



Instrutivo para coleta, preparo, acondicionamento e remessa ao laboratório de amostras oficiais de PEIXES

Os procedimentos de coleta e remessa de material para diagnóstico laboratorial guardam relação direta com a qualidade do resultado final. Portanto, se o material é coletado, acondicionado ou conservado de maneira incorreta, haverá prejuízo à análise laboratorial, sobretudo na avaliação microscópica, podendo, inclusive, impossibilitar sua consecução, ocasionando prejuízos para o sistema de defesa sanitária de animais aquáticos.

Materiais e equipamentos

Equipamentos de proteção individual (EPIs):

- Macacão e botas de borracha (quando não houver contato direto com a água).
- Jardineira impermeável com bota acoplada (quando houver contato direto com a água).
- Colete salva-vidas no caso de necessidade de uso de embarcação.
- Luvas de pesca impermeáveis para manipulação de animais enfermos.
- Óculos de proteção para aproximação e manipulação de animais enfermos.
- Máscara cirúrgica para a realização de necropsia.
- Acessórios para proteção solar (chapéu, protetor solar etc.).

Materiais para a coleta:

- Dispositivos para registro fotográfico e das coordenadas geográficas (exemplos: smartphone e GPS).
- Puçá ou passaguá de pesca pequeno, para alevinos e juvenis. Sugerido: 1 m de comprimento mínimo, aro de 40 x 50 cm e malha de 12 mm (Dar preferência à utilização dos puçás do próprio estabelecimento aquícola).
- Puçá ou passaguá de pesca grande para peixes adultos. Sugerido: 1,50 m de comprimento mínimo, aro de 40x50 cm e malha de 35mm. *Dar preferência à utilização dos puçás do próprio estabelecimento aquícola.
- Recipientes impermeáveis para transporte e eutanásia (caixa plástica com tampa de 15-20L para alevinos e de 250L para adultos) *Dar preferência à utilização de recipientes do próprio estabelecimento aquícola.
- Formulário de investigação inicial (FORM-IN) ou complementar (FORM-COM) de doenças de animais aquáticos (anexos V e VI da IN MPA nº 04/2015), para anotação de dados do atendimento.

Materiais para o preparo:

- Luvas de procedimento.
- Hidrocloro de benzocáína, etomidato, metomidato ou 2-fenoxietanol para eutanásia por imersão, caso o estabelecimento aquícola não disponha de equipamento de eletronarcorese de peixes (Alevinos com peso inferior a 200mg podem ser eutanasiados por imersão em nitrogênio líquido (Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15/02/2018).
- Pinças anatômicas, pinças dente de rato, tesouras romba/fina, cabo de bisturi, lâminas de bisturi, facas, recipientes para descarte de perfurocortantes e materiais para higienização de material cirúrgico.
- Costótomo para abertura de calota craniana.
- Sacos plásticos brancos para descarte de material potencialmente infectado.

Materiais para acondicionamento:

- 30 microtubos tipo Eppendorf de 2mL, para acondicionamento de fragmentos de órgãos a serem congelados ou refrigerados.
- Caso não seja possível a preservação por congelamento ou refrigeração, utilizar 30 tubos Falcon de 15mL, contendo etanol a 70% - 95%.
- 5 sacos plásticos grandes, transparentes e resistentes para o acondicionamento de alevinos inteiros e de embalagens menores
- * Caso a conservação seja feita em etanol, utilizar um ou mais sacos plásticos de dimensão suficiente para a proporção de 10% a 20% de amostra e 80% a 90% de etanol.
- Frascos plásticos de boca larga contendo solução de formol a 10%, para acondicionamento de amostras para histopatologia (certificar-se que os frascos estejam completamente vedados para impedir o vazamento do fixador).
- Lacs numerados.



- Materiais para identificação de amostras (pincel atômico, canetas, lápis, etiquetas, fita adesiva etc.), que devem ser resistentes à água, etanol e formol para garantir que a identificação das amostras se mantenha seca, preservada e legível até a chegada ao laboratório. Por exemplo, para amostras conservadas em etanol, recomenda-se a identificação da embalagem com papel, lápis e fita adesiva para que não haja apagamento das inscrições em caneta ou pincel atômico.
- Arquivos editáveis dos formulários de investigação (FORM-IN e FORM-COM) para preenchimento eletrônico e posterior impressão.
- Caneta e carimbo de identificação do agente público responsável pela coleta de amostras para assinatura dos formulários de investigação oficial.
- Envelopes para proteção e envio dos formulários impressos junto das amostras.
- Fita adesiva para afixar envelopes e fechar caixas.
- Caixa térmica (isopor ou similar impermeável) que comporte a quantidade de amostras coletadas e o material de refrigeração/conservação necessário.

Procedimentos

Verificações para a coleta:

- Verificar com os piscicultores a possibilidade de utilização de embarcação para inspeção de cultivos em tanque-rede.
- Verificar com os piscicultores a disponibilidade de equipamento de eletronarcorese para eutanásia de peixes por atordoamento elétrico e eletrocussão até a garantia da morte.

Coleta:

- Realizar registro fotográfico das coletas, se possível.
- Não misturar espécies no momento da coleta.
- Para larviculturas:** Utilizando-se os EPIs adequados, coletar formas jovens de todos os tanques/berçários presentes no estabelecimento aquícola, com o auxílio do puçá ou passaguá pequeno, a fim de se obter um **total de 156 indivíduos**.

Observação: **Recomenda-se** otimizar e distribuir a colheita entre os tanques, para evitar concentração ou má distribuição, propondo-se uma **amostragem aleatória proporcional ao total da produção entre os tanques existentes**.

Deve-se dar preferência a animais com sinais clínicos, moribundos (letárgicos ou depositados no fundo dos berçários), mortos sem sinais de deterioração ou de tanques com presença ou histórico de mortalidade.

- Para estabelecimentos de engorda:** Utilizando-se os EPIs adequados, coletar indivíduos adultos de todos os tanques presentes no estabelecimento aquícola, com o auxílio do puçá ou passaguá grande, a fim de se obter um **total de 30 animais**.

Observação: **Recomenda-se** otimizar e distribuir a colheita entre os tanques, para evitar concentração ou má distribuição, propondo-se uma **amostragem aleatória proporcional ao total da produção entre os tanques existentes**.

Deve-se dar preferência a animais com alterações comportamentais, manifestação de sinais clínicos, moribundos (letárgicos e próximos à superfície), mortos sem sinais de deterioração ou de tanques com presença ou histórico de mortalidade.

- Registrar as coordenadas do estabelecimento aquícola e dados nos formulários de investigação (FORM-IN/FORM-COM) para posterior preenchimento eletrônico.
- Transportar os animais para área de preparação das amostras.

Preparo:

❑ Proceder à eutanásia dos animais por atordoamento elétrico e subsequente eletrocussão ou por imersão em solução anestésica de hidrocloreto de benzocaína, etomidato, metomidato ou 2-fenoxietanol (observar a diluição indicada pelo fabricante), em caixas plásticas ou local próprio para eutanásia na propriedade (Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15/02/2018).

*Para utilização de hidrocloreto de benzocaína, recomenda-se a dose de 40 a 100 mg/L.

*Para utilização de 2-fenoxietanol, recomenda-se a dose de 0,6 a 1 mg/L.

*Utilizar luvas devido ao potencial cancerígeno dos anestésicos.

❑ No caso de alevinos de **até 5 cm de comprimento**, manter os indivíduos inteiros. **ATENÇÃO: Não serão aceitos pelo laboratório animais inteiros maiores do que 5 cm.**

***Deve-se abrir o abdômen, anteriormente ao orifício anal, dos alevinos acima de 3cm, de forma a propiciar maior superfície de contato e melhor penetração do fixador, no caso de amostras acondicionadas em etanol ou formol.**

❑ **No caso de peixes maiores do que 5 cm**, coletar fragmentos não superior a 0,5cm x 0,5cm de tecidos. Para histopatologia as amostras devem ser colhidas com cuidado (não comprimir ou esmagar) e ter dimensões aproximadas de até 1 cm³ (1,0 cm x 1,0 cm x 1,0 cm) e superfície ampla.

Os órgãos alvo de coleta (observar **Figura 1**) para diagnóstico molecular mudam de acordo com a doença suspeita. Assim, o médico veterinário responsável pela coleta deve estar familiarizado com as particularidades das diferentes enfermidades que acometem os peixes.

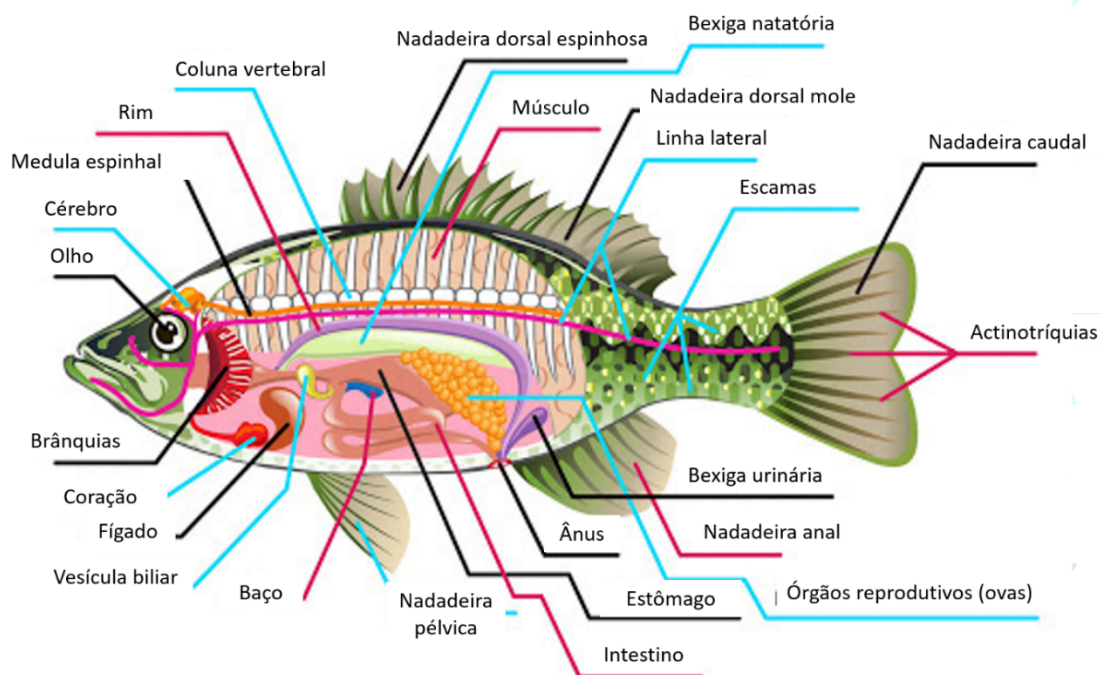


Figura 1: Anatomia básica de peixes

Para a **histopatologia**, devem ser obtidas amostras representativas de todos os órgãos e tecidos principais: encéfalo, brânquias (coletar o arco branquial inteiro), coração, fígado, baço, rim (cranial e caudal - remover o órgão juntamente com a musculatura e vértebras sobrejacentes a fim de minimizar danos ao órgão), estômago, intestino, pâncreas, gônadas, bexiga e músculo, mesmo na ausência de alterações macroscópicas. No caso de locais com lesões visíveis, colher fragmentos das áreas com as lesões (incluindo o centro da lesão, limites da mesma com o tecido normal e áreas



aparentemente normais circunvizinhas à lesão) Amostras de pele e nadadeiras devem ser coletadas sempre que houver lesões.

- No caso de animais com elevado valor zootécnico (reprodutores) a coleta de sangue, plasma ou muco pode ser uma alternativa, dependendo da doença suspeita e do método de análise laboratorial requerido.
- Higienizar e descontaminar com solução de hipoclorito de sódio (50mg/L) os materiais cirúrgicos utilizados.
- Descartar as carcaças e restante dos órgãos em sacos plásticos brancos identificados como material potencialmente infectante, fechar bem e destinar ao lixo hospitalar.
- Descartar a água utilizada nos procedimentos de eutanásia, necropsia e higienização de material cirúrgico em rede de tratamento de esgoto, fossa séptica devidamente impermeabilizada ou solo de maneira a não atingir lençóis freáticos ou outros corpos d'água.

Caso a água de descarte não possa ser descartada conforme disposto acima, deve-se realizar o tratamento da água com hipoclorito de sódio (50mg/L).

Conservação das amostras para diagnóstico molecular:

- Quantidade de gelo reciclável (gelo-gel, Gelox etc.) suficiente para garantir que a amostra não descongele até a chegada ao laboratório de destino.
- Etanol a 70% - 95% respeitando-se a proporção de 10% a 20% de amostra para 80% a 90% de etanol. Nesse caso, o prazo máximo recomendado para a chegada até o laboratório é de 10 dias.
- Em último caso, utilizar gelo comum devidamente embalado em sacos plásticos resistentes para evitar o contato da água de degelo com a embalagem da amostra.

Conservação das amostras enviadas para histopatologia:

- Após a coleta, devem ser imersas em solução de formol a 10% (preferencialmente tamponada), o mais rápido possível, e serem mantidas em temperatura ambiente. Essas amostras NÃO devem ser congeladas, pois tornam-se impróprias para histopatologia.

Os reagentes necessários para produzir 1 litro da solução de formol a 10% são:

Formaldeído 37% (Formalina comercial)	100 mL
Água	900 mL

Os reagentes necessários para produzir 1 litro da solução tamponada de formol 10% são:

Formaldeído 37% (Formalina comercial)	100 mL
Fosfato monobásico de sódio (CAS 10049215)	4,0 g
Fosfato dibásico de sódio (CAS 7558794)	6,5 g
Água	qsp 1.000 mL

- Para garantir a correta fixação dos tecidos, a proporção ideal é de 1 volume de material (amostra) para 9 volumes de solução fixadora. No caso eventual dos fragmentos de tecido permanecerem boiando na solução de formol 10%, recomenda-se que o volume extra seja preenchido com algodão ou papel, de forma que as amostras permaneçam submersas totalmente no fixador até a sua chegada ao laboratório.
- Após sua imersão em solução de formol a 10%, as amostras se mantêm preservadas em temperatura ambiente por longos períodos.

Acondicionamento para biologia molecular e histopatologia:

- Realizar registros fotográficos, se possível.
- No caso de alevinos de até **5 cm** de comprimento, colocar em um saco plástico devidamente identificado.
- Caso a conservação seja feita em etanol, utilizar um ou mais sacos plásticos de dimensão suficiente para a proporção de 10% a 20% de amostra e 80% a 90% de etanol.



Inserir o saco com os alevinos em um saco plástico maior (embalagem secundária), amarrar bem e lacrar. O lacre deve transpassar as camadas do plástico para que não deslize (**Figura 2**).

No caso de peixes maiores, acondicionar os fragmentos de até 0,5cm x 0,5cm de cérebro, fígado, baço e rim em um único microtubo tipo Eppendorf de 2mL, por amostra, devidamente identificado.

Observação: a quantidade de tecidos inseridas nos eppendorfs não deve ultrapassar 2/3 da capacidade do microtubo.

Caso a conservação seja feita em etanol, utilizar os 30 tubos Falcon de 15mL, contendo etanol a 70% - 95%.

Acondicionar os microtubos Eppendorfs ou tubos Falcon na caixa.

Inserir os “racks” de tubos em um saco plástico maior (embalagem secundária), amarrar bem e lacrar. O lacre deve transpassar as camadas do plástico para que não deslize (**Figura 2**).

Identificar, com pincel atômico, a embalagem secundária, descrevendo-se a espécie, município, UF e número do FORM-IN para facilitar a organização.

Preencher eletronicamente, imprimir, assinar, carimbar e digitalizar os formulários de investigação oficial.

Congelar as amostras já lacradas e identificadas por, no mínimo, 8h em freezer a -10°C ou temperatura inferior.

Caso não seja possível realizar o congelamento, manter as amostras refrigeradas e efetuar a remessa o mais rápido possível, não devendo o tempo para chegada ao laboratório ser superior a 24h.



Figura 2: Embalagem secundária amarrada e lacrada

Acondicionar as amostras na caixa térmica com material de refrigeração (**Figura 3**). Recomendamos 10kg de gelo reciclável para cada amostra de 1,5kg.

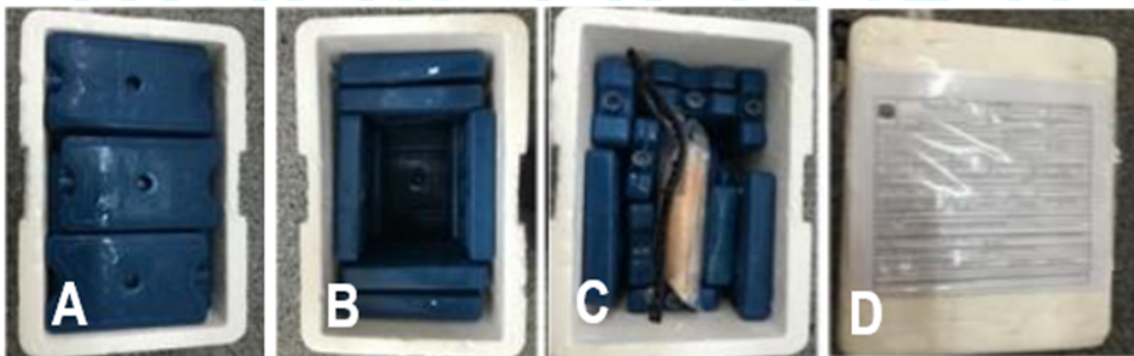


Figura 3: Caixa térmica com gelo reciclável (A), espaço para acondicionar a amostra (B), amostra acondicionada entre o gelo reciclável (C) e formulário fixado na tampa da caixa térmica (D)

Amostras para histopatologia **NÃO** devem ser acondicionadas e enviadas nas mesmas caixas contendo material congelado ou refrigerado, mas acondicionadas em caixas de transporte mantidas a temperatura ambiente até a chegada ao laboratório (**Figura 4**). Devem ser acondicionadas e identificadas seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente (embalagem plástica secundária, identificação e lacre).

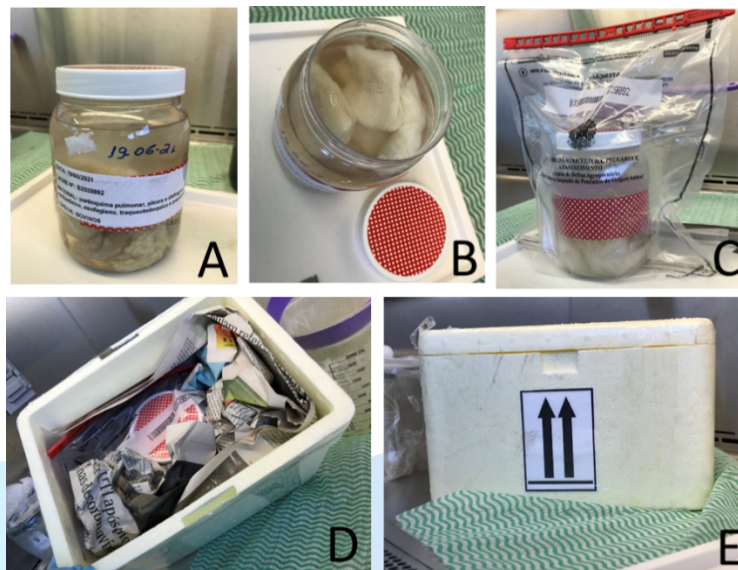


Figura 4: Acondicionamento de amostras para histopatologia. Utilizar frascos de boca larga contendo solução de formol a 10% (A). Se necessário (por exemplo, fragmentos leves que permanecem boiando na solução), usar papel, gaze ou algodão para garantir que todos os tecidos estejam completamente submersos no fixador (B). Envolver em embalagem plástica secundária e lacrar (C). Após o posicionamento dos frascos na caixa de transporte, preenchê-la com algum tipo de material leve (papel, plástico ou isopor, por exemplo) a fim de evitar que os frascos se movimentem e tombem durante o transporte (D). Sinalizar a caixa externamente com o símbolo de orientação para o transporte - “Este lado para cima” (E).

- Inserir uma cópia do formulário de investigação (FORM-IN/FORM-COM) no envelope e afixá-lo com fita adesiva na parte externa da caixa térmica (Figura 4) e da caixa de transporte de amostras para histopatologia.
- Para amostras destinadas a biologia molecular, certificar-se de que o tempo de transporte das amostras até os laboratórios ocorra em até 48h, contanto que o gelo reciclável permaneça congelado. *Caso as amostras não possam ser previamente congeladas, o tempo máximo de transporte deve ser de 24h.
- Comunicar o envio ao laboratório de destino.
- Enviar as cópias digitalizadas dos formulários de investigação aos pontos focais de epidemiologia e de sanidade de animais aquáticos no OESA e SFA, à CAQ (sanidade.aquaticos@agro.gov.br), ao e-mail de notificação do DSA (notifica.dsa@agro.gov.br) e ao LFDA/MG (rec.lfda-mg@agro.gov.br, marcelo.camargos@agro.gov.br, anselmo.rivetti@agro.gov.br, fabiana.xavier@agro.gov.br e leandro.rezende@agro.gov.br).
- Enviar os registros fotográficos à CAQ (sanidade.aquaticos@agro.gov.br)

Remessa

Laboratório oficial do Mapa para diagnóstico de doenças de animais aquáticos

Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Minas Gerais – LFDA/MG

Av. Rômulo Joviano S/Nº - CX POSTAL 35– Sala AD 215. Bairro Olaria.

Pedro Leopoldo/MG - CEP: 33.250-220

CNPJ: 00.396.895/0062-47

Telefone: (31) 3660-9611 ou (31) 3660-9635

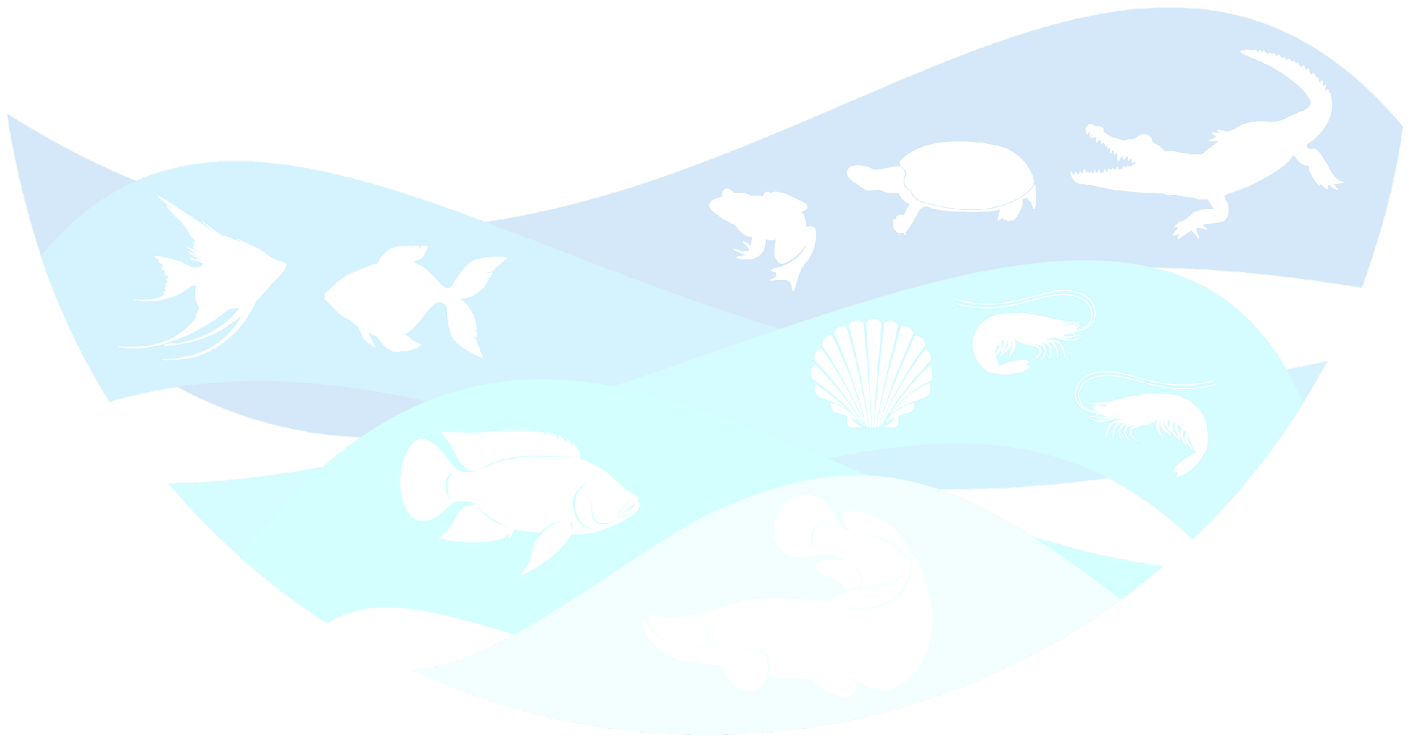
coord.lfda-mg@agro.gov.br

Referências

MAPA. LFDA/MG. Instrução de serviço – IS/LPV/PL/016-v3. Coleta, conservação e remessa de amostras para diagnóstico histopatológico. 2019



MPA. Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico de Enfermidades de Animais Aquáticos na Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura – RENAQUA. 2013



AQUICULTURA COM SANIDADE