



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, 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.
- Formulário de coleta para procedimentos de vigilância, incluindo testes em processos de importação.

Materiais para o preparo:

- Luvas de procedimento.
- Hidrocloro de benzocaína, etomidato, metomidato ou 2-fenoxietanol para eutanásia por imersão, caso o estabelecimento aquícola não disponha de equipamento de eletroanestesia 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 (2mL) ou Falcon (15 ml), contendo etanol a 70% - 95% para acondicionamento de fragmentos de órgãos a serem fixados.
- 5 sacos plásticos grandes, transparentes e resistentes para o acondicionamento de alevinos inteiros e de embalagens menores.
- Lacres numerados.
- Materiais para identificação de amostras (pincel atômico, canetas, lápis, etiquetas, fita adesiva etc.), que devem ser resistentes à água e etanol 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 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 de transporte.

Procedimentos

Verificações para a coleta:

- Verificar com os piscicultores a possibilidade de utilização de embarcação para inspeção de cultivos em tanque-rede.

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.



- ❑ **Para coletas de vigilância ativa/importação:** Utilizando-se os EPIs adequados, obedecer a amostragem determinada no plano de vigilância ou requisito sanitário de importação;
- ❑ Registrar as coordenadas do estabelecimento aquícola e dados nos formulários 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 superiores a 0,5cm x 0,5cm de tecidos.

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. No mínimo, devem ser coletados fígado, baço, rim e cérebro. 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).

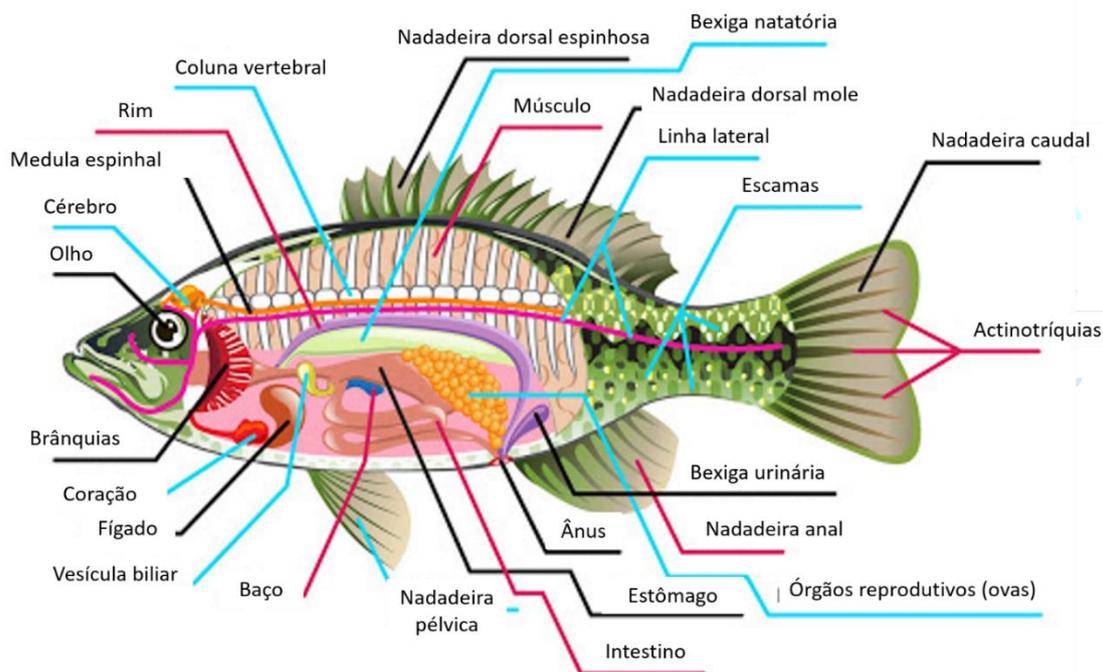


Figura 1: Anatomia básica de peixes



- 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 identificados como material potencialmente infectante, fechar bem e dar destinação correta.
 - 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:

- 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.

Acondicionamento para biologia molecular:

- 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 (e outros tecidos a critério do veterinário) em um único microtubo tipo Eppendorf (2 ml) ou tubo Falcon (15 ml) , por amostra, devidamente identificado.

Observação: a quantidade de tecidos + fixador inseridos nos tubos não deve ultrapassar 2/3 da capacidade do tubo.

- 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 FORMULÁRIO para facilitar a organização.
- Preencher eletronicamente, imprimir, assinar, carimbar e digitalizar os formulários.



Figura 2: Embalagem secundária amarrada e lacrada



- Inserir uma cópia do formulário no envelope e afixá-lo com fita adesiva na parte externa da caixa de transporte de amostras.
- 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, ao DSA (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), conforme o caso
- Enviar os registros fotográficos ao DSA (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

Laboratório Federal de Defesa Agropecuária no Pará – LFDA/PA**

Av. Almirante Barroso, 1234 - Bairro Marco

CNPJ: 00.396.895/0040-31

Belém/PA - CEP: 66093-032

Telefone: (91) 3226-4233; 3226-4310; ou 3226-8814

E-mail: lanagro-pa@agro.gov.br

*As amostras oriundas de importação devem ser encaminhadas para o LFDA-MG, uma vez que para estas amostras é solicitada a detecção de todos ou quase todos os agentes.

Para as amostras oriundas da vigilância passiva, caso as doenças a serem diagnosticadas sejam, **APENAS, ISKNV e TILV, estas poderão ser encaminhadas para o LFDA-PA.

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