mais o inchaço e grau 5- sangramento intenso mais inchaço.

A avaliação subjetiva de temperamento no tronco de contenção durante o procedimento de coleta de sangue, também foi determinado de forma subjetiva dado por escores (Adaptado de Silveira et al., 2006), grau 1- pouco deslocamento dentro do tronco, parado na maior parte do tempo, movimentos de cauda ocasionais e relaxados; grau 2- animal mais ativo, que não permanece na mesma posição mais do que alguns segundos, movimentos de cauda ocasionais e vigorosos; grau 3- deslocamentos frequentes dentro do tronco, movimentos vigorosos e abruptos, movimento de cauda frequente e vigorosos; grau 4- deslocamento frequente dentro do tronco, movimentos vigorosos e abruptos, tentativa de deitar no tronco; grau 5- deslocamento contínuo, salta, força a grade de saída com a cabeça, movimento de cauda contínuo e vigoroso, animal cai no tronco.

O tempo gasto para a coleta de sangue também foi computado, sendo o início determinado no momento em que o animal era contido no tronco de contenção e o término o momento ao qual o recipiente contendo a amostra de sangue era depositado em caixa térmica.

2.3 Análises microbiológicas

Previamente aos ensaios microbiológicos, foram realizadas análises da série vermelha (eritrócito, hematócrito, dosagem de hemoglobina e índices hematimétricos) para diagnóstico de anemias e da série branca onde se avaliou as contagens dos leucócitos, linfócitos e monócitos e plaquetas. Os resultados dos

hemogramas (Tabela 1) demonstraram que os parâmetros sanguíneos de todos os animais estavam dentro da normalidade, estando todos saudáveis, o que não interferiu nos resultados microbiológicos.

Foram coletadas 20 amostras de sangue de cada método de coleta de sangue, sem levar em consideração a raça dos animais. As amostras de sangue coletadas foram devidamente identificadas com a numeração dos animais. Posteriormente, foram transferidas e diluídas para os frascos de reagente Hemoprov de 10 ml (New Prov, Pinhais- Paraná, Brasil), e inoculadas nos respectivos meio de cultura. Em seguida, as amostras foram armazenadas em estufa a 35°C.

As análises foram realizadas em cinco tempos, zero (0) (imediatamente após a coleta de sangue), 24, 48, 72 e 96 horas. Todos os procedimentos para a execução das análises microbiológicas foram realizados com as devidas assepsias. As inoculações nas placas foram feitas em capela de fluxo laminar para minimizar problemas com contaminação vinda do meio ambiente, evitando assim alterações nos resultados. As placas foram comercializáveis com seus respectivos meios Ágar Triptico de soja (TSA), Ágar Azida, Ágar Sangue e Ágar Mac Conkey (New Prov, Pinhais- Paraná, Brasil), e após a semeadura foram colocadas em estufa com temperatura a 35°C por 24 horas.

2.3.1 Contagem Bacteriana Total (CBT)

Para determinar a CBT, foi preparado o meio Ágar para contagem padrão diluído em água destilada, autoclavado, e posteriormente, distribuído em placas de petri (15 x 100) esterilizadas, logo, foram armazenadas adequadamente para a solidificação. Na inoculação foram adicionadas 0,05 mL de sangue diluído no reagente Hemoprov na placa, posteriormente foi feito a semeadura. Em seguida as amostras foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas, assim as placas que tiveram desenvolvimento bacteriano, foram levadas para realização da coloração de Gram para classificação das bactérias em Gram-positivas (+) ou Gram-negativas (-).

O primeiro procedimento realizado para a técnica da coloração de Gram foi confeccionar o esfregaço, em seguida este foi corado com violeta de cristal por 60 segundos. Após esse período a lâmina foi lavada com água destilada e corada com Lugol por mais 60 segundos, sendo posteriormente descorada com álcool 95% durante 10 segundos e realizada a lavagem com água destilada. A última coloração

foi feita com Safranina durante 60 segundos, logo após foi lavada e seca naturalmente. Ao término do processo as lâminas foram observadas com o auxílio de um microscópio para classificação das bactérias em Gram-positiva e Gram-negativa.

O método de coloração foi utilizado para diferenciar espécies bacterianas em dois grupos, bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*). Assim, lâminas que apresentaram bactéria em forma de bastonete com coloração rosada foram identificadas como *Escherichia coli*. As placas que apresentaram bactérias de forma esférica de coloração roxa foram identificadas como *Staphylococcus aureus*. Como contraprova, foram utilizadas placas com meio de cultura Ágar Triptico de soja (TSA), sendo inoculado e avaliado exatamente da mesma forma, porém, sem a submissão ao método de Gram.

2.3.2 Confirmação de *Staphylococcus aureus*

As estirpes de *Staphylococcus aureus* foram isoladas utilizando placas de petri contendo meio Ágar Azida e Ágar Sangue (New Prov, Pinhais- Paraná, Brasil). Em cada placa foram adicionados 0,05 mL de sangue já diluído no reagente Hemoprov. Em seguida as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24 horas na estufa. Posteriormente, verificou-se o desenvolvimento de colônias típicas: colônias de bordas regulares, médias com pigmento amarelo ou cinza-amarelo e brilhantes, com cerca de 1 mm de diâmetro normalmente circundadas por 1 halo opaco, mais próximo da colônia. Foram selecionadas para contagem, placas que continham entre 20 a 200 destas colônias típicas de *Staphylococcus aureus*, sendo estas submetidas aos testes bioquímicos, de coagulase, catalase e oxidase. Como contraprova do meio de cultura Ágar sangue Azida, foi realizado a inoculação em placas de Petri com o meio de cultura Ágar sangue.

2.3.2.1 Teste da Coagulase

Para a realização do teste de coagulase, foi feita a diluição de um frasco de plasma de coelho de 1 mL em 3 mL de soro fisiológico, em seguida, foram adicionados 0,05 mL desta mistura numa lâmina de vidro juntamente com 0,1 mL de soro fisiológico, assim, transferiu-se a colônia de bactéria mais isolada da placa Ágar sangue azida evitando-se portanto as bordas para a lâmina de vidro. Então foi efetuada a homogeneização da colônia de bactéria com a solução de plasma de

coelho e soro fisiológico. Após isso, verificou-se a formação de coágulo, onde placas que apresentaram esta formação foram avaliadas como positivas para *Staphylococcus aureus*.

2.3.2.2 Teste de Catalase

Com uma alça de semeadura flambada retirou-se uma colônia da placa de petri Ágar Sangue Azida, e logo após, foi feito o esfregaço em lâmina de vidro. Adicionou-se 0,05 mL de peróxido de hidrogênio, sobre o esfregaço. As lâminas que apresentaram material espumoso foram avaliadas como positivas para *Staphylococcus aureus*.

2.3.2.3 Teste da Oxidase

A realização do teste de oxidase consistiu em verificar se a bactéria é produtora da enzima oxidase. O procedimento foi realizado com o auxílio de fitas de oxidase, onde foram adicionados 0,05 mL de água destilada, em seguida espalhou-se a colônia de bactéria da placa Ágar azida sobre a fita com auxílio de um palito de madeira, dessa forma, tiras que se apresentaram com coloração púrpura intensa, foram avaliadas como positivas para *Staphylococcus aureus*.

2.3.3 Análise microbiológica para identificação de *Escherichia coli*

Os coliformes fecais foram determinados por meio da incidência de *Escherichia coli*, deste modo, foram semeados 0,05 mL de sangue diluído no reagente Hemoprov, em uma placa de petri contendo o meio Ágar Mac Conkey, meio este, apropriado para o crescimento dessa bactéria. Placas que apresentaram bactérias de coloração rosada ou arroxeadas após a inoculação, num período de 24 horas foram submetidas ao teste de coloração de Gram.

2.4 Análises Estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância com auxílio programa estatístico R versão 3.3.1 (R Development Core Team 2016) de acordo com o delineamento inteiramente casualizado e quando constatado diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Os dados de frequência cardíaca e respiratória foram obtidos através de ranges, que consiste na

diferença entre o valor máximo e mínimo, para melhor expressar os resultados. Após a transformação dos dados, os mesmos foram submetidos à análise de variância. Os dados da contaminação microbiológica foram expressos em porcentagem.

3. Resultados

3.1 Comportamento animal durante a coleta de sangue

Observaram-se diferenças significativas entre os grupos genéticos quanto ao grau de temperamento no tronco de contenção durante a coleta de sangue ($P < 0,05$), sendo que os animais da raça Girolando apresentam os menores valores (Tabela 2). Não foi observada diferença com relação aos métodos de coleta e o grupo de manejadores (com e sem experiência).

Verifica-se que na raça Nelore houve uma maior variação dos batimentos cardíacos durante a coleta de sangue na veia coccígea e jugular que nos animais Girolando ($P < 0,05$). Todavia não foi observado efeito do método de coleta e nem do grupo de manejadores (com e sem experiência) sob a variável frequência cardíaca (Tabela 3).

Com relação, a frequência respiratória durante a coleta de sangue na veia coccígea houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos genéticos, sendo os valores mais elevados para a raça Nelore em relação aos animais Girolando. Porém, não houve diferença com relação aos métodos de coleta e aos grupos manejadores (com e sem experiência).

Houve interação entre método de coleta e raça Girolando ($P < 0,03$) para a variável frequência respiratória durante a coleta de sangue na veia jugular (Figura 1). Com o método Vacutainer os animais Girolando apresentaram uma redução da frequência respiratória jugular comparativamente ao método Tradicional de coleta de sangue. Os animais da raça Nelore não apresentaram diferença estatística entre os métodos de coleta para a variável estudada ($P > 0,05$).

3.2 Formações de hematomas após punção venosa

Houve diferença significativa entre os métodos de coleta ($P<0,05$), o método Tradicional causou maior grau de hematoma na veia coccígea que os métodos Vacutainer e Krev (Tabela 4). Observou-se ainda efeito de interação entre a raça e os grupos de manejadores avaliados ($P<0,02$), para a variável grau de hematoma na veia coccígea, sendo que, ambos os grupos de manejadores provocaram maior grau de hematomas na veia coccígea dos animais Nelore. Em relação aos animais Girolando, notou-se diferenças entre os grupos de manejadores (com e sem experiência) para o grau de hematomas na veia coccígea. O grupo de manejadores sem experiência em coleta de sangue causou maior grau de hematoma, que o grupo de manejadores com experiência.

A interação método de coleta, raça e grupo de manejadores foi significativa ($P<0,01$) para o grau de hematoma na veia jugular (Figura 2). O grupo de manejadores sem experiência em coleta de sangue foi responsável pelo maior grau de hematomas na jugular dos animais Girolando com o método Tradicional ($P<0,01$). No grupo de manejadores com experiência, não foram observadas diferenças para a variável grau de hematoma na veia jugular dos animais Girolando em relação ao método de coleta ($P>0,84$).

Nos animais Nelore o grupo de manejadores sem experiência em coleta de sangue causou maior grau de hematomas com o método tradicional ($P<0,02$). Já para o grupo de manejadores com experiência em coleta de sangue não houve diferença para a variável grau de hematoma jugular, em relação aos métodos de coleta ($P>0,39$).

3.3 Tempo gasto durante a coleta de sangue

O tempo de coleta foi maior no método tradicional ($P<0,05$), seguido pelo método vacutainer (Tabela 5). O grupo de manejadores com experiência na coleta de sangue teve menor tempo quando comparados às pessoas sem experiência. Houve diferença significativa entre os locais de punção da veia ($P<0,01$), sendo que, na veia coccígea o processo de obtenção do sangue foi mais rápido ($P<0,05$) comparativamente a veia jugular.

3.4 Variáveis Microbiológicas

Foi observado aumento da Contagem Bacteriana Total nas amostras de sangue no método Tradicional a partir de 0 hora (zero) após a inoculação no reagente Hemoprov (Figura 3).

Nas análises microbiológicas das amostras de sangue coletada por diferentes tubos coletores, observou-se crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* em todos os cinco tempos (0, 24, 48, 72 e 96 horas) para o método de coleta Tradicional (Figura 4). A partir de 24 horas após inoculação em reagente Hemoprov houve crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* no método Krev e Vacutainer, porém em porcentagens diferentes e menores, comparativamente ao método Tradicional.

Já para *Escherichia Coli* observou-se crescimento nos tempos de incubação 24, 48, 72 e 96 horas (Figura 5) para o método Tradicional. No entanto, no método Vacutainer e Krev não houve crescimento bacteriano para *Escherichia Coli* nas amostras de sangue.

4. Discussão

Os animais da raça Nelore apresentam comportamento mais reativo no tronco de contenção durante a coleta de sangue que os animais Girolando. Diferenças entre raças têm sido descritas de modo semelhante a Silveira et al. (2006), que avaliaram a interação entre grupos genéticos vs temperamento dos animais, encontrando diferenças para as variáveis escore de temperamento, tempo de saída e distância de fuga. Os autores concluíram que os animais Nelore ou cruzados com Nelore são mais reativos e excitáveis que os animais classificados como europeus. Já Hotzel et al. (2008) concluíram que vacas leiteiras da raça europeia, quando submetidas a procedimentos aversivos aplicados de forma esporádica não apresentaram alterações no comportamento.

De maneira geral, a reatividade tem efeito estimulador sobre a resposta comportamental dos animais, tornando-se mais intenso quanto mais reativo for o animal (MAFFEI, 2009). Diferenças no temperamento têm base fisiológica, assim, animais reativos tem menor capacidade adaptativa às mudanças e está mais suscetível a sofrer estresse de contenção e manejo (COSTA et al., 2015). Os animais Nelore quando entravam no tronco de contenção apresentavam comportamento bastante agitado e com batimentos cardíacos elevados, conforme

procedeu-se ao manejo de coleta de sangue os batimentos diminuía progressivamente. Corroborando com os resultados obtidos Luchiari Filho e Mourão (2006), em que valores maiores de frequência cardíaca na raça Nelore podem ser explicados pelo temperamento mais ativo destes animais ao manejo. Ademais, de acordo com Martello et al. (2004), o aumento ou a redução da frequência respiratória depende da duração do estresse a que estão submetidos os animais.

Dessa forma, mudanças fisiológicas e respostas a curto prazo, como alteração no batimento cardíaco e frequência respiratória estão ligadas diretamente à resposta de medo e excitação. Entretanto, pode-se inferir que o aumento ou redução da frequência cardíaca depende da intensidade do estresse, e da capacidade de adaptação dos mesmos. De acordo com Giralt (2002), a exposição repentina a um determinado estímulo a qual o animal não está adaptado pode desencadear estresse ou reação de alarme que é caracterizado por um conjunto de respostas como o aumento da frequência cardíaca, que neste projeto foi mais acentuada em animais da raça Nelore. De acordo com Rivera (2002), quando a resposta comportamental não alivia o estresse, o animal necessita alterar seu estado biológico evocando o sistema autônomo que possui respostas rápidas e específicas, como o aumento dos batimentos cardíacos e frequência respiratória.

Em estudo feito por Boissy & Bouissou (1988), avaliando o efeito de diferentes intensidades de manejo em resposta a reatividade animal ao homem, constataram que animais submetidos a tratamento mais intensivo por tempo mais longo apresentam maiores valores de frequência cardíaca durante os testes comportamentais.

A punção venosa é um procedimento invasivo e a formação de hematoma é uma complicação que ocorre na venopunção, nesse contexto, o hematoma é uma lesão do vaso. Observou-se efeito de interação para o grau de hematomas caudal, os dois grupos de manejadores avaliados causaram maior grau de hematomas nos animais Nelore, por apresentar comportamento mais inquieto no tronco de contenção na presença do homem que os animais da raça Girolando. Em relação, aos grupos de manejadores o grupo sem experiência causa maior grau de hematomas, por não possuir habilidade durante a punção venosa.

Por outro lado, a punção na veia jugular compreende a elevação do pescoço do animal, causando desconforto, deixando-o inquieto no tronco de contenção, tornando a localização e punção da veia jugular mais difícil para pessoas sem

experiência em coleta de sangue, consequentemente à maior ocorrência de hematomas. O método de coleta Tradicional causou maior grau de hematomas que os métodos Krev e Vacutainer. Isto fica mais evidente pelo fato do método Tradicional depender de maior tempo e maior habilidade para localização e punção da veia o que, consequentemente, pode ter provocado mais hematomas. Tal fato corrobora com Stöber (1993), que relata o fato da quantidade de hematomas estar associado a forma errada de punção da veia. Assim, a ocorrência de maior grau de hematomas nos animais Nelore pode estar associada ao fato desses animais possuírem comportamento mais agitado no tronco de contenção, o que despende de maior tempo durante a coleta de sangue.

Em vista disso, ressalta-se que a coleta de sangue é um processo doloroso aos animais, devendo ser realizada de forma rápida e segura. Neste contexto a coleta na veia coccígea é mais recomendada, pois os resultados demonstram que independente do grupo de manejador (com e sem experiência), métodos e raça o tempo para extração do sangue nesse local é menor, portando causa menos estresse nos animais.

Com relação aos métodos de coleta observou-se que o tempo de coleta de sangue com o método Krev foi mais satisfatório pelo menor tempo para coleta do sangue. Esta eficiência está relacionada a estrutura do coletor, pois o plástico que é flexível funciona por um processo chamado de “memória do plástico” (o tubo volta para seu formato inicial), dessa forma, em situações que ocorram o erro na punção dobra-se novamente o tubo no intuito de formar um vácuo natural novamente, sem perda do recipiente. Nesse sistema a agulha vem acoplada no tudo, o que facilita o manuseio durante a coleta de sangue, quando comparado aos outros métodos aqui estudados.

No que diz respeito ao método Vacutainer, este é um sistema fechado, com gasto de tempo de coleta relativamente maior que o método Krev, porém menor que o método Tradicional. Para a punção da veia com o método Vacutainer é preciso utilizar um adaptador, que auxilia a agulha na perfuração do tubo coletor. Porém, é preciso habilidades que devem ser conciliadas no momento de puncionar a veia, pois caso ocorra erro na punção, perde-se o vácuo e o tubo coletor, o que requer maior quantidade de tempo quando comparado ao método de coleta Krev. Além do que, uma coleta de sangue que despende de maior tempo interfere na qualidade das amostras. Ademais, no método Vacutainer é necessário fazer a troca da agulha em

1143 cada punção da veia, rosqueando a agulha do adaptador, esse procedimento, porém
1144 expõe a ocorrência de acidentes com materiais perfurocortantes.

1145 Em relação ao método Tradicional, infere-se que o tempo de coleta foi
1146 superior aos outros métodos, pois exigiu maior habilidade no manuseio no momento
1147 de sua utilização, haja vista, que o sistema agulha e tubo são independentes,
1148 portanto o procedimento da punção venosa é mais complexo até a localização da
1149 veia. Nota-se que o método Tradicional causou mais hematomas que os outros
1150 métodos, devido a realização de diversas tentativas de localização da veia, somado
1151 a isto outro fator a ser considerado é a maior probabilidade de contato e a
1152 transmissão de agentes infecciosos seja por respingo de sangue ou por acidentes
1153 com materiais perfurocortantes.

1154 Da mesma maneira que o tempo gasto e o método utilizado na coleta, as
1155 contaminações dos tubos também podem interferir na análise correta dos
1156 parâmetros sanguíneos. O maior crescimento bacteriano nas amostras de sangue
1157 coletadas com o método Tradicional possivelmente é justificado pelo método de
1158 coleta ser aberto e agulha separada do frasco coletor, o que possibilita maior contato
1159 do sangue com o ambiente, aumentando assim a possibilidade de contaminação. De
1160 modo semelhante ao resultado encontrado, Wiwanitkit (2003) realizou um estudo
1161 para avaliar a contaminação em 100 tubos de coleta de sangue pelo método
1162 Vacutainer no tempo zero e observou prevalência nula de contaminação microbiana
1163 nos tubos de coleta.

1164 Corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, Ashavaid
1165 (2008), onde monitorou 14 indicadores de qualidade pré-analítica e avaliou a
1166 contaminação em amostras de sangue coletadas com método Vacutainer e método
1167 Tradicional (agulha e seringa), os autores concluíram que o sistema Vacutainer
1168 apresentou baixa contaminação (3 das 10.000 das amostras de sangue estudadas)
1169 no tempo zero (após a coleta). Em um estudo feito por Washington (1977),
1170 envolvendo 20 laboratórios clínicos, foi avaliada a contaminação de tubos de coleta
1171 de sangue a vácuo no tempo zero. O autor concluiu que 14% dos 1433 tubos
1172 examinados continham micro-organismos, como bactérias *Pseudomonas* e
1173 *Enterococcus*.

1174
1175
1176

5. Conclusion

Os animais Nelore são mais reativos no tronco de contenção durante a coleta de sangue comparativamente ao Girolando, apresentando maior nível de estresse e frequência cardíaca. O método Krev é mais eficiente na coleta de sangue bovino apresentando menor tempo de coleta, além de provocar menos hematomas na veia coccígea e jugular que o método Tradicional e Vacutainer.

O método Tradicional apresentou no tempo zero alta contagem microbiológica e isto foi potencializado com os demais tempos de incubação. O método Krev e Vacutainer apresentou resultados similares, com contaminação nula somente no momento da coleta.

Referência

Andriolo, A., Martins, A.R., Ballarati, C.A., Barbosa, I.V., Mendes, M.E., Melo, M.R., Sumita, N.M., Romano, P., Trindade, P.A. 2010 Recomendação da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso. <http://www.sbpc.org.br/conteudo.pdf>. (Acesso em 25 julho 2017)

Ashavaid, T.F.; Dandekar, S.P.; Khodaiji, S.; Singh, A.P. 2009. Influence of method of specimen collection on various preanalytical sample quality indicators in EDTA blood collected for cell counting. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 24, 356-360.

Boissy, A.; Bouissou, M. 1988. Effects of early handling on heifers' subsequent activity to human sandtoun familiar situations. Applied Animal Behaviour Science. 20, 259-273.

Cenci, A.; Braga, A.C.; Brito, B.G., Cerva, C., Mayer, F.Q., Karam, F.S.C., Martins, J.R.S., Neto, J.A.S.P., Rosa, J.C.A., Brito, K.C.T., Coppola, M.M., Dasso, M.G., Roehe, P.M., Doyle, R.L., Borowski, S.M. 2011. Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico Laboratorial Veterinário. Porto Alegre: FEPAGRO, Boletim Técnico. 20, 9-80.

Costa, M. J.R.P.; Sant'anna, A.C.; Silva, L.C. M. 2015. Temperamento de bovinos Gir e Girolando: efeitos genéticos e de manejo. Informe Agropecuário. 36, 100-107.

- 1211 Dirksen, G.; Gründer H.D.; Stöber M. 1993. Exame Clínico dos Bovinos, terceira ed.
1212 Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 114-117.
1213
- 1214 Giralt, J.M. Valoración del estrés de captura, transporte y manejo em el corzo
1215 (Capreolus capreolus): efecto de la acepromacina y de la cautividad. 2002. Tesis del
1216 Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra. 209.
1217
- 1218 Hötzel, M.J.; Gomes, C.C. M.; Machado Filho, L.C.P. 2009. Comportamento de
1219 vacas leiteiras submetidas a um manejo aversivo. Biotemas. 22, 135-140.
1220
- 1221 Luchiari Filho, A.; Mourão, G.B. 2006. Melhoramento, raças e seus cruzamentos na
1222 pecuária de corte brasileira. Pirassununga: A. Luchiari Filho. 142
1223
- 1224 Maffei, W.E. 2009. Reatividade animal. Revista Brasileira de Zootecnia. 38, 81-92.
1225
- 1226 Martello, L.S.; Savastano Júnior, H.; Silva, S.L.; Titto, E.A.L. 2004. Respostas
1227 fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas a diferentes
1228 ambientes. Revista Brasileira de Zootecnia. 33, 181-191.
1229
- 1230 Silveira, I.D.B.; Fisher, V.; Soares, G.J.D. 2006. Relação entre o genótipo e o
1231 temperamento de novilhos em pastejo e seu efeito na qualidade da carne. Revista
1232 Brasileira de Zootecnia. 35, 519-526.
1233
- 1234 Stöber, M. 1993. Identificação, anamnese, regras básicas da técnica de exame
1235 clínico geral. In: Dirksen, G.; Gründer, H.D.; Stöber, M. Exame clínico dos bovinos.
1236 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2, pp. 44-80.
1237
- 1238 Riviera, E.A.B. 2002. Estresse em animais de laboratório. In: Andrade, A.; Pinto, S.
1239 C.; Oliveira, R. S. Animais de Laboratório: criação e experimentação. Editora
1240 FIOCRUZ. 29, pp. 267.
1241
- 1242 Washington J.D. 1977. The microbiology of evacuated blood collection tubes. Annals
1243 Internal Medicine. 86, 186- 188.
1244

1245 Wiwanitkit V. 2003. Bacterial contamination in the evacuated blood collection tube: a
1246 short report. Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn
1247 University, Songklanagarind Medical Journal. 21, 245-248.

1248

1249

1250

1251

1252

1253

1254

1255

1256

1257

1258

1259

1260

1261

1262

1263

1264

1265

1266

1267

1268

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Hemograma dos bovinos.

Variáveis	Idade				Referência-bovinos
	24-36	48-60	72-84	120-132	
Leucócitos Totais x10³/μl	12.2 x10 ³ /μl	12.3 x10 ³ /μl	12.4 x10 ³ /μl	8.7 x10 ³ /μl	5.0-16.0 x10 ³ /μl
Linfócitos x10³/μl	7.4 x10 ³ /μl	6.2 x10 ³ /μl	7.0 x10 ³ /μl	4.3 x10 ³ /μl	1.5-9.0 x10 ³ /μl
Monócitos x10³/μl	1.0 x10 ³ /μl	1.2 x10 ³ /μl	1.0 x10 ³ /μl	0.8 x10 ³ /μl	0.3-1.6 x10 ³ /μl
Granulócitos Totais x10³/μl	4.4 x10 ³ /μl	5.3 x10 ³ /μl	4.5 x10 ³ /μl	3.6 x10 ³ /μl	2.3-9.1 x10 ³ /μl
Linfócitos%	55.1%	46.7%	53.3%	48.0%	20.0-60.3%
Monócitos%	8.5%	9.4%	8.4%	9.0%	4.0-12.1%
Granulócitos Totais%	36.4%	41.5%	38.4%	44.0%	30-65.0%
Eritrócitos x10⁶/μl	7.1x10 ⁶ /μl	6.1 x10 ⁶ /μl	7.0 x10 ⁶ /μl	6.02 x10 ⁶ /μl	5.00-10.10 x10 ⁶ /μl
Hemoglobina g/dL	10.4 g/dL	9.8 g/dL	10.4 g/dL	10.1 g/dL	9.0-13.9 g/dL
Hematócrito%	28.0%	28.1%	31.2%	30.0%	28.0-46.0%
VCM fL	44.9fL	75.0 fL	44.6 fL	51.2 fL	38.0-53.0 fL
HCM pg	14.9pg	16.6 pg	14.9 pg	17.1 pg	13.0-19.0 pg
CHCM g/dL	33.2g/dL	36.1 g/dL	33.3 g/dL	33.8 g/dL	30.0-37.0 g/dL
Plaquetas x10⁹/L	143 x10 ⁹ /L	220 x10 ⁹ /L	167 x10 ⁹ /L	209 x10 ⁹ /L	120-820 x10 ⁹ /L

VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Hemoglobina Corpuscular Média, CHCM (Concentração Hemoglobina Corpuscular Média).

Tabela 2. Grau de temperamento (GT) em função dos tratamentos experimentais.

Variavéis	Raça		Métodos			Grupo de manejadores	
	Girolando	Nelore	TRAD	VACU	KREV	Com	Sem
GT	2,18b	3,36a	2,78	2,85	2,68	2,76	2,78

Médias seguidas por letra minúscula distintas nas linhas para a mesma variável, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Métodos: TRAD (Tradicional), VACU (Vacutainer), KREV (Krev)

Tabela 3. Ranger da frequência cardíaca durante a coleta de sangue.

Variavéis	Raça		Métodos			Grupo de manejadores	
	Girolando	Nelore	TRAD	VACU	KREV	Com	Sem
Caudal	-1,11b	-5,53a	-3,05	-3,35	-3,57	-3,82	-3,92
Jugular	1,32b	-1,98a	0,97	0,23	-0,24	0,03	-0,68

Médias seguidas por letra minúscula distintas nas linhas para a mesma variável, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Métodos: TRAD (Tradicional), VACU (Vacutainer), KREV (Krev).

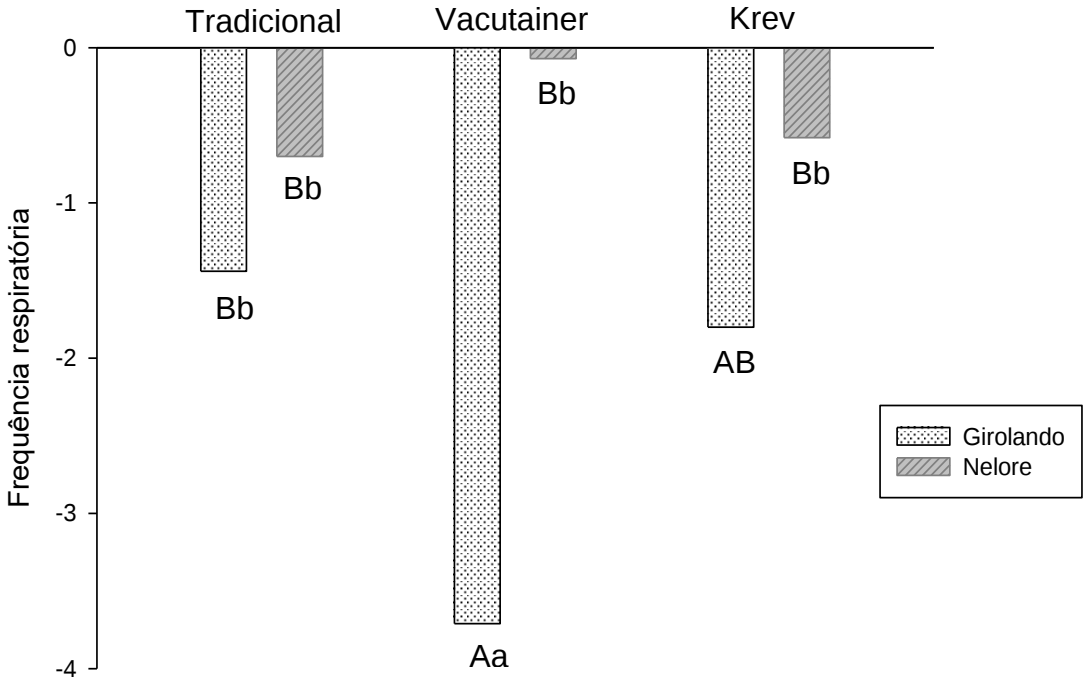


Figura 1. Ranger da frequência respiratória jugular em função dos tratamentos experimentais. Médias seguidas por letras minúsculas ou maiúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Letras maiúsculas são referentes as diferenças entre métodos de coleta e letras minúsculas são referentes a raça.

Tabela 4. Médias para grau de hematoma na veia caudal de bovinos.

Variável	Métodos		
	TRAD	VACU	KREV
Hematoma na veia coccígea	2,96a	2,44b	2,37b

Médias seguidas por letra minúscula distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).
TRAD (tradicional), VACU (vacutainer), KREV (Krev).

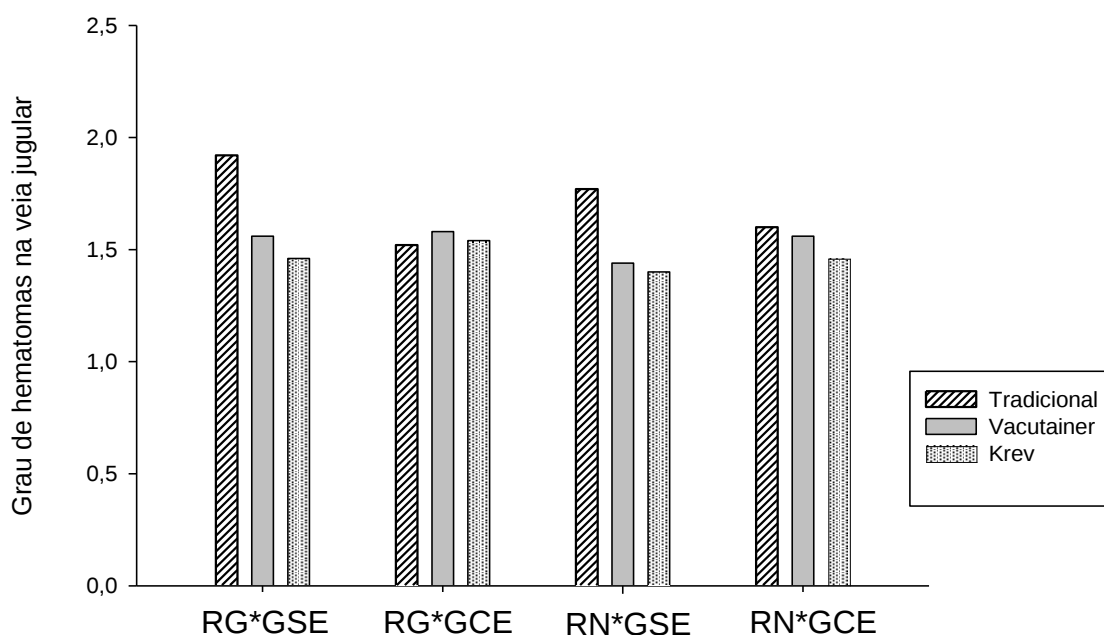


Figura 2. Médias para o grau de hematomas na veia jugular de bovinos. Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$). RG (raça Girolando), RN (raça Nelore), GCE (grupo de manejadores com experiência), GSE (grupo de manejeadores sem experiência).

Tabela 5. Tempo médio em segundos de coleta de sangue em função do local de coleta, métodos e experiência dos manejadores.

Variável	Local		Métodos			Grupo de manejadores	
	CC	CJ	TRAD	VACU	KREV	Com	Sem
TC	55,52b	67,66a	84,10a	68,19b	32,57c	51,92b	71,21a

Médias seguidas por letra minúscula distintas nas linhas para a mesma variável, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$). TC (tempo de coleta), CC (coleta veia coccígea), CJ (coleta veia jugular), TRAD. (tradicional), VACU. (vacutainer).

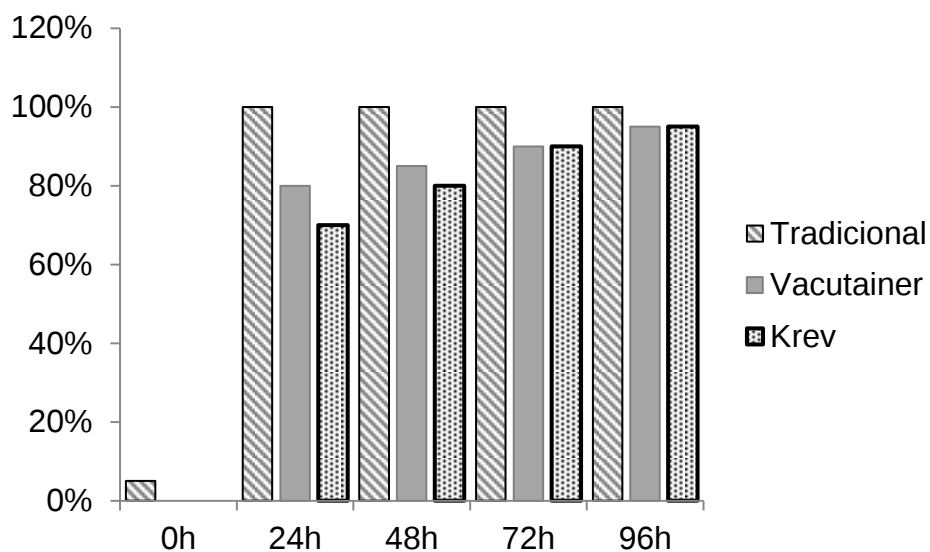


Figura 3. Contagem Bacteriana Total nas amostras de sangue coletadas na veia coccígea por diferentes coletores.

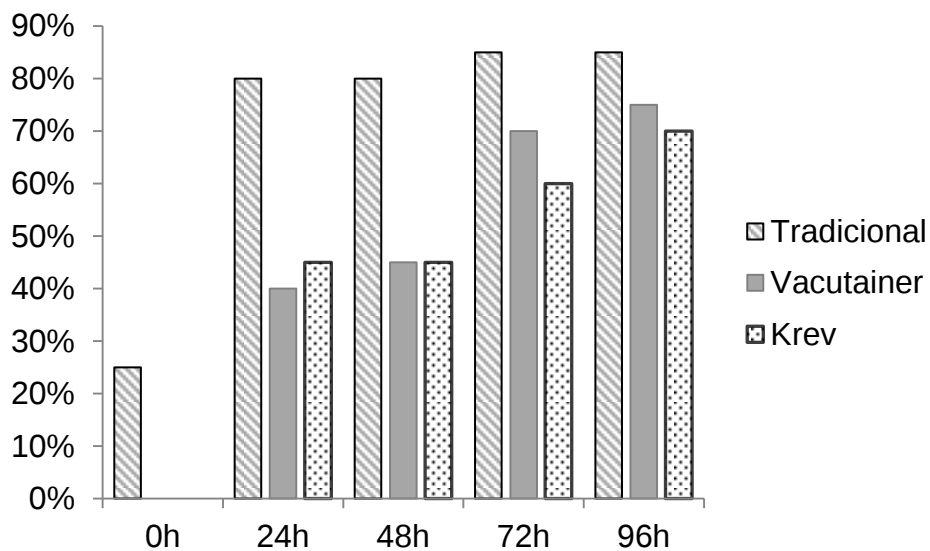
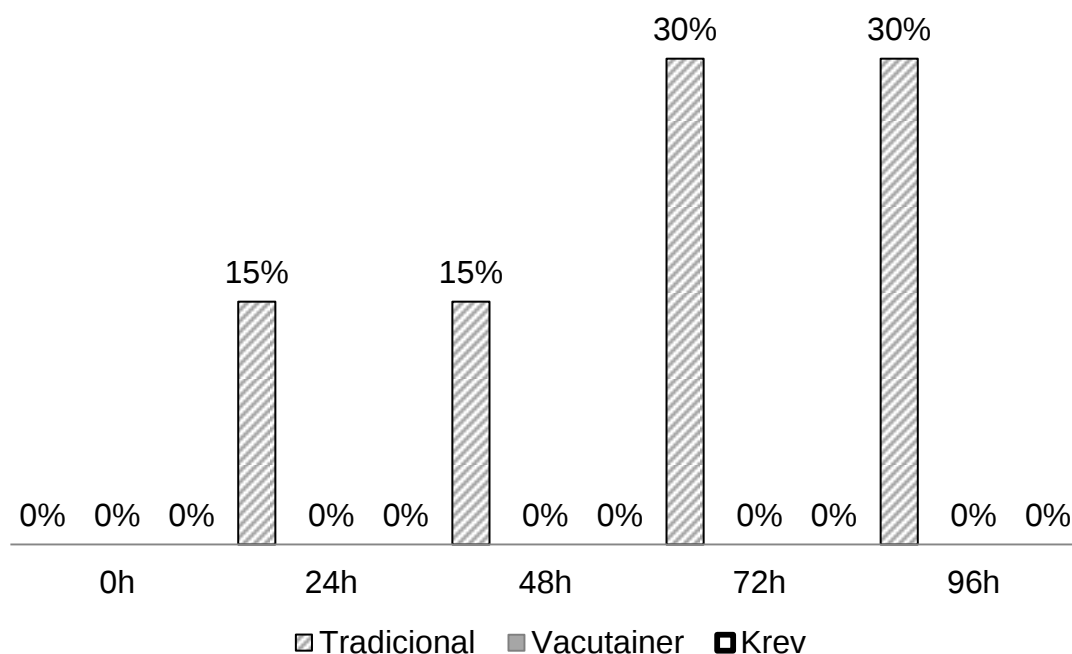


Figura 4. Crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus* em amostras de sangue coletada na veia coccígea por diferentes coletores.

1343



1344

1345

1346

1347

1348

1349

1350

1351

1352

1353

1354

1355

1356

1357

1358

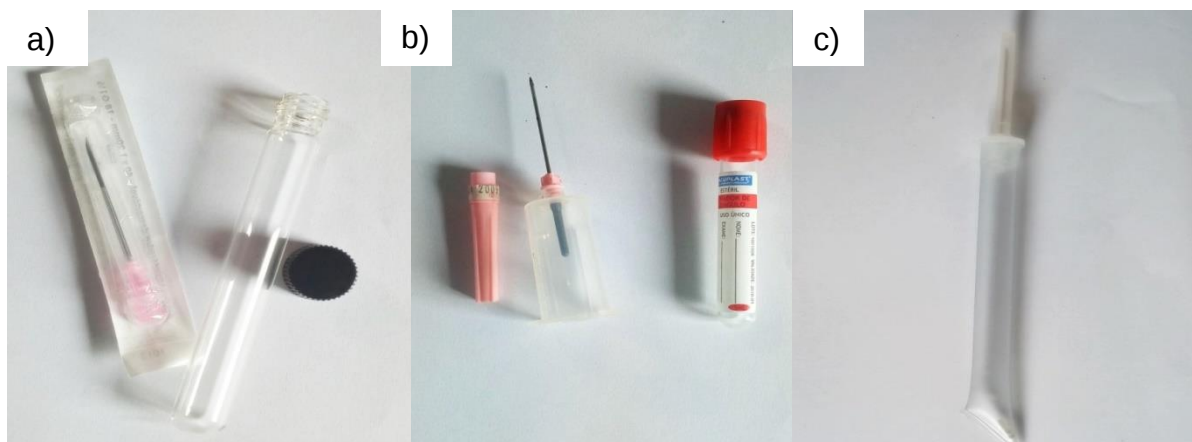
1359

1360

1361

Figura 5. Identificação de *E. Coli* nas amostras de sangue coletadas na veia coccígea por diferentes coletores.

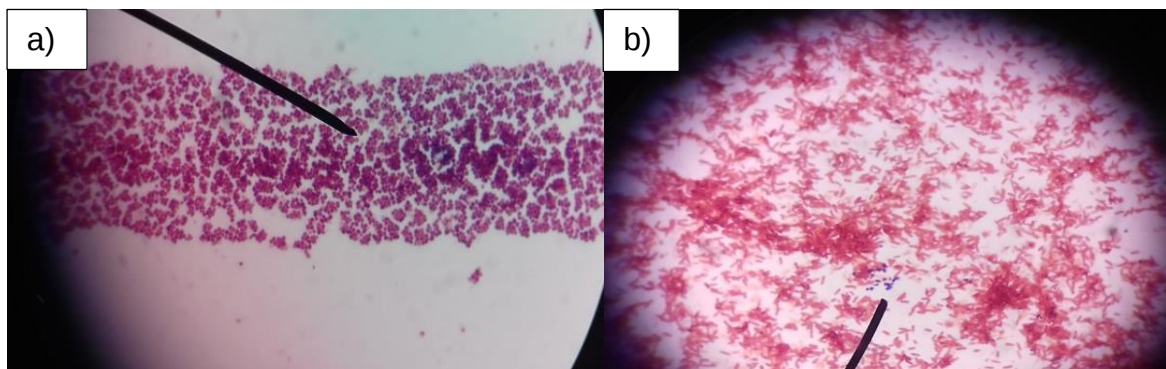
Anexos



Métodos de coleta de sangue. a) Tradicional; b) Vacutainer; c) Krev.
Fonte: Arquivo pessoal.



Placa de CBT. Fonte: Arquivo pessoal.



Lâminas de coloração de Gram. a) cocos Gram-positivo; b) bastonetes Gram-negativos



Teste de coagulase com formação de coágulo. Fonte: Arquivo pessoal



Teste de catalase. Fonte: Arquivo pessoal.