



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

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).
- Luvas impermeáveis para manipulação de animais.
- 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 de tamanho adequado (Dar preferência à utilização dos puçás do próprio estabelecimento aquícola).
- Recipientes impermeáveis para transporte e eutanásia *in loco* (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.
- Materiais de escolha para eutanásia de acordo com a 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.
- Sacos plásticos brancos para descarte de material potencialmente infectado.

Materiais para acondicionamento:

- 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% para condicionamento de tecidos.
- “Racks” para 30 tubos Falcon de 15mL de boca larga.
- 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

Coleta:

- Realizar registro fotográfico das coletas, se possível.
- Não misturar espécies no momento da coleta.
- Utilizando-se os EPIs adequados, coletar animais* de todos os tanques no estabelecimento aquícola, com o auxílio do puçá pequeno, a fim de se obter um total de 30 indivíduos.

Em estabelecimentos com reprodução, coletar animais de todos os tanques com animais pós-metamorfosados (imagos, jovens e adultos).

Devido ao seu valor elevado, reprodutores não precisam ser coletados caso existam 30 indivíduos pós-metamorfosados aptos para a coleta. Caso contrário, dar preferência aos reprodutores de descarte.

Recomenda-se otimizar e distribuir a coleta aleatoriamente e proporcionalmente entre os tanques, em função do povoamento de cada um, para evitar concentração ou má distribuição da amostra.

Deve-se dar preferência a animais com sinais clínicos, moribundos ou mortos sem sinais de deterioração, 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 com o método escolhido, respeitando a Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15/02/2018.
- Coletar **fragmentos de tecidos** (Figura 1) ou **Swabs**, de acordo com o quadro a seguir: (Não enviar os animais inteiros).

Doença suspeita	Órgão alvo	Tamanho da amostra, acondicionamento e conservação	
		Biologia molecular	Histopatologia
Ranavirose	Anfíbios grandes (>60mm): Baço, fígado e rim. Anfíbios médios (30-60mm): todas as vísceras. Anfíbios pequenos (<30mm): Corpo do animal inteiro sem cabeça e cauda (abrir o abdômen para melhor fixação em caso de conservação em etanol e em formol).	Amostras de 0,5 cm x 0,5 cm de tecidos devem ser preservadas em etanol 70-90%, na proporção de 10:1. Caso não seja possível, deverão ser congeladas (-18°C).	Amostras de tecidos** devem ser submersas em solução de formol a 10% na proporção de 10:1, o mais rápido possível após a retirada do animal. <u>Manter em temperatura ambiente.</u>
Quitridiomicose (<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>)	Amostras de pele: • métodos invasivos (biópsias de pele, partes dos dedos ou cauda) • métodos não invasivos (Swabs).	Swabs podem ser enviados a seco e preferencialmente congelados ou em temperaturas de até 23°C.	
Infecção por <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> *	Amostras de pele: • métodos invasivos (biópsias de pele, partes dos dedos ou da cauda) • métodos não invasivos (Swabs).		

*Os animais suscetíveis incluem, somente, salamandras e tritões.



**Amostras para histopatologia 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). Colher amostras de tecidos mesmo na ausência de lesões 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).

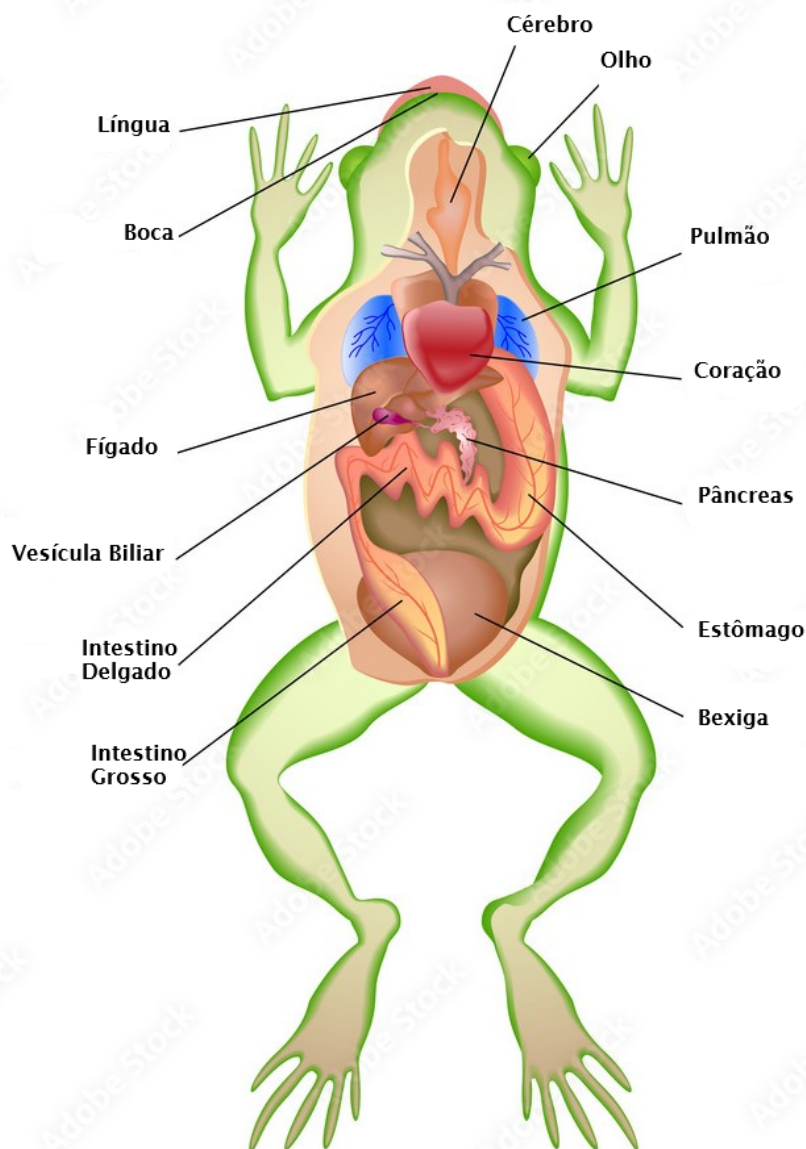


Figura 1: Anatomia básica de rãs

- Higienizar e desinfetar com solução de hipoclorito de sódio (50 mg/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 (50 mg/L).

Conservação das amostras enviadas para diagnóstico molecular:

- Quantidade de gelo reciclável (gelo-gel, Gelox etc.) suficiente para garantir que a amostra não descongele até sua 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 para a chegada até o laboratório é de 10 dias.

Versão Fev/2022



- 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, 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

- 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 a 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 de amostras para biologia molecular e histopatologia:

- Realizar registros fotográficos, se possível;
- Acondicionar os microtubos, Eppendorfs ou tubos Falcon na caixa;
- Inserir as “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);



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;
- 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 (Figura 3). Recomendamos 10kg de gelo reciclável para cada amostra de 1,5kg;

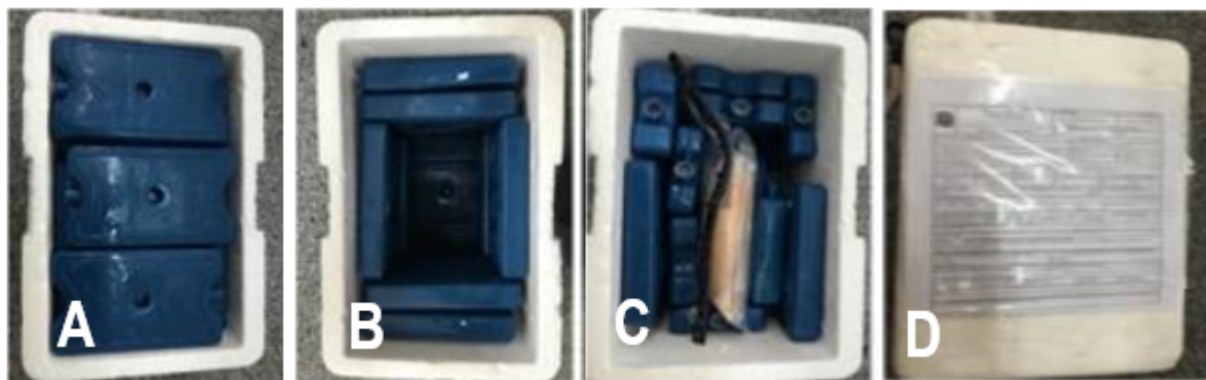


Figura 3: Caixa térmica com gelo reciclável (A), espaço para acondicionar a amostra (B), amostra acondicionada entre o gelo reciclável (C) e formulário afixado na tampa da caixa térmica (D)

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

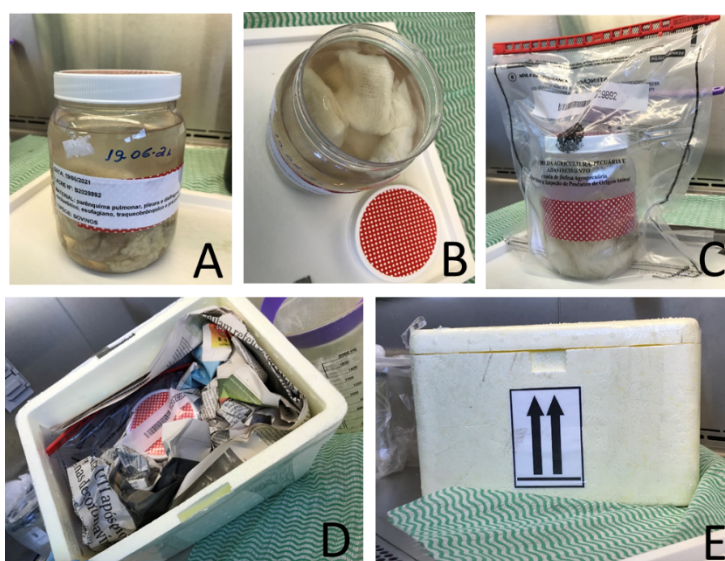


Figura 4: Acondicionamento de amostras para histopatologia. Utilizar frascos de boca larga contendo solução de formol a 10% (A). Se necessário (por exemplo, fragmentos leves que permanecem boiando na solução), usar papel, gaze ou algodão para garantir que todos os tecidos estejam completamente submersos 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 3) e da caixa de transporte de amostras para histopatologia;
- Para amostras 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 (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 e-mail do LFDA/MG (rec.lfda-mg@agro.gov.br; marcelo.camargos@agro.gov.br, e 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.