



## Instrutivo para coleta, preparo, acondicionamento e remessa ao laboratório de amostras oficiais de MOLUSCOS.

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):

- o Jardineira impermeável com bota acoplada (quando houver contato direto com a água).
- o Luvas impermeáveis para manipulação de animais.
- o Acessórios para proteção solar (chapéu, protetor solar etc.).

#### Materiais para a coleta:

- o Dispositivos para registro fotográfico e das coordenadas geográficas (exemplos: smartphone e GPS).
- o Faca apropriada para retirada de moluscos fixos.
- o Recipientes impermeáveis para transporte.
- o 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:

- o Luvas de procedimento.
- o Escova para limpeza externa das conchas.
- o Faca apropriada para remoção de bioincrustações (algas e invertebrados).
- o Sacos plásticos brancos para descarte de material potencialmente infectado.

#### Materiais para acondicionamento:

- o Sacos plásticos transparentes de primeiro uso, preferencialmente, do tipo “zip-lock”. Caso indisponível, utilizar 2 sacos finos transparentes colocando um dentro do outro (embalagem primária).
- o Sacos plásticos transparentes e resistentes de primeiro uso (embalagem secundária).
- o Pincel atômico de tinta permanente para identificação na embalagem secundária.
- o Gelo reciclável (gelo-gel, Gelox etc.) ou, em último caso, gelo comum.
- o Caso não seja possível a preservação por congelamento, utilizar tubos Falcon de 15mL contendo etanol a 70% - 95% para condicionamento de tecidos.
- o “Racks” para tubos Falcon de 15mL de boca larga.
- o 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).
- o Lacs numerados.
- o 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.
- o Arquivos editáveis dos formulários de investigação (FORM-IN e FORM-COM) para preenchimento eletrônico e posterior impressão.
- o Caneta e carimbo de identificação do agente público responsável pela coleta de amostras para assinatura dos formulários de investigação oficial.
- o Envelopes para proteção e envio dos formulários impressos junto das amostras.



- o Fita adesiva para afixar envelopes e fechar caixas.
- o Caixa térmica (isopor ou similar impermeável) que comporte a quantidade de amostras coletadas e o material de refrigeração/conservação necessário.

## Procedimentos

### Coleta:

- o Realizar registro fotográfico das coletas, se possível.
- o Não misturar espécies no momento da coleta.
- o Verificar com os maricultores a possibilidade de utilização de embarcação e coletes salva-vidas para colheita de animais cultivados em long-lines (mexilhões, sururus, ostras e vieiras).
- o Verificar com os maricultores a possibilidade de apoio para coleta de moluscos de areia (sururus, berbigões, amêijoas, lambretas, sernambis etc.) durante a maré baixa.
- o Utilizando-se os EPIs adequados, coletar **30 moluscos vivos**, no mínimo. Caso os animais possuam menos de 1,5 cm de comprimento, coletar, no mínimo, **70 moluscos vivos**. Animais em decomposição **não** devem ser coletados.

**Recomenda-se colher indivíduos de diferentes alturas em relação à coluna d'água, otimizar e distribuir a colheita aleatoriamente e proporcionalmente dentro da área de cultivo ou extração.**

**Devem ser amostrados com prioridade os animais com as valvas semiabertas (ainda vivos, mas geralmente apresentando dificuldades para fechar suas conchas).**

**Em caso de mortalidade de moluscos infaunais (espécies que se encontram enterradas no sedimento, como os berbigões, vôngoles, massunins e sarnambis), os animais com tendência a subir à superfície devem ser escolhidos com prioridade.**

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

### Preparo:

- o Descartar os moluscos que estiverem com as conchas abertas (mortos).
- o Escovar externamente os moluscos com água corrente limpa sem aditivos ou detergentes.
- o Remover bioincrustações de mais fácil extração (não é necessário remover o bisco dos mexilhões).
- o Enviar os **animais inteiros**. **Não** abrir os moluscos.
- o Higienizar e desinfetar com solução de hipoclorito de sódio (50 mg/L) os materiais utilizados
- o Descartar as carcaças em sacos plásticos brancos identificados como material potencialmente infectante, fechar bem e destinar ao lixo hospitalar.
- o Descartar a água utilizada 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 (50 mg/L).

### Conservação das amostras enviadas para diagnóstico molecular:

- o A quantidade de gelo reciclável (gelo-gel, Gelox etc.) deve ser suficiente para garantir que a amostra não descongele até a chegada ao laboratório de destino.
- o 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.
- o 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 para a chegada até o laboratório é de 10 dias.



### **Conservação das amostras enviadas para histopatologia:**

- o Após a coleta, as amostras devem ser imersas em solução de formol a 10% (preferencialmente tamponada), o mais rápido possível, e serem mantidas em temperatura ambiente. As 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

- o 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.
- o Após a imersão em solução de formol a 10%, as amostras se mantêm preservadas em temperatura ambiente por longos períodos.

### **Acondicionamento de amostras para biologia molecular e histopatologia:**

- ✓ Realizar registros fotográficos, se possível.
- ✓ Acondicionar os sacos, tubos ou frascos na caixa, dentro de um saco plástico maior (embalagem secundária), amarrar bem e lacrar. O lacre deve transpassar as camadas do plástico para que não deslize (Figura 1).



Figura 1: Embalagem secundária amarrada e lacrada

- o Identificar, com pincel atômico, a embalagem secundária, descrevendo-se a espécie, município, UF e número do FORM-IN para facilitar a organização.
- o Congelar as amostras já lacradas e identificadas por, no mínimo, 8h em freezer a -10°C ou temperatura inferior.
- o Acondicionar as amostras na caixa térmica com material de refrigeração (Figura 2). Recomendamos 10kg de gelo reciclável para cada amostra de 1,5kg.



Figura 2: 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)

- o Amostras para histopatologia **NÃO** devem ser acondicionadas e enviadas nas mesmas caixas contendo material congelado ou refrigerado. Devem ser acondicionadas e identificadas seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente (embalagem plástica secundária, identificação e lacre), mas acondicionadas em caixas de transporte mantidas à temperatura ambiente até a chegada ao laboratório (Figura 3).

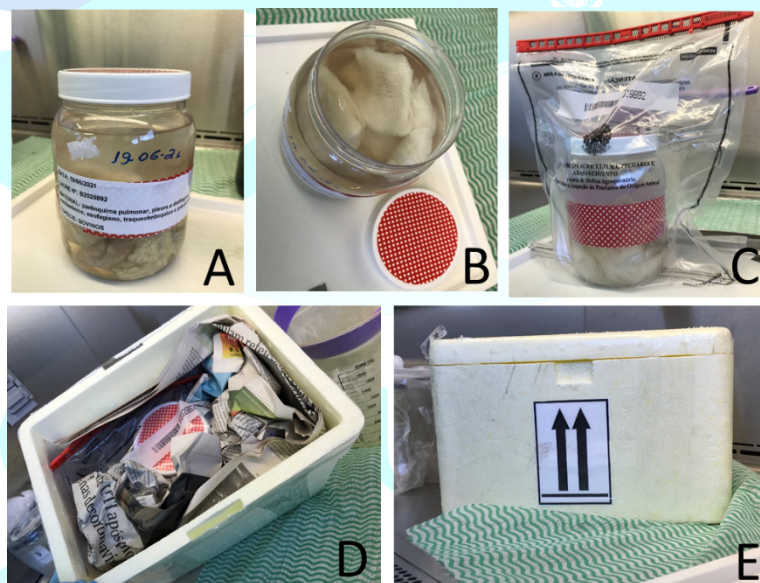


Figura 3: Acondicionamento de amostras para histopatologia. Utilizar frascos de boca larga contendo solução de formol a 10% (A). Se necessário (por exemplo, fragmentos leves que permanecem boiando na solução), usar papel, gaze ou algodão para garantir que todos os tecidos estejam completamente submersos 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).

- o Inserir uma cópia do formulário de investigação (FORM-IN/FORM-COM) no envelope e afixá-la com fita adesiva na parte externa da caixa térmica (Figura 2) e da caixa de transporte de amostras para histopatologia.
- o Para amostras congeladas (-10°C) destinadas a biologia molecular, certificar-se de que o tempo de transporte até os laboratórios ocorra em até 48h, contanto que o gelo reciclável permaneça congelado.
- o Comunicar o envio ao laboratório de destino.
- o 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](mailto:sanidade.aquaticos@agro.gov.br)), ao e-mail de notificação do DSA



([notifica.dsa@agro.gov.br](mailto:notifica.dsa@agro.gov.br)) e ao e-mail do LFDA/MG ([rec.lfda-mg@agro.gov.br](mailto:rec.lfda-mg@agro.gov.br); [marcelo.camargos@agr.gov.br](mailto:marcelo.camargos@agr.gov.br), e [anselmo.rivetti@agro.gov.br](mailto:anselmo.rivetti@agro.gov.br), [fabiana.xavier@agro.gov.br](mailto:fabiana.xavier@agro.gov.br) e [leandro.rezende@agro.gov.br](mailto:leandro.rezende@agro.gov.br)).

- o Enviar os registros fotográficos à CAQ ([sanidade.aquaticos@agro.gov.br](mailto: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](mailto: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