

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICOS DE  
ENFERMIDADES DE CRUSTÁCEOS – LAQUA/MA

# Manual de Coleta de Amostras

PROCEDIMENTOS DE FIXAÇÃO DE AMOSTRAS PARA PCR, RT-PCR,  
qPCR e qRT-PCR



LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICOS DE ENFERMIDADES DE  
CRUSTÁCEOS – LAQUA/MA

# MANUAL DE COLETA

PROCEDIMENTOS DE FIXAÇÃO DE AMOSTRAS PARA PCR, RT-PCR, qPCR e qRT-PCR

**Missão do LAQUA:**

“Promover o desenvolvimento sustentável da agropecuária e a segurança e competitividade de seus produtos.”

1ª edição  
São Luís/MA  
2021

🔒 Laboratório de Diagnósticos de Enfermidades de Crustáceos. Todos os direitos reservados.  
É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial. A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens desta obra é do autor.

1ª ed. Ano 2021.

*Elaboração, distribuição, informações:*

**LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICOS DE ENFERMIDADES DE CRUSTÁCEOS**

**DIRETOR: PROF. THALES PASSOS DE ANDRADE PHD**

Universidade Estadual do Maranhão-UEMA

Cidade Universitária Paulo VI – Caixa Postal 09 –

São Luís/MA

e-mail: [laqua@cca.uema.br](mailto:laqua@cca.uema.br)

[www.laqua.uema.br](http://www.laqua.uema.br)

# Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>5</b>
1.1	Objetivos.....	5
1.2	Finalidade .....	5
1.3	Descrição e definições .....	5
<b>2</b>	<b>Procedimentos.....</b>	<b>6</b>
2.1	Segurança .....	6
2.2	Materiais utilizados.....	7
2.2.1	Meios e soluções.....	7
2.3	Coleta das amostras.....	7
<b>3</b>	<b>Fixação e preservação.....</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>Descarte de resíduos.....</b>	<b>8</b>
<b>5</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>8</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>9</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Objetivos

O Manual de Coleta objetiva orientar a adoção de metodologia adequada e sistemática para o conhecimento do histórico clínico, a amostragem e o exame por meio de biópsia e necrópsia e molecular.

## 1.2 Finalidade

Aplica-se aos profissionais responsáveis pela amostragem de itens (coleta de amostra) para fins de diagnóstico pelos métodos qualitativo ou quantitativo de amplificação de ácidos nucleicos.

## 1.3 Descrição e definição

O estudo biopatológico executa tarefas e análise especializada por meio de método qualitativo ou quantitativo de amplificação de ácidos nucleicos (PCR, qPCR etc.) e por fim a confecção do relatório. Em resumo, consiste em realizar uma análise geral ou específica seguindo uma metodologia adequada e sistemática e que estará focada nos seguintes procedimentos: o conhecimento do histórico clínico; a amostragem; exame por meio de biópsia e necrópsia; e avaliação histopatológica e/ou molecular.

## 2 PROCEDIMENTOS

a) Quanto ao conhecimento do histórico clínico da amostra a ser analisada: enviar todos os dados referentes ao histórico do problema assim como o nome da fazenda, viveiro, data de coleta, parâmetros físico-químicos, biometria, periodicidade de arramento (se feito), comportamento (hiperatividade, natação errática), prevalência das lesões em uma escala de 100%.

b) Quanto à amostragem: selecionar indivíduos que apresentem os mesmos sinais da doença a ser estudada (o laboratório escolherá os melhores indivíduos para análise). Considerar que todos os procedimentos deverão ser feitos de maneira rápida para evitar mascaramento nas lesões por formação de artefatos, hipoxia e autólise dos tecidos.

### 2.1 Segurança

Utilizar luvas e cuidado ao manusear o animal para não causar lesões e/ou comprometer a anatomia e fisiologia interna.

### 2.2 Materiais Utilizados

- Luvas
- Pinça esterilizada
- Tubos de armazenamento
- Lápis
- Papel vegetal

### 2.2.1 Meios e Soluções

- Álcool etílico 95%
- Cloro ativo 200 ppm

### 2.3 Coleta das Amostras

Capturar camarões moribundos que apresentem sintomas da doença. Em caso de dúvidas técnicas para a coleta, contatar o laboratório.

## 3 FIXAÇÃO E PRESERVAÇÃO

Pós-larvas, brânquias, hepatopâncreas, pleópodos, hemolínfa e outras amostras:

- a) Confeccionar histórico (vide capítulo 2 alínea a) e fotografar.

**OBS: A elaboração de um histórico e foto promove relevante informação clínica na submissão de amostras, facilitando assim a interpretação dos resultados em relação ao agente causador da enfermidade nos camarões submetidos.**

- b) Coletar aproximadamente 0.5 g ou ml dos indivíduos (ver anexo A).
- c) Colocar em recipientes novos ou bem limpos com a solução de álcool etílico 95%.

- d) Colocar os indivíduos dentro dos recipientes contendo a solução de álcool etílico 95% (deixar amostras bem cobertas com álcool), exemplo no anexo B.
- e) Etiquetar usando lápis e papel vegetal e/ou caneta permanente. A etiqueta deve conter a identificação do viveiro/tanque de origem ou família da amostra.
- f) Lacrar bem as tampas, preferencialmente rosqueada e com reforço com plástico filme ou fita adesiva que garanta a vedação para impedir vazamento.
- g) Fechar e lavar externamente com 200 ppm de cloro ativo retirando em seguida o teor residual com água potável.
- h) Embalar e enviar rapidamente.

# ANEXOS

## ANEXO A - REGIME DE AMOSTRAGEM PARA DIAGNÓSTICO DE INDIVÍDUOS MORIMBUNDOS SELECIONADOS PARA AVALIAÇÃO

Para análise de PCR (atentar para a idade do camarão):

<b>Se Idade</b>	<b>Órgão/tecido#</b>	<b>Fixador</b>	<b>No. camarões /Lote</b>
PL5-35 (0.001 a 0.5gr)	PL inteira	Álcool 95%	30-10 (PCR)
PL35-70 (0.5 – 6gr)	Cefalotórax	Álcool 95%	10-5 (PCR)
6-30 gr	Pleópodos/brânquias hepatopâncreas	Álcool 95%	5 (PCR)
30-60 gr	Pleópodos//brânquias hepatopâncreas	Álcool 95%	5 (PCR)

# Pleópodos ou brânquias (IMNV, WSSV, IHHNV, TSV, YHV, MRNV, CMNV).

# Hepatopâncreas (AHPND “EMS”, NHP-B, HPV, BP, EHP)

## ANEXO B - COLETA E FIXAÇÃO DE AMOSTRAS PARA DIAGNOSTICO

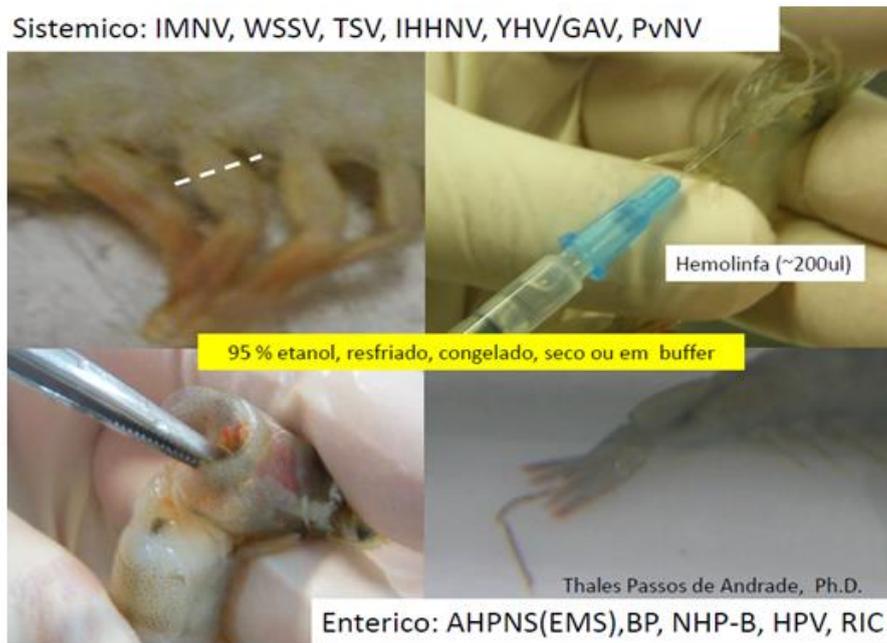


Figura 1- Formas de coleta de amostra



Figura 2. Procedimentos para embalagem de amostragens de pleopodos, pós-larvas, branquias, hepatopancreas, hemolinfa e outras pequenas amostras; 1) colocar álcool 95% nos tubos; 2) Colocar a amostra; 3 e 4 ) Completar com álcool, lacrar e identificar; 5) Colocar todas as amostras em um saco maior, vedar bem e em seguida colocar o pacote protegido dentro de uma caixa de isopor e remeter

## ANEXO C – FORMULÁRIO DE ATENDIMENTO

1. FORMULÁRIO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE/ ORDEM DE SERVIÇO	
Ordem de serviço n.º	
Data do pedido:	
<b>1.1 DADOS DO SOLICITANTE</b>	
Solicitante:	
Endereço:	CEP:
Cidade/UF:	
Telefone: (____) _____ ou (____) _____	E-mail:
Contato:	
Destinatário do laudo /mesmo do solicitante <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não (favor identificar) _____	
Deseja remessa de laudo impresso? <input type="checkbox"/> sim (será cobrado o envio junto a NF – Nota explicativa nas orientações)	
<b>1.2 DADOS PARA EMISSÃO DE NF</b>	
Pessoa Física/Jurídica:	CNPJ/CPF:
Razão Social:	
Endereço:	Cidade/UF:
Inscrição Estadual/Municipal:	E-mail:
Observações:	

## ANEXO D – ORDEM DE SERVIÇO

<b>ORDEM DE SERVIÇO</b>
N.º
Data do pedido:

1.3 Tipo de Análise																		
Histopatologia <input type="checkbox"/>					Biologia Molecular <input type="checkbox"/>													
Doença específica <input type="checkbox"/>				Exportação <input type="checkbox"/>				Quarentena <input type="checkbox"/>										
Descrição da amostra								Seleção de Patógenos										
Ident. (i)	Amostra			Coleta				Tecido /órgão a ser coletado (em negrito melhor)										
								Pleopodos; hemolinfa; brânquias; pos larva inteira, cefalotorax				Hepatopancreas; fezes; pos larva inteira, cefalotorax			consultar			
	Descrição (ii)	Qtd	Método de Fixação (iii)	Data	Origem (iv)	Resp.	Observações	WSSV	IMNV (NIM)	IHHNV	TSV	YHV	MrNV	DIV1	NHP-B	EHP	AHPND( S(EMS)	OUTRO *

(\*) Se a sua opção foi “OUTRO” na tabela acima, descreva o nome do patógeno a pesquisar: \_\_\_\_\_

- i. Identificação: código da amostra
- ii. Descrição: pós-larva, pleópodos, hepatopancreas, brânquias, fezes, outro
- iii. Método de fixação: para análise histopatológica: solução de Davidson ou álcool 70% / para análise biologia molecular: álcool 95%, buffer, congelado e outros.
- iv. Origem: reprodução, larvicultura, viveiro, beneficiamento e outros

## 2. ORDEM DE SERVIÇO

N.º

Data do pedido:

Atenção: Os próximos campos são de uso exclusivo do laboratório.

Recebimento da Amostra							Preparo da Amostra
Data:							Data:
Responsável:							Responsável:
sequência de envio de amostra	Identificação da Amostra (origem do tanque/ viveiro e código de identificação)	Amostra conforme descrição	Amostra Identificada	Amostra íntegra	Recipiente íntegro	Observações	Observação (i.)
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
10							
11							
12							
13							
Total	:						

i. Descrição de sinais atípicos dos sintomas identificados ou outras informações relevantes acerca da amostra

## **OBSERVAÇÕES:**

### **ORIENTAÇÕES:**

1. Seguir as orientações para coleta que constam no documento “Manual de Coleta de Amostras”.
2. Identificar os tubos das amostras com a origem do tanque/viveiro de forma legível e que não apague facilmente.
3. A identificação deve ser compatível com as informações registradas neste formulário.
4. As amostras devem ser encaminhadas ao destinatário a seguir:

Universidade Estadual do Maranhão, Campus Paulo VI – UEMA  
Avenida Lourenço Vieira da Silva, 1000, Jardim São Cristóvão, São Luís – MA  
CEP: 65055-970

**Local de entrega: Protocolo Geral**

#### **Em atenção:**

Prof. Thales Passos de Andrade  
Laboratório de Diagnostico de Doenças de Crustáceos LAQUA-UEMA

#### **5. Para Amostras enviadas para retirada sob responsabilidade do laboratório, encaminhar previamente documento de identificação de remessa**

Destinatário: Thales Passos de Andrade  
CPF: 430.437.983-68

6. Após o recebimento das amostras no laboratório, o prazo para liberação é de até 7 dias úteis. Em caso de dúvidas, como informações quanto à forma de fixação das amostras, enviar um e-mail para [laqua@cca.uema.br](mailto:laqua@cca.uema.br)
7. No caso de urgência quanto a liberação do relatório, antecedendo o prazo de 7 dias úteis, será cobrada taxa adicional.
8. Será cobrada taxa adicional na Nota Fiscal, caso seja solicitada remessa de laudo impresso.