

MANUAL DE COLETA

AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE BIOMARCADORES E
PARASITOS MONOGENOIDES DE PEIXES EM PISCICULTURAS



CLIDILENE NOGUEIRA DE ALENCAR MIRANDA
DÉBORA MARTINS SILVA SANTOS

CLIDILENE NOGUEIRA DE ALENCAR MIRANDA
DÉBORA MARTINS SILVA SANTOS

**MANUAL DE COLETA DE AMOSTRAS PARA
ANÁLISE DE BIOMARCADORES E PARASITOS
MONOGENOIDES DE PEIXES EM PISCICULTURAS**

São Luís
2025

ELABORAÇÃO

Clidilene Nogueira de Alencar Miranda

Médica Veterinária

Doutoranda em Defesa Sanitária Animal – UEMA

Fiscal Estadual Agropecuário – AGED-MA

Prof^ª. Dr^ª Débora Martins Silva Santos

Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

REVISÃO

Dr^ª Tânia Maria Duarte Silva

M.Sc. Ítallo Cristian da Silva de Oliveira

Verdson Frazão Ferreira

DIAGRAMAÇÃO

Bruna Lages Veloso

EDITOR RESPONSÁVEL

Jeanne Ferreira de Sousa da Silva

CONSELHO EDITORIAL

Alan Kardec Gomes Pachêco Filho

Ana Lucia Abreu Silva

Ana Lúcia Cunha Duarte

Cynthia Carvalho Martins

Eduardo Aurélio Barros Aguiar

Emanoel Cesar Pires de Assis

Denise Maia Pereira

Fabiola Hesketh de Oliveira

Helciane de Fátima Abreu Araújo

Helidacy Maria Muniz Corrêa

Jackson Ronie Sá da Silva

José Roberto Pereira de Sousa

José Sampaio de Mattos Jr

Luiz Carlos Araújo dos Santos

Marcos Aurélio Saquet

Maria Medianeira de Souza

Maria Claudene Barros

Rosa Elizabeth Acevedo Marin

Wilma Peres Costa



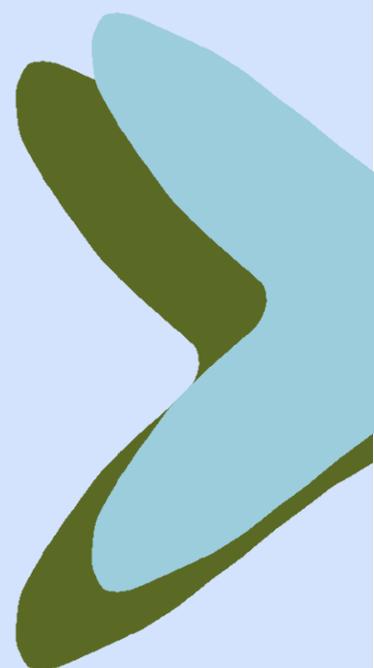
Uema
UNIVERSIDADE ESTADUAL
DO MARANHÃO



PPGPDSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROFISSIONAL
DEFESA SANITÁRIA ANIMAL



LABIOAQUA
Laboratório de Biologia e Ambiente Aquático





Editora
Uema

Miranda, Clidilene Nogueira de Alencar

Manual de Coleta de amostras para análise de biomarcadores e parasitos monogenoides de peixes em pisciculturas. / Clidilene Nogueira de Alencar Miranda, Débora Martins Silva Santos. - São Luís, 2025.

35 f

ISBN: 978-85-8227-569-6

1.Manual 2. Biomarcadores 3. Parasitos monogenoides. I. Santos, Débora Martins Silva

II. Titulo

CDU: 639.3.09(035)

Elaborado por Cássia Diniz - CRB 13/910

SIGLAS E DEFINIÇÕES

PNSAA - Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos de Cultivo

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura

MAPA - Ministério da Agricultura e Pecuária

SVO - Serviço Veterinário Oficial

AGED – Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

ULSAV – Unidade Local de Sanidade Animal e Vegetal

Amostra Oficial - Amostra coletada por servidor público do SVO, em exercício do Órgão de Defesa Agropecuária.

Coleta Oficial - Procedimento de recolhimento de material ou substância para análise, executado por servidor público do SVO.

Sistema de Defesa Sanitária Animal - conjunto de ações, políticas, normas e procedimentos implementados para proteger e promover a saúde dos animais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. ORGANIZAÇÃO DO MATERIAL DE COLETA	7
2.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS PARA COLETA E REMESSA DE AMOSTRAS	7
2.1.1 Equipamentos de proteção individual (EPIs).....	7
2.1.2 Equipamentos para captura e transporte dos peixes	9
2.1.3 Material para coleta de sangue para análise de micronúcleo e alterações nucleares.....	12
2.1.4 Material para coleta de órgãos-alvo (brânquias, fígado e rim)	13
2.1.4.1 Para análise histológica.....	13
2.1.4.2 Para pesquisa de parasitos monogenoides em brânquias	15
2.2 PONTO DE COLETA NA PROPRIEDADE	16
3 PROCEDIMENTOS DE EUTANÁSIA DOS PEIXES	17
3.1 MÉTODOS QUÍMICOS: ANESTÉSICOS	17
3.2 MÉTODOS FÍSICOS.....	18
4. PROCEDIMENTOS DE COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	20
4.1 COLETA DE SANGUE PARA PESQUISA DE MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES NUCLEARES ERITROCÍTICAS.....	20
4.2 COLETA DE PARASITOS MONOGENOIDES NAS BRÂNQUIAS.....	22
4.3 PARA PESQUISA DE BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS	23
5 REMESSA DE MATERIAL BIOLÓGICO	26
5.1 MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA	27
5.2 MATERIAL PARA PESQUISA DE PARASITOS MONOGENOIDES	27
5.3 PARA PESQUISA DE MICRONÚCLEO E OUTRAS ALTERAÇÕES ERITROCÍTICAS	28
6. DOCUMENTAÇÃO PARA ACOMPANHAMENTO DA AMOSTRA	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXO I - Formulário de coleta e envio de amostras	30
APÊNDICE A.....	32
APÊNDICE B	33
APÊNDICE C	33
APÊNDICE D	34

CONTEXTUALIZAÇÃO

O Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos de Cultivo (PNSAA) foi instituído pela Instrução Normativa nº 4, de 04 de fevereiro de 2015, do extinto Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e atualizado pela IN nº 4, de 28 de fevereiro de 2019 do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e tem como finalidade assegurar a prevenção, o controle e a erradicação de doenças nos sistemas de produção de animais aquáticos (Brasil, 2015).

As ações do PNSAA são executadas pelo Serviço Veterinário Oficial (SVO) dos estados da federação e envolvem dentre outras atribuições, a implementação de medidas preventivas de problemas sanitários nas pisciculturas, que envolvem diretamente a manutenção da qualidade da água (ambiente hídrico). Nesse contexto, a pesquisa de biomarcadores e ectoparasitos monogenoídeos em peixes configura-se como uma metodologia eficaz para avaliação da saúde dos peixes e da qualidade ambiental.

A análise de amostras de tecidos de órgãos como brânquias, fígado e rins, aliada à investigação de monogenoídeos, permite identificar alterações patológicas associadas a estressores diversos, incluindo infecções parasitárias e poluentes químicos. Essas abordagens não apenas ajudam no diagnóstico de problemas vinculados à sanidade, mas também informam as práticas de manejo para melhorar o bem-estar dos peixes e a produtividade da piscicultura.

A inclusão dessas análises nas ações de vigilância agropecuária permite a detecção precoce de ocorrências sanitárias, viabilizando a adoção de medidas corretivas e a redução de morbidade e mortalidade nos cultivos.

1. INTRODUÇÃO

Biomarcadores são respostas biológicas mensuráveis que indicam exposição a agentes estressores, podendo representar adaptações ou alterações funcionais significativas. Segundo Decaprio (1997), esses marcadores podem refletir desde respostas adaptativas até perturbações fisiológicas severas. Van der Oost *et al.* (2003) definem biomarcadores como alterações bioquímicas, celulares, fisiológicas ou comportamentais observáveis em tecidos ou fluidos corporais, que indicam a presença de poluentes químicos.

Ectoparasitos monogenoides também atuam como bioindicadores sensíveis das condições ambientais nas pisciculturas, estando associados a práticas inadequadas de manejo, como alta densidade de estocagem e baixa qualidade da água. Surto desses parasitos podem comprometer a produção e representar risco à segurança dos alimentos.

A adequada coleta e conservação de amostras biológicas é essencial para garantir resultados laboratoriais confiáveis. Procedimentos incorretos podem inviabilizar as análises, gerar prejuízos aos piscicultores e desperdiçar recursos públicos aplicados nas ações do SVO.

Este manual tem por objetivo orientar equipes técnicas dos Órgãos de Defesa Agropecuária e demais profissionais sobre os procedimentos de coleta de sangue e órgãos de peixes (brânquias, fígado e rins) destinados a análises laboratoriais. A iniciativa integra o monitoramento sanitário e ambiental das pisciculturas de cultivo.

O conteúdo está organizado de forma a abranger os materiais e equipamentos indispensáveis à realização das coletas, incluindo aqueles necessários antes, durante e após o procedimento, bem como os métodos de eutanásia recomendados. Em seguida, são descritos os procedimentos técnicos relativos à coleta, ao acondicionamento e ao envio das amostras, considerando as especificidades de cada tipo de análise. Por fim, apresenta-se um modelo de formulário padronizado, destinado ao registro e à rastreabilidade das amostras, desde a propriedade de origem até o laboratório de referência.

2. ORGANIZAÇÃO DO MATERIAL DE COLETA

A equipe técnica responsável pela coleta deve reunir e organizar, com antecedência, todos os materiais necessários para a realização do procedimento, incluindo equipamentos de proteção individual (EPIs), materiais para coleta, preparo, acondicionamento, identificação das amostras e formulários de encaminhamento.

Considerando que a piscicultura é uma atividade dinâmica e cíclica, recomenda-se uma visita prévia à propriedade para reconhecimento da área e levantamento de informações relevantes, como: histórico recente de enfermidades ou alterações comportamentais dos peixes, número de tanques ou viveiros em operação, espécies cultivadas, disponibilidade de equipamentos (redes de pesca, puçás) e materiais (caixas térmicas, baldes), bem como a definição do local onde ocorrerão os procedimentos.

É igualmente importante esclarecer ao produtor ou responsável os objetivos da coleta e os benefícios do biomonitoramento sanitário e ambiental realizado pelo Órgão de Defesa Agropecuária, enquanto estratégia de vigilância epidemiológica ativa voltada à promoção da sanidade aquícola.

2.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS PARA COLETA E REMESSA DE AMOSTRAS

2.1.1 Equipamentos de proteção individual (EPIs)

Os equipamentos de proteção individual são dispositivos, instrumentos ou vestimentas destinados a eliminar ou minimizar riscos à saúde e à segurança do usuário durante a execução de determinada atividade.

No contexto da coleta de amostras oficiais, os EPIs têm a dupla função de proteger o profissional responsável pela coleta e de evitar contaminações ou alterações nas características físicas, químicas ou microbiológicas das amostras.

A seguir, estão listados alguns EPIs indispensáveis para a coleta de material biológico (Figura 1) proveniente de peixes:

- **Luvras de procedimentos descartáveis** – Devem permitir o isolamento entre as mãos do responsável pela coleta e a amostra biológica;
- **Luvras de borracha** – Impermeáveis, que facilitam a manipulação dos peixes;
- **Botas de borracha** – Devem ser impermeáveis e de fácil higienização;
- **Avental** – Confeccionado com material resistente à água e demais líquidos;

- **Jaleco ou macacão** – Deve proteger o vestuário do técnico responsável pela coleta;
- **Máscara descartável e óculos de proteção** – Devem evitar o contato acidental de material biológico, fixadores ou outras substâncias químicas com olhos e boca;
- **Colete salva-vidas** – Destinado à prevenção de afogamentos em situações em que a equipe necessite utilizar embarcações durante os procedimentos nos tanques ou viveiros das pisciculturas.

Figura 1 — Tipos de EPIs: A) Jaleco descartável e avental impermeável; B) Botas e luvas de borracha; C) Óculos, máscara de proteção e luvas nitrílicas descartáveis.



Fonte: A autora (2024).

2.1.2 Equipamentos para captura e transporte dos peixes

Os peixes devem ser capturados e contidos com o uso de equipamentos que permitam sua apreensão com o mínimo possível de estresse, como redes de arrasto (Figura 2), tarrafas ou puçás (Figura 3), adequados ao porte dos animais e, preferencialmente, pertencentes ao próprio estabelecimento aquícola.

Como sugestão de tamanhos:

- Para alevinos e juvenis - puçá ou passaguá de pesca pequeno (medidas: 1 m de comprimento mínimo, aro de 40 x 50 cm e malha de 12 mm).
- Para peixes adultos - puçá ou passaguá de pesca grande (medidas: 1,50 m de comprimento mínimo, aro de 40 x 50 cm e malha de 35mm).

Figura 2 — Rede de arrasto para captura de peixes de maior tamanho.



Fonte: A autora (2024).

Figura 3 — Puçá para coleta de peixes menores.



Fonte: A autora (2024).

Para o transporte dos peixes dos tanques ou viveiros até o local da propriedade definido como ponto de coleta, os animais devem ser mantidos vivos em recipientes (Figura 4) contendo água com temperatura e níveis de oxigênio compatíveis com o ambiente de origem.

Podem ser utilizados os seguintes utensílios:

- Recipientes plásticos (caixas, baldes);
- Caixas d'água, com capacidade de 500L;
- Tanques com sistema de aeração portátil, no caso das pisciculturas mais tecnificadas.

Figura 4 — Caixa d'água para a manutenção dos peixes vivos até a realização das coletas.



Fonte: A autora (2024).

Para facilitar a manipulação dos peixes e garantir melhor aderência, recomenda-se o uso de luvas de borracha impermeáveis (Figura 5).

Figura 5 — Contenção de tilápia (*Oreochromis niloticus*) com uso de luvas de borracha.



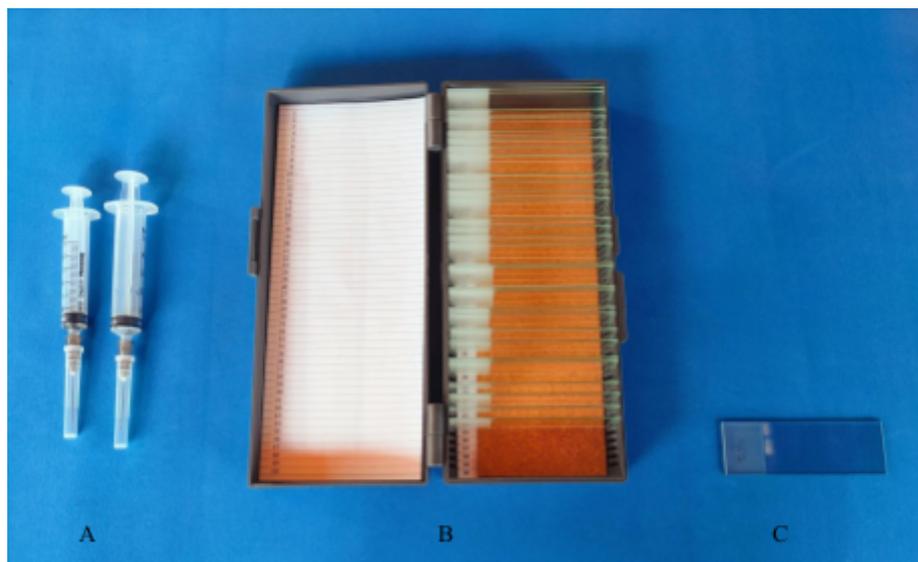
Fonte: A autora (2024).

2.1.3 Material para coleta de sangue para análise de micronúcleo e alterações nucleares

Para a coleta de sangue destinada à análise de micronúcleos e alterações nucleares em peixes, recomenda-se a utilização dos seguintes materiais:

- Seringas hipodérmicas (3 mL) e agulhas (22G X 1) – para a punção caudal (Figura 6A);
- EDTA (1 frasco) – anticoagulante utilizado para conservação das amostras sanguíneas;
- Porta lâminas – com capacidade para até 160 lâminas (Figura 6B);
- Lâminas de vidro para microscopia – para confecção dos esfregaços sanguíneos (Figura 6C);
- Panos – utilizados para vedação ocular e melhoria da contenção dos peixes durante o procedimento (Figura 7);
- Tábua de apoio – confeccionada em material de fácil higienização, para posicionamento do peixe durante a coleta;
- Formulário de coleta – para registro e encaminhamento da amostra ao laboratório;
- Lápis dermatográfico ou equivalente – para identificação das lâminas de microscopia;
- Recipientes para descarte de materiais perfurocortantes;
- Materiais para higienização de material cirúrgico (detergente; esponja abrasiva).

Figura 6 — A) Material para coleta de sangue (seringas e agulhas); B) Porta lâminas; C) Lâminas de vidro para microscopia.



Fonte: A autora (2024).

Figura 7 — Utensílios para posicionamento (tábua de corte) e contenção do peixe (pano umedecido sobre a cabeça) para a coleta de sangue.



Fonte: A autora (2024).

2.1.4 Material para coleta de órgãos-alvo (brânquias, fígado e rim)

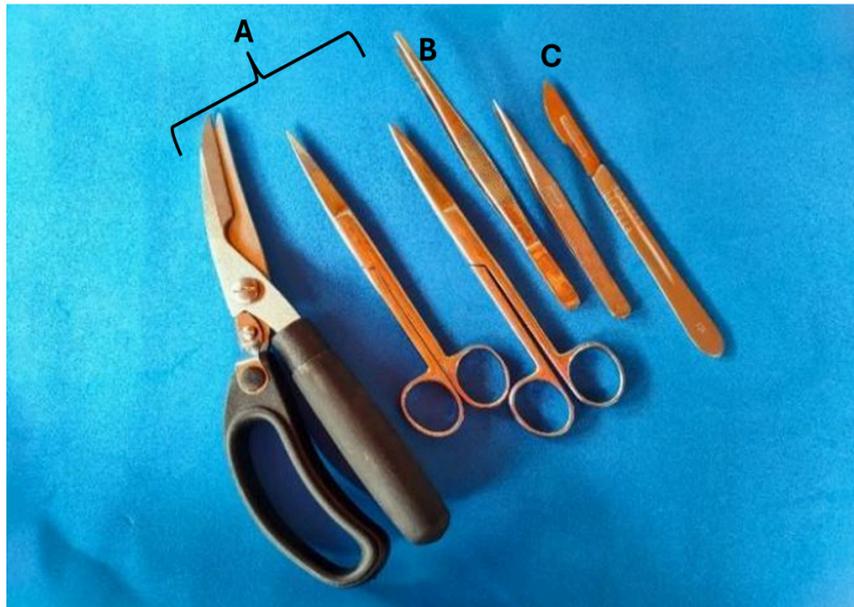
2.1.4.1 Para análise histológica

Para a coleta de órgãos destinados à análise histológica, recomenda-se o uso dos seguintes materiais:

- Tesouras cirúrgicas do tipo romba/fina - 3 unidades (Figura 8A);
- Pinças anatômicas e do tipo dente de rato – 3 unidades, utilizadas para dissecação (Figura 8B);
- Cabos de bisturi (3 unidades) e lâminas estéreis descartáveis – em quantidade suficiente (Figura 8C);
- Panos – utilizados para contenção dos peixes durante o procedimento (Figura 9);
- Tábua de apoio – confeccionada em material de fácil higienização, para posicionamento do peixe durante a coleta (Figura 9);
- Frascos de vidro ou plástico com tampa vedante – para conservação e fixação dos órgãos (Figura 10);

- Solução de formol a 10% – volume mínimo de 2 litros (Figura 10);
- Etiquetas impermeáveis e caneta marcadora – para identificação segura das amostras;
- Formulário de coleta – para registro das informações da amostra e encaminhamento ao laboratório.

Figura 8 — Materiais de uso cirúrgico (tesouras e pinças) para remoção de fragmentos de órgãos de peixes.



Fonte: A autora (2024).

Figura 9 — Tábua para posicionamento do peixe e instrumentos para coleta de amostras e contenção (pano).



Fonte: A autora (2024).

Figura 10 — Frascos coletores para conservação das amostras (órgãos), com substância fixadora (formol a 10%).



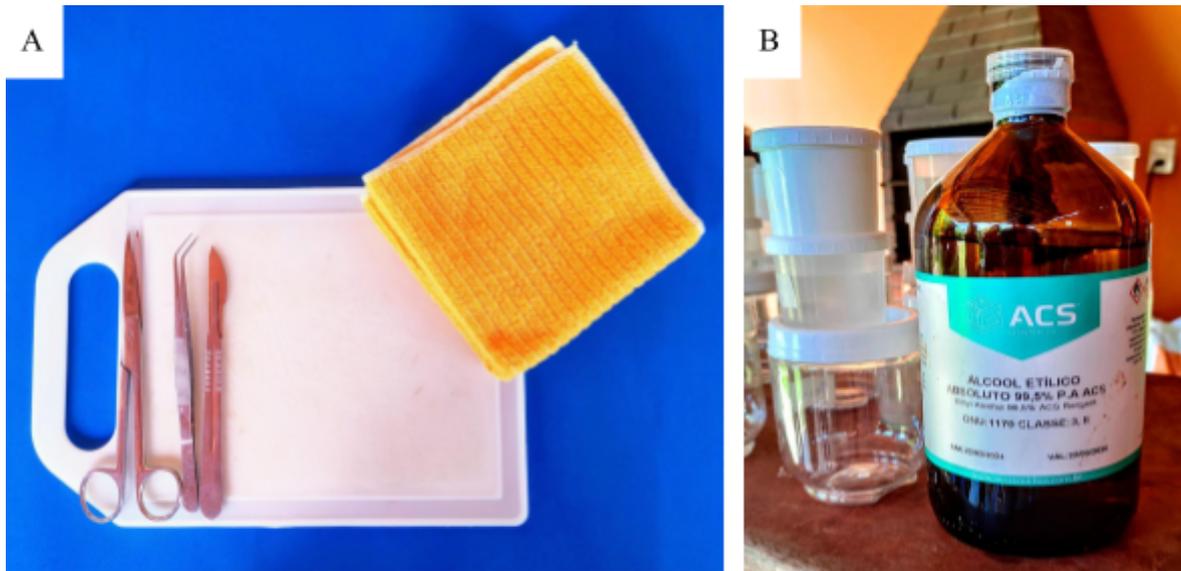
Fonte: A autora (2024).

2.1.4.2 Para pesquisa de parasitos monogenoides em brânquias

- Lâminas para bisturi estéreis (várias);
- Cabo para bisturi (03 unidades);
- Tesouras cirúrgicas (03 unidades);
- Pinças (03 unidades) – do tipo anatômica e dente de rato para dissecação;
- Tábuas ou bandejas higienizadas (02 unidades) (Figura 11A);
- Frascos de vidro ou plástico para conservação e fixação dos órgãos, com tampa vedante;
- Etiquetas impermeáveis e caneta marcadora;
- Termômetro;
- Garrafa térmica (para manutenção da água aquecida);
- Aquecedor elétrico portátil (para aquecimento da água);
- Álcool etílico absoluto 99,5% ou formol a 10% (02 L)¹ (Figura 11B).

¹ A escolha da substância fixadora depende da finalidade da análise. Para estudo morfológico, genético, e molecular, as literaturas recomendam o uso do álcool etílico para a preservação do DNA do parasito, e para as análises morfológicas (taxonomia), recomenda-se o uso do formol a 10%.

Figura 11 — A) Utensílios para coleta de amostras em peixes; B) Recipientes para acondicionar as amostras de brânquias e substância fixadora (álcool etílico).

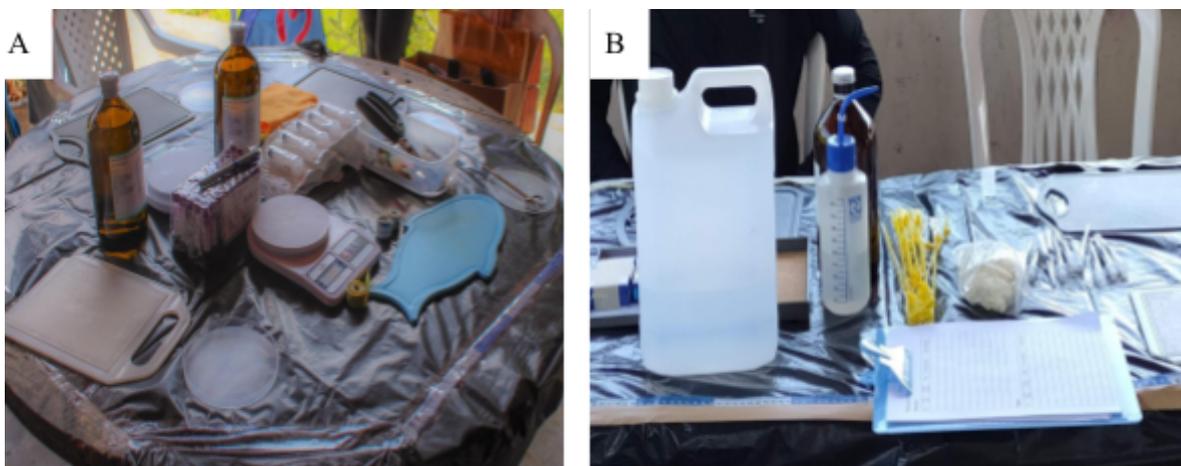


Fonte: A autora (2024).

2.2 PONTO DE COLETA NA PROPRIEDADE

Para facilitar a execução dos procedimentos, recomenda-se, se possível, que seja selecionado um local na propriedade com sombra, mesa e cadeiras para organização dos equipamentos e materiais que serão utilizados pela equipe técnica responsável pela coleta (Figura 12AB).

Figura 12 — Procedimento de organização dos materiais de coleta em diferentes pisciculturas.



Fonte: A autora (2024).

3 PROCEDIMENTOS DE EUTANÁSIA DOS PEIXES

Para a realização da coleta de órgãos, os peixes devem ser insensibilizados e eutanasiados. Os métodos de eutanásia em estudos de biomarcadores devem garantir a integridade das amostras e minimizar o estresse e a dor dos animais. A escolha do método depende do tamanho da espécie, do objetivo do estudo, das normas éticas e das condições disponíveis no momento da coleta do material. Seguem abaixo, algumas recomendações de métodos e materiais utilizados para a eutanásia de peixes:

3.1 MÉTODOS QUÍMICOS: ANESTÉSICOS

Os anestésicos são métodos recomendados de eutanásia em estudos de biomarcadores histológicos, por causarem a perda rápida de consciência, com mínimo estresse, preservando a integridade celular. A eutanásia é obtida por imersão dos peixes em solução anestésica em caixas plásticas ou local próprio para essa finalidade na propriedade² (Brasil, 2018). Deve-se observar a dosagem indicada pelo fabricante e, quando necessário, a diluição dos anestésicos, como o eugenol. Exemplos de substâncias que podem ser utilizadas incluem:

- **Benzocaína**

- Dose recomendada: 40 a 100 mg/L.
- Vantagens: Barato e eficiente.
- Cuidados: Necessário preparo da solução e controle do tempo de exposição.

- **Eugenol (óleo de cravo)**

- Dose recomendada: 20-53 mg/L³
- Deve ser previamente diluído em álcool etílico a 95% (proporção de 1:20)
- Vantagens: Alternativa natural e de fácil aquisição.
- Cuidados: Concentrações inadequadas podem causar estresse celular.

Após o peixe atingir o estágio anestésico profundo, deve ser aplicada uma sobredose letal para eutanásia completa. Este método é recomendado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e indicado para preservação histológica adequada das amostras.

² Resolução Normativa CONCEA nº 37, de 15 de fevereiro de 2018.

³ Boijink *et al.* (2017); Cavali *et al.* (2020).

Em peixes, nos casos de incompatibilidade experimental, impossibilidade de uso de métodos que possam interferir nos resultados da pesquisa e quando o uso de anestésicos não for possível, o método físico deve assegurar rápida perda de consciência e, conseqüentemente, o óbito.

3.2 MÉTODOS FÍSICOS

Os métodos físicos são aceitos com restrições pelo CONCEA, sendo utilizados em situações específicas, especialmente para peixes de médio e maior porte, ou quando não há disponibilidade de anestésicos. Devem ser realizados por técnicos experientes para evitar sofrimento dos animais. Exemplos de materiais utilizados em alguns métodos físicos:

Para a concussão cerebral (percussão):

Bastões ou martelos de borracha - instrumentos contundentes para aplicação de golpe rápido e preciso na região craniana, são indicados para peixes de médio a grande porte (Figura 13).

Figura 13 — Martelo de borracha para concussão cerebral em peixes.



Fonte: A autora (2024).

Para a decapitação:

- Facas;
- Tesouras (Figura 14).

A decapitação é indicada para peixes pequenos e médios. Tem a vantagem de preservar tecidos para análises histológicas, desde que as amostras sejam imersas em substâncias fixadoras logo após o procedimento.

Figura 14 — Tesoura multiuso de cozinha para decapitação de peixes menores.



Fonte: A autora (2024).

Para a secção da medula espinhal:

Instrumentos pontiagudos: facas, tesouras, bisturis (Figura 15).

Esse procedimento pode ser utilizado como complementar a outros métodos de eutanásia como a concussão, decapitação ou choque térmico (imersão em gelo) para evitar qualquer possibilidade de consciência residual e, assim assegurar a morte do peixe.

Figura 15 — Secção da medula espinhal em tilápia (*Oreochromis niloticus*) com uso de bisturi.



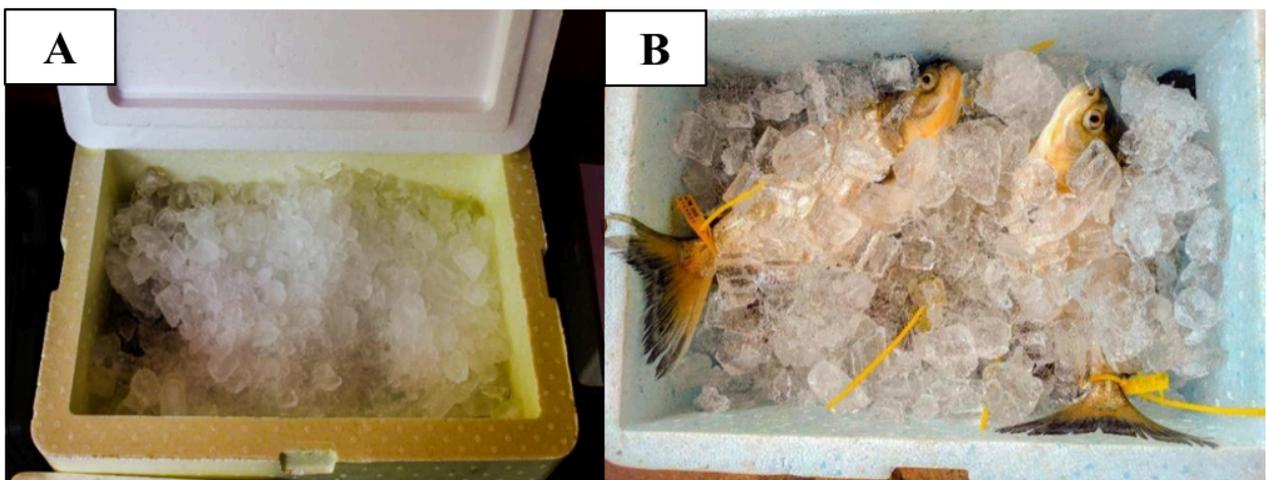
Fonte: A autora (2024).

Para o choque térmico (imersão em gelo):

- Recipientes adequados (caixas térmicas) com volume proporcional à quantidade e tamanho dos peixes, abastecidos com gelo e água (0-4°C);
- Termômetro para controle de temperatura.

Para a obtenção do choque térmico, recomenda-se a imersão dos peixes em água com gelo (Figura 16), mantendo a temperatura entre 0 e 4°C por 10 a 20 minutos. Esse método é indicado exclusivamente para espécies de peixes estenotérmicos tropicais e subtropicais de pequeno porte, resultando na perda de consciência e morte por hipotermia. As principais vantagens dessa técnica são sua simplicidade, baixo custo e rapidez relativa, especialmente para espécies tropicais mais sensíveis ao choque térmico. No entanto, a água utilizada na mistura com o gelo deve estar limpa, e a temperatura precisa ser rigorosamente controlada para evitar sofrimento aos peixes.

Figura 16 — A) Método físico (imersão em água e gelo) para insensibilização e eutanásia de peixes; B) Tambaquis (*Colossoma macropomum*) eutanasiados por imersão em água e gelo.



Fonte: A autora (2024).

4 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

4.1 COLETA DE SANGUE PARA PESQUISA DE MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES NUCLEARES ERITROCÍTICAS

A coleta de sangue deve ser realizada em animais vivos por meio de punção caudal (Figura 17), utilizando uma seringa com agulha previamente umedecida com EDTA a 10%

(anticoagulante). Este procedimento minimiza a coagulação do sangue e assegura a qualidade da amostra para análise. Recomenda-se coletar cerca de 0,5 mL de sangue de cada peixe. Para a confecção dos esfregaços sanguíneos, utiliza-se uma gota de sangue de cada exemplar, que será aplicada em triplicata. As etapas do procedimento são as seguintes:

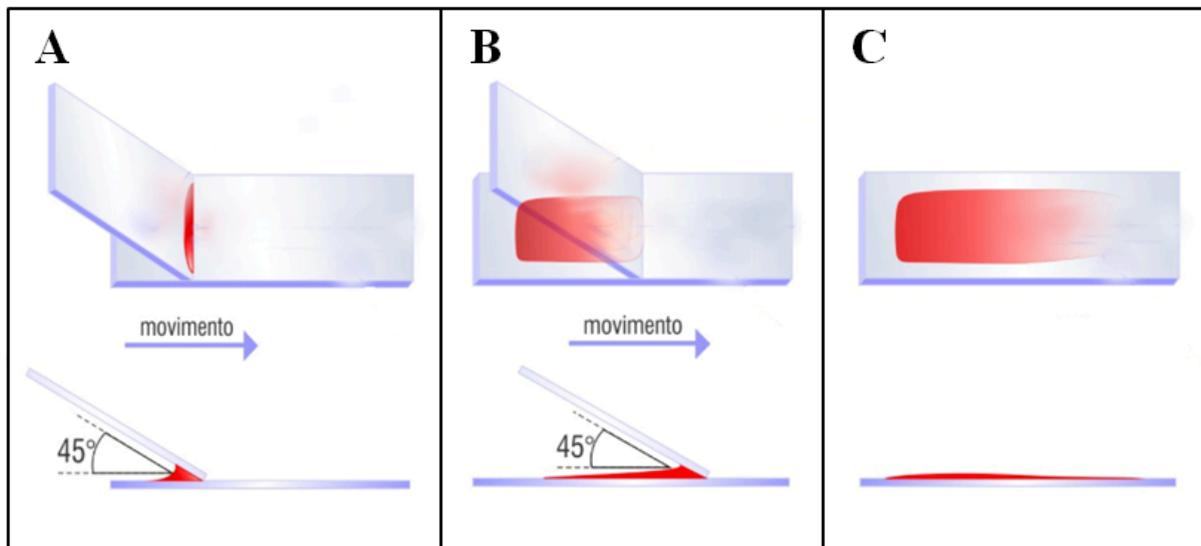
- Posicionar a primeira lâmina com a gota de sangue sobre uma superfície fixa;
- Com a outra mão, segurar uma segunda lâmina (para espalhamento) em um ângulo de aproximadamente 45 graus (Figura 18A);
- Tocar a segunda lâmina na gota de sangue para que ela se espalhe ao longo de sua borda.
- Em um movimento rápido e uniforme, deslizar a lâmina de espalhamento para frente ao longo da superfície da lâmina com a gota (Figura 18B), criando uma camada fina de sangue (Figura 18C);
- Outras recomendações: o esfregaço deve ter uma extremidade fina (com um "bico de pena") para melhor avaliação das células; deve-se evitar pressionar demais a lâmina de espalhamento para não esmagar as células e certificar-se de que o sangue está espalhado de forma uniforme e sem bolhas;
- Caso não seja possível realizar os esfregaços no local da coleta, o sangue pode ser armazenado em tubos heparinizados e encaminhado ao laboratório para a execução do procedimento.

Figura 17 — Procedimento de coleta de sangue por punção caudal em tambaqui (*Colossoma macropomum*).



Fonte: A autora (2024).

Figura 18 — Etapas de preparo de esfregaço sanguíneo após a coleta de sangue. A) e B) Posicionamento das lâminas em angulação de 45°; C) Camada fina de sangue, após deslizamento da lâmina de espalhamento.



Fonte: Adaptado de VLab, (2014).

4.2 COLETA DE PARASITOS MONOGENOIDES NAS BRÂNQUIAS

Após realizada a eutanásia dos peixes para a pesquisa de parasitos monogenoides nas brânquias devem ser realizados os seguintes procedimentos:

- 1) Levantar a estrutura que recobre as brânquias, chamada de opérculo, para expô-las e retirá-las com cuidado (Figura 19A);
- 2) Em seguida, separar cada parte das brânquias, chamada de arco branquial (Figura 19B);
- 3) Colocar toda a brânquia que foi separada em um recipiente coletor (frasco ou vidro de boca larga) e banhá-la com água aquecida a 60°C (Figura 19C), agitar o frasco com movimentos leves e, após 30 minutos, completar com o álcool etílico absoluto a 99,5% (Figura 19D);
- 4) Identificar os frascos com etiquetas impermeáveis, contendo o código de identificação do peixe, o local e a data da coleta, além do tipo de tecido.

Figura 19 — **A)** Retirada do opérculo para a remoção da brânquia; **B)** Brânquia removida; **C)** Separação da brânquia em frasco coletor com água aquecida; **D)** Imersão da brânquia em substância fixadora (álcool etílico).



Fonte: A autora (2024).

4.3 PARA PESQUISA DE BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS

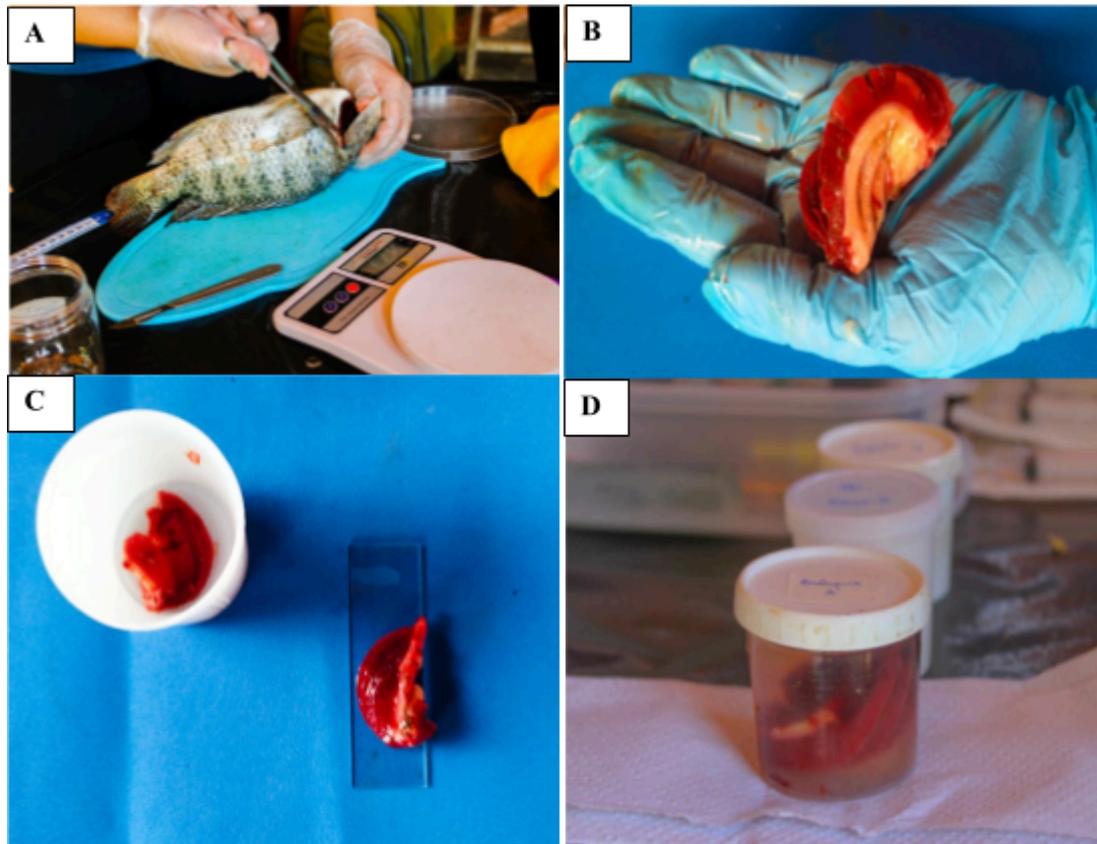
Após a eutanásia, deve-se proceder à coleta de brânquias, fígado e rim (órgãos-alvo de predileção) que deverão ser acondicionados em frascos identificados, contendo formol a 10%, e encaminhados ao laboratório para análise histológica.

4.3.1 Brânquias

- 1) Levantar a estrutura que recobre as brânquias, chamada de opérculo, para expô-las e retirá-las com cuidado (Figura 20A);
- 2) Em seguida, separar cada parte das brânquias, chamada de arco branquial (Figura 20B);

- 3) Colocar toda a brânquia que foi separada em um recipiente coletor (frasco ou vidro de boca larga) (Figura 20C) e completar com o formol a 10% (Figura 20D);
- 4) Identificar os frascos com etiquetas impermeáveis, contendo o código de identificação do peixe, o local e a data da coleta, além do tipo de tecido.

Figura 20 — **A)** Retirada do opérculo para a remoção da brânquia. **B)** Brânquia removida. **C)** Separação da brânquia em frasco coletor. **D)** Imersão das brânquias em substância fixadora (formol a 10%).



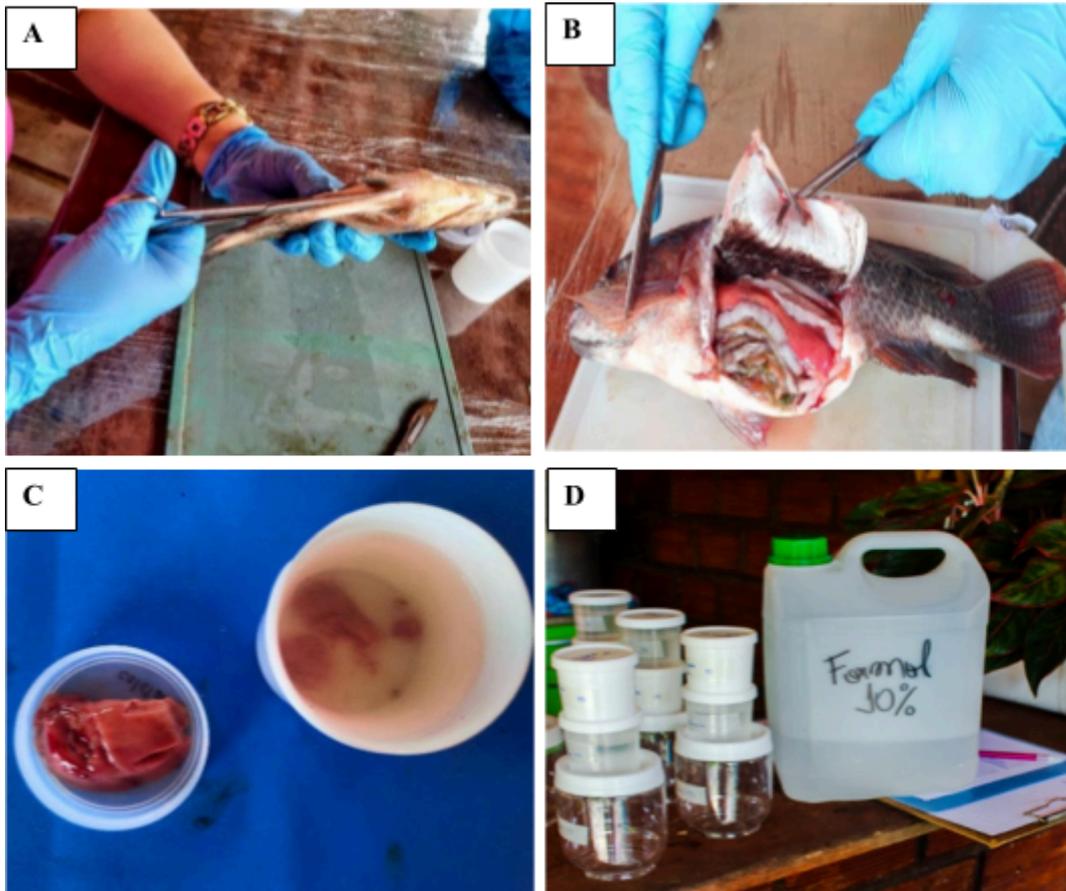
Fonte: A autora (2024).

4.3.2 Fígado

- 1) Posicionar o peixe em decúbito lateral sobre a bandeja de dissecação ou da tábua de corte;
- 2) Com o uso de tesoura ou bisturi, acessar a cavidade abdominal. Fazer uma incisão na linha ventral (do ânus até o início da cavidade opercular), evitando cortes profundos que possam danificar órgãos internos, como o tubo digestivo (Figura 21A);
- 3) Localizar o fígado (Figura 21B), que se encontra próximo ao tubo digestivo, geralmente de coloração avermelhada a marrom, de consistência macia;

- 4) Retirar um fragmento do fígado usando bisturi ou tesoura estéril e adicionar o fragmento ao frasco (Figura 21C) contendo volume de solução fixadora (formol a 10%) (Figura 21D);
- 5) Identificar os frascos com etiquetas impermeáveis, contendo o código de identificação do peixe, o local e a data da coleta, além do tipo de tecido.

Figura 21 — **A)** Abertura da cavidade abdominal; **B)** Exposição das vísceras para localização e extração do fígado; **C)** Separação de fragmentos do fígado; **D)** Frascos coletores com substância fixadora (formol a 10%).



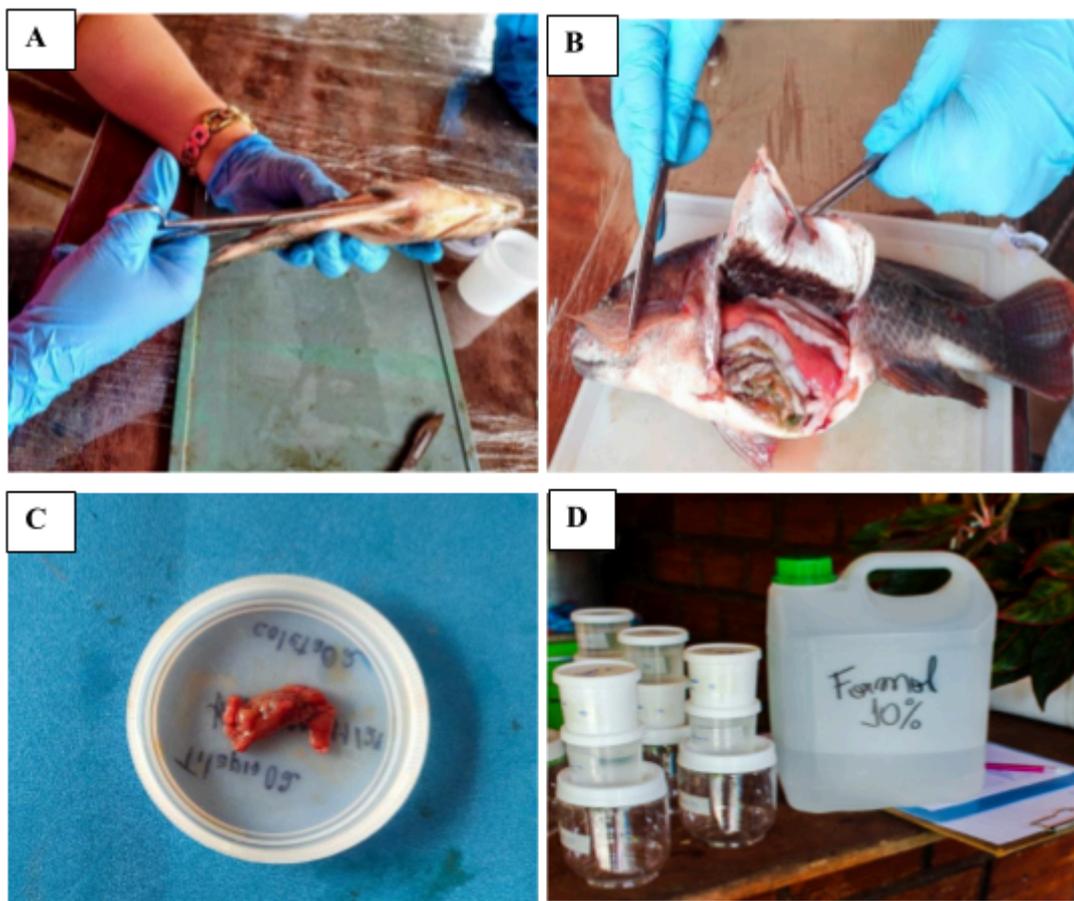
Fonte: A autora (2024).

4.3.3 Rim

- 1) Posicionar o peixe em decúbito lateral sobre a bandeja de dissecação ou da tábua de corte;
- 2) Com o uso do bisturi, acessar a cavidade abdominal. Fazer uma incisão na linha ventral (do ânus até o início da cavidade opercular), evitando cortes profundos que possam danificar órgãos internos, como o tubo digestivo (Figura 22A);

- 3) Localizar o órgão, que se apresenta como duas massas com coloração marrom avermelhada a cinza, paralelas e dispostas longitudinalmente, ventral à coluna vertebral (Figura 22B);
- 4) Usar pinça anatômica para expor cuidadosamente o rim, evitando danos ao órgão;
- 5) Remover um fragmento do órgão (Figura 22C);
- 6) Adicionar o fragmento ao frasco (recipiente coletor) contendo volume de solução fixadora (formol a 10%). O órgão deve ficar imerso na solução (Figura 22D);
- 7) Identificar os frascos com etiquetas impermeáveis, contendo o código de identificação do peixe, o local e a data da coleta, além do tipo de tecido.

Figura 22 — A) Abertura da cavidade abdominal; B) Exposição das vísceras para localização e extração dos rins; C) Separação de fragmentos dos rins; D) Frascos coletores com substância fixadora (formol a 10%).



Fonte: A autora (2024).

5 REMESSA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Para assegurar a integridade das amostras durante o transporte, recomenda-se:

- 1) Verificar a vedação dos frascos: certificar-se de que todos os frascos estejam devidamente fechados para evitar vazamentos;
- 2) Utilizar embalagem secundária impermeável: colocar os frascos em uma embalagem secundária à prova de vazamentos;
- 3) Empregar caixa térmica protegida da luz: transportar as amostras em uma caixa térmica que as proteja da luz direta.

5.1 MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para garantir a preservação ideal de amostras histológicas, recomenda-se:

- 1) **Acondicionamento:** As amostras devem ser mantidas em solução fixadora por um período entre 24 e 72 horas, dependendo do tamanho da amostra. Períodos de fixação inferiores a 6 horas podem resultar em fixação inadequada, comprometendo a integridade do tecido. Por outro lado, tempos de fixação superiores a 72 horas podem levar ao endurecimento excessivo do tecido, tornando-o friável e dificultando o processamento subsequente.
- 2) **Transporte:** As amostras podem ser armazenadas e transportadas em temperatura ambiente. No entanto, é fundamental que o ambiente de armazenamento seja fresco, seco e protegido da luz direta, para preservar a integridade das amostras e evitar degradação.

5.2 MATERIAL PARA PESQUISA DE PARASITOS MONOGENOIDES⁴

Para o transporte de amostras de brânquias de peixes visando a pesquisa de parasitos, como monogenoides, recomenda-se o seguinte procedimento:

- 1) **Acondicionamento:** Após a coleta, as brânquias devem ser fixadas em álcool etílico a 99,5% para preservar a integridade dos parasitos.

⁴ Adaptado de:

JERÔNIMO, G. T.; MARTINS, M. L.; ISHIKAWA M. M.; VENTURA A.S.; TAVARES-DIAS, M. **Métodos para coleta de parasitos de peixes**. Circular Técnica. Embrapa. Macapá 2011; 39: 1-6.

JERÔNIMO, G. T.et al. **Manual para coleta de parasitos em peixes de cultivo**. Brasília, DF: Embrapa, 2012.

- 2) **Transporte:** As amostras fixadas podem ser transportadas à temperatura ambiente, desde que protegidas da luz direta, a fim de preservar a integridade dos tecidos e parasitos.
- 3) **Tempo de transporte:** As amostras devem ser enviadas ao laboratório o mais rapidamente possível, preferencialmente dentro de 24 horas após a coleta. Se o transporte imediato não for viável, as amostras devem ser mantidas refrigeradas entre 2°C e 8°C para retardar processos de degradação.

5.3 PARA PESQUISA DE MICRONÚCLEO E OUTRAS ALTERAÇÕES ERITROCÍTICAS

Para a pesquisa de micronúcleos e outras alterações eritrocíticas, recomenda-se que, caso o esfregaço de sangue não seja realizado imediatamente após a coleta, as amostras de sangue sejam mantidas e transportadas sob refrigeração entre 2°C e 8°C.

É importante ressaltar que o tempo entre a coleta e o processamento das amostras deve ser minimizado. As amostras devem ser processadas, de preferência, dentro de 24 horas após a coleta. Se o processamento imediato não for possível, a refrigeração adequada é essencial para manter a qualidade das amostras. Essa prática preserva a integridade celular e a viabilidade das amostras para análises posteriores.

6 DOCUMENTAÇÃO PARA ACOMPANHAMENTO DA AMOSTRA ⁵

As amostras devem ser encaminhadas ao laboratório acompanhadas de documentação com dados de identificação do material coletado, do proprietário e da propriedade de origem.

Para padronizar as informações e orientar a ação laboratorial, está disponível no Anexo deste manual, um modelo de Formulário de Coleta e Envio de Amostras que poderá ser adotado pelo Órgão de Defesa Agropecuário do Estado, a AGED/MA.

Nas coletas oficiais, o Formulário de Coleta e Envio de Amostras deve ser preenchido e assinado pelo fiscal estadual agropecuário responsável pelo procedimento. O preenchimento poderá ser realizado eletronicamente ou com letra legível e sem rasura.

⁵ 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

REFERÊNCIAS

- BOIJINK, C. L.; MACIEL, P. O.; TAVARES-DIAS, M.; IWASHITA, M. K. P.; MORAIS, M. S.; HIDE, D. M. V.; SOUZA, N. C.; COUTO, M. V. S.; MENESES, J. O.; CUNHA, F. S.; FUJIMOTO, R. Y. Anesthesia by sprinkling method in the gills of tambaqui *Colossoma macropomum* does not influence intensity and morphology of monogeneans. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 2, p. 367-371, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1519-6984.15915>>. Acesso em: 21 ago. 2022.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Coleta, acondicionamento, transporte, recepção e destinação de amostras para análises laboratoriais no âmbito do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária: Guia nº 19/2019 – versão 3**. Brasília: ANVISA, 2022.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrutivo para coleta, preparo, acondicionamento e remessa ao laboratório de amostras oficiais de peixes do MAPA**. Brasília: MAPA, 2024.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 155, n. 36, p. 5, 22 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-37-de-15-de-fevereiro-de-2018.pdf/view>>. Acesso em: 19 abr. 2021.
- CAVALI, J.; LIMA, T. O.; PORTO, M. O.; FERREIRA, E.; NUNES, N. N. S. Eugenol dosages in the anesthetic induction of Amazonian Tambaqui under different temperatures. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 2, p. 8631-8643, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n2-248>>. Acesso em: 21 ago. 2022.
- DECAPRIO, A. P. Biomarkers: comino of age for environmental health and risk assessment. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 1937-1948, 1997. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/es960920a>>. Acesso em: 15 jan. 2024.
- JERÔNIMO, G. T.; MARTINS, M. L.; ISHIKAWA M. M.; VENTURA A.S.; TAVARES-DIAS, M. **Métodos para coleta de parasitos de peixes**. Circular Técnica. Embrapa. Macapá 2011; 39: 1-6.
- JERÔNIMO, G. T. et al. **Manual para coleta de parasitos em peixes de cultivo**. Brasília, DF: Embrapa, 2012.
- 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
- VAN DER OOST, R.; J. BEYER.; N. P. E. VERMEULEN. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003

Cont.

Página 2 de 2

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

03. Análise (s) requerida (s)

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:	

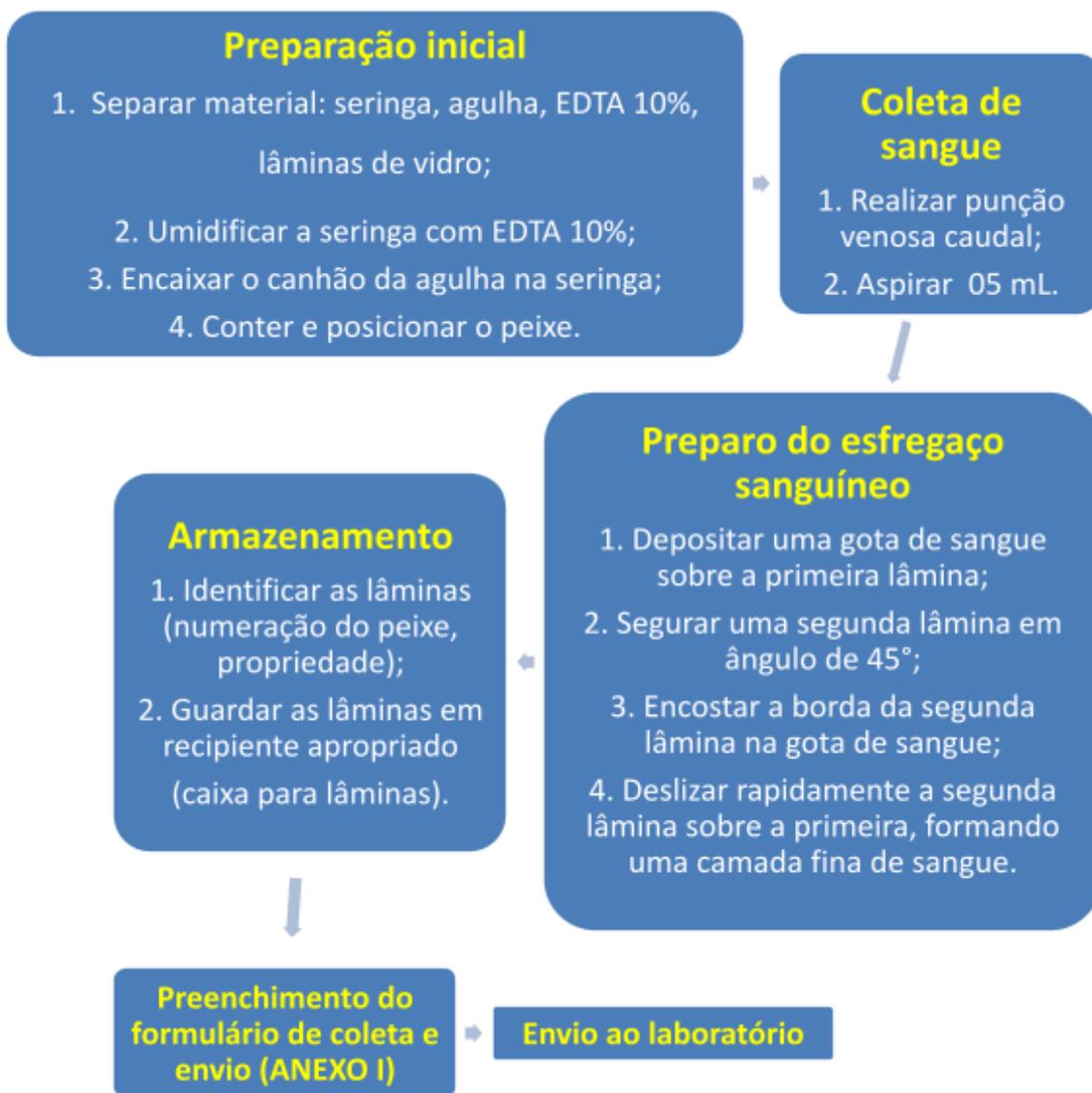
06. Recebimento das amostras	
Responsável pelo recebimento:	Data/hora de chegada das amostras:
Órgão:	Carimbo e assinatura:
Contato:	
Observações:	

1ª via – Laboratório

2ª via – ULSAV

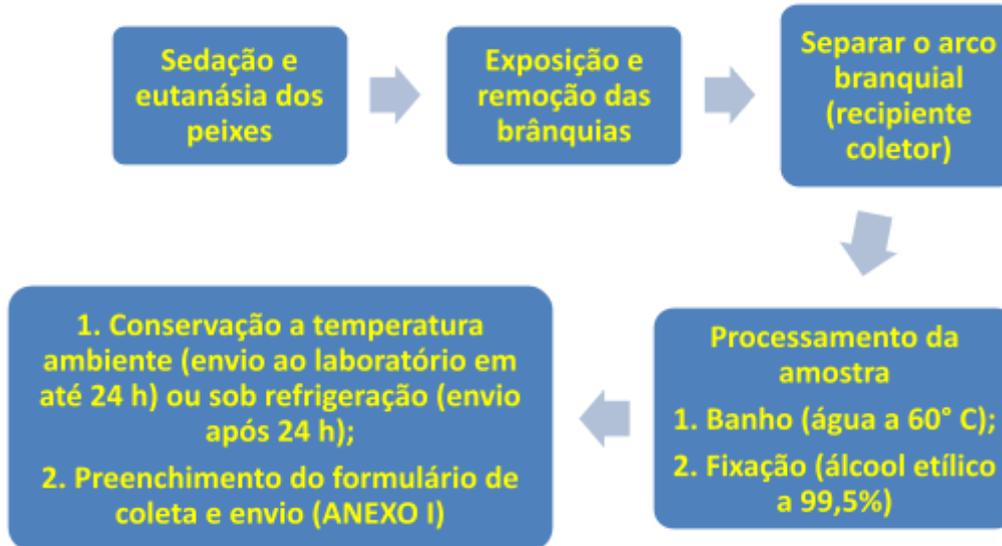
Fonte: MPA (2013)

APÊNDICE A - Procedimentos de campo para pesquisa de micronúcleos e alterações nucleares eritrocíticas



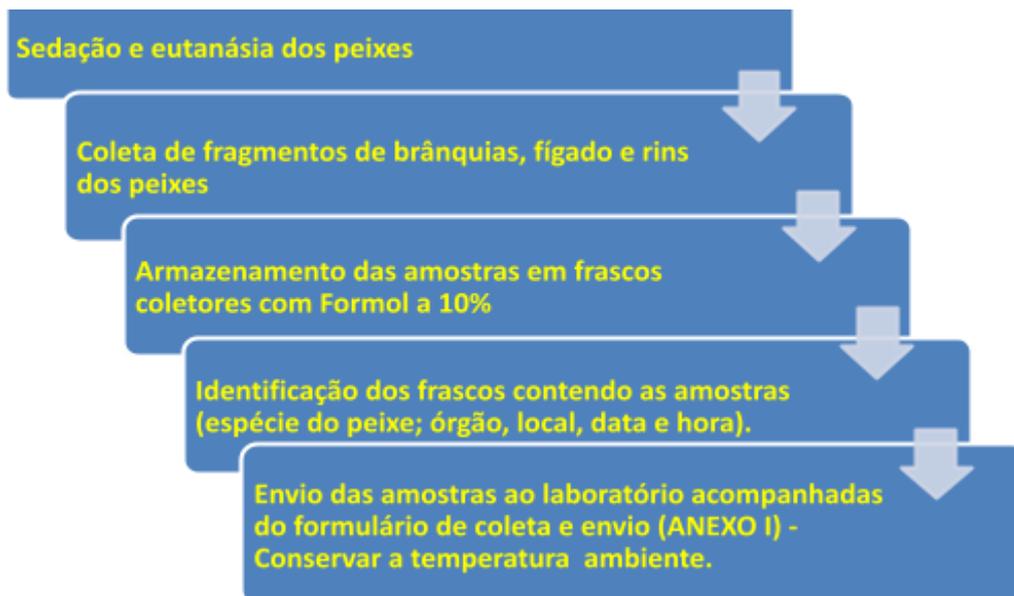
Fonte: A autora (2024)

APÊNDICE B - Procedimentos de campo para coleta de parasitos monogenoides em brânquias de peixes



Fonte: A autora (2024)

APÊNDICE C - Coleta de fragmentos de brânquias, fígado e rins de peixes para pesquisa de biomarcadores histológicos



Fonte: A autora (2024)

APÊNDICE D - Check list do material para coleta (pesquisa de biomarcadores e de parasitos monogenoides)

1. Relação dos materiais para atividade de campo

1.1 Sedação e eutanásia (química)

- Frasco de eugenol;
- Álcool etílico a 99,5%.

1.2 Sedação e eutanásia (física)

- Água tratada;
- Gelo;
- Termômetro

1.3 Micronúcleo

- Lâminas (03 lâminas por peixe) - 120 lâminas;
- Seringas - 40 unidades;
- Agulhas hipodérmicas 0,70mm x 30mm - 22G X 1 - 40 unidades;
- Porta-lâminas.

1.4 Parasitos monogenoides

- Frascos de vidro ou plástico com tampa vedante;
- Garrafa térmica para conservação da água em temperatura de 60°C;
- Lâminas para bisturi;
- Tesouras;
- Pinças;
- Aquecedor elétrico portátil;
- Álcool etílico a 99,5%.

1.5 Histologia

- Frascos de vidro ou plástico com tampa vedante;
- Cabos de bisturi (05 unidades);
- Lâminas para bisturi;
- Tesouras;

- Pinças;
- Formol a 10%.

1.6 Outros materiais

- Luvas;
- Máscaras;
- Avental;
- Óculos de proteção;
- Protetor solar;
- Botas;
- Tábuas de corte;
- Panos pequenos para contenção dos peixes;
- Pranchetas;
- Lápis, canetas e papel;
- Etiquetas impermeáveis;
- Álcool a 70%;
- Detergente;
- Água sanitária;
- Esponja de lavar louça;
- Sacos de lixo (50 L);
- Caixas de isopor / caixa térmica

