

Ministério da Pesca e Aquicultura
RENAQUA
Manual de Coleta



**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**

Ministério da Pesca e Aquicultura
Secretaria de Monitoramento da Pesca e Aquicultura
Departamento de Monitoramento e Controle
Coordenação-Geral de Sanidade Pesqueira



MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA
Secretaria de Monitoramento e Controle da Pesca e Aquicultura
Departamento de Monitoramento e Controle
Coordenação-Geral de Sanidade Pesqueira

**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

CGSAP/DEMOC/SEMOC/MPA

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA

SBS Qd. 2 lote 10 Bloco “J”

Brasília – DF 70.070-120

Fone 55 (61) 2023 3531

Website: <http://www.mpa.gov.br>

Coordenação-Geral de Sanidade Pesqueira

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

1ª edição

2013

CGSAP/DEMOC/SEMOC/MPA

SUMÁRIO

SUMÁRIO	4
APRESENTAÇÃO	6
DEFINIÇÕES	7
BASE LEGAL	10
INTRODUÇÃO	11
NOTIFICAÇÃO AO SERVIÇO VETERINÁRIO OFICIAL – SVO.....	11
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	12
1. INSTRUÇÕES GERAIS.....	12
1.1. <i>BIOSSEGURANÇA NA COLETA E REMESSA DE AMOSTRAS</i>	12
1.1.1. EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL (EPI).....	12
A. LUVAS DESCARTÁVEIS DE BORRACHA OU SILICONE – QUE POSSIBILITEM O ISOLAMENTO ENTRE AS MÃOS DO RESPONSÁVEL PELA COLETA E A AMOSTRA E SEJAM IMPERMEÁVEIS À ÁGUA E DEMAIS LÍQUIDOS.....	12
B. BOTA DE BORRACHA – IMPERMEÁVEL E DE FÁCIL HIGIENIZAÇÃO.	12
C. AVENTAL – DE MATERIAL RESISTENTE À ÁGUA E DEMAIS LÍQUIDOS.....	12
D. JALECO OU MACACÃO – QUE PERMITA PROTEÇÃO DO VESTUÁRIO PRIMÁRIO DO RESPONSÁVEL PELA COLETA.....	12
E. MÁSCARA DESCARTÁVEL E ÓCULOS DE PROTEÇÃO – UTILIZADO PARA EVITAR O CONTATO ACIDENTAL DE MATERIAL BIOLÓGICO, FIXADORES E OUTRAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS POTENCIALMENTE IRRITANTES, TÓXICAS E NOCIVAS COM OS OLHOS E BOCA DO RESPONSÁVEL PELA COLETA.....	12
F. COLETE SALVA-VIDAS – TEM POR OBJETIVO EVITAR CASOS DE AFOGAMENTO DAS PESSOAS ENVOLVIDAS NA COLETA, EM CASOS DE	

**ACIDENTE OU QUEDA ACIDENTAL NA ÁGUA DURANTE OS
PROCEDIMENTOS REALIZADOS ABORDO DE EMBARCAÇÕES EM
ÁGUAS CONTINENTAIS (LAGOAS, REPRESAS, RIOS ETC.) E NO MAR.. 13**

1.1.2. EQUIPAMENTOS PARA CONTENÇÃO/MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS..... 13

• CONTENÇÃO FÍSICA 13

**A. BANDEJA BRANCA DE POLIETILENO OU DE AÇO INOXIDÁVEL –
QUE POSSIBILITE UMA SUPERFÍCIE PLANA, HIGIENIZÁVEL E
ADEQUADA À MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS OU DAS AMOSTRAS. 13**

**B. MATERIAL CIRÚRGICO (TESOURA ROMBA/FINA, PINÇA
ANATÔMICA, PINÇA “DENTE DE RATO”, CABO DE BISTURI, LÂMINAS
PARA BISTURI E OUTROS) – NECESSÁRIOS À MANIPULAÇÃO,
EVISCERAÇÃO OU SECÇÃO ANATÔMICA DE ÓRGÃOS ESPECÍFICOS
PARA COLETA DA AMOSTRA. 13**

**C. BALDE PLÁSTICO DE FÁCIL HIGIENIZAÇÃO – PARA IDENTIFICAÇÃO
DOS ANIMAIS, ACLIMATAÇÃO, ABATE E DEMAIS NECESSIDADES. 14**

**D. SACOS PLÁSTICOS TRANSPARENTES – PARA O
ACONDICIONAMENTO E TRANSPORTE DOS ANIMAIS E/OU AMOSTRAS.**

14

• CONTENÇÃO QUÍMICA (DE PEIXES) 14

A. BENZOCAÍNA; 14

I. DOSE: 40 A 100 MG/L; 14

B. METANOSULFONATO DE TRICAÍNA; 14

I. DOSE: 50 A 100 MG/L; 14

C. FENOXIETANOL; 14

I. DOSE: 0,6 A 1MG/L; 14

D. ESSÊNCIA DE CRAVO DA ÍNDIA (EUGENOL); 14

I. DOSE: 50 A 100 MG/L; 14

**OBSERVAÇÃO: ACONSELHÁVEL O USO DE LUVAS PARA
MANIPULAÇÃO (IRRITAÇÃO CUTÂNEA)..... 15**

1.1.3. DESCARTE DE MATERIAL 15

1.1.4.	IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA.....	16
2.	FORMULÁRIOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	16
2.1.	FORMULÁRIO PADRÃO.....	17
2.2.	FORM-IN.....	17
	• A AVALIAÇÃO, POR PARTE DA AUTORIDADE CENTRAL, DA NECESSIDADE DE COMUNICAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO FOCO À OIE; 18	
	• A VERIFICAÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS PARA ATENDIMENTO AO FOCO (CONFORME O CASO);.....	18
	• O CONHECIMENTO DOS DADOS DA INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA PRELIMINAR;	18
	• A AVALIAÇÃO DA NECESSIDADE DE ADOÇÃO DE MEDIDAS ADICIONAIS DE CONTROLE NO FOCO.....	18
2.3.	FORM-COM.....	18
3.	COLETA E REMESSA DE MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS DE PEIXES	19
3.1.	AVALIAÇÃO OU EXAME PARASITOLÓGICO.....	19
3.1.1.	ENVIO DE PEIXES VIVOS PARA PARASITOLOGIA.....	19
3.1.2.	ENVIO DE AMOSTRAS DE TECIDO FIXADAS PARA PARASITOLOGIA.....	21
3.2.	DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS BACTERIANAS, MICÓTICAS E VIRAIS.....	24
3.2.1.	ENVIO DE PEIXES VIVOS PARA BACTERIOLOGIA, MICOLOGIA E VIROLOGIA	24
3.2.2.	ENVIO DE PEIXES RESFRIADOS PARA BACTERIOLOGIA, MICOLOGIA E VIROLOGIA	26
3.2.3.	ENVIO DE PEIXES CONGELADOS BACTERIOLOGIA, MICOLOGIA E VIROLOGIA	28
3.2.4.	DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS VIRAIS - MÉTODOS ADICIONAIS DE ENVIO.....	30
3.2.5.	ENVIO DE AMOSTRAS DE TECIDO FIXADAS EM RNALATER	30
3.2.6.	ENVIO DE AMOSTRAS DE TECIDO FIXADAS PARA HISTOPATOLOGIA.....	32
3.3.	DOENÇA X TIPO DE AMOSTRA E FORMA DE ENVIO	35
4.	COLETA E REMESSA DE MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS DE CAMARÕES	39
4.1.	ENVIO DE AMOSTRAS PARA EXAME HISTOPATOLÓGICO.....	39
4.1.1.	AMOSTRA FIXADA PARA EXAME HISTOPATOLÓGICO	39
4.2.	ENVIO DE AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO POR PCR E qPCR.....	41
4.2.1.	ENVIO DE AMOSTRAS EM ETANOL 70-95%.....	41
4.2.2.	ENVIO DE AMOSTRAS CONGELADAS.....	42
4.2.3.	COLETA E ENVIO DE HEMOLINFA	43
4.3.	ENVIO DE AMOSTRAS PARA EXAME BACTERIOLÓGICO	43
4.3.1.	ENVIO DE AMOSTRAS RESFRIADAS	43
4.4.	DOENÇA X TIPO DE AMOSTRA E FORMA DE ENVIO	44

5. COLETA E REMESSA DE MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS DE MOLUSCOS BIVALVES	46
5.1. ENVIO DE AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO POR PCR, PCR EM TEMPO REAL E PCR+RFLP . 46	
5.1.1. AMOSTRA VIVA RESFRIADA OU REFRIGERADA	46
1. SELECIONAR AS AMOSTRAS DE ACORDO COM O PROPÓSITO DE AMOSTRAGEM;	46
2. EMBALAR AS AMOSTRAS EM SACO PLÁSTICO DEVIDAMENTE ETIQUETADO E FECHADO (EMBALAGEM PRIMÁRIA);	47
3. EM SEGUIDA COLOCAR AS AMOSTRAS EM NOVA EMBALAGEM PLÁSTICA (EMBALAGEM SECUNDÁRIA), ESSA POR SUA VEZ, LACRADA.....	47
4. COLOCAR AS AMOSTRAS NO INTERIOR DE UMA CAIXA ISOTÉRMICA SOBRE UMA CAMADA DE GELO DE APROXIMADAMENTE 10 CM E, APÓS O ACONDICIONAMENTO DE TODAS AS AMOSTRAS, COBRIR COM GELO TRITURADO (CAMADA DE 20 CM DE GELO);.....	47
5. FECHAR A CAIXA ISOTÉRMICA, VEDAR COM FITA ADESIVA, IDENTIFICAR E PRONTAMENTE REMETER AO LABORATÓRIO. O RESPECTIVO FORMULÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PODERÁ SER ENVIADO NO INTERIOR DA CAIXA, DENTRO DE UM SACO PLÁSTICO VEDADO E COLADO NA TAMPA;.....	47
6. FAZER A REPOSIÇÃO DO GELO A CADA 8 A 10 HORAS DE TRANSPORTE;	47
5.1.2. AMOSTRA INTEIRA CONGELADA	47
1. SELECIONAR AS AMOSTRAS DE ACORDO COM O PROPÓSITO DE AMOSTRAGEM;	47
2. CONGELAR AS AMOSTRAS EM FREEZER DOMÉSTICO OU SIMILAR A - 20°C, POR 24 HORAS;.....	47
3. EMBALAR AS AMOSTRAS EM SACO PLÁSTICO DEVIDAMENTE ETIQUETADO E FECHADO (EMBALAGEM PRIMÁRIA);	47
4. EM SEGUIDA COLOCAR AS AMOSTRAS EM NOVA EMBALAGEM PLÁSTICA (EMBALAGEM SECUNDÁRIA), ESSA POR SUA VEZ, LACRADA;	47

5. COLOCAR AS AMOSTRAS NO INTERIOR DE UMA CAIXA ISOTÉRMICA SOBRE UMA CAMADA DE GELO DE APROXIMADAMENTE 10 CM E, APÓS O ACONDICIONAMENTO DE TODAS AS AMOSTRAS, COBRIR COM GELO TRITURADO (CAMADA DE 20 CM DE GELO);.....	48
6. FECHAR A CAIXA ISOTÉRMICA, VEDAR COM FITA ADESIVA, IDENTIFICAR E PRONTAMENTE REMETER AO LABORATÓRIO. O RESPECTIVO FORMULÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PODERÁ SER ENVIADO NO INTERIOR DA CAIXA, DENTRO DE UM SACO PLÁSTICO VEDADO E COLADO NA TAMPA;.....	48
7. FAZER A REPOSIÇÃO DO GELO A CADA 8 A 10 HORAS DE TRANSPORTE;	48
5.1.3. AMOSTRAS CONSERVADAS EM ETANOL	48
1. SELECIONAR AS AMOSTRAS DE ACORDO COM O PROPÓSITO DE AMOSTRAGEM;.....	48
2. IMERSÃO DE MOLUSCOS INTEIROS (QUANDO AS AMOSTRAS FOREM PEQUENAS) E TECIDOS RETIRADOS DE MOLUSCOS MAIORES DEVERÃO SER IMERSOS EM UM RECIPIENTE (EMBALAGEM PRIMÁRIA); 48	
3. PREENCHER O RECIPIENTE COM AS AMOSTRAS COM SOLUÇÃO DE ETANOL NÃO DESNATURADO 95 A 99%, COM OBJETIVO DE CONSERVAR A AMOSTRA DURANTE O TRANSPORTE ATÉ O LABORATÓRIO;	48
4. IDENTIFICAR A EMBALAGEM PRIMÁRIA COM ETIQUETA CONTENDO OS DADOS DA AMOSTRA;.....	48
5. EM SEGUIDA COLOCAR AS AMOSTRAS EM NOVA EMBALAGEM PLÁSTICA (EMBALAGEM SECUNDÁRIA), ESSA POR SUA VEZ, LACRADA.....	48
6. COLOCAR AS AMOSTRAS NO INTERIOR DE UMA CAIXA PARA TRANSPORTE;	48
7. FECHAR A CAIXA, VEDAR COM FITA ADESIVA, IDENTIFICAR E PRONTAMENTE REMETER AO LABORATÓRIO. O RESPECTIVO FORMULÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PODERÁ SER ENVIADO NO INTERIOR	

DA CAIXA, DENTRO DE UM SACO PLÁSTICO VEDADO E COLADO NA TAMPA.....	48
6. AMOSTRAGEM	51
EXEMPLO: COLETA ALEATÓRIA DE CINCO AMOSTRAS EM UM TANQUE DE PISCICULTURA.....	51
6.1. NÚMERO DE AMOSTRAS	51
7. ANATOMIA BÁSICA DOS ANIMAIS AQUÁTICOS.....	52
7.1. ANATOMIA BÁSICA DE PEIXES.....	52
7.1.1. ANATOMIA EXTERNA.....	53
7.1.2. ANATOMIA INTERNA.....	54
7.2. ANATOMIA BÁSICA DE CRUSTÁCEOS.....	55
7.2.1. ANATOMIA EXTERNA.....	55
7.2.2. ANATOMIA INTERNA.....	56
• REGIÃO ORAL (BOCA): FUNÇÃO DE APREENSÃO DO ALIMENTO; .	56
• ESTÔMAGO: COMPOSTO PELO PROVENTRÍCULO E ESÔFAGO;	56
• INTESTINO MÉDIO, ANTERIOR OU DELGADO;	56
• INTESTINO GROSSO OU POSTERIOR;.....	56
• ÂNUS.....	56
7.3. ANATOMIA BÁSICA DE MOLUSCOS	57
7.3.1. ANATOMIA EXTERNA.....	57
ANEXO 1 - FORMULÁRIO PADRÃO.....	58
ANEXO 2 - CÁLCULO DA AMOSTRAGEM.....	61

Apresentação

Os produtos oriundos da pesca e da aquicultura são consumidos no Brasil e em todo mundo, e como tal, apresentam características sanitárias específicas no que tange à saúde dos organismos aquáticos sob cultivo e de vida livre e aos riscos à saúde dos consumidores.

No Brasil, a responsabilidade sobre a regulação e fiscalização da saúde animal de organismos aquáticos é do Ministério da Pesca e Aquicultura do Brasil (MPA), de acordo com a Lei Federal nº 11.958, de 26 de junho de 2009 e o Decreto nº 7.024, de 07 de dezembro de 2009.

Dentre as diversas atividades que compõem o monitoramento e controle da sanidade dos animais aquáticos no Brasil se destaca o processo de coleta, acondicionamento e remessa de amostras oficiais para análise nos laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura – RENAQUA, considerando as diversas espécies, enfermidades, situações sanitárias e técnicas encontradas no cultivo e captura de pescado no país.

Dessa forma, o MPA, por meio da criação da RENAQUA e de regulamentos específicos, vem padronizando os procedimentos e processos necessários ao diagnóstico de enfermidades em animais aquáticos, fortalecendo assim a defesa sanitária das cadeias produtivas de pescados.

Definições

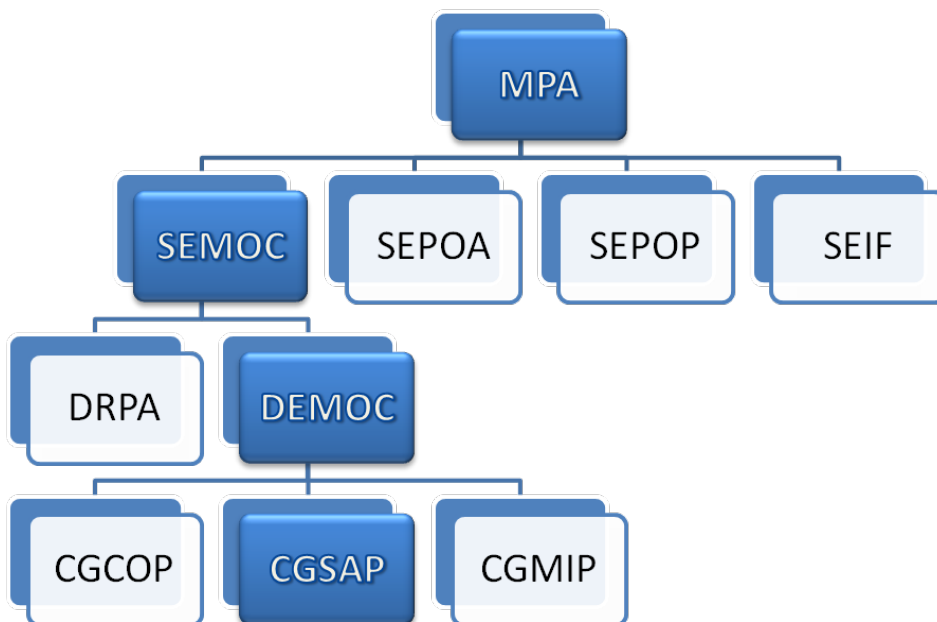
MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura: Possui, dentre outras competências, a responsabilidade sobre o monitoramento e controle da sanidade aquícola e pesqueira.

SEMOC – Secretaria de Monitoramento e Controle da Pesca e Aquicultura (Figura 2. Estrutura do MPA).

DEMOC – Departamento de Monitoramento e Controle (Figura 1. Estrutura do MPA).

CGSAP – Coordenação-Geral de Sanidade Pesqueira (Figura 1. Estrutura do MPA).

Estrutura do MPA.



Fonte: CGSAP/DEMOC/SEMOC/MPA

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Órgão responsável pela segurança alimentar dos produtos da pesca e aquicultura.

RENAQUA – Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura.

AQUACEN – Laboratório Oficial Central da RENAQUA.

LAQUA – Laboratório da Rede RENAQUA.

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal – Fórum internacional de referência para discussão e estabelecimento de parâmetros para saúde animal, reconhecido como referência para o comércio internacional de animais e produtos de origem animal.

EPI – Equipamento de Proteção Individual.

Aquicultura – Cultivo de organismos cujo ciclo de vida em condições naturais se dá total ou parcialmente em meio aquático. A aquicultura pode ser tanto continental (água doce) como marinha (água salgada), esta chamada de maricultura.

Carcinicultura – Criação de camarão em viveiros, ou ainda de caranguejos e afins.

Piscicultura – Criação de peixes em tanques escavados ou tanques-rede.

Malacocultura – Produção de moluscos, como ostras, mexilhões, caramujos e vieiras. A criação de ostras é conhecida por Ostreicultura e a criação de mexilhão por Mitilicultura.

Serviço Veterinário Oficial (SVO) – Serviço Veterinário federal, dos estados e municípios, responsável pelo monitoramento, controle, regulação e fiscalização sanidade pesqueira e aquícola.

Veterinário Privado Habilitado - Médicos Veterinários particulares que atenderem às exigências legais do MPA para a execução de determinadas atividades oficiais.

UVL – Unidade Veterinária Local.

FORM-IN – Formulário de Investigação de Doenças – Inicial.

FORM-COM – Formulário de Investigação de Doenças – Complementar.

Amostra Oficial – Amostra coletada por médico veterinário do SVO para fins de atendimento à investigação epidemiológica, programas sanitários, estudos epidemiológicos, fiscalizações e demais atividades, a critério do SVO, analisada em laboratório oficial.

Coleta Oficial – Coleta de amostra oficial, realizada por médico veterinário do SVO.

Unidade epidemiológica – Grupo de animais com uma relação epidemiológica definida e que apresenta a mesma probabilidade de exposição a um patógeno, por exemplo, por dividir um ambiente em comum (por exemplo, várias propriedades que

realizam a captação de água em um mesmo estuário), ou por práticas compartilhadas de manejo.

Foco – Unidade epidemiológica onde foi constatada a presença de um ou mais animais acometidos por qualquer uma das doenças alvo.

Unidade amostral – Menor divisão da população da qual a amostra é obtida; é cada indivíduo.

Prevalência – Número total de casos de uma doença existentes num determinado local e período em uma dada população.

Incidência - Número de novos casos surgidos numa determinada população e num determinado intervalo de tempo.

Caso Suspeito – Será considerado caso suspeito qualquer aumento súbito na taxa de mortalidade em uma unidade epidemiológica, independente da fase de vida dos animais.

Doenças alvo – São as doenças de notificação para OIE, bem como as doenças de interesse para o país (endêmicas, emergentes ou exóticas).

Plano de Contingência – Conjunto de procedimentos e medidas a serem adotadas no caso de ocorrência inesperada de um foco de doença, com o objetivo de conter, mitigar e erradicar o agente e a doença o mais rápido possível.

Sistema de Produção Aberto: Sistema em que não há controle nem do movimento dos animais nem do fluxo de água, tais como: pesca, retirada de moluscos bivalves dos bancos naturais e outras atividades extrativistas.

Sistema de Produção Semi-aberto: Sistema em que há controle do movimento dos animais, mas não há controle do fluxo de água, tais como: cultivo de moluscos bivalves em lanternas, tanque-rede, gaiolas.

Sistema de Produção Semi-fechado: Sistema em que há controle do movimento dos animais, e algum controle do fluxo de água, tais como: tanque-escavado, tanque edificado (revestido) açudes, e sistema de fluxo contínuo (*raceways*).

Sistema de Produção Fechado: Sistema em que há controle tanto do movimento dos animais quanto do fluxo de água, tais como: aquários, e outros cultivos com recirculação total da água.

Base Legal

O Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), criado no ano de 2009, por meio da Lei Federal nº 11.958, de 26 de junho de 2009, possui, dentre suas competências institucionais, o monitoramento e controle da sanidade pesqueira e aquícola, atribuído pelo Decreto nº 7.024, de 07 de dezembro de 2009, que regulamenta a alínea “e” do inciso XXIV do artigo nº 27 da Lei nº 10.683, de 28 de maio de 2003 (Dispõe sobre a organização da Presidência da República e dos Ministérios, e dá outras providências), alínea essa que tem por objetivo descrever a sanidade pesqueira e aquícola, compreendendo “as ações do Ministério da Pesca e Aquicultura que objetivem a saúde de organismos aquáticos sob cultivo, o controle de organismos aquáticos para fins ornamentais e a qualidade do pescado a ser utilizado como matéria-prima para fins de manipulação, processamento nos estabelecimentos industriais e venda direta ao consumidor”.

Por fim, a Portaria MPA nº 523, de 02 de dezembro de 2010 (Regimento Interno do MPA), detalhou as ações de sanidade pesqueira e aquícola e atribuiu à Coordenação-Geral de Sanidade Pesqueira (CGSAP) a responsabilidade de execução de tais ações; assim, ficou a cargo da CGSAP a coordenação, promoção e fiscalização da execução de planos de contingência para doenças dos animais aquáticos.

Porém até a transformação da Secretaria Especial de Pesca e Aquicultura (SEAP/PR) em MPA (Lei Federal nº 11.958, de 26 de junho de 2009), a maior parte da legislação editada que aborda o tema "defesa da saúde dos organismos aquáticos" foi publicada no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão responsável pela a defesa sanitária dos animais terrestres no Brasil. Dessa forma, a sanidade dos animais aquáticos conta atualmente apenas com um Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos – PNSAA, instituído pela Instrução Normativa MAPA nº 53, de 02 de julho de 2003.

Dessa forma, o MAPA permanece como responsável pela sanidade dos animais terrestres no Brasil, e o MPA responsável pela sanidade dos animais aquáticos. Tal divisão de competências foi harmonizada entre os órgãos através do Acordo de Cooperação Técnica nº 06/2010, celebrado entre o MPA e o MAPA. Essa situação é reforçada pelo disposto no inciso VI da cláusula quinta do referido acordo, onde é reforçada a posição do MPA quanto à sua responsabilidade na elaboração e execução de programas de controle e erradicação de enfermidades de animais aquáticos.

Introdução

O presente Manual descreve os procedimentos para coleta e remessa de material para o diagnóstico das principais doenças infecciosas de peixes, crustáceos e moluscos bivalves.

O objetivo desse Manual é padronizar a coleta, acondicionamento e preservação das amostras, possibilitando o diagnóstico de doenças em animais aquáticos.

Cabe ressaltar que a coleta e acondicionamento inadequados podem acarretar no comprometimento dos resultados das análises ou mesmo impossibilitar as mesmas, implicando em prejuízos para a eficiência e eficácia do sistema de defesa sanitária de animais aquáticos.

Esse Manual não pretende esgotar todos os assuntos relativos à coleta de amostras, contudo, abre a possibilidade para uma discussão focada e tecnicamente embasada. Dessa forma, em caso de dúvidas, o fiscal responsável pela coleta deverá entrar em contato com os técnicos da RENAQUA para esclarecimento de possíveis dúvidas.

Notificação ao Serviço Veterinário Oficial – SVO

Todo médico veterinário (do Serviço Veterinário Oficial ou não), proprietário, produtor, transportador de animais, fornecedor de insumos ou ainda qualquer outro cidadão que tenha conhecimento de suspeita da ocorrência de alguma das doenças alvo fica obrigado, de acordo o Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006 (organiza o Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária - SUASA), a comunicar imediatamente o fato à unidade local do serviço veterinário oficial mais próxima. Tal comunicação poderá ser efetuada pessoalmente, por telefone, fax ou qualquer outro meio de comunicação disponível, desde que fornecidas as informações necessárias que possibilitem a investigação da suspeita de foco e a identificação do comunicante.

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

1. INSTRUÇÕES GERAIS

1.1. BIOSSEGURANÇA NA COLETA E REMESSA DE AMOSTRAS

1.1.1. EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL (EPI)

Os Equipamentos de Proteção Individual (EPI) são quaisquer meios, dispositivos ou ferramentas destinadas a eliminar ou minimizar possíveis riscos à saúde ou segurança do usuário durante o exercício de uma determinada atividade.

No caso específico da coleta de amostras oficiais, o EPI se destina a proteger o técnico responsável pela coleta, bem como a evitar possíveis contaminações ou alterações de características químicas, físicas ou microbiológicas das amostras.

Dessa forma, são EPI indispensáveis para coleta de amostras de animais aquáticos:

- a. **Luvas descartáveis de borracha ou silicone** – Que possibilitem o isolamento entre as mãos do responsável pela coleta e a amostra e sejam impermeáveis à água e demais líquidos.
- b. **Bota de borracha** – Impermeável e de fácil higienização.
- c. **Avental** – De material resistente à água e demais líquidos.
- d. **Jaleco ou macacão** – Que permita proteção do vestuário primário do responsável pela coleta.
- e. **Máscara descartável e óculos de proteção** – Utilizado para evitar o contato acidental de material biológico, fixadores e outras substâncias químicas potencialmente irritantes, tóxicas e nocivas com os olhos e boca do responsável pela coleta.

- f. Colete salva-vidas** – Tem por objetivo evitar casos de afogamento das pessoas envolvidas na coleta, em casos de acidente ou queda acidental na água durante os procedimentos realizados a bordo de embarcações em águas continentais (lagoas, represas, rios etc.) e no mar.

1.1.2. EQUIPAMENTOS PARA CONTENÇÃO/MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS

Conter um animal significa limitar seus movimentos ou, até mesmo, imobilizá-lo completamente. A contenção de um animal pode ser: (1) física, quando utilizamos as mãos ou algum equipamento, ou (2) química, quando utilizamos tranquilizantes ou anestésicos.

- **Contenção Física**

Para captura e contenção dos animais deverão ser utilizados **redes e puçás** que possibilitem a apreensão dos indivíduos com o mínimo de estresse possível. No caso de moluscos bivalves, as pencas, lanternas, travesseiros ou “long-lines” deverão ser trazidos a bordo da embarcação para possibilitar coleta dos indivíduos.

Redes e puçás utilizados para apreensão dos animais

Para a contenção física pode-se utilizar apenas as mãos protegidas por luvas ou equipamentos específicos, tais como:

- a. Bandeja branca de polietileno ou de aço inoxidável** – Que possibilite uma superfície plana, higienizável e adequada à manipulação dos animais ou das amostras.
- b. Material cirúrgico (tesoura romba/fina, pinça anatômica, pinça “dente de rato”, cabo de bisturi, lâminas para bisturi e outros)** – Necessários à manipulação, evisceração ou secção anatômica de órgãos específicos para coleta da amostra.

- c. **Balde plástico de fácil higienização** – Para identificação dos animais, aclimatação, abate e demais necessidades.
- d. **Sacos plásticos transparentes** – Para o acondicionamento e transporte dos animais e/ou amostras.

- **Contenção Química (de peixes)**

Quando necessária, a contenção química deve ser realizada por médico veterinário, por meio do uso de produtos analgésicos e/ou anestésicos diluídos na água, todavia sendo necessária a prévia contenção física.

A utilização da contenção química dos animais implicará na impossibilidade de aproveitamento condicional das carcaças para consumo.

A escolha do produto utilizado para contenção química deverá levar em conta a espécie do animal a ser contido, seu tamanho e peso, metabolismo e a possibilidade de interferência entre o produto utilizado e o método de diagnóstico a ser realizado.

A administração do produto deve ser realizada por imersão (mergulhar o animal na solução anestésica / analgésica). É uma técnica análoga à anestesia inalatória para animais terrestres. Dessa forma, os produtos deverão ser diluídos ou homogeneizados na água para serem absorvidos pelo sistema respiratório dos animais.

Dentre os compostos mais utilizados (e concentrações adotadas) encontram-se:

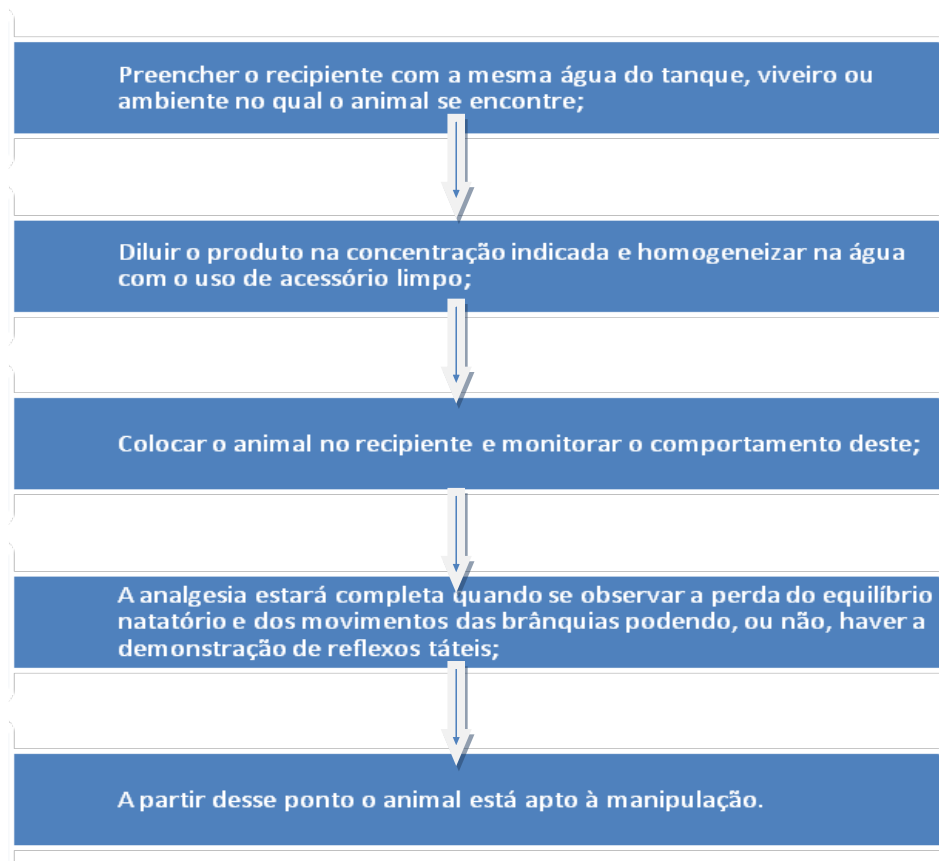
- a. Benzocaína;
 - i. Dose: 40 a 100 mg/L;
- b. Metanosulfonato de tricaína;
 - i. Dose: 50 a 100 mg/L;
- c. Fenoxietanol;
 - i. Dose: 0,6 a 1mg/L;

Observação: Aconselhável o uso de luvas para manipulação (potencial cancerígeno);

- d. Essência de Cravo da Índia (Eugenol);
 - i. Dose: 50 a 100 mg/L;

Observação: Aconselhável o uso de luvas para manipulação (irritação cutânea).

Logo, para realizar a imersão deverá ser utilizado recipiente que possua volume tamanho suficiente para comportar tanto o peixe quanto a água.



A escolha entre a contenção física ou a contenção química depende de fatores como (1) o tipo de procedimento que será realizado, (2) o temperamento do animal, (3) o grau de risco para os envolvidos e (4) o estado de saúde do animal, entre (5) outros fatores.

1.1.3. DESCARTE DE MATERIAL

Após a coleta e acondicionamento das amostras, os materiais não descartáveis utilizados (com exceção de macacões, jalecos e aventais) deverão ser adequadamente desinfetados, observando-se o tempo de contato e as indicações de uso de cada produto. Já os macacões, jalecos e aventais deverão ser acondicionados (em saco plástico) para posterior desinfecção e/ou esterilização (autoclave) e lavagem.

Os materiais descartáveis deverão ser acondicionados em saco branco de lixo, devidamente identificado para substâncias potencialmente infectantes, lacrados e destinados ao lixo hospitalar, incineração ou quaisquer outros métodos que possibilitem a inativação dos possíveis patógenos presentes, como a autoclavagem, inativação química etc.

As agulhas, lâminas de bisturi, tubos de vidro quebrados etc, devem ser descartados em caixas coletoras próprias para materiais perfurocortantes. Na falta dessas, utilizar um recipiente rígido com tampa (latas de leite em pó e garrafa pet, por exemplo). Os recipientes contendo os resíduos potencialmente infectantes devem ser sinalizados e destinados para coleta de lixo hospitalar ou equivalente, tendo por finalidade minimizar os riscos sanitários e ambientais.

1.1.4. IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA

A identificação da amostra começa com a coleta dos dados que possibilitem a rastreabilidade dessa durante todo o processo. No momento da coleta, deverão ser anotados os dados referentes ao(s) lote(s), viveiro(s), tanque(s) ou “long-line(s)”, bem como da propriedade, no formulário epidemiológico correspondente a ser remetido para o laboratório junto à amostra (dentro de um saco plástico vedado e colado na tampa da caixa).

É importante que a informação de identificação do animal ou da amostra coletada esteja presente também no recipiente de coleta, preferencialmente em rótulo de esparadrapo (ou etiqueta adesiva) com caneta esferográfica, fixado na face exterior do recipiente, ou ainda identificado a lápis em uma etiqueta de papel colocada junto à amostra.

2. FORMULÁRIOS EPIDEMIOLÓGICOS

Os formulários epidemiológicos são as ferramentas de identificação e rastreabilidade das amostras. Todas as amostras remetidas para os laboratórios de destino deverão estar acompanhadas do respectivo formulário.

A coleta de amostras pode ser motivada por diversas situações como o aumento da mortalidade em um determinado sistema ou a suspeita de alguma doença em questão, dessa forma, diferentes formulários epidemiológicos são utilizados para cada situação.

2.1. FORMULÁRIO PADRÃO

Quando a amostra coletada tem por objetivo a certificação para programas sanitários ou exportação, a realização de estudos epidemiológicos e demais situações, deverá ser utilizado o formulário padrão para coleta e remessa de amostras da RENAQUA (Anexo 1), podendo ser emitido tanto por médicos veterinários do SVO, quanto veterinários privados habilitados.

Esse formulário deverá acompanhar a amostra durante seu trânsito e será emitido em duas vias, uma destinada para o laboratório (via que acompanha a amostra) e outra para arquivo na UVL. E poderá ser emitido tanto pelos veterinários do SVO quanto por veterinários privados habilitados.

2.2. FORM-IN

O Formulário de Investigação Inicial de Suspeitas de Doenças (FORM-IN) é a ferramenta a ser utilizada para comunicação inicial da confirmação da suspeita de doenças alvo.

Tem por objetivo o registro dos atendimentos (investigação inicial) do médico veterinário oficial (os médicos veterinários privados conveniados não podem emitir FORM-IN) a suspeitas ou focos de doenças animais, de notificação obrigatória ao MPA, e outras doenças que sejam de interesse do SVO.

Quando o atendimento inicial envolver mais de uma visita, no mesmo dia, ao estabelecimento sob investigação, as informações deverão ser registradas em um único FORM-IN. Todas as visitas complementares ocorridas a partir do dia seguinte ao atendimento inicial deverão ser registradas em FORM-COM.

O FORM-IN deverá ser impresso em três vias, sendo: a 1ª via para o SVO local, a 2ª remetida ao laboratório oficial no qual as análises de diagnóstico serão realizadas (juntamente às amostras coletadas) e a 3ª via para a SEMOC/MPA.

O FORM-IN deverá ser enviado à SEMOC/MPA em, no máximo, 24 horas após a notificação da suspeita, possibilitando:

- A avaliação, por parte da autoridade central, da necessidade de comunicação da ocorrência do foco à OIE;
- A verificação da disponibilidade de materiais e equipamentos necessários para atendimento ao foco (conforme o caso);
- O conhecimento dos dados da investigação epidemiológica preliminar;
- A avaliação da necessidade de adoção de medidas adicionais de controle no foco.

2.3. FORM-COM

O Formulário de Investigação de Doenças - Complementar (FORM-COM) é a ferramenta a ser utilizada para as comunicações complementares relativas à(s) propriedade(s) suspeitas, quando forem realizadas visitas e ações adicionais nessas propriedades, bem como quando da confirmação dos focos de doenças.

Tem por objetivo registrar as inspeções complementares (intermediárias ou de encerramento) do médico veterinário oficial (os médicos veterinários privados conveniados não podem emitir FORM-COM) às suspeitas ou focos de doenças, bem como outras doenças que sejam de interesse do SVO.

Deve ser utilizado, portanto, para registrar qualquer atividade realizada no estabelecimento sob investigação após a primeira visita do SVO. Assim, por exemplo, caso o SVO tenha, durante a primeira inspeção, agendado a realização de colheita de amostras para o dia seguinte, o retorno ao estabelecimento para executar a referida atividade deverá ser registrado por meio de FORM-COM.

Caso, durante a visita complementar (ou de seguimento), o atendimento envolva mais de uma visita ao estabelecimento envolvido no mesmo dia, preencher apenas um FORM-COM.

Assim como o FORM-IN, o FORM-COM deverá ser impresso em três vias, sendo: a 1ª via para o SVO local, a 2ª remetida ao laboratório oficial juntamente às amostras complementares para análise e a 3ª via para a SEMOC/MPA.

3. COLETA E REMESSA DE MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS DE PEIXES

No que tange à eutanásia dos animais para coleta das amostras, esse manual segue as recomendações da Resolução CFMV nº 1000, de 11 de maio de 2012, que Dispõe sobre os procedimentos e métodos de eutanásia em animais.

3.1. AVALIAÇÃO OU EXAME PARASITOLÓGICO

A eutanásia do animal, por resfriamento, congelamento da carcaça ou overdose de anestésicos pode ocasionar a eliminação dos parasitas (principalmente protozoários ectoparasitas) ou redução na infestação, assim sendo, não permitindo a avaliação da carga parasitária. Por esse motivo, o material de eleição para a realização de exame parasitológico em peixes é o animal vivo. Adicionalmente, amostras fixadas de tecidos podem ser avaliadas, porém a fixação reduz o número de parasitas, o que leva a uma subestimação da infestação. A seguir são descritos os protocolos de envio citados.

3.1.1. ENVIO DE PEIXES VIVOS PARA PARASITOLOGIA

1. Realizar a coleta de animais com sinais clínicos sugestivos de doença parasitária (melanose, anorexia, letargia, taquipnéia etc.).



2. Encher um saco plástico resistente (semelhante aos utilizados para transporte de alevinos) com 1/3 de água limpa;
3. Acondicionar os peixes doentes, completar os 2/3 restantes com oxigênio, vedá-los com ligas de borracha ou outros materiais e lacrar;



4. Colocar os sacos no interior de uma caixa isotérmica e envolvê-lo com gelo picado até a altura da água no interior do saco plástico. O objetivo é diminuir a temperatura da água, o metabolismo dos animais e prolongar o tempo de transporte;
5. Fechar a caixa isotérmica, vedar com fita adesiva, identificar e prontamente remeter ao laboratório. O respectivo formulário epidemiológico pode ser enviado no interior da caixa, dentro de um saco plástico vedado e colado na tampa;



6. O tempo de transporte não deve ultrapassar 6 a 8 horas. Caso o responsável tenha dúvidas se o animal chegará vivo, amostras de tecido devem ser coletadas, fixadas e enviadas.

3.1.2. ENVIO DE AMOSTRAS DE TECIDO FIXADAS PARA PARASITOLOGIA

1. Realizar a coleta de animais com sinais clínicos sugestivos de doença parasitária (melanose, anorexia, letargia, taquipnéia etc.);



2. Realizar a eutanásia dos animais por secção da medula espinhal ou decapitação;

Observação: a utilização de outros métodos de abate, como hipotermia e overdose de analgésico/anestésicos pode ocasionar a eliminação dos parasitas e comprometer o diagnóstico.



3. Para avaliação de ectoparasitas de superfície, realizar a coleta de uma amostra significativa (proporcional ao tamanho das brânquias) do tecido branquial e raspado de muco de superfície de cada peixe.

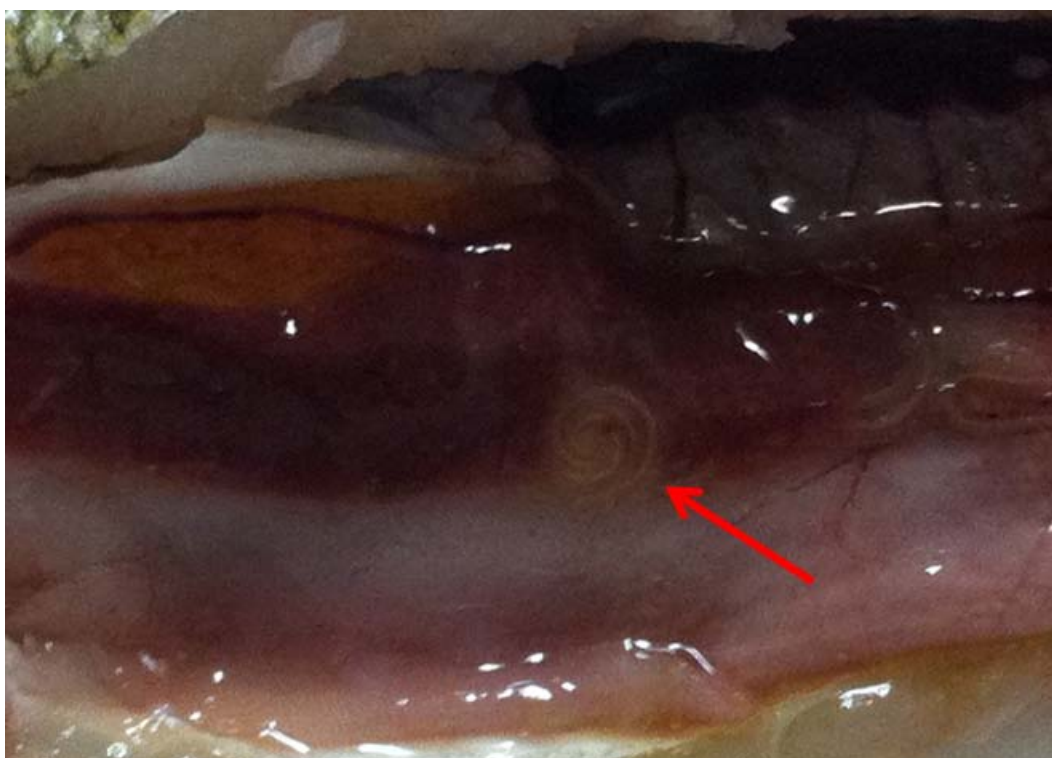
Acondicionar as brânquias em cassetes histológicos e identifica-lós a lápis com o código da amostra e nº do lacre. Colocar os cassetes em frascos de coleta

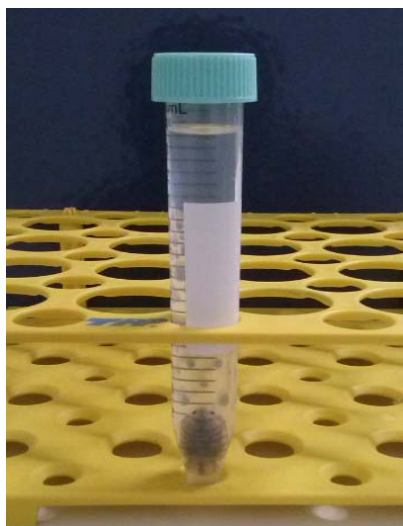
(frasco para coleta de fezes, leite etc.) e adicionar a solução de fixação (formol 5% tamponado) na proporção volume:volume (v:v) 1:10.

O muco de superfície deve ser colocado em tubos tipo Falcon de 15 mL (figura ao lado), seguido da adição formol 5% tamponado 1:10 (v:v). Identificar a lápis uma etiqueta de papel com o código da amostra e nº do lacre, posteriormente colocar junto com a amostra no tubo.



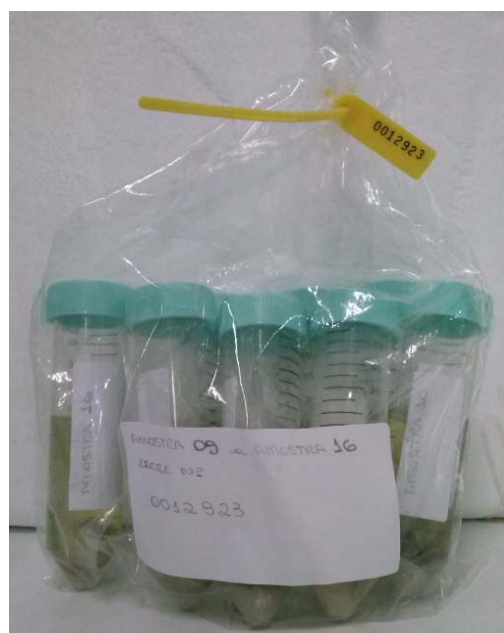
Para avaliação de endoparasitas (indicado pela seta vermelha na figura abaixo) ou parasitas que causem infecção tecidual, necropsiar o peixe e colher uma amostra do tecido infectado, xenoma ou o próprio parasita (ex. helmintos). Os tecidos devem ser acondicionados em cassetes histológicos e não podem possuir espessura superior a 0,5 cm. Identificar a lápis os cassetes, colocar em tubos de coleta (frasco para coleta de fezes, leite etc.) e adicionar a solução de fixação (formol 10% tamponado) na proporção volume: volume (v:v) 1:10. Esse serão submetidos a avaliação histopatológica.





Para identificação de ectoparasitas macroscópicos (principalmente crustáceos), coletar os mesmos, colocar em tubos tipo Falcon de 15 mL (figura ao lado) e fixar em etanol 70% ou 95%, de acordo com disponibilidade. Identificar a lápis uma etiqueta de papel com o código da amostra e nº do lacre, posteriormente colocar junto com a amostra no tubo.

4. Colocar os tubos em sacos plásticos individuais ou agrupá-los por propriedade ou sistema de cultivo, lacrar (vide figura ao lado) e colocar em uma caixa para transporte. O respectivo formulário epidemiológico pode ser enviado no interior da caixa, dentro de um saco plástico vedado e colado na tampa;



5. Prontamente enviar as amostras ao laboratório à temperatura ambiente.

3.2. DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS BACTERIANAS, MICÓTICAS E VIRAIS

O diagnóstico de doenças bacterianas, fúngicas e virais deve ser realizado, preferencialmente, a partir de amostras de peixes vivos ou resfriados. O congelamento do material pode ocasionar a inativação dos microrganismos e conseqüentemente originar resultados falsos negativos.

Esse método de envio (peixes congelados) poderá ser realizado em casos específicos, de acordo a doença (tabela 1) ou prévia recomendação da equipe técnica do AQUACEN.

A utilização de técnicas histológicas será recomendável em casos de doenças novas. Porém, a identificação dos patógenos somente poderá ser realizada quando métodos imunistoquímicos ou de “hibridização *in situ*” forem associados à histopatologia.

Devido à rápida contaminação da carcaça “*post mortem*”, não é recomendável a coleta de animais mortos para a realização de exames laboratoriais.

3.2.1. ENVIO DE PEIXES VIVOS PARA BACTERIOLOGIA, MICOLOGIA E VIROLOGIA

1. Realizar a coleta de animais com sinais clínicos sugestivos de doença bacteriana, fúngica ou viral (exoftalmia, hiperemia cutânea/base de nadadeira, natação errática, ulcerações cutâneas com halo hiperêmico, ascite, lesões “cotonosas”, erosão nas brânquias e nadadeiras etc.) e animais assintomáticos.

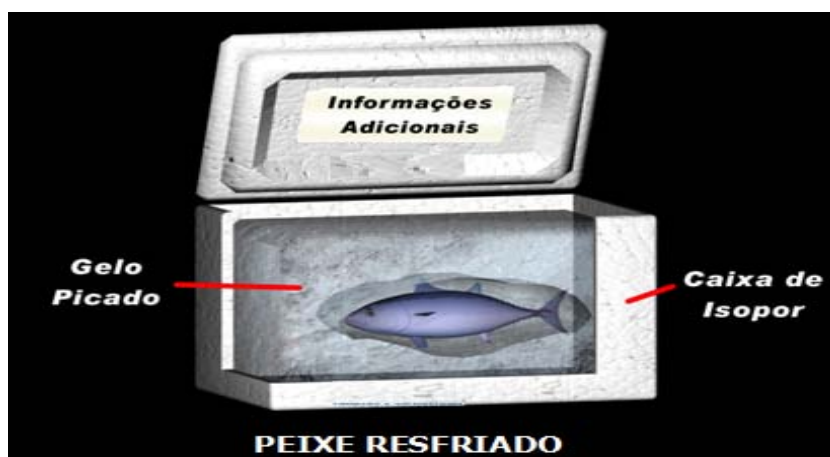


2. Encher um saco plástico resistente (semelhante aos utilizados para transporte de alevinos) com 1/3 de água limpa;



3. Acondicionar os peixes doentes e assintomáticos em sacos plásticos distintos, completar os 2/3 restantes com oxigênio, vedá-los e lacrar;

4. Colocar os sacos no interior de uma caixa isotérmica e envolvê-lo com gelo picado até a altura da água no interior do saco plástico. O objetivo é diminuir a temperatura da água, o metabolismo dos animais e prolongar o tempo de transporte;



5. Fechar a caixa isotérmica, vedar com fita adesiva, identificar e prontamente remeter ao laboratório. O respectivo formulário epidemiológico pode ser enviado no interior da caixa, dentro de um saco plástico vedado e colado na tampa;

6. O tempo de transporte não deve ultrapassar 6 a 8 horas. Caso o responsável tenha dúvidas se o animal chegará vivo, amostras de tecido devem ser coletadas, fixadas e enviadas.

3.2.2. ENVIO DE PEIXES RESFRIADOS PARA BACTERIOLOGIA, MICOLOGIA E VIROLOGIA

Essa é a forma mais comum de envio de material para diagnóstico de doenças bacterianas, fúngicas e virais.

1. Realizar a coleta de animais com sinais clínicos sugestivos de doença bacteriana ou fúngica ou viral (exoftalmia, hiperemia cutânea/ base de nadadeira, natação errática, ulcerações cutâneas com halo hiperêmico, ascite, lesões “cotonosas”, erosão brânquias e nadadeiras etc.) e animais assintomáticos.



2. Eutanasiar os animais por hipotermia, por meio da imersão em água a 0°C até a morte do animal. Contudo, a critério do responsável pela coleta, a eutanásia poderá ser realizada por meio da secção de medula espinhal ou decapitação;
3. Acondicionar os peixes em sacos plásticos individuais (preferencialmente) ou agrupar os peixes de acordo com lote ou sistema de cultivo de origem;



Observação: animais adultos não devem ser agrupados, pois a sobreposição das carcaças pode dificultar seu resfriamento e comprometer a viabilidade do material para diagnóstico.

4. Vedar, identificar e lacrar os sacos plásticos;

Observação: colocar a identificação no interior do saco plástico. Evitar marcações com pincéis atômicos ou similares, pois essas podem se perder com o derretimento do gelo.

5. Colocar os peixes no interior de uma caixa isotérmica sobre uma camada de gelo de aproximadamente 10 cm e, após o acondicionamento de todas as amostras, cobrir com gelo triturado (camada de 10 a 15 cm);



Observação: em casos de caixas isotérmicas grandes e quantidades elevadas de amostras, camadas intermediárias de gelo devem ser colocadas entre os peixes.

6. Fechar a caixa isotérmica, vedar com fita adesiva, identificar e prontamente remeter ao laboratório. O respectivo formulário epidemiológico pode ser enviado no interior da caixa, dentro de um saco plástico vedado e colado na tampa;
7. Fazer a reposição do gelo a cada 8 a 10 horas de transporte;
8. O tempo de transporte não deve ultrapassar 48 horas.

3.2.3. ENVIO DE PEIXES CONGELADOS BACTERIOLOGIA, MICOLOGIA E VIROLOGIA

1. Realizar a coleta de animais com sinais clínicos sugestivos de doença bacteriana ou fúngica ou virais (exoftalmia, hiperemia cutânea/ base de nadadeira, natação errática, ulcerações cutâneas com halo hiperêmico, ascite, lesões “cotonosas”, erosão brânquias e nadadeiras etc.) e animais assintomáticos.



2. Eutanasiar os animais por hipotermia, por meio da imersão em água a 0°C até a morte do animal. Contudo, a critério do responsável pela coleta, a eutanásia poderá ser realizada por meio da secção de medula espinhal ou decapitação;





3. Acondicionar os peixes em sacos plásticos individuais, vedar, identificar e lacrar;

Observação: colocar a identificação no interior do saco plástico. Evitar marcações com pincéis atômicos ou similares, pois essas podem se perder com o derretimento do gelo.

4. Congelar as amostras em freezer a -20°C , doméstico ou similar, por 24 horas;
5. Colocar os peixes no interior de uma caixa isotérmica sobre uma camada de gelo de aproximadamente 10 cm e, após o acondicionamento de todas as amostras, cobrir com gelo triturado (camada de 20 cm).



Observação: em casos de caixas isotérmicas grandes e quantidades elevadas de amostras, camadas intermediárias de gelo devem ser colocadas entre os peixes.

6. Fechar a caixa isotérmica, vedar com fita adesiva, identificar e prontamente remeter ao laboratório. O respectivo formulário epidemiológico pode ser enviado no interior da caixa, dentro de um saco plástico vedado e colado na tampa;
7. Fazer a reposição do gelo a cada 8 a 10 horas de transporte;

3.2.4. DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS VIRAIS - MÉTODOS ADICIONAIS DE ENVIO

O diagnóstico de doenças virais deve ser realizado, preferencialmente, a partir de amostras de peixes vivos, resfriados ou congelados, sendo essa última não aplicável a todos os casos. Os protocolos de envio coleta e remessa desses tipos de amostra estão descritos nos itens anteriores.

Adicionalmente, o diagnóstico dos vírus pode ser realizado através da detecção de material genético viral em amostras de tecido fixadas. O estudo histopatológico apresenta-se também como uma ferramenta importante na prospecção inicial de infecções virais. Os protocolos de envio desses tipos de amostra estão descritos a seguir.

3.2.5. ENVIO DE AMOSTRAS DE TECIDO FIXADAS EM RNALATER

O envio de amostras de tecido fixadas em *RNalater* será importante e viável principalmente em casos de infecção por vírus de RNA.

1. Realizar a coleta de animais com sinais clínicos sugestivos de doença virais, bem como, animais assintomáticos;





2. Eutanasiar os animais por hipotermia, por meio da imersão em água a 0°C até a morte do animal. Contudo, a critério do responsável pela coleta, a eutanásia poderá ser realizada por meio da secção de medula espinhal ou decapitação;

Observação: peixes de clima temperado, como os salmonídeos, apresentam maior resistência à hipotermia. Esses devem mantidos por períodos maiores na água com gelo.

3. Necropsiar os animais e realizar a coleta dos tecidos que serão submetidos à análise laboratorial;



4. Realizar a toailete dos tecidos. Esses não podem possuir espessura superior a 0,5 cm ou o processo de fixação poderá ser comprometido;

5. Colocar os tecidos em cassetes histológicos e identificar a lápis com o código da amostra e nº do lacre. Em seguida, os cassetes devem ser acondicionados em frascos de coleta (frasco para coleta de fezes, leite etc.) e o *RNAlater* adicionado na proporção 1:5 (v:v).

Em casos de animais muito pequenos, como larvas de peixes nativos, esses devem ser “embrulhados” em papel filtro, previamente a sua colocação nos cassetes.

Quando os cassetes não estiverem disponíveis, os tecidos podem ser acondicionados diretamente em tubos tipo Falcon de 50 mL ou em frascos de coleta (frasco para coleta de fezes, leite etc.), seguido da adição do *RNAlater* na proporção 1:5 (v:v). Identificar a lápis uma etiqueta de papel com o código da amostra e nº do lacre, posteriormente colocar junto com a amostra no tubo.

6. Colocar os tubos em sacos plásticos individuais ou agrupá-los por propriedade ou sistema de cultivo e lacra-los;
7. Remeter ao laboratório à temperatura ambiente.

As amostras fixadas em *RNAlater* poderão ser mantidas a temperatura ambiente por período máximo de sete dias. Esses tecidos poderão ser utilizados para realização de exame histopatológico.

3.2.6. ENVIO DE AMOSTRAS DE TECIDO FIXADAS PARA HISTOPATOLOGIA

1. Realizar a coleta de animais com sinais clínicos sugestivos de doença virais, bem como, animais assintomáticos;





2. Eutanasiar os animais por hipotermia, por meio da imersão em água a 0°C até a morte do animal. Contudo, a critério do responsável pela coleta, a eutanásia poderá ser realizada por meio da secção de medula espinhal ou decapitação;

3. Necropsiar os animais e realizar a coleta dos tecidos que serão submetidos à análise laboratorial;



4. Realizar a toailete dos tecidos. Esses não podem possuir espessura superior a 0,5 cm ou o processo de fixação ficará comprometido;

5. Colocar os tecidos em cassetes histológicos e identificar a lápis com o código da amostra e nº do lacre. Em seguida, os cassetes devem ser acondicionados em frascos de coleta (frasco para coleta de fezes, leite etc.) e a solução de fixação (formol 10% tamponado ou líquido de Bouin) adicionada na proporção 1:10 (v:v);

Em casos de animais muito pequenos, como larvas de peixes nativos, esses devem ser “embrulhados” em papel filtro, previamente a sua colocação nos cassetes histológicos ou utilizar cassetes especiais para biopsia de tecidos.



Para larvas de peixes recomenda-se preferencialmente o uso do líquido de Bouin para fixação (devido a seu caráter ácido, que promove uma descalcificação parcial do tecido ósseo, facilitando os cortes);

Quando os cassetes não estiverem disponíveis, os tecidos podem ser acondicionados diretamente em tubos tipo Falcon de 50 mL ou em frascos de coleta (frasco para coleta de fezes, leite etc.), seguido da adição da solução de fixação (formol 10% tamponado ou líquido de Bouin) adicionada na proporção 1:10 (v:v). Identificar a lápis uma etiqueta de papel com o código da amostra e nº do lacre, posteriormente colocar junto com a amostra no tubo.

6. Na fixação com líquido de Bouin, após 24 horas transferir os cassetes ou tecidos para um frasco de coleta com álcool 70%;

Observação: esse passo não é necessário para a fixação com formol 10% tamponado.

7. Colocar os tubos em sacos plásticos individuais ou agrupá-los por propriedade ou sistema de cultivo e lacra-los;
8. Remeter ao laboratório à temperatura ambiente.

As amostras fixadas poderão ser mantidas por tempo indefinido. Para ensaios de imunohistoquímica recomenda-se que as amostras sejam fixadas em líquido de Bouin. As amostras não deverão ser mantidas por períodos longos em formol 10% tamponado.

Após a fixação das amostras por 24 horas, o volume de fixador pode ser reduzido à quantidade mínima que mantenha a amostra imersa. Esse procedimento reduz o volume de material a ser enviado e facilita o transporte por parte das empresas de logística.

3.3. DOENÇA X TIPO DE AMOSTRA E FORMA DE ENVIO

Na tabela 1 são apresentadas as amostras e a forma de envio para o diagnóstico das diferentes doenças infecciosas e parasitárias de peixes.

Tabela 1: Amostras a serem coletadas e respectivas formas de envio de acordo com diferentes doenças ou suspeitas.

Doença/ Enfermidade	Amostra	Forma de Envio	Item manual
Necrose Hematopoiética Epizoótica (EHN)	Peixe inteiro (recomendado) Amostras de fígado, rim cranial e baço	Vivo	3.2.1.
		Resfriado	3.2.2.
Síndrome Ulcerativa Epizoótica (EUS)	Peixe inteiro (recomendado), amostras de músculo e úlceras cutâneas	Vivo	3.2.1.
		Resfriado	3.2.2.
Necrose Hematopoiética Infecciosa (IHN)	Peixe inteiro (recomendado), amostras de larvas, rim cranial, baço, cérebro, coração e fluido ovariano	Vivo	3.2.1.
		Resfriado	3.2.2.
		Fixado em RNAlater	3.2.5.
Anemia Infecciosa do Salmão (ISA)	Peixe inteiro (recomendado), mostras de larvas, rim posterior, coração e brânquias	Vivo	3.2.1.
		Resfriado	3.2.2.
		Fixado em RNAlater (tecidos)	3.2.5.
Herpesvirose da Carpa Koi (KHD)	Peixe inteiro (recomendado), amostras de rim, baço, intestino e cérebro	Vivo	3.2.1.
		Resfriado	3.2.2.
		Congelado	3.2.3.
Iridovirose do "Red Sea Bream"	Peixe inteiro (recomendado) ou amostras de baço	Vivo	3.2.1.
		Resfriado	3.2.2.
		Congelado	3.2.3.
Viremia Primaveril da Carpa (SVC)	Peixe inteiro (recomendado), amostras de larvas, baço, rim,	Vivo	3.2.1.
		Resfriado	3.2.2.

	cérebro e brânquias	Fixado em <i>RNA later</i> (tecidos)	3.2.5.
Septicemia Hemorrágica Viral (VHS)	Peixe inteiro (recomendado), amostras de larvas, baço, rim cranial, cérebro e coração	Vivo	3.2.1.
		Resfriado	3.2.2.
Doenças Parasitárias- ectoparasitas microscópicos, macroscópicos e endoparasitas	Peixe inteiro (recomendado), amostras de brânquias e muco de superfície	Vivo	3.1.1.
		Fixadas Para Parasitologia	3.1.2.
Doenças Bacterianas- <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. iniae</i> , <i>Aeromonas</i> móveis, <i>F.</i> <i>columnare</i> , <i>Weissella ceti</i> , <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>E. ictaluri</i> , <i>Vibrio sp.</i> , <i>Francisella noatunensis subsp orientalis</i>	Peixe inteiro	Vivo	3.2.1.
		Resfriado	3.2.2.
Doenças Fúngicas	Peixe inteiro, amostras de larvas, rim, baço, fígado, intestino, estômago, cérebro, coração, olho, brânquias e pele	Vivo	3.2.1.
		Resfriado	3.2.2.
		Fixado para Histopatologia*	3.2.6.
Doenças virais (suspeitas)	Peixe inteiro, amostras de larvas, rim, baço, fígado, intestino, estômago, cérebro, coração, olho, brânquias e pele	Vivo	3.2.1.
		Resfriado	3.2.2.
		Fixado em <i>RNA later</i>	3.2.5.
		Fixado para Histopatologia*	3.2.6.
Surto atípico com alta mortalidade, inéditos (espécies novas, regiões diferentes etc.) ou em	Peixe inteiro, amostras de brânquias e muco de superfície,	Vivo	3.2.1.
		Resfriado	3.2.2.

caso de dúvida	amostras de larvas, rim, baço, fígado, intestino, estômago, cérebro, coração, olho, brânquias e pele	Fixadas Para Parasitologia	3.1.2.
		Fixado em <i>RNAlater</i>	3.2.5.
		Fixado para Histopatologia*	3.2.6.

* Em casos onde o *RNAlater* estiver indisponível;

4. COLETA E REMESSA DE MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS DE CAMARÕES

4.1. ENVIO DE AMOSTRAS PARA EXAME HISTOPATOLÓGICO

4.1.1. AMOSTRA FIXADA PARA EXAME HISTOPATOLÓGICO

1. Realizar a coleta de animais com sinais clínicos sugestivos de doenças infecciosas ou parasitárias (letargia, descoloração, coloração incomum, manchas negras ou brancas no corpo etc.) ou comportamento e morfologia anormais;
2. Eutanasiar os animais por hipotermia, por meio da imersão em água a 0°C até a morte do animal. Contudo, a critério do responsável pela coleta, a eutanásia poderá ser realizada por meio da decapitação;
3. Com uma seringa estéril, injetar 0,1 a 5 mL do fixador Davidson em quatro pontos na região dorsal do cefalotórax do animal:
 - a. (1) lateral direita e anterior ao hepatopâncreas;
 - b. (2) lateral esquerda e anterior ao hepatopâncreas,
 - c. (3) lateral direita e posterior ao hepatopâncreas;
 - d. (4) lateral esquerda e posterior ao hepatopâncreas.
 - e. (5) Posteriormente, injetar o fixador na região abdominal anterior e posterior. O volume de fixador deverá ser dividido entre pontos de inoculação;

Observação: poderá ser utilizado como parâmetro para mensuração da quantidade de fixador a ser injetado, o volume equivalente a 10% do peso vivo do animal. Adicionalmente, após a injeção o camarão não deve apresentar qualquer tipo de movimento ou reação.

4. Realizar incisões caudo-craniais, lateralmente à direita e à esquerda da linha mediana dorsal, a partir do sexto segmento abdominal até o rostrum;

Observação: atenção ao realizar a incisão da carapaça para evitar a laceração de tecidos e órgãos adjacentes localizados no cefalotórax.

5. Em camarões acima de 12 gramas, realizar incisões transversais na região abdominal;
6. Colocar os animais nos frascos de coleta e adicionar o fixador de Davidson na proporção 1:10 (v:v). Identificar a lápis uma etiqueta de papel com o código da amostra e nº do lacre, posteriormente colocar junto com a amostra no tubo;

Observação: Em casos de larvas e pós-larvas, esses podem ser acondicionados diretamente em tubos tipo Falcon de 50 mL ou em frascos de coleta (frasco para coleta de fezes, leite etc.), seguido da adição da solução de fixação na proporção 1:10 (v:v). Identificar a lápis uma etiqueta de papel com o código da amostra e nº lacre, posteriormente colocar junto com a amostra no tubo.

7. Fixar as larvas/pós-larvas por 12 horas, formas juvenis por 24 horas e adultos por 48-72 horas. Substituir no frasco inicial o fixador por etanol 70% ou transferir as amostras para um novo frasco com etanol;

Observação: o volume de etanol deverá ser o suficiente para imersão total da amostra.

8. Colocar os tubos em sacos plásticos individuais ou agrupá-los por propriedade ou sistema de cultivo e lacra-los;
9. Remeter ao laboratório à temperatura ambiente.

4.2. ENVIO DE AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO POR PCR E qPCR

4.2.1. ENVIO DE AMOSTRAS EM ETANOL 70-95%

Esse método de envio é recomendado principalmente para o diagnóstico de doenças infecciosas por PCR e PCR em tempo real (qPCR) em amostras de larvas, pós-larvas e juvenis (> 2g), bem como, a partir de amostras de pleópodes, brânquias, tecido abdominal e estômago coletados de animais adultos.

1. Realizar a coleta dos animais inteiros com sinais clínicos sugestivos de doenças infecciosas (letargia, descoloração, coloração incomum, manchas negras ou brancas no corpo etc.) ou amostras de pleópodes, brânquias, tecidos abdominais e estômago;
2. Eutanasiar os animais por hipotermia, por meio da imersão em água a 0°C até a morte do animal. Contudo, a critério do responsável pela coleta, a eutanásia poderá ser realizada por meio da decapitação;
3. Acondicionar os animais ou tecidos diretamente em tubos tipo Falcon de 50 mL ou em frascos de coleta (frasco para coleta de fezes, leite etc.), seguido da adição de etanol 70% ou 95%. Identificar a lápis uma etiqueta de papel com o código da amostra e nº do lacre, posteriormente colocar junto com a amostra no tubo;
4. Colocar os tubos em sacos plásticos individuais ou agrupá-los por propriedade ou sistema de cultivo e lacrar;
5. Remeter ao laboratório à temperatura ambiente;

4.2.2. ENVIO DE AMOSTRAS CONGELADAS

Esse método de envio é recomendado principalmente para o diagnóstico de doenças infecciosas por PCR e PCR em tempo real (qPCR) em camarões adultos.

1. Realizar a coleta dos animais com sinais clínicos sugestivos de doenças infecciosas (letargia, descoloração, coloração incomum, manchas negras ou brancas no corpo etc.) e animais assintomáticos;
2. Eutanasiar os animais por hipotermia, por meio da imersão em água a 0°C até a morte do animal. Contudo, a critério do responsável pela coleta, a eutanásia poderá ser realizada por meio da decapitação;
3. Acondicionar os camarões em sacos plásticos individuais, identificar, vedar e lacrar;

Observação: colocar a identificação no interior do saco plástico. Evitar marcações com pincéis atômicos ou similares, pois essas podem se perder com o derretimento do gelo.

4. Congelar as amostras em freezer a -20°C, doméstico ou similar, por 24 horas;
5. Colocar as amostras no interior de uma caixa isotérmica sobre uma camada de gelo de aproximadamente 10 cm e, após a colocação de todas as amostras, cobrir com gelo triturado (camada de 20 cm de gelo);

Observação: em casos de caixas isotérmicas grandes e quantidades elevadas de amostras, camadas intermediárias de gelo devem ser colocadas entre os camarões.

6. Fechar a caixa térmica, vedar com fita adesiva, identificar e prontamente remeter ao laboratório. O respectivo formulário epidemiológico poderá ser enviado no interior da caixa, dentro de um saco plástico vedado e colado na tampa;
7. Fazer a reposição do gelo a cada 8 a 10 horas de transporte.

4.2.3. COLETA E ENVIO DE HEMOLINFA

Esse método de envio é recomendado principalmente para o diagnóstico de doenças infecciosas por PCR e PCR em tempo real (qPCR) em reprodutores de alto valor zootécnico, onde o número de animais for reduzido ou o sacrifício inviável.

1. Coletar a hemolinfa dos animais a serem analisados, utilizando uma seringa com o anticoagulante citrato de sódio 10%. A seringa deve conter 10-30 uL da solução anticoagulante. Será necessário a coleta de no mínimo 200 uL de hemolinfa;

Observação: utilizar somente seringas novas e estéreis, sendo uma para cada animal.

2. Transferir a hemolinfa para um tubo estéril de 1,5 mL e identificar;
3. Congelar as amostras em freezer -20°C doméstico ou similar por 24 horas;
4. Colocar as amostras no interior de uma caixa isotérmica sobre uma camada de gelo e após a colocação de todas as amostras cobrir com gelo picado;
5. Fechar a caixa térmica, vedar com fita adesiva, identificar e prontamente submeter ao laboratório. O respectivo formulário epidemiológico, pode ser enviado no interior da caixa, dentro de um saco plástico vedado e colado na tampa;
6. Fazer a reposição do gelo a cada 8-10 horas de transporte.

4.3. ENVIO DE AMOSTRAS PARA EXAME BACTERIOLÓGICO

4.3.1. ENVIO DE AMOSTRAS RESFRIADAS

1. Realizar a coleta dos animais com sinais clínicos sugestivos de doenças infecciosas (letargia, descoloração, coloração incomum, manchas negras ou brancas no corpo etc.) e animais assintomáticos;

Observação: não necropsiar e não coletar hemolinfa dos animais que serão submetidos à avaliação bacteriológica.

2. Eutanasiar os animais por hipotermia, por meio da imersão em água a 0°C até a morte do animal. Contudo, a critério do responsável pela coleta, a eutanásia poderá ser realizada por meio da decapitação;
3. Acondicionar os camarões em sacos plásticos individuais (preferencialmente) ou agrupá-los de acordo com lote ou sistema de cultivo de origem. Vedar, identificar e lacrar os sacos plásticos;

Observação: colocar a identificação no interior do saco plástico. Evitar marcações com pincéis atômicos ou similares, pois essas podem se perder com o derretimento do gelo.

4. Colocar as amostras no interior de uma caixa isotérmica sobre uma camada de gelo de aproximadamente 10 cm e, após a colocação de todas as amostras, cobrir com gelo tritura (camada de 10 a 15 cm de gelo);
5. Fechar a caixa isotérmica, vedar com fita adesiva, identificar e prontamente remeter ao laboratório. O respectivo formulário epidemiológico poderá ser enviado no interior da caixa, dentro de um saco plástico vedado e colado na tampa;
6. Fazer a reposição do gelo a cada 8 a 10 horas de transporte;
7. O tempo de transporte não deve ultrapassar 48 horas.

4.4. DOENÇA X TIPO DE AMOSTRA E FORMA DE ENVIO

Na tabela 2 são apresentadas as amostras que devem ser coletadas e a forma de envio de acordo com as diferentes doenças, enfermidades ou suspeitas em camarões.

Tabela 2: Amostras a serem coletadas e respectivas formas de envio de acordo com diferentes doenças ou suspeitas.

Doença/ Enfermidade	Amostra	Forma de Envio	Item manual
Doença da Mancha Branca (WSSV)	Camarões inteiros*, pleópodes e brânquias	Fixadas Para Histopatologia	4.1.1.
		Fixadas em Etanol 70-95%	4.2.1.
		Congeladas	4.2.2.
Necrose Hipodérmica e Hematopoiética Infecciosa (IHHNV)	Camarões inteiros*, pleópodes e brânquias	Fixadas Para Histopatologia	4.1.1.
		Fixadas em Etanol 70-95%	4.2.1.
		Congeladas	4.2.2.
Mionecrose Infecciosa (IMNV)	Camarões inteiros* ou tecido abdominal	Fixadas Para Histopatologia	4.1.1.
		Fixadas em Etanol 70-95%	4.2.1.
		Congeladas	4.2.2.
Síndrome Taura (TSV), Doença da Cabeça Amarela (YHV) e Doença da Cauda Branca (MrNV ou XSV)	Camarões inteiros*	Fixadas Para Histopatologia	4.1.1.
		Fixadas em Etanol 70-95%	4.2.1.
		Congeladas	4.2.2.
Doenças Bacterianas	Camarões inteiros*	Fixadas Para Histopatologia	4.1.1.
		Resfriadas	4.3.1.
Surto atípicos com alta mortalidade, doenças nova ou em caso de dúvida	Camarões inteiros*	Fixadas Para Histopatologia	4.1.1.
		Fixadas em Etanol 70-95%	4.2.1.
		Congeladas	4.2.2.
		Resfriadas	4.3.1.

* Larvas, pós-larvas, juvenis e adultos.

5. COLETA E REMESSA DE MATERIAL PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS DE MOLUSCOS BIVALVES

As amostras de moluscos deverão ser remetidas ao laboratório preferencialmente vivas. Caso a distância entre o local da coleta e o laboratório impossibilite o transporte dessas “*in natura*”, as mesmas poderão ser transportadas em gelo, porém não congeladas (conforme as orientações a seguir).

Considerando que, no âmbito da RENAQUA, a metodologia analítica de eleição para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias dos moluscos são as técnicas moleculares – PCR, PCR em tempo real e PCR+RFLP (“restriction fragment length polymorphism”).

5.1. ENVIO DE AMOSTRAS PARA DIAGNÓSTICO POR PCR, PCR EM TEMPO REAL E PCR+RFLP

As amostras selecionadas devem ser manipuladas e acondicionadas com cuidado, uma vez que o potencial de contaminação cruzada entre amostras é grande.

A fim de evitar a contaminação da amostra, deverão ser utilizados recipientes estéreis (saco plástico, frasco para coleta de amostras e similares). A etiqueta (referente a cada conjunto de amostras) utilizada para identificação deve ser resistente à água e acondicionada dentro de cada embalagem ou recipiente. Para identificação dos dados da amostra na etiqueta deverá ser utilizado lápis ou caneta que não se dissolva em etanol, o qual é utilizado como fixador da amostra.

Os possíveis métodos para a preservação e transporte de amostras para testes moleculares são:

5.1.1. AMOSTRA VIVA RESFRIADA OU REFRIGERADA

Método de eleição para coleta de amostras que possam ser transportadas rapidamente para o laboratório, em até 24 horas após a coleta.

1. Selecionar as amostras de acordo com o propósito de amostragem;

2. Embalar as amostras em saco plástico devidamente etiquetado e fechado (embalagem primária);
3. Em seguida colocar as amostras em nova embalagem plástica (embalagem secundária), essa por sua vez, lacrada.
4. Colocar as amostras no interior de uma caixa isotérmica sobre uma camada de gelo de aproximadamente 10 cm e, após o acondicionamento de todas as amostras, cobrir com gelo triturado (camada de 20 cm de gelo);
5. Fechar a caixa isotérmica, vedar com fita adesiva, identificar e prontamente remeter ao laboratório. O respectivo formulário epidemiológico poderá ser enviado no interior da caixa, dentro de um saco plástico vedado e colado na tampa;
6. Fazer a reposição do gelo a cada 8 a 10 horas de transporte;

5.1.2. AMOSTRA INTEIRA CONGELADA

Método de eleição para coleta de amostras quando o tempo de transporte entre o local da coleta e o laboratório for superior a 24 horas.

1. Selecionar as amostras de acordo com o propósito de amostragem;
2. Congelar as amostras em freezer doméstico ou similar a - 20°C, por 24 horas;
3. Embalar as amostras em saco plástico devidamente etiquetado e fechado (embalagem primária);
4. Em seguida colocar as amostras em nova embalagem plástica (embalagem secundária), essa por sua vez, lacrada;

5. Colocar as amostras no interior de uma caixa isotérmica sobre uma camada de gelo de aproximadamente 10 cm e, após o acondicionamento de todas as amostras, cobrir com gelo triturado (camada de 20 cm de gelo);
6. Fechar a caixa isotérmica, vedar com fita adesiva, identificar e prontamente remeter ao laboratório. O respectivo formulário epidemiológico poderá ser enviado no interior da caixa, dentro de um saco plástico vedado e colado na tampa;
7. Fazer a reposição do gelo a cada 8 a 10 horas de transporte;

5.1.3. AMOSTRAS CONSERVADAS EM ETANOL

Método de eleição para amostras coletadas em regiões nas quais o acondicionamento e remessa das amostras congeladas sejam inviáveis.

1. Selecionar as amostras de acordo com o propósito de amostragem;
2. Imersão de moluscos inteiros (quando as amostras forem pequenas) e tecidos retirados de moluscos maiores deverão ser imersos em um recipiente (embalagem primária);
3. Preencher o recipiente com as amostras com solução de etanol não desnaturado 95 a 99%, com objetivo de conservar a amostra durante o transporte até o laboratório;
4. Identificar a embalagem primária com etiqueta contendo os dados da amostra;
5. Em seguida colocar as amostras em nova embalagem plástica (embalagem secundária), essa por sua vez, lacrada.
6. Colocar as amostras no interior de uma caixa para transporte;
7. Fechar a caixa, vedar com fita adesiva, identificar e prontamente remeter ao laboratório. O respectivo formulário epidemiológico poderá ser enviado no interior da caixa, dentro de um saco plástico vedado e colado na tampa.

Tabela 3: Amostras a serem coletadas e respectivas formas de envio de acordo com diferentes doenças ou suspeitas.

Doença/ Enfermidade	Amostra	Forma de Envio	Item manual
Abalone herpes-like virus (AbHV)	Molusco inteiro ou tecidos retirados de moluscos maiores	Amostra viva resfriada ou refrigerada	5.1.1.
		Congeladas	5.1.2.
		Fixadas em Etanol 95-99%	5.1.3.
Infecção por <i>Bonamia exitiosa</i>	Molusco inteiro ou tecidos retirados de moluscos maiores	Amostra viva resfriada ou refrigerada	5.1.1.
		Congeladas	5.1.2.
		Fixadas em Etanol 95-99%	5.1.3.
Infecção por <i>Bonamia ostreae</i>	Molusco inteiro ou tecidos retirados de moluscos maiores	Amostra viva resfriada ou refrigerada	5.1.1.
		Congeladas	5.1.2.
		Fixadas em Etanol 95-99%	5.1.3.
Infecção por <i>Marteilia refringens</i>	Molusco inteiro ou tecidos retirados de moluscos maiores	Amostra viva resfriada ou refrigerada	5.1.1.
		Congeladas	5.1.2.
		Fixadas em Etanol 95-99%	5.1.3.
Infecção por <i>Perkinsus marinus</i>	Molusco inteiro ou tecidos retirados de moluscos maiores	Amostra viva resfriada ou refrigerada	5.1.1.
		Congeladas	5.1.2.

		Fixadas em Etanol 95-99%	5.1.3.
Infecção por <i>Perkinsus olseni</i>	Molusco Inteiro ou tecidos retirados de moluscos maiores	Amostra viva resfriada ou refrigerada	5.1.1.
		Congeladas	5.1.2.
		Fixadas em Etanol 95-99%	5.1.3.
Infecção por <i>Xenohaliotis californiensis</i>	Molusco inteiro ou tecidos retirados de moluscos maiores	Amostra viva resfriada ou refrigerada	5.1.1.
		Congeladas	5.1.2.
		Fixadas em Etanol 95-99%	5.1.3.

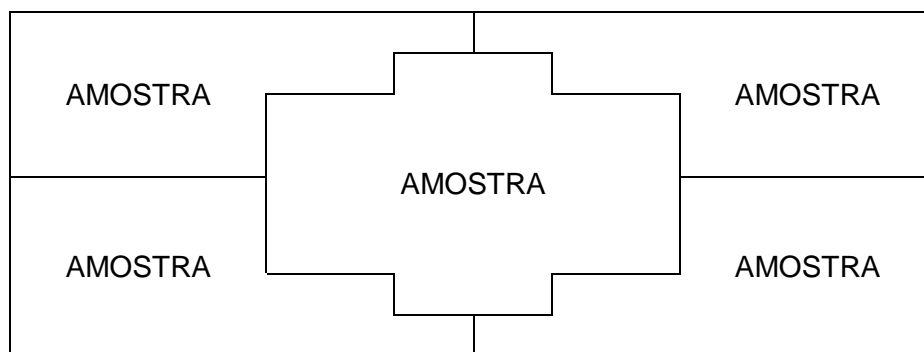
6. AMOSTRAGEM

A amostra será definida com base em fatores como o intervalo de confiança utilizado e o tamanho das populações em uma determinada unidade epidemiológica, doenças-alvo e espécies analisadas.

Durante a seleção das amostras deverão ser priorizados os animais com sintomatologia clínica aparente.

Quando houver o aumento da mortalidade em um tanque, viveiro, propriedade, área aquícola ou unidade epidemiológica, sem o correspondente aparecimento de animais com sintomas de doença, deverão ser amostrados os indivíduos aparentemente saudáveis de forma aleatória. Abrangendo, quando possível, as bordas ou pontas e o centro dos tanques, viveiros, “long-line” etc. Segue abaixo o exemplo:

EXEMPLO: Coleta aleatória de cinco amostras em um tanque de piscicultura.



6.1. NÚMERO DE AMOSTRAS

O número mínimo de amostras a ser coletado por unidade epidemiológica suspeita será de 29 amostras, independente do número de tanques da propriedade sendo essas divididas dentre o número de tanques, viveiros ou “long-lines” presentes nessa unidade.

Como exemplo, segue abaixo um quadro com as amostras conforme o número de tanques, viveiros ou “long-lines”.

Número de tanques, viveiros ou “long-lines”.	Número de amostras por tanques, viveiros ou “long-lines”.
1	31
2	16
3	11
4	8
5	7
10	4
15	3
20	2
25	2
30	2
40	2
50	2
100	1

Fonte: CGSAP/DEMOC/SEMOC/MPA e Anexo .

O cálculo para definição da amostragem em casos de investigação de suspeita de foco de doenças em animais aquáticos utilizado nesse Manual não deve ser utilizado para demais estudos epidemiológicos, tendo em vista o caráter específico do mesmo para a situação abordada por esse Manual.

O número de amostras poderá ser alterado a critério da CGSAP e do AQUAEPI, com base nas características epidemiológicas das doenças de animais aquáticos e demais informações.

7. ANATOMIA BÁSICA DOS ANIMAIS AQUÁTICOS

7.1. ANATOMIA BÁSICA DE PEIXES

Peixes são vertebrados aquáticos que possuem a capacidade de adaptação da sua temperatura corporal, de acordo com a do meio em que se encontram e realizam a respiração por meio de trocas gasosas com a água, geralmente promovidas pelas brânquias.

Algumas espécies pseudopulmonadas possuem adaptações que permitem a respiração aérea. Esses peixes possuem um pulmão especializado que não apresenta brônquios, sendo capaz de extrair oxigênio diretamente do ar atmosférico.

Seus formatos anatômicos variam de acordo com as condições ambientais em que vivem, sendo a mais comum a fusiforme (melhor hidrodinâmica na locomoção).

Normalmente apresentam simetria bilateral e se locomovem em sentido longitudinal, sendo que a nadadeira caudal funciona como o principal apêndice locomotor.

7.1.1. ANATOMIA EXTERNA

O corpo dos peixes possui três regiões anatômicas distintas, a cabeça, o tronco e a cauda. A cabeça estende-se da boca até a região branquial, o tronco vai até o orifício anal, onde a cauda inicia-se.

A boca é rodeada pelos maxilares superior e inferior. Os olhos não possuem pálpebras, portanto não se fecham, porém são recobertos por uma película transparente que tem por objetivo a proteção desses.

De cada lado da cabeça, entre os olhos e a boca, situam-se dois orifícios interligados às narinas (essas possuindo função olfativa). Caudalmente aos olhos localiza-se uma placa óssea chamada opérculo que tem por função recobrir a cavidade branquial.

Levantando-se o opérculo é possível observar as brânquias. Cada brânquia é formada por um arco branquial, sendo duas brânquias de cada lado da cabeça. Entre as brânquias encontram-se as fendas branquiais, por onde a água passa durante a respiração.

As nadadeiras normalmente apresentam-se em sete ou oito, dividindo-se em pares e ímpares, sendo duas peitorais, duas pélvicas, a dorsal (que pode ser bifurcada), a anal, a caudal e a adiposa, quando presente.

O esqueleto é basicamente composto por tecidos ósseos e/ou cartilagosos, promovendo a sustentação dos músculos e demais órgãos do corpo. Divide-se em exoesqueleto, constituído pelas escamas (quando presentes) e endoesqueleto constituído pelas estruturas da cabeça, coluna vertebral, nadadeiras e tubos internos do corpo, como as brânquias que possuem arcos ósseos ou cartilagosos entre as suas aberturas.

7.1.2. ANATOMIA INTERNA

O coração dos peixes localiza-se imediatamente atrás das brânquias e é constituído por duas cavidades, sendo um átrio e um ventrículo. O sistema circulatório é do tipo fechado de circulação simples, ou seja, a cada ciclo completo pelo corpo o sangue somente passa pelo coração uma vez. O sangue que chega ao coração é venoso, oriundo da circulação pelo corpo, que então segue para as brânquias para oxigenação.

Os peixes apresentam rins pronéfricos (presentes em alevinos e excretores de amônia) e mesonéfricos (encontrados em indivíduos adultos tanto ósseos quanto cartilagosos e excretores de ureia).

Os rins, nos indivíduos adultos, apresentam-se como duas massas com aspecto avermelhado, paralelas e dispostas longitudinalmente junto à coluna vertebral.

Geralmente os ureteres, ao saírem dos rins, unem-se formando um ducto único que desemboca na bexiga urinária ou diretamente no orifício urogenital, dependendo da espécie. Adicionalmente, o rim apresenta tecido hematopoiético, responsável pela produção de eritropoetina por células intersticiais peritubulares, e função imunológica, promovendo a interação imuno-endócrina, atuando na produção de anticorpos e de catecolaminas.

O tubo digestivo se inicia na boca e termina no orifício anal, podendo ser dividido em três partes: intestino cefálico ou anterior (cavidade buco-faríngea), intestino médio e intestino posterior.

Enquanto no intestino cefálico localizam-se a boca e faringe, no intestino médio encontram-se o esôfago e estômago. O tipo de estômago pode variar conforme os hábitos alimentares dos peixes, podendo apresentar formato alongado (carnívoros – se alimenta de outros animais), formato de saco (onívoros – ingerem diversos tipos de alimentos) e mesmo uma estrutura similar a uma moela, no caso dos iliófagos (se alimentam de detritos e sedimentos). No intestino posterior localiza-se o intestino “de fato”.

Os peixes ainda apresentam o fígado situado dentro da cavidade celomática (cavidade única para diversos órgãos, similar à cavidade torácica e abdominal), separado da cavidade pericárdica por um septo transversal. Esse apresenta formatos diversos

entre diferentes espécies, possuindo coloração escura, tendo como anexo à vesícula biliar.

7.2. ANATOMIA BÁSICA DE CRUSTÁCEOS

7.2.1. ANATOMIA EXTERNA

Os crustáceos possuem um exoesqueleto de quitina e seu corpo encontra-se dividido em duas partes: cefalotórax e abdômen.

O cefalotórax representa a fusão entre a cabeça e tórax (dividido em rostrum e carapaça), comum entre os crustáceos.

Tipicamente apresentam dois pares de antenas: as antênulas, que possuem função quimiorreceptora, e as antenas, que funcionam como sensores táteis para detecção de predadores e alimentos.

Os olhos são compostos e apresentam-se em par, um de cada lado do rostrum. Apresentado nas fêmeas, correlação com ao período reprodutivo, tendo em vista o período reprodutivo foto negativo.

Próximos à boca encontram-se os maxilípedes, utilizados para manipulação e apreensão de alimentos.

Locomovem-se no fundo por meio dos periópodos que se inserem ventralmente no cefalotórax e se apresentam em pares bilaterais.

Já no abdômen, é possível identificar a presença de segmentos contrativos que possuem função locomotora para, por exemplo, auxiliar no escape de predadores.

Inseridos ventralmente no abdômen encontram-se os pleópodos, que tem função locomotora na natação dos indivíduos e ainda reprodutiva, no caso das fêmeas que mantêm os ovos aderidos nessa estrutura para proteção e incubação durante os estágios iniciais de desenvolvimento.

Na parte caudal do abdômen, encontra-se a cauda, dividida em urópodos e télson, ambos sendo estruturas que auxiliam na natação, todavia o primeiro tem função de direcionar o indivíduo, enquanto o segundo está ligado à locomoção em natação.

7.2.2. ANATOMIA INTERNA

São animais que apresentam um aparelho digestivo completo, dessa forma esse sistema é composto por:

- Região oral (Boca): função de apreensão do alimento;
- Estômago: Composto pelo proventrículo e esôfago;
- Intestino médio, anterior ou delgado;
- Intestino grosso ou posterior;
- Ânus.

Anexos ao sistema digestório dos crustáceos encontram-se o ceco hepático anterior e o ceco posterior, que tem por função receber o conteúdo do intestino médio e iniciar a reabsorção de água e nutrientes.

Por fim, o sistema digestivo apresenta um hepatopâncreas com função de produção de enzimas e proteínas relacionadas com os processos de catabolismo e metabolismo fisiológico.

Os crustáceos possuem em seu sistema circulatório a hemolinfa, que é constituída por uma fração celular, os hemócitos, e uma fração humoral, composta por plasma. Os hemócitos circulantes realizam o transporte e armazenamento de lipoproteínas e aminoácidos, a coagulação e a defesa imunológica, dentre outras.

Esses animais apresentam um sistema circulatório aberto, ou seja, a hemolinfa encontra distribuída entre os órgãos internos no hemocélio (hemocélio é o sistema de cavidades e vasos existentes entre os órgãos), sendo então bombeada para dentro e fora do coração.

Os resíduos metabólicos, recolhidos pela hemolinfa e presentes nas hemoceles, são excretados pelas glândulas verdes ou antenais, presentes no cefalotórax e que se abrem nos poros excretores, localizados perto das inserções das antenas.

A respiração dos crustáceos é branquial. As brânquias são projeções plumosas da parede do corpo, localizadas ao longo de cada lado do tórax e se encarregam de realizar as trocas gasosas.

7.3. ANATOMIA BÁSICA DE MOLUSCOS

7.3.1. ANATOMIA EXTERNA

Os moluscos bivalves se caracterizam essencialmente por possuírem um corpo envolvido por duas conchas ou valvas, articuladas em sua porção dorsal por um ligamento córneo.

O formato da concha é variável e depende do ambiente e alimentação. Geralmente, a concha inferior ou esquerda é maior e mais côncava, enquanto a concha superior ou direita é mais plana. Em uma das extremidades existe uma protuberância denominada umbo, local onde as valvas se encontram unidas pelo ligamento. ANATOMIA INTERNA

Outra estrutura presente nesses animais é o músculo adutor, que se encontra aderido às conchas, sendo responsável pelo fechamento das mesmas.

Este músculo atua contra a pressão exercida pelo ligamento e, quando relaxado, promove a abertura das conchas.

As brânquias são filamentosas e responsáveis pela respiração e filtração de alimentos. As partículas de alimento retidas nos filamentos branquiais são conduzidas através de batimentos ciliares até os palpos labiais e posteriormente à boca.

O manto é a camada de tecido que recobre o corpo, com exceção da região do músculo adutor. A borda do manto é responsável pelo controle do fluxo de água que passa pelo interior do organismo.

A boca é conectada ao estômago por um curto esôfago. A partir do estômago, o alimento segue para os divertículos digestivos e posteriormente para o intestino. O intestino termina no ânus, que se localiza na câmara cloacal, próximo ao músculo adutor.

O sistema circulatório é do tipo aberto, composto por veias, artérias, coração, pericárdio e seios tissulares, por onde circula a hemolinfa.

ANEXO 1 - FORMULÁRIO PADRÃO

Cont.

Identificação de amostra	Espécie	Sintomas (S / N)	Local de origem	Tipo de conservação	Número do lacre	Data/hora da coleta

04. Responsável pela coleta

Nome:	Telefone/e-mail:
Órgão:	Carimbo e assinatura:
Cargo/matricula:	

05. Envio das amostras

Destino das amostras:	Meio de envio:
Responsável pelo envio:	Empresa responsável:
Órgão:	Contato:
Contato:	Código de rastreamento:
Data/hora de envio:	Observações:
Carimbo e assinatura:	

06. Recebimento das amostras

Responsável pelo recebimento:	Data/hora de chegada das amostras:
Órgão:	Carimbo e assinatura:
Contato:	
Observações:	

ANEXO 2 - CÁLCULO DA AMOSTRAGEM

Cálculo da Amostragem

O cálculo utilizado para determinação do tamanho da amostra teve por objetivo a detecção da presença de doença em uma dada população (ou seja, sem o objetivo de quantificá-la) tendo sido utilizada, discricionariamente, a prevalência esperada igual a 10%, considerando o caráter endêmico e/ou desconhecido da maioria das doenças de animais aquáticos no país.

O nível de confiança é responsável pela mensuração do quão confiante o valor encontrado está próximo do real. Usualmente, o valor mais usado e recomendado para estudos de prevalência pela OIE é 95% (0,95).

Na amostragem recomendada nesse Manual, os parâmetros considerados foram: população “infinita”, sensibilidade do teste de diagnóstico igual a 95%, nível de confiança de 95% e prevalência esperada de 10%.

Contudo para esse cálculo foi utilizada a ferramenta “EpiTools” (freeware) da empresa “AusVet Animal Health Services”, na qual é possível determinar o tamanho da amostragem para identificação da presença de doenças utilizando amostras em pool, no endereço eletrônico: <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=PPFreedom>.

Todavia, o cálculo do tamanho de amostra adequado pode ser definido aplicando-se a fórmula abaixo, considerando a sensibilidade do teste de diagnóstico utilizado e o tamanho finito conhecido da população.

Por exemplo, o número de animais doentes na população pode ser determinado pela prevalência (real ou esperada), ou seja, para uma prevalência esperada de 10% (0,10) e uma população de 1.000 animais, o número de animais doentes esperados será de 100 animais.

$$n = \frac{(1 - (1 - \alpha)^{\frac{1}{D}})(N - \frac{1}{2} * (Se * D - 1))}{Se}$$

Onde:

n= tamanho da amostra calculado

α = nível de confiança

D= número de animais doentes na população

N= tamanho da população

Se= sensibilidade do teste diagnóstico