

Checklist geral para os procedimentos de coleta, preparo, acondicionamento e remessa ao laboratório oficial de amostras de peixes para investigação epidemiológica

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 na avaliação laboratorial, sobretudo na avaliação microscópica, podendo, inclusive, impossibilitar a análise e gerar prejuízos para a eficiência e eficácia do sistema de defesa sanitária de animais aquáticos.

Coleta (captura)

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
- Assessórios 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 40x50 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

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 puçás ou passaguás pequenos e grandes para a coleta de alevinos e adultos, respectivamente. *Dar preferência à utilização dos puçás do próprio estabelecimento aquícola. Caso contrário, utilizar puçás previamente desinfetados com solução de hipoclorito de sódio (50mg/L), principalmente entre estabelecimentos
- Verificar com os piscicultores a disponibilidade de recipientes para transporte e eutanásia dos animais. *Dar preferência à utilização de recipientes do próprio estabelecimento aquícola. Caso contrário, utilizar recipientes previamente desinfetados com solução de hipoclorito de sódio (50mg/L), principalmente entre estabelecimentos
- Verificar com os piscicultores a disponibilidade de equipamento de eletroanestesia para eutanásia de peixes por atordoamento elétrico e eletrocussão até a garantia da morte

Procedimentos de 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 aproximado de 500 indivíduos (1/2 milheiro).

* 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

Materiais de 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 eletronarcose 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

Procedimentos de preparo:

Realizar registros fotográficos, se possível

Proceder com a eutanásia dos animais por atordoamento elétrico e subsequente eletrocussão ou por imersão em solução anestésica de hidrocloro 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)

*Alevinos com peso inferior a 200mg podem ser eutanasiados por imersão em nitrogênio líquido

*Para utilização de hidrocloro 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 5cm de comprimento, manter os indivíduos inteiros.

*Deve-se abrir o abdômen dos alevinos acima de 1g, de forma a propiciar maior superfície de contato e melhor penetração do fixador, no caso de amostras acondicionadas em etanol.

No caso de peixes maiores, coletar fragmentos de 0,5cm x 0,5cm de tecidos.

*Os órgãos alvo de coleta (observar Figura 1) mudam de acordo com a doença suspeita. Por exemplo, deve-se coletar fragmentos de cérebro, fígado, baço e rim em casos de suspeita de TiLV. Assim, o médico veterinário responsável pela coleta deve estar familiarizado com as particularidades das diferentes enfermidades que acometem os peixes.

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.

- No caso de envio para histopatologia, a amostra deve ter a espessura máxima de 1 cm e superfície ampla. Deve-se colher fragmentos de tecido do centro da lesão, do limite da mesma com o tecido normal e das áreas aparentemente normais circunvizinhas à lesão, tomando cuidado para não comprimi-las ou esmagá-las.
- Higienizar e desinfetar 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)

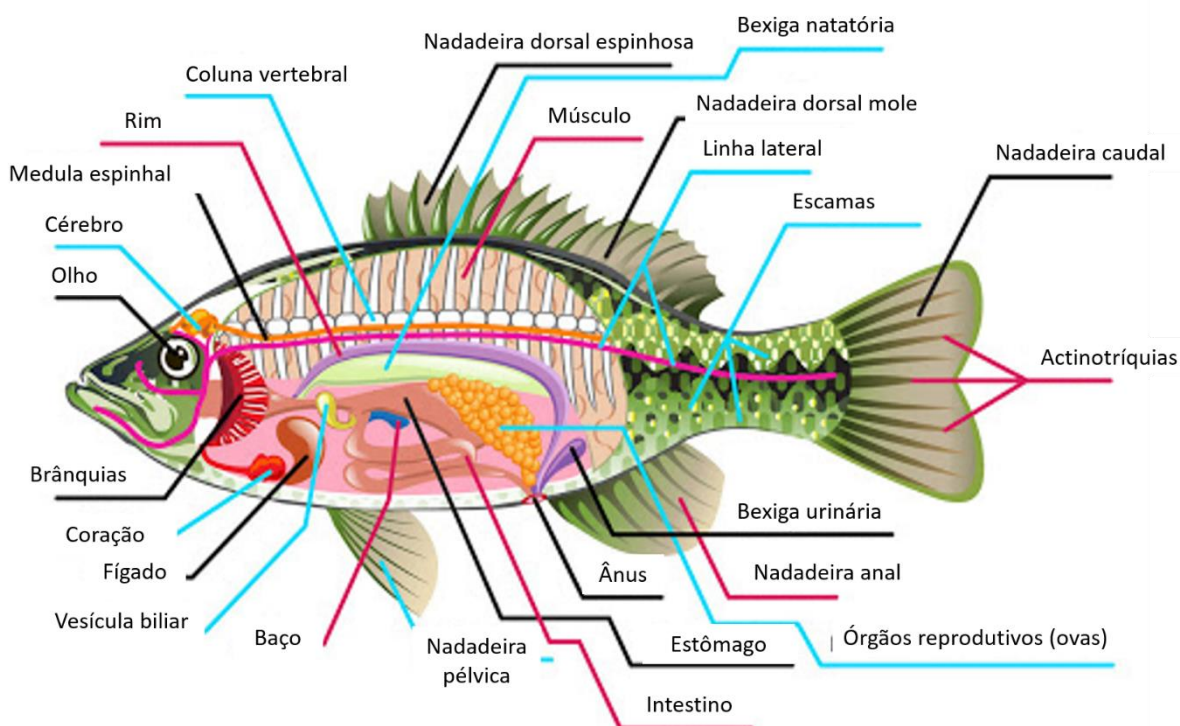


Figura 1: Anatomia básica de peixes.

Acondicionamento

Materiais para acondicionamento (quantidades para cada estabelecimento aquícola):

- 30 criotubos de 2,5mL ou microtubos tipo Eppendorf de 2mL para acondicionamento de fragmentos de órgãos a serem congelados ou refrigerados. *Caso não seja possível a criopreservação, utilizar 30 tubos Falcon de 15mL contendo etanol a 70% - 95%
- 1 caixa para criopreservação de microtubos ou 6 racks de alumínio para armazenamento de criotubos em botijão de nitrogênio líquido. *Caso não seja possível a criopreservação, utilizar racks para 30 tubos Falcon de 15mL de boca larga
- 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
- Materiais para diagnóstico histopatológico devem ser acondicionados em frascos também de boca larga (preferencialmente de plástico) certificando-se que estejam completamente vedados para impedir o vazamento do fixador.
- Balança para pesagem de alevinos
- Lacs numerados

Materiais para identificação de amostras (pincel atômico, canetas, lápis, etiquetas, fita adesiva etc.). *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

Para conservação das amostras: Quantidade de gelo reciclável (gelo-gel, Gelox etc.) suficiente para garantir que a amostra não descongele até a chegada ao laboratório de destino. Recomendamos 10kg de gelo reciclável para cada amostra de 1,5kg.

* Na ausência de gelo reciclável suficiente, verificar a possibilidade de utilização das seguintes alternativas:

- 1 botijão de nitrogênio líquido para alevinos eutanasiados e para criotubos com fragmentos de órgãos de peixes maiores que 5cm de comprimento. Neste caso, recomenda-se o transporte das amostras em carro oficial para descarga das amostras no laboratório e retorno com o botijão para demais coletas
- Etanol a 70% - 95% respeitando-se a proporção de 10% a 20% de amostra para 80% a 90% de etanol
- 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

Para conservação das amostras enviadas para histopatologia: Após a coleta, devem ser imersas em solução de formol a 10% (preferencialmente tamponada), o mais rápido possível. 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 modo que as amostras permaneçam submersas totalmente no fixador até a sua chegada ao laboratório.

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 de acondicionamento:

Realizar registros fotográficos, se possível

No caso de alevinos de até 5cm de comprimento, pesar 500g e colocar em um saco plástico devidamente identificado

* Alevinos já eutanasiados podem ser conservados e transportados diretamente em nitrogênio líquido

* 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

Amarrar bem o saco plástico contendo os alevinos para evitar vazamentos 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 0,5cm x 0,5cm de cérebro, fígado, baço e rim em um único criotubo de 2,5mL (ou um microtubo tipo Eppendorf de 2mL), devidamente identificado

Obs.: a quantidade de amostra inserida nos criotubos ou 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 criotubos ou Eppendorfs na caixa de criopreservação. *Caso tenham sido utilizados tubos Falcon com etanol, acondicionar em racks para 30 tubos

Inserir a caixa de criopreservação ou as racks de tubos Falcon 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)

*Os botijões de nitrogênio líquido não precisam ser lacrados. Entretanto, solicita-se que o transporte até o laboratório seja feito em veículo oficial



Figura 2: Embalagem secundária amarrada e lacrada.

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

Acondicionar as amostras na caixa térmica com material de refrigeração (Figuras 3 e 4). Recomendamos 10kg de gelo reciclável para cada amostra de 1,5kg



Figura 3: Caixa térmica com gelo reciclável (esquerda) e espaço para acondicionar a amostra (direita).



Figura 4: Amostra acondicionada entre o gelo reciclável (esquerda) e formulário fixado na tampa da caixa térmica (direita).

Inserir uma cópia do formulário de investigação (FORM-IN/FORM-COM) no envelope e afixar com fita adesiva na parte externa da caixa térmica (Figura 4)

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@agricultura.gov.br) e ao e-mail de notificação do DSA (notifica.dsa@agricultura.gov.br)
- Enviar os registros fotográficos à CAQ (sanidade.aquaticos@agricultura.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. Romulo Joviano S/Nº - CX POSTAL 35/50 – Sala AD 215
Pedro Leopoldo/MG - CEP: 33.600-000
CNPJ: 00.396.895/0062-47
Telefone: (31) 3660-9611 ou (31) 3660-9635
coord.lfda-mg@agricultura.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