

**SERVIÇOS DE AVALIAÇÃO DA
INTERFERÊNCIA DA ATIVIDADE DE E&P NO
PÓLO PRÉ-SAL DA BACIA DE SANTOS
SOBRE AS AVES, QUELÔNIOS E
MAMÍFEROS MARINHOS E ESTRUTURAÇÃO
DA REDE DE ATENDIMENTO
VETERINÁRIO NO LITORAL DE ESTADOS DO
SUDESTE E SUL DO BRASIL**

Protocolos de Atividades

**7 - Coleta, armazenamento e envio das amostras para
análises histopatológicas**

Volume 01

BR 00000000/00

Revisão 03

JUNHO / 2017



E&P

CONTROLE DE REVISÕES – BR 00000000/00

[illegible]

	Original	Rev. 01	Rev. 02	Rev. 03	Rev. 04	Rev. 05	Rev. 06	Rev. 07	Rev. 08
Data	05/08/2015	30/10/2015	16/03/2016	26/06/2017					
Elaboração	Coletiva	Coletiva	A. Barreto / M. Carrion	M. Cardim/ A. Barreto					
Verificação	A. Barreto	A. Barreto	A. Barreto	A. Barreto					
Aprovação	A. Barreto	A. Barreto	A. Barreto	Petrobras					

ÍNDICE GERAL

<i>FIGURAS</i>	4
<i>QUADROS</i>	5
<i>I - ESCOPO DESTE PROTOCOLO</i>	7
<i>II - PREPARAÇÃO PARA A ATIVIDADE</i>	8
<i>III - COLHEITA E PREPARO DAS AMOSTRAS</i>	9
III.1 - Cuidados Especiais	9
III.2 - Colheita de Amostras do Sistema Nervoso Central.....	10
III.3 - Colheita de Amostras de Intestino	10
III.4 - Acondicionamento para Remessa.....	11
<i>IV - ENCERRAMENTO DA ATIVIDADE</i>	13
<i>V - GLOSSÁRIO</i>	14
<i>VI - ANEXOS</i>	15
VI.1 - Receitas para soluções fixadoras	15
<i>VII - COLABORADORES</i>	16
<i>VIII - EQUIPE TÉCNICA</i>	17

FIGURAS

Figura III.3-1 Intestino aderido ao papel com mucosa aparente. A seta indica a porção mesentérica. Fonte: Ana Paula F. Bracarense/UEL. 11

Figura III.3-2 Intestino com extremidades grampeadas no papel. As setas indicam o local dos grampos. Fonte: Ana Paula F. Bracarense/UEL..... 11

QUADROS

Quadro III.4-1 Laboratórios de processamento de amostras.	13
--	----

I - ESCOPO DESTES PROTOCOLO

Este documento tem como finalidade orientar os participantes do Projeto de Monitoramento de Praia da Bacia de Santos (PMP-BS) no desenvolvimento das atividades previstas no projeto executivo do mesmo. O Projeto Executivo do Monitoramento de Praias da Bacia de Santos (PMP-BS) foi elaborado considerando as orientações contidas no Termo de Referência CGPEG/DILIC/IBAMA Nº 002/13 - “Termo de Referência para Elaboração do Estudo de Impacto Ambiental – EIA e Respectivo Relatório de Impacto Ambiental - RIMA para a Produção e Escoamento de Petróleo e Gás Natural do Polo Pré-Sal da Bacia de Santos – Etapa 2” e nos Pareceres Técnicos Nº 122/2014 e 343/2014.

As equipes que executam as atividades devem seguir os procedimentos aqui descritos para garantir a qualidade e homogeneidade das informações coletadas, e assim permitir análises integradas confiáveis.

A elaboração deste protocolo foi um esforço colaborativo dos diversos pesquisadores envolvidos no PMP-BS, além de especialistas externos convidados a contribuir em áreas específicas. A listagem completa dos pesquisadores que contribuíram com este protocolo se encontram no final do documento.

Este documento não deve ser utilizado em atividades alheias ao PMP-BS, uma vez que foi concebido com foco nas especificidades deste projeto. O uso deste documento como fonte de referência para trabalhos acadêmicos deve ser evitado e recomenda-se que sejam utilizadas as fontes de referência indicadas.

II - PREPARAÇÃO PARA A ATIVIDADE

Antes de iniciar a coleta de amostras para análises histopatológicas, deve-se:

1. Estar de posse do Identificador do Indivíduo do animal que gerou as amostras, para através do Sistema de Informações do Monitoramento da Biota Aquática (SIMBA) poder acessar o prontuário do mesmo e as informações sobre a coleta e necropsia do animal, para orientação sobre as lesões descritas, se houver.
2. Conferir a disponibilidade dos EPIs necessários (máscara e luvas de procedimentos).
3. Preparar os recipientes (transparentes - vidro ou plástico - de boca larga) necessários para acondicionar a amostra, bem como a solução fixadora (formalina tamponada ou AFA, ver Anexo VI.1 - Receitas para Soluções Fixadoras).
4. Preparar o instrumental a ser utilizado na coleta da amostra: lupa (facultativa), facas, tesouras, pinças e papel de filtro (este para manter planas as amostras de órgãos tubulares, como os intestinos). No caso de órgãos tubulares, a amostra aberta (cortada) é suavemente lavada em água corrente, e colocada com a superfície serosa sobre o papel de filtro que, presa/colada, é imersa no fixador, com a túnica mucosa para cima.

Para garantir a correta coleta das amostras, todos os procedimentos devem se efetuados em ambiente confortável e bem iluminado.

III - COLHEITA E PREPARO DAS AMOSTRAS

1. As amostras devem ser, o máximo possível, representativas da lesão e, preferencialmente, conter áreas de tecido normal, de transição e da alteração propriamente dita. Isto quando esta não for difusa.
2. Obtidas por instrumento cortante afiado, devem ter, aproximadamente, um centímetro (1,0 cm) de espessura.
3. Devem ser tratadas (fixadas) por uma solução aquosa fixadora de formol a 10%, preferencialmente tamponada e neutra, ou por uma solução de formol salina a 10%, conforme Anexo VI.1 - Receitas para soluções fixadoras.
4. A proporção do volume da solução fixadora para a(s) peça(s) deve ser de 15:1, em recipiente de boca larga. As amostras deverão estar inteiramente submersas na solução fixadora.
5. No caso de amostras de tecidos pouco densos (que boiam), a submersão deve ser forçada com um “chumaço” de algodão ou gaze.
6. Os recipientes, sempre de boca larga e transparentes, devem ser forrados com algodão ou gaze se forem acondicionadas amostras com "superfícies de corte" planas, que possam assentar no fundo destes e impedir o contato com o fixador.
7. O recipiente com o material e fixador, deve ser identificado. Nunca na tampa, que pode ser trocada e, quando a identificação for imersa no fixador, nesta não deve ser usada caneta, mas lápis.

III.1 - Cuidados Especiais

1. Na obtenção de amostras de tecidos moles, usar instrumental cortante amolado e afiado, tais como lâminas de bisturi e navalhas de micrótomo. Nunca usar tesoura, de forma a evitar o esmagamento.
2. Para a colheita de amostras de tecidos duros (osso/cartilagem), usa-se a serra e, na clivagem (uma das etapas do processamento histotécnico) despreza-se a superfície de corte.

III.2 -Colheita de Amostras do Sistema Nervoso Central

As doenças do sistema nervoso central (SNC), com frequência, não apresentam lesões óbvias à necropsia. Por este motivo, o histórico clínico e a colheita adequada de amostras para exames complementares se tornam imprescindíveis.

Se o material for destinado ao exame histopatológico, é extremamente importante que o manuseio do tecido nervoso, ainda não-fixado, seja o mínimo possível. O manuseio do tecido nervoso não-fixado causa artefatos que prejudicam a avaliação histológica das lesões.

Para análise histopatológica, o ideal é que todo o encéfalo seja imerso em formol e as secções para obtenção de fragmentos realizada 24 horas após a fixação inicial. Pode-se utilizar formalina neutra tamponada a 20% para o SNC.

Tanto quanto possível, o exame macroscópico sistemático do encéfalo deve ser feito no órgão já fixado no formol. Isso facilita a seleção de áreas apropriadas para o diagnóstico de doenças específicas e permite que se determine a distribuição das lesões (i.e. bilaterais, simétricas, focais, multifocais, na substância branca, na substância cinzenta).

III.3 -Colheita de Amostras de Intestino

Um fragmento de aproximadamente 3 cm deve ser cortado e aberto pela porção mesentérica (lado em que o mesentério liga-se às alças intestinais, Figura III.3-1. A mucosa não deve ser raspada ou manipulada. No caso de conteúdo intestinal abundante, lavar delicadamente a mucosa com água corrente. Posteriormente o fragmento intestinal é depositado com a mucosa voltada para cima em um pedaço de papel grosso (cartolina, cartão) para que a serosa fique aderida. É possível grampear as extremidades do fragmento para evitar que ocorra o descolamento (Figura III.3-2). Após esse procedimento o fragmento intestinal é imerso no fixador. Esse método permite que ao corte histológico as vilosidades intestinais fiquem preservadas em sua totalidade, incluindo a altura das vilosidades.



Figura III.3-1 Intestino aderido ao papel com mucosa aparente. A seta indica a porção mesentérica. Fonte: Ana Paula F. Bracarense/UEL.

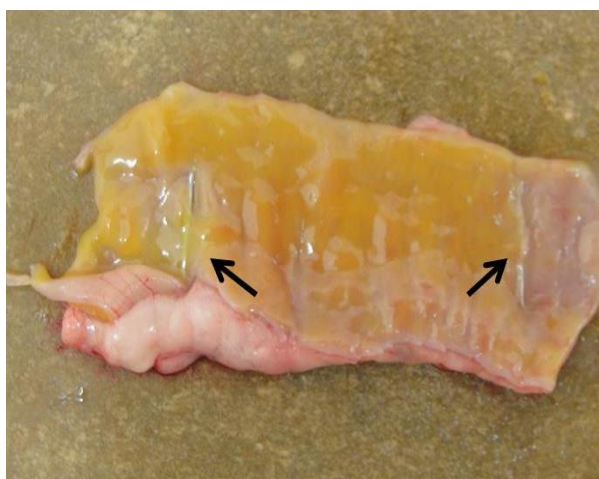


Figura III.3-2 Intestino com extremidades grampeadas no papel. As setas indicam o local dos grampos. Fonte: Ana Paula F. Bracarense/UEL.

III.4 -Acondicionamento para Remessa

1. As amostras devem ter ficado, no mínimo, 48 horas na solução de fixação.

2. As amostras devem ser retiradas da solução e envolvidas por uma manta de algodão ou gaze abundantemente umedecida pelo fixador.
3. Acondicionam-se as mantas, com os fragmentos, em recipiente de plástico (sacos plásticos p/ congelamento, p. ex.) e veda-se (com o “zíper” do saco plástico, fita adesiva, etc).
4. Os sacos plásticos deverão ser acondicionados em caixa resistentes, de tamanho adequado à quantidade de amostras a serem enviadas, para que não sofram danos no o transporte.
5. Na caixa a ser despachada deve ser incluída uma listagem que apresente os dados básicos dos animais que estão sendo enviados: espécie, Identificador do Indivíduo no SIMBA, identificador da amostra (código gerado pelo SIMBA no momento da requisição do exame), resenha do animal (características individuais), história com suspeita(s), se houver, e descrição macroscópica das alterações (lesões).

Considerando a possibilidade de extravio ou da necessidade de envio de novas amostras para análises, devem ser mantidas reservas fixadas do material até o recebimento de laudo conclusivo.

É fundamental que o identificador do indivíduo seja informado ao laboratório que realizará as análises para que os dados referentes à amostra possam ser resgatados no momento da análise.

IV - ENCERRAMENTO DA ATIVIDADE

As amostras dos animais processados deverão ser agrupadas e enviadas o mais brevemente possível para o laboratório que irá realizar as análises. Os laboratórios de análises histopatológicas para este projeto são:

Lab. de Patologia Comparada de Animais Selvagens/USP

Responsável: Dr. José Luiz Catão Dias

Lab. de Patologia Animal/UEL

Responsável: Dra. Ana Paula Bracarense

Lab. de Sanidade Animal/UENF

Responsável: Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho

O destino das amostras dependerá da origem das mesmas, conforme o Quadro III.4-1. No caso de algum dos laboratórios já ter atingido sua capacidade mensal de processamento, deverá informar a coordenação geral do PMP. Esta por sua vez irá informar as instituições que usualmente enviam materiais para o mesmo, que passarão a enviar para o laboratório mais próximo que ainda tenha capacidade de processamento.

Quadro III.4-1 Laboratórios de processamento de amostras.

Destino	Origem das Amostras
LAPCOM/USP (Av. Afrânio Peixoto, 412- São Paulo, SP)	SC
UENF (Av. Presidente Vargas, 180 – Campo dos Goytacazes, RJ)	SP
UEL (Rod. Celso Garcia Cid, s/n - Campus Universitário, Londrina, PR)	PR

V - GLOSSÁRIO

Para fins deste protocolo são consideradas as seguintes definições:

Lesão	é a expressão morfológica, de organelas, células, tecidos ou órgãos, como uma resposta do hospedeiro a uma agressão (ferimento, estímulo) por um agente etiológico (físico, químico e biológico), dentre outros.
Amostra	é parte do tecido ou lesão que, fixada e processada pela cito e/ou histotécnica, será examinada ao microscópio eletrônico ou óptico, também pode ser preparada para a estereomicroscopia (lupa). A importância da(s) amostra(s) se dá pelo fato de que em medicina, o padrão de qualquer diagnóstico laboratorial, (histopatológico, no caso) como forma de apoio, está condicionado às possibilidades da(s) amostra(s) representar(em), o mais fielmente possível, o processo patológico (lesão, no caso), de forma a permitirem ao Patologista a elucidação diagnóstica (conclusiva) e/ou a exclusão ou inclusão de suspeita(s).

VI - ANEXOS

VI.1 -Receitas para soluções fixadoras

Formalina neutra tamponada a 10%

Para cada litro de solução utilize
100 ml de formalina (solução comercial)
900 ml de H₂O
4 g de Fosfato de sódio monobásico
6,5 g de Fosfato de sódio dibásico

Solução de formol acético – AFA

50 ml de Álcool a 95%
10 ml de Formol
2 ml de Ácido acético glacial
40 ml de Água destilada

Esta solução deve ser utilizada para fixação de helmintos. Na ausência de AFA os helmintos podem ser conservados em álcool aquoso a 70%.

VII - COLABORADORES

A elaboração deste protocolo foi um esforço colaborativo dos diversos pesquisadores envolvidos no PMP-BS, além de especialistas externos convidados a contribuir em áreas específicas. Neste documento contribuíram os seguintes profissionais:

Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho

Anatomia Patológica - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro.

Ana Paula F.R.L. Bracarense

Laboratório de Patologia Animal/ Universidade Estadual de Londrina.

Matheus Martins Cardim

Lab. de Informática da Biodiversidade e Geoprocessamento, CTTMar, UNIVALI

André S. Barreto (org.)

Lab. de Informática da Biodiversidade e Geoprocessamento, CTTMar, UNIVALI

VIII - EQUIPE TÉCNICA

Profissional	André S. Barreto
Empresa	UNIVALI
Registro no Conselho de Classe	21.500/03-D
Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental	358880
Responsável pela(s) Seção(ões)	I a VII
Assinatura	Lab. de Informática da Biodiversidade e Geoprocessamento, CTTMar, UNIVALI -----

Profissional	Mariana Carrion
Empresa	UNIVALI
Registro no Conselho de Classe	95368/03
Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental	--
Responsável pela(s) Seção(ões)	I a VII
Assinatura	Lab. de Informática da Biodiversidade e Geoprocessamento, CTTMar, UNIVALI -----

Profissional	Matheus Martins Cardim
Empresa	UNIVALI
Registro no Conselho de Classe	07212 CRMV-SC
Cadastro Técnico Federal de Atividades e Instrumentos de Defesa Ambiental	6870429
Responsável pela(s) Seção(ões)	I a XII
Assinatura	Lab. de Informática da Biodiversidade e Geoprocessamento, CTTMar, UNIVALI -----