

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO
OBRIGATÓRIO
Área: Saúde Pública e Zoonoses

Aluno: Arielle Aparecida Lara
Orientador: M.V. Karina Ruaro de Paula
Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro
Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire
Supervisor: Prof^a. Dr^a. Silvia Cristina Osaki

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado, como parte das exigências
para a conclusão do Curso de Graduação
em Medicina Veterinária da Universidade
Federal do Paraná.

PALOTINA-PR
Dezembro de 20

FOLHA DE APROVAÇÃO

Universidade Federal do Paraná

Setor Palotina

Curso de Medicina Veterinária

Relatório Final de Estágio Supervisionado Obrigatório

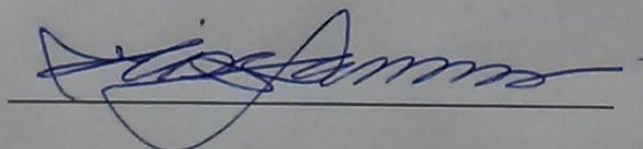
Área de estágio: Saúde Pública e Zoonoses

Orientador(es) do estágio: M. V. Karina Ruaro de Paula, Prof. Dr. Italmar

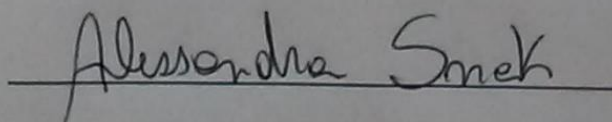
Teodorico Navarro e Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire

Supervisor(a) do estágio: Prof^a. Dr^a. Silvia Cristina Osaki

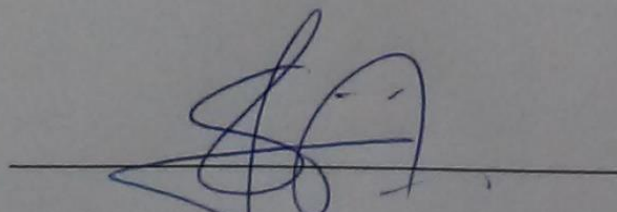
O presente relatório foi apresentado e aprovado pela seguinte banca
examinadora:



Prof^a. Dr^a. Elisabete Takiuchi



M. V. Alessandra Snak



Prof^a. Dr^a. Silvia Cristina Osaki
(Supervisora)

Palotina, 05 de dezembro de 2014

*Peça a Deus que abençoe seus planos, e eles darão certo.
Provérbios 16, v.3*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que sempre esteve ao meu lado, renovando minhas forças e me ajudando a seguir em frente. E pela saúde e oportunidade que Ele me concedeu para que pudesse chegar ao objetivo final.

Aos meus pais, Nivaldo e Solange, pela força, amor, carinho e dedicação que sempre me deram, e que com certeza foram indispensáveis durante esta caminhada. Por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado em todos os momentos, por permitirem que eu pudesse realizar este objetivo. A minha irmã, pelos conselhos nas horas difíceis, e por torcer sempre pela minha felicidade, sucesso e realização.

Aos meus queridos avós, José Paulino e Romilda, que sempre se preocupam comigo, que me ajudaram, de forma direta e indireta, na realização deste sonho. Obrigada por serem esses avós queridos, doces e que sempre se orgulham em mencionar seus netos.

Ao meu namorado Jorge, por estar comigo sempre, pelo companheirismo nas horas mais difíceis e nas felizes também.

Às minhas amigas, de quem tive que me distanciar fisicamente, mas que de uma forma ou de outra sempre estiveram presentes torcendo pela minha felicidade e realização.

Agradeço também a minha grande amiga, Patrícia, que conheci já na primeira semana de aula e pude contar com ela sempre, desde o começo, dividindo comigo as angústias, alegrias, estudos, felicidades, trabalhos. Agradeço pelos momentos de apoio, união, amizade, que foram essenciais nessa caminhada, agradeço sua família também, em especial a Dona Lorinete e o Seu Antônio que sempre me acolheram com todo o amor do mundo tornando-se uma família em Palotina. Que Deus os proteja sempre, é muito bom saber que existem pessoas especiais e de bom coração pelo mundo.

Agradeço as amigas que fiz em Palotina, Anete, Joice, por dividir as angústias, felicidades, estudos, trabalhos, momentos de estresse, paz e alegria, pelos momentos de risadas, diversão que tornaram a caminhada rumo ao objetivo menos árdua e o caminho bem mais fácil.

À Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, pois foi através desta que pude concretizar meu sonho, uma faculdade que me enche de orgulho, que me proporcionou momentos inesquecíveis e do qual sempre me orgulharei em citar a UFPR e o Setor Palotina.

A todos os professores que ao longo desses cinco anos contribuíram para a minha formação profissional, compartilhando seus conhecimentos. Em especial, agradeço à professora Silvia Cristina Osaki, que me orientou desde o terceiro período de faculdade, desde projetos de extensão, monitorias, estágios, até o estágio curricular supervisionado dividindo seus conhecimentos e experiências, que com certeza contribuíram muito para a minha formação profissional e pessoal.

À SESA, em especial, a Divisão Sanitária de Alimentos, e à UEL por me concederem a oportunidade de estagiar. Aos profissionais, residentes, professores, que compartilharam comigo seus conhecimentos, de forma atenciosa e prestativa.

Agradeço a todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

O presente Trabalho de Conclusão de Curso refere-se às atividades desenvolvidas no período de 21 de julho a 12 de setembro de 2014 na Secretaria de Estado da Saúde do Paraná – SESA, e do período de 16 de setembro a 17 de novembro de 2014 na Universidade Estadual de Londrina – UEL, como atividades da disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina. As atividades foram desenvolvidas na área de Vigilância Sanitária de Alimentos sob a orientação da Médica Veterinária chefe da divisão de alimentos, Karina Ruaro de Paula e na área laboratorial de zoonoses e saúde pública sob a orientação do Prof. Dr. Itamar Teodorico Navarro e da Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire na Universidade Estadual de Londrina - UEL, sob a supervisão local da Prof^a. Dr^a. Silvia Cristina Osaki. Foi caracterizada a estrutura e o funcionamento da Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos – DVVSA da SESA e do Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública e do Laboratório de Protozoologia da UEL, em especial as atividades desenvolvidas na Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos da Secretaria de Estado da Saúde sobre surtos alimentares, e as atividades laboratoriais, como exames de rotina e de pesquisa, desenvolvidos no laboratório da UEL.

Palavras-chave: Alimentos; Protozoologia; Vigilância sanitária.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma - Hierarquização da Secretaria de Estado da Saúde	15
Figura 2 – (A) Entrada da Secretaria de Estado da Saúde - PR. (B) Recepção da Secretaria de Estado da Saúde - PR. (C) Sala de permanência da Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos	16
Figura 3 - Total de amostras clínicas e bromatológicas enviadas para análise no Laboratório Central do Estado - LACEN/PR.....	20
Figura 4 - Locais de produção e/ou preparação de refeições que ocasionaram surtos alimentares.....	21
Figura 5 - Principais sinais e sintomas apresentados pelos pacientes envolvidos em surtos de DTA's.....	21
Figura 6 - Total de surtos alimentares por faixa etária no sexo masculino.....	22
Figura 7 - Total de surtos alimentares por faixa etária no sexo feminino	22
Figura 8 - Critérios de confirmação de surtos alimentares	23
Figura 9 - Entrada do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina...	26
Figura 10 - Secretaria do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Estadual de Londrina.....	26
Figura 11 - Vista externa do laboratório de protozoologia, UEL.....	27
Figura 12 - Vista interna do laboratório de protozoologia, UEL.....	27
Figura 13 - Sala para extração de ácidos nucléicos. Laboratório de protozoologia, UEL	28
Figura 14 - Sala de cultivo celular. Laboratório de protozoologia, UEL.....	28
Figura 15 - Sala para PCR. Laboratório de protozoologia, UEL.....	29
Figura 16 - Sala para leitura de RIFI. Laboratório de protozoologia, UEL.....	29
Figura 17 - Sala para lavagem e esterilização de materiais. Laboratório de protozoologia, UEL.....	30
Figura 18 - Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, da Universidade Estadual de Londrina	31
Figura 19 - Cuba para eletroforese em gel de poliacrilamida	33
Figura 20 - Aparelho para eletroforese em gel de poliacrilamida	33
Figura 21 - Equipamento de transferência para a membrana de nitrocelulose	34
Figura 22 - Placa para <i>Western blotting</i> com fitas de nitrocelulose.....	34

Figura 23 - Fluxo, localizado no infectório da UEL, onde são mantidos os camundongos para a manutenção de cepas de <i>T. gondii</i>	36
Figura 24 - Fluxo, para a realização da manutenção de cepas de <i>T. gondii</i>	37
Figura 25 - Camundongo em câmara saturada com éter.....	37
Figura 26 - (A) Camundongo fixado em cortiça e com a cama muscular exposta. (B) Inoculação, em camundongo eutanasiado, de solução salina estéril. (C) Aspiração do exsudato peritoneal de camundongo	38
Figura 27 - Observação dos taquizoítas de <i>T. gondii</i> aspirados de camundongo.....	38
Figura 28 - Lâminas para RIFI, em câmara úmida.....	40
Figura 29 - Mapa organizativo das lâminas a serem usadas na RIFI.....	40
Figura 30 - Lâmina adsorvida com taquizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i> para realização da RIFI	41
Figura 31 - Microscópio de epifluorescência para leitura de RIFI.....	43
Figura 32 - Observação do teste positivo em microscópio de epifluorescência no aumento de 400 vezes	43
Figura 33 - Observação do teste negativo em microscópio de epifluorescência no aumento de 400 vezes	44
Figura 34 - Lâmina adsorvida com promastigotas de <i>Leishmania</i> sp. para realização da RIFI	45
Figura 35 - Observação de reação de fluorescência em microscópio de epifluorescência no aumento de 400 vezes	46
Figura 36 - Visualização de lâmina com esfregaço de fezes, contendo oocistos de <i>Cryptosporidium</i> spp. no aumento de 1000 vezes	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluição do conjugado de acordo com a espécie animal.....	42
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEVS – Centro Estadual de Vigilância Sanitária

DAB – Diaminobenzidina

DMVP – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos

DVVSA – Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HV – Hospital Veterinário

PA – Persulfato de Amônia

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

PR – Paraná

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

Rpm – Rotações por minuto

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SESA – Secretaria de Estado da Saúde

SVS – Superintendência de Vigilância em Saúde

TBS – Tampão Fosfato Salino

TEMED - Tetramethylethylenediamine

TN – Teste Negativo

TP – Teste Positivo

UEL – Universidade Estadual de Londrina

VISA – Vigilância Sanitária

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	DESENVOLVIMENTO	14
2.1	PARTE 1 – Secretaria de estado da Saúde - SESA.....	14
2.1.1	Descrição do Local de Estágio	14
2.1.2	Área Física	15
2.1.3	Atividades desenvolvidas	16
2.2	PARTE 2 – Universidade Estadual de Londrina - uel.....	24
2.2.1	Descrição do Local de Estágio.....	24
2.2.2	Área Física	25
2.2.2.1	Entrada do Hospital Veterinário	25
2.2.2.2	Secretaria do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – DMVP.....	26
2.2.2.3	Laboratório de protozoologia	26
2.2.2.4	Sala de lavagem e esterilização de materiais	29
2.2.2.5	Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública	30
2.2.3	Atividades desenvolvidas	31
2.2.3.1	<i>Western blotting</i> para <i>Toxoplasma gondii</i>	31
2.2.3.2	Manutenção de cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	35
2.2.3.3	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	39
2.2.3.3.1	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para diagnóstico de <i>Toxoplasma gondii</i>	39
2.2.3.3.2	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para diagnóstico de <i>Leishmania</i> sp	44
2.2.3.4	Coloração de Ziehl-Neelsen modificada	46
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
4	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Entende-se por Vigilância Sanitária um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e da circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde (BRASIL, 1990).

As atividades ligadas à Vigilância Sanitária surgiram devido a uma propagação de doenças transmissíveis nos conjuntos urbanos, que aumentavam em população e sem melhorias das condições sanitárias básicas (BRASIL, 2014a).

No início da década de 80, a Vigilância Sanitária (VISA) tornou-se o que é atualmente, e com a participação da população, passou a administrar as atividades concebidas para o Estado como papel de guardião dos direitos do consumidor e provedor das condições de saúde da população. Através do surgimento da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) houve uma organização das vigilâncias estaduais e municipais para que possam atender todas as áreas que foram atribuídas os seus serviços (BRASIL, 2014a).

A Vigilância Sanitária de alimentos tem como objetivo garantir a qualidade dos serviços de alimentos. As ações desta vigilância valem para todos os tipos de alimentos, matérias-primas, embalagens, equipamentos, utensílios, processos tecnológicos e aspectos nutricionais (BRASIL, 2014b).

A parte de fiscalização e inspeção dos serviços fica sob responsabilidade das Secretarias Municipais de Saúde, podendo ser complementada pela VISA Estadual (BRASIL, 2014b).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS,2014) zoonoses são doenças e infecções que se transmitem naturalmente entre animais vertebrados e seres humanos (WHO, 2014a).

As zoonoses ainda constituem uma ameaça à saúde pública, embora muitas delas são negligenciadas pelos sistemas de saúde. Elas afetam milhões de pessoas, especialmente em países em desenvolvimento, porém a maioria delas pode ser evitada (WHO, 2014b).

Dias (2012) relata que as zoonoses possuem importância na saúde pública, e interferem na parte econômica também, devido os gastos para a rede pública de

saúde, óbitos dos indivíduos em idade economicamente ativa e os custos com a ausência no trabalho do indivíduo acometido.

Este relatório discorre sobre as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular supervisionado, na área de Vigilância Sanitária de Alimentos na Secretaria de Estado da Saúde – SESA - PR de 21 de julho a 12 de setembro de 2014 e na área de zoonoses e saúde pública no Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública e no Laboratório de Protozoologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), de 16 de setembro a 17 de novembro de 2014.

No período de estágio foi realizado o acompanhamento das atividades desenvolvidas pelos profissionais da vigilância sanitária de alimentos com ênfase para o assunto relacionado a surtos alimentares. E o acompanhamento das atividades desenvolvidas pelos laboratórios de zoonoses e saúde pública e protozoologia, como execução de técnicas de exames laboratoriais, preparo e lavagem de materiais e acompanhamentos de projetos de pesquisa desenvolvidos nos referidos laboratórios.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 PARTE 1 – Secretaria de Estado da Saúde - SESA

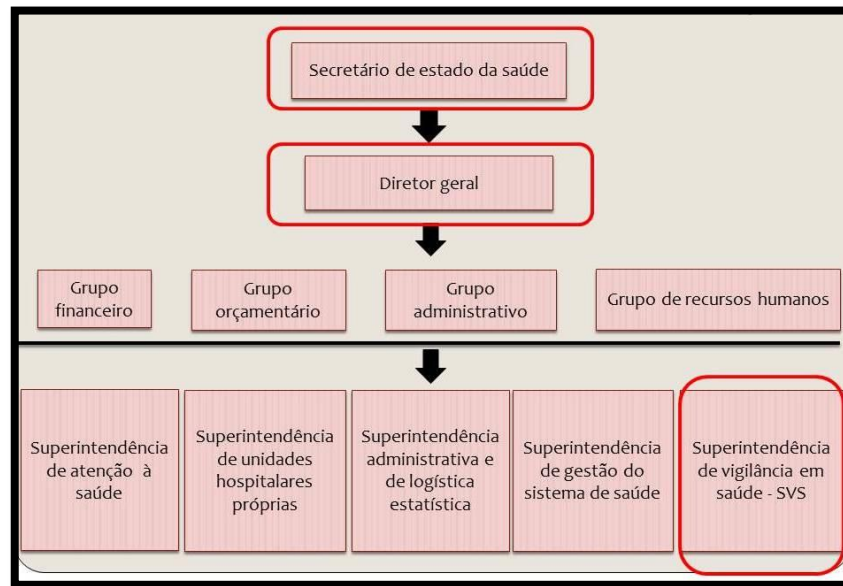
2.1.1 Descrição do Local de Estágio

No período compreendido entre 21 de julho a 12 de setembro de 2014, parte do estágio supervisionado foi realizado na Secretaria de Estado da Saúde do Paraná – SESA-PR, na Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos – DVVSA, localizada na Rua Piquiri nº 170, bairro Rebouças, na cidade de Curitiba – PR, das 08:00 às 12:00 horas e das 13:30 até as 15:30 horas, com uma carga horária semanal de 30 horas, totalizando 240 horas. Sob a orientação da Médica Veterinária Chefe da DVVSA Karina Ruaro de Paula.

A Secretaria Estadual de Saúde possui uma hierarquização (Figura 1), tendo como autoridade máxima o secretário de estado da saúde, seguido do diretor-geral e dos grupos (financeiro, orçamentário, administrativo e de recursos humanos). Após os grupos, existem as superintendências, que são um total de cinco (superintendência de atenção à saúde, de unidades hospitalares próprias, administrativa e de logística especializada, de gestão do sistema de saúde e a de vigilância em saúde).

O estágio foi realizado na Superintendência de Vigilância em Saúde (SVS), que é constituída por seis centros, um laboratório e um departamento. Dentre os centros que compõem a SVS está o Centro Estadual de Vigilância Sanitária (CEVS) no qual este possui três divisões: produtos, serviços e alimentos, sendo o estágio realizado nesta última divisão.

Figura 1 - Fluxograma - Hierarquização da Secretaria de Estado da Saúde



Dentro da divisão, cada profissional ficava responsável por trabalhos específicos, como o de coordenação e/ou orientação sobre a rotulagem de produtos, exercido pela nutricionista, coordenação e/ou orientação sobre a questão de surtos alimentares desenvolvido por um Médico Veterinário, e coordenação e/ou orientação de produtos de origem animal, e do programa de qualidade de água, ambos também exercidos por Médicos Veterinários.

O Programa Estadual de Análises de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA/PR, também é um ponto trabalhado na divisão e possui a coordenação da Médico Veterinária e da Engenheira Agrônoma da divisão.

A divisão possui uma chefia que é responsável por coordenar os trabalhos e também desenvolvia atividades relacionadas ao programa do estado, "Leite das crianças - diminuição da desnutrição infantil" desenvolvido no âmbito do Estado do Paraná, na forma do Decreto Estadual nº 1279, de 14 de maio de 2003.

As atividades exercidas por estes profissionais envolviam grande parte o lado burocrático da vigilância, e caso houvesse necessidade os profissionais poderiam exercer a parte prática de inspeção e fiscalização de produtos.

2.1.2 Área Física

A Secretaria de Estado da Saúde está localizada na Rua Piquiri nº 170, bairro Rebouças, na cidade de Curitiba – PR (Figura 2 - A).

A recepção conta com a presença de duas seguranças e catracas (Figura 2 - B), onde a passagem de pessoas desconhecidas somente era permitida após solicitação e autorização por parte do departamento a qual a pessoa se destinava.

A sala de permanência da Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos (Figura 2 - C) é o local onde os profissionais passavam a maior parte do tempo desenvolvendo seus trabalhos e era equipada com mesas e computadores.

Figura 2 – (A) Entrada da Secretaria de Estado da Saúde - PR. (B) Recepção da Secretaria de Estado da Saúde - PR. (C) Sala de permanência da Divisão de Vigilância Sanitária de Alimentos



2.1.3 Atividades desenvolvidas

Durante o período de estágio, as atividades desenvolvidas incluíam o acompanhamento da rotina dos profissionais da DVVSA, porém esta rotina não envolvia parte prática, então as atividades ficaram limitadas apenas à parte teórica.

Na rotina da divisão eram elaborados ofícios circulares, memorandos, os profissionais recebiam algumas notificações sobre casos de alimentos supostamente contaminados e/ou estragados, a partir desta notificação era encaminhado um ofício para o município ou regional correspondente ao local de notificação. Os profissionais após encaminharem o ofício comunicando o respectivo município sobre as devidas atividades e precauções a serem desenvolvidas diante do caso, acompanhavam até o desfecho do caso, se as devidas medidas foram adotadas e se o caso foi sanado.

Durante o período de estágio, houve um enfoque maior sobre a questão de surtos alimentares, devido a importância que este possui sobre a questão de saúde pública.

Doenças Transmitidas por Alimentos, DTA, constituem um termo aplicado a uma síndrome que na maioria das vezes envolve náuseas, vômitos, anorexia. Além de sintomas digestivos as DTAs podem causar sintomas extraintestinais, envolvendo assim outros órgãos como, o fígado, rins e sistema nervoso (BRASIL, 2010).

As DTAs ocorrem devido à ingestão de alimentos ou água contaminados por toxinas produzidas pelas bactérias *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp.* *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Vibrio spp.* Entre outros que podem também estar contaminados pelas próprias bactérias, como por exemplo, a *Shigella spp.* ou por vírus, parasitas e até mesmo por substâncias tóxicas, como no caso de contaminação por agrotóxico e metal pesado (BRASIL, 2010).

A ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos vem aumentando a nível mundial. Dentre as razões que explicam este aumento, temos o aumento das populações, a existência de grupos populacionais mais vulneráveis ou mais expostos, o processo desordenado de urbanização, e a necessidade de uma grande produção de alimentos visando atender toda a demanda existente. Podemos citar também com uma razão, a falta de controle e fiscalização por parte dos órgãos públicos em relação à qualidade dos alimentos destinados a população (BRASIL, 2010).

A incidência das DTA's varia de acordo com a população, condições socioeconômicas, condições de saneamento entre outros. O aumento no consumo das chamadas redes "fast-foods", o consumo de alimentos em vias públicas, mudanças no hábito alimentar da população também explicam tal aumento na incidência das DTA's (BRASIL, 2010).

O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos no Brasil não é totalmente conhecido, apenas alguns estados e municípios possuem dados relacionados ao agente etiológico mais comumente envolvido, os alimentos mais frequentes, e a população mais exposta e de maior risco (BRASIL, 2010).

A notificação de surtos é obrigatória. A portaria número 104, de 25 de janeiro de 2011 da SVS/MS dispõe sobre a notificação de surto de DTA às autoridades locais de saúde e investigação imediata (BRASIL, 2011).

Antes da notificação de algum surto alimentar chegar ao nível central, ele era notificado à vigilância do município de origem, e após encaminhado à regional de saúde a qual o município pertencia, e por fim chegava ao nível central, na DVVSA.

Após receber a notificação, inicia-se a atividade de campo do surto de DTA, onde uma equipe se desloca até o local envolvido, para obter informações epidemiológicas, identificar fatores de riscos, agentes etiológicos mais prováveis, com o objetivo de apresentar medidas de prevenção e controle adequadas a tal situação (BRASIL, 2010).

A investigação do surto alimentar, começa com a identificação dos doentes e não doentes, chamados também de comensais, a definição do caso e o período de incubação, a fim de elaborar hipóteses relacionadas ao provável agente etiológico responsável pelo surto e o alimento mais suspeito (BRASIL, 2010).

Após a coleta de dados, a análise destes é fundamental, pois permitirá avaliar o risco ao qual os indivíduos foram expostos, quais são os alimentos mais suspeitos e os pontos críticos que não foram devidamente controlados/detectados que permitiram a ocorrência do surto. As medidas de prevenção e controle, como cuidados desde a agricultura, armazenamento, até a indústria e comércio e a casa do consumidor, devem ocorrer e serem aplicadas simultaneamente com a investigação (BRASIL, 2010).

O diagnóstico de uma DTA pode ser clínico-epidemiológico, e neste caso durante a investigação é importante considerar dados sobre os hábitos alimentares do paciente, consumo de alimentos ou refeições suspeitas, tempo da doença clínica e existência de outro indivíduo com a mesma sintomatologia (BRASIL, 2010).

O diagnóstico laboratorial constitui uma ferramenta importante para a investigação de um surto. É importante ressaltar que as análises laboratoriais não necessitam estar associadas ao aspecto legal. Ou seja, mesmo que o agente esteja dentro dos valores padrões normais, o diagnóstico laboratorial dependerá também de critérios clínicos e epidemiológicos. Em casos de não confirmação laboratorial, deve-se levar em conta o uso de antibioticoterapia, inativação do agente por conservação e/ou transporte inadequado da amostra ou também o uso de uma metodologia não específica para o isolamento do agente (BRASIL, 2010).

O tratamento das DTAs na maioria das vezes baseia-se em medidas de suporte, em geral é uma doença autolimitante, exceto para casos de botulismo,

intoxicação do tipo paralítica por mariscos, casos que acometem crianças, idosos ou pessoas imunodeprimidas entre outros (BRASIL, 2010).

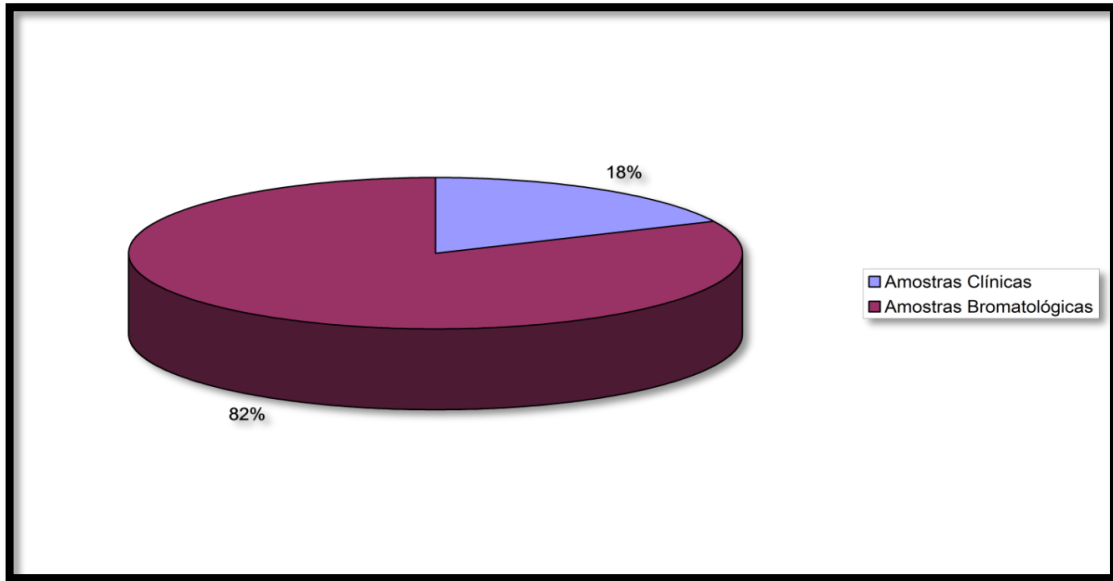
Segundo o Guia de Alimentos e Vigilância Sanitária da ANVISA, para a produção de alimentos seguros e saudáveis medidas de higiene, conhecidas como boas práticas são fundamentais em todas as etapas de produção, desde o campo até a casa do consumidor (BRASIL, 2014d).

Durante a realização de atividades relacionadas a surtos alimentares houve um levantamento de dados de diferentes categorias, os dados foram obtidos através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN-NET, que é mantido através de notificação e investigação de casos de doenças e agravos que estão descritos na lista nacional de doenças de notificação compulsória. Os estados e municípios que quiserem adicionar outros problemas de saúde presentes em sua região podem fazê-lo. A utilização deste sistema permite realizar um diagnóstico mais dinâmico sobre a ocorrência de um determinado evento na população. O sistema é um instrumento de trabalho que ajuda no planejamento da saúde, definir medidas de intervenção e avaliar o impacto destas intervenções (BRASIL, 2014c).

Os dados levantados são demonstrados em gráficos que podem ser observados a seguir.

A maioria das amostras enviadas para análise no Laboratório Central do Estado do Paraná – LACEN/PR eram bromatológicas e o seu percentual pode ser observado na Figura 3.

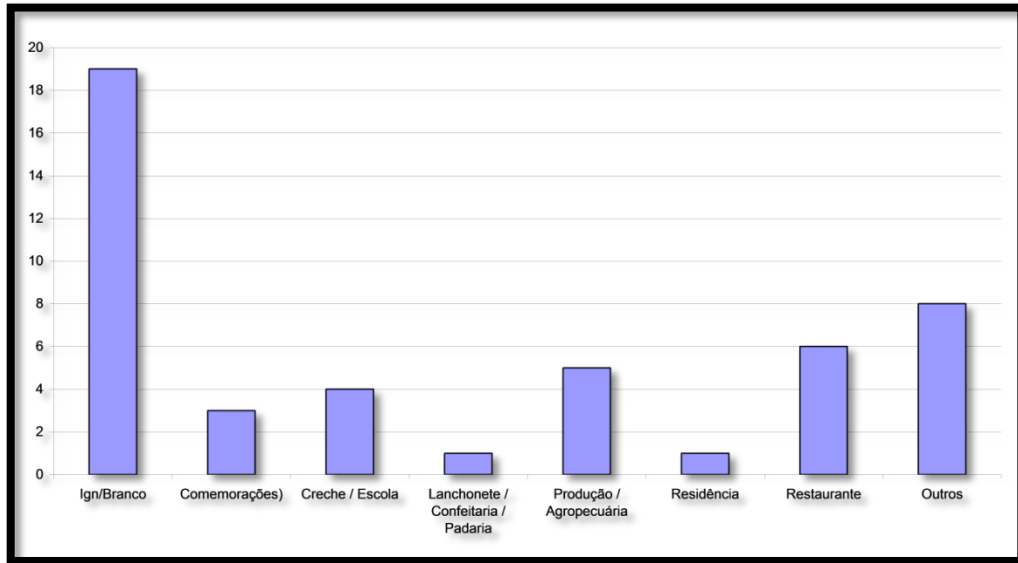
Figura 3 - Total de amostras clínicas e bromatológicas enviadas para análise no Laboratório Central do Estado - LACEN/PR



Fonte: DVVSA\CEVS\SVS\SINANNET
*Dados preliminares de janeiro a julho de 2014

Na maioria dos casos não foi possível chegar ao local exato de ocorrência do surto (Figura 4). Porém diversos autores relatam que a residência está muitas vezes relacionada com o local de ingestão do alimento contaminado. Almeida et al. (2013) demonstram que a residência do indivíduo acometido é considerada o principal local de ingestão do alimento contaminado. Dados encontrados pela Secretaria de Saúde – São Paulo (2009) também consideraram a residência como o principal local de ocorrência de surtos. Amson et al. (2006) obteve os mesmos resultados citados anteriormente.

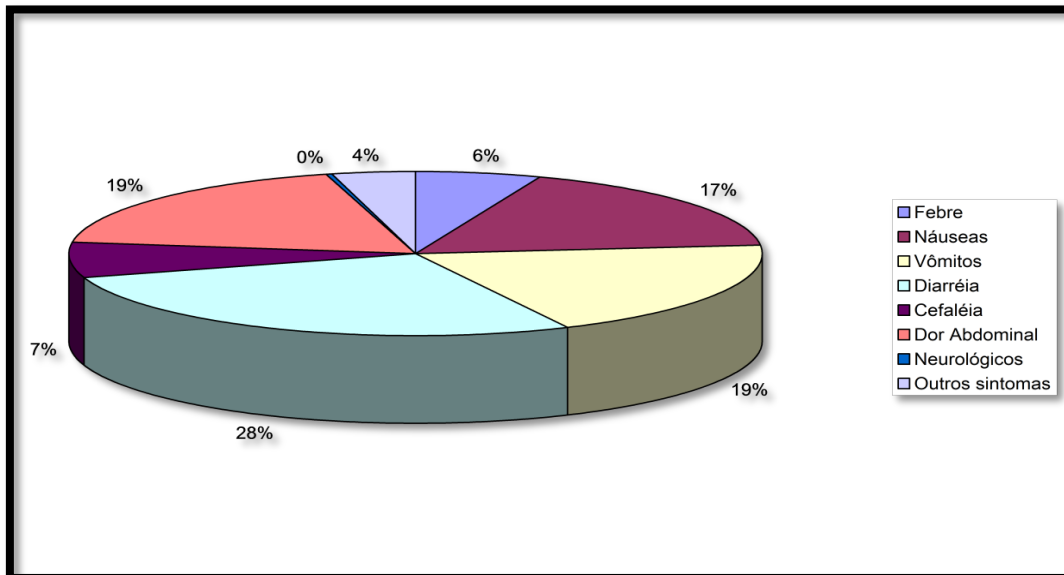
Figura 4 - Locais de produção e/ou preparação de refeições que ocasionaram surtos alimentares



Fonte: DVVSA\CEVS\SVS\SINANNET
 *Dados preliminares de janeiro a julho de 2014
 *Ign = Ignorados
 *Outros = hospitais, centros comunitários

Os principais sinais e sintomas apresentados pelos pacientes envolvidos no surto estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Principais sinais e sintomas apresentados pelos pacientes envolvidos em surtos de DTA's



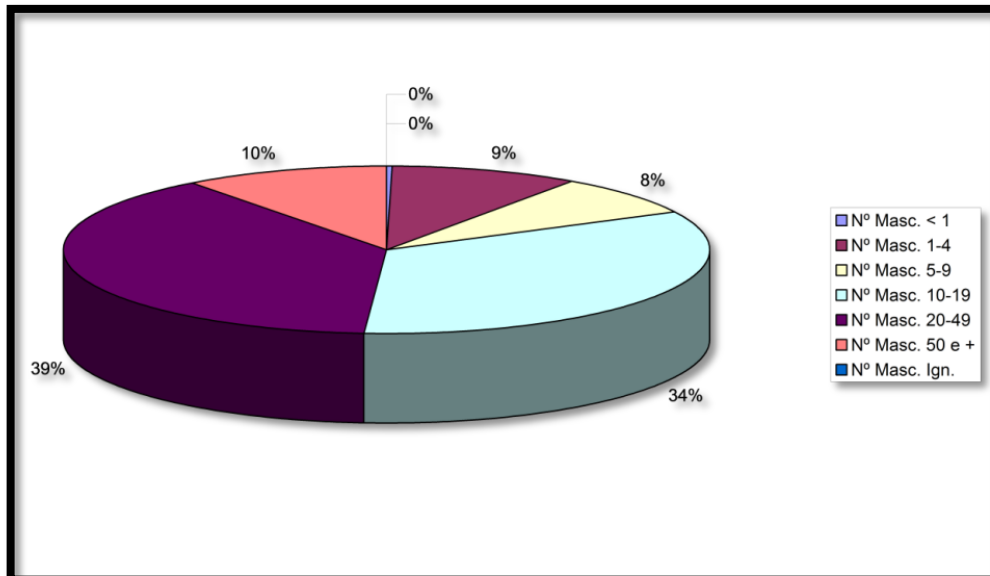
Fonte: DVVSA\CEVS\SVS\SINANNET
 *Dados preliminares de janeiro a julho de 2014

Podemos observar também que tanto para o sexo masculino (Figura 6) quanto para o feminino (Figura 7) a principal faixa etária envolvida nos surtos,

compreende dos 20 aos 49 anos com um percentual de 39% para o sexo masculino e de 41% para o sexo feminino.

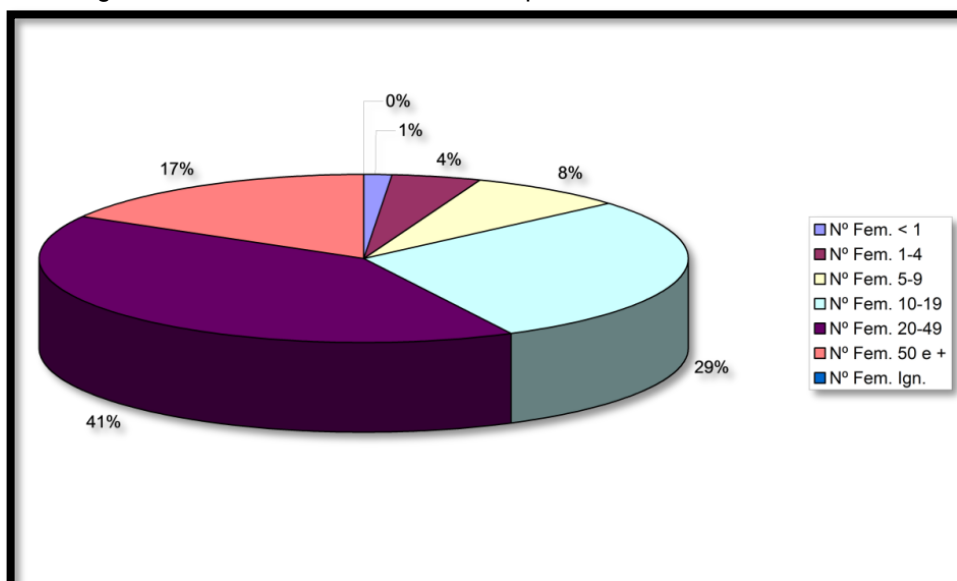
Os dados encontrados convergem com os encontrados por Almeida et al. (2013), onde no sexo feminino a faixa etária em que foi mais registrada o número de casos, foi indivíduos entre 20 e 49 anos de idade.

Figura 6 - Total de surtos alimentares por faixa etária no sexo masculino



Fonte: DVVSA\CEVS\SVS\SINANNET
*Dados preliminares de janeiro a julho de 2014

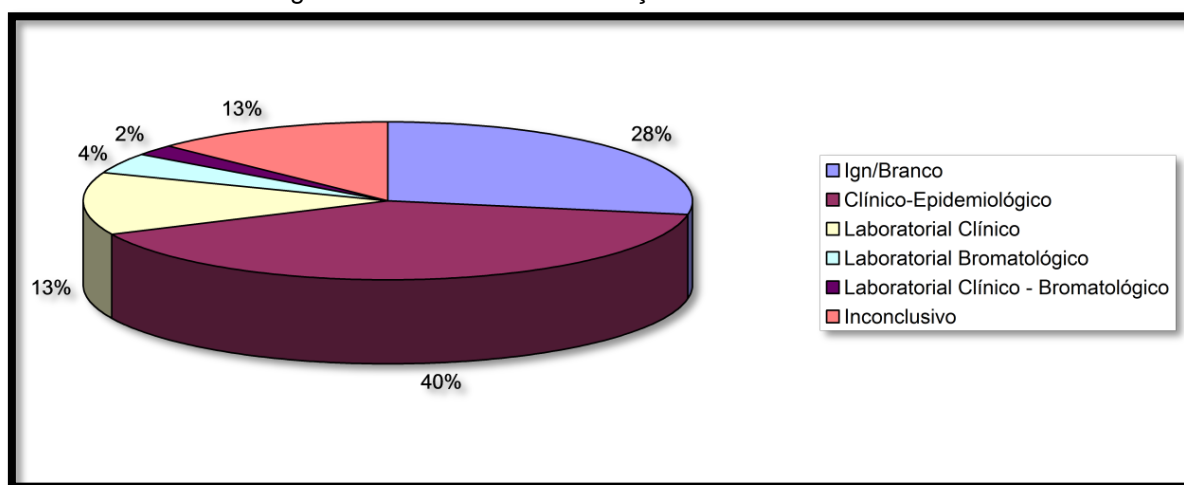
Figura 7 - Total de surtos alimentares por faixa etária no sexo feminino



Fonte: DVVSA\CEVS\SVS\SINANNET
*Dados preliminares de janeiro a julho de 2014

O critério de confirmação de surtos que foi mais empregado foi o clínico-epidemiológico com um percentual de 40% dos casos (Figura 8). Dados estes que vão de encontro com os encontrados por Almeida et al. (2013) em que o foi utilizado o mesmo critério de confirmação de surtos com um percentual de 44,68%. Estes dados divergem no trabalho de Amson et al. (2006), no período entre 1978 – 2000 no Estado do Paraná, onde 41,72% dos surtos foram confirmados por análise laboratorial.

Figura 8 - Critérios de confirmação de surtos alimentares



Fonte: DVVSA\CEVS\SVS\SINANNET
*Dados preliminares de janeiro a julho de 2014

Diante dos dados observados nos gráficos e tabela contidos neste estudo, podemos concluir que há uma necessidade de se aprofundar melhor a investigação dos surtos, visto que a maioria destes não se chegou ao local exato de produção dos alimentos que ocasionaram os surtos, pois só assim, poderão ser aplicadas medidas cabíveis e específicas, evitando a ocorrência de novos casos.

Há uma necessidade de maior vigilância sobre a produção de alimentos, sobre estabelecimentos que manipulam, comercializam alimentos, e principalmente deve-se informar ao consumidor os riscos a que eles podem estar expostos, os pontos principais que precisam ser levados em consideração ao comprar e consumir um alimento, e também as medidas higiênicas sanitárias que precisam ser exercidas dentro de suas residências, visto que os autores referenciados neste estudo encontraram na residência o principal local de ingestão do alimento contaminado.

A segurança alimentar e a produção de alimento seguro são essenciais, para a promoção da saúde pública. É fundamental investir em medidas de prevenção e controle sobre os alimentos, a fim de evitar maiores complicações para a sociedade, conservando assim o direito do cidadão de ter a saúde preservada e garantida.

2.2 PARTE 2 – Universidade Estadual de Londrina - UEL

2.2.1 Descrição do Local de Estágio

No período compreendido entre 16 de setembro a 17 de novembro de 2014, parte do estágio supervisionado foi realizado na Universidade Estadual de Londrina (UEL), no Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), das 08:00 as 12:00 horas e das 14:00 as 18:00 horas, com uma carga horária semanal de 40 horas, totalizando 360 horas. Sob a orientação da Professora Doutora Roberta Lemos Freire e do Professor Doutor Itamar Teodorico Navarro. Os laboratórios realizam exames tanto para rotina do Hospital Veterinário quanto para pesquisa, dentre os exames estão os de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) indireto, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), exame bacteriológico de água e coloração de Ziehl Neelsen modificada para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp.

A Universidade Estadual de Londrina - UEL foi oficialmente criada no dia sete de outubro de 1970 e tem como missão a gestão democrática, com plena autonomia didático-científica, comprometida com o desenvolvimento e a transformação social, econômica, política e cultural do Estado do Paraná e do Brasil. A UEL está localizada na Rodovia Celso Garcia Cid – PR 445 – km 380, município de Londrina, Paraná e detém autonomia didático-científica, administrativa e de gestão financeira e patrimonial em política educacional, porém depende dos recursos financeiros do governo do estado do Paraná que é de onde provém a grande parte dos recursos que certificam a operação e manutenção da universidade (UEL, 2014).

O Hospital Veterinário (HV), criado em nove de setembro de 1976, com atendimento de Pronto-Socorro 24 horas, atende à comunidade ininterruptamente

durante todo o ano. O complexo Hospital Veterinário tem atuação de dois Departamentos: Medicina Veterinária Preventiva e Clínicas Veterinárias (UEL, 2014).

As atividades do primeiro Departamento estão relacionadas com o diagnóstico em Sanidade Animal, e o segundo Departamento com as atividades clínicas, cirúrgicas, reprodução e obstetrícia e diagnóstico por imagem no Hospital Veterinário (UEL, 2014).

O Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública e o de Protozoologia encontram-se no Hospital Veterinário, no Centro de Ciências Agrárias, no *Campus* da UEL. O Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública realiza exame bacteriológico de água, Coloração de Ziehl Neelsen modificada para diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. pesquisa de toxoplasmose, neosporose e leishmaniose (UEL, 2014). Este laboratório conta além dos professores responsáveis, com uma residente e uma técnica de nível superior. O Laboratório de Protozoologia realiza exames sorológicos de rotina como Imunofluorescência Indireta para *Babesia* sp e *Anaplasma* sp, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para *Anaplasma* sp. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Ambas as residentes, fazem parte da residência em saúde pública, onde no primeiro ano a permanência é no Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, e no segundo ano a permanência é no Laboratório de Protozoologia.

Os exames diagnósticos são realizados a partir de amostras biológicas provenientes de animais do Hospital Veterinário da UEL, ao ensino dos alunos de graduação e aos projetos de pesquisa.

2.2.2 Área Física

2.2.2.1 Entrada do Hospital Veterinário

O Hospital Veterinário (HV) fica localizado em frente ao Centro de Ciências Agrárias, e a entrada observada na Figura 9 é destinada somente para docentes, discentes e funcionários. Os proprietários de animais que iriam ser consultados devem entrar pela recepção do HV, onde é realizada a triagem dos mesmos..

Figura 9 - Entrada do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina



2.2.2.2 Secretaria do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – DMVP

A Secretaria do DMVP (Figura 10) ficava localizada na entrada do Hospital Veterinário à esquerda, onde também estão localizadas as salas dos docentes da área de medicina veterinária preventiva.

Figura 10 - Secretaria do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Estadual de Londrina



2.2.2.3 Laboratório de protozoologia

O laboratório de protozoologia (Figuras 11 e 12) também faz parte do Hospital Veterinário, porém encontra-se anexo ao mesmo bloco da área de isolamento dos animais com moléstias infecciosas e do laboratório de virologia. Dentre a rotina, estão incluídos os exames sorológicos como Imunofluorescência

Indireta para *Babesia* sp e *Anaplasma* sp, e o Teste Imunoenzimático – ELISA para *Anaplasma* sp. Neste local também realiza-se a técnica da PCR para *Ehrlichia* spp, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma platys*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. É constituído de uma sala de extração (Figura 13), onde são extraídos os materiais biológicos (sangue, fezes) que irão ser submetidos à técnica da PCR. Uma sala para cultivo celular (Figura 14), e uma sala para PCR (Figura 15), que dispõe de um fluxo exclusivo para adicionar as amostras e outro para preparo mix, chamados respectivamente de fluxo sujo e fluxo limpo, além de um almoxarifado onde são estocados os materiais necessários para a continuidade da rotina.

Figura 11 - Vista externa do laboratório de protozoologia, UEL



Figura 12 - Vista interna do laboratório de protozoologia, UEL



Figura 13 - Sala para extração de ácidos nucleicos. Laboratório de protozoologia, UEL



Figura 14 - Sala de cultivo celular. Laboratório de protozoologia, UEL

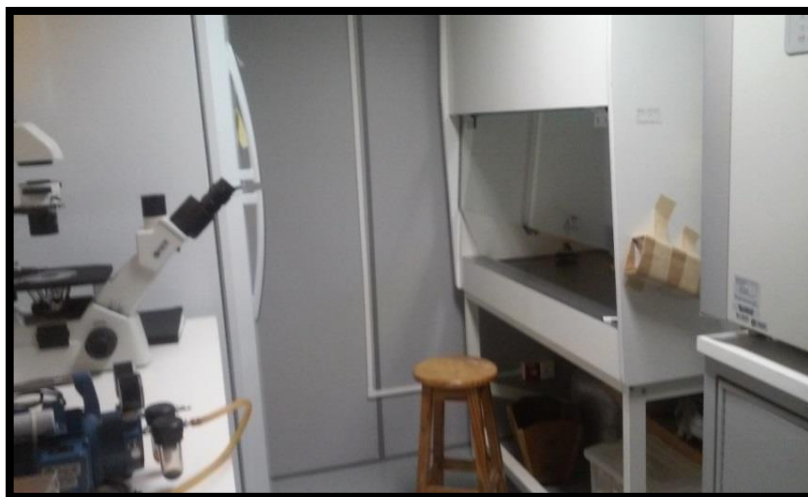


Figura 15 - Sala para PCR. Laboratório de protozoologia, UEL



O laboratório é constituído por uma parte superior, onde ficam as salas destinadas aos mestrandos e doutorandos e a técnica responsável pelo laboratório, uma sala com um sornicador e um liofilizador, uma sala com um fluxo laminar, e a sala para leitura de RIFI (Figura 16).

Figura 166 - Sala para leitura de RIFI. Laboratório de protozoologia, UEL



2.2.2.4 Sala de lavagem e esterilização de materiais

Em anexo ao Laboratório de Protozoologia encontra-se uma sala que é destinada apenas para lavagem e esterilização dos materiais utilizados na rotina do

laboratório. Esta sala conta com uma pia, duas estufas e duas geladeiras (Figura 17).

Figura 17 - Sala para lavagem e esterilização de materiais. Laboratório de protozoologia, UEL



2.2.2.5 Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública

O laboratório de Zoonoses e Saúde Pública (Figura 18) encontra-se dentro do Hospital Veterinário, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, e é constituído de duas estufas para secagem de materiais, uma autoclave, duas geladeiras sendo uma para materiais limpos e outra para materiais sujos e dois freezers para a conservação dos materiais. Há uma técnica de nível superior responsável pelo laboratório e a residente do primeiro ano do Programa de Residência em Saúde Pública. Dentre as atividades desenvolvidas estão à rotina de reação de Imunofluorescência Indireta para leishmaniose, toxoplasmose e neosporose, realizada toda quinta-feira. Manutenção de cepas de *Toxoplasma gondii*, também faz parte da rotina, porém é realizada no infectório, análise microbiológica da água e pesquisa de *Cryptosporidium* spp. O laboratório também conta com a presença de alguns mestrados e doutorandos e estagiários de diferentes períodos da medicina veterinária.

Figura 18 - Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, da Universidade Estadual de Londrina



2.2.3 Atividades desenvolvidas

Foram desenvolvidas diversas atividades da rotina laboratorial, acompanhamento dos residentes e pós-graduandos, lavagem e preparação de materiais, realização de RIFI para diagnóstico de leishmaniose e toxoplasmose, *Western blotting* para diagnóstico de toxoplasmose, manutenção de cepas de *Toxoplasma gondii* e acompanhamento das residentes nos plantões realizados na área de moléstias infecciosas.

2.2.3.1 *Western blotting* para *Toxoplasma gondii*

O *Western blotting* é um método que possui alta especificidade e sensibilidade, sendo considerada "padrão ouro" para a detecção de proteínas. Porém a realização da técnica é demorada e com várias etapas de execução, fazendo com que a sua utilização na rotina prática seja um pouco limitada, principalmente em casos com grandes números de amostras (BONSING et al., 1997). Segundo Pinheiro (2001) a técnica de *Western blotting* possui a desvantagem por ser uma técnica laboriosa e demorada que requer a separação das proteínas através da eletroforese, antes da transferência destas para a membrana de nitrocelulose, porém é uma técnica mais sensível que o teste de ELISA.

A técnica foi realizada como descrito por Towbin et al. (1979). A transferência foi realizada com o uso do aparelho I BLOT™ Gel Transfer System. O *Western blotting* foi padronizado para o desenvolvimento de um projeto de doutorado de uma médica infectopediatra que trabalha no Hospital Universitário de Londrina.

A técnica inicia-se com a preparação do gel de poliacrilamida. Eram utilizadas duas concentrações de gel para a eletroforese, um que fica na parte inferior que é a 12% e outro que fica na parte superior a 5%. Para o preparo do primeiro gel utilizava-se 3,4 mL de água ultra pura, 2,5 mL de Tris pH 8,8, 0,1 mL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%, Persulfato de amônia (PA) 50 µL e Tetramethylethylenediamine (TEMED) 10 µL. Todos os reagentes eram diluídos e adicionados à cuba onde estavam montados os vidros para o gel, e aguardava-se a polimerização em temperatura ambiente. Após, era preparado o segundo gel, que era constituído dos mesmos reagentes citados anteriormente mudando apenas na quantidade adicionada, sendo 2,85 mL de água ultra pura, 1,25 mL de Tris pH 6,8, 50 µL de SDS 10%, 25 µL de PA e 5 µL de TEMED.

As amostras eram preparadas em microtubos de 200 µL, onde 20 µL era da amostra e 10 µL do Tampão de Adsorção (TA) 5% concentrado, em seguida eram levados ao termociclador aparelho que promove a alternância de temperaturas durante um período de tempo, promovendo a repetição de vários ciclos de desnaturação e síntese de DNA.

Após a correta polimerização do gel, este era colocado na cuba de eletroforese vertical, adicionado tampão de glicerina 1 vez concentrado até a cobertura total do gel, e então era adicionada a amostra de proteína de *Toxoplasma gondii* preparada anteriormente em microtubo de 200 µL no gel, um espaço específico do gel, ficava destinado à colocação do peso molecular (5 µL).

Após esta etapa, o equipamento para a eletroforese era montado e ligado, e então iniciava-se a etapa de eletroforese, onde as frações antigênicas sofriam ação da carga elétrica migrando assim, do pólo negativo para o positivo (Figura 19 e 20).

Figura 19 - Cuba para eletroforese em gel de poliacrilamida



Posteriormente, ocorria a separação das proteínas pelo seu tamanho, sendo a posição definida pela comparação com a migração do peso molecular conhecido, podendo desta forma determinar o peso molecular das proteínas.

Figura 20 - Aparelho para eletroforese em gel de poliacrilamida



Ao término da eletroforese, o gel era usado para transferir para a membrana de nitrocelulose as proteínas, pois o gel não é considerado um meio muito apropriado para a imunodeteção, por não servir de suporte ideal para as ligações antígeno/anticorpo. A transferência foi feita com o aparelho I BLOT™ Gel Transfer System (Figura 21), seguindo todas as instruções do fabricante e utilizando o *kit* para transferência do mesmo. Ao final da transferência, a membrana serve de apoio para o ensaio imunoenzimático.

Figura 21 - Equipamento de transferência para a membrana de nitrocelulose



Após a transferência retirava-se o papel de nitrocelulose do aparelho e corava-se com ponceau por cinco minutos sob agitação para evidenciar a eficácia da transferência, seguido da lavagem com água destilada. As fitas após cortadas eram colocadas em placas, onde cada uma representava uma amostra de soro a ser analisada (Figura 22).

Figura 22 - Placa para *Western blotting* com fitas de nitrocelulose



A membrana de nitrocelulose possui alta afinidade por proteínas sendo dessa forma, necessário bloqueá-la para que assim se evite que os anticorpos se liguem a toda membrana e não apenas ao antígeno, como desejado. O leite utilizado para bloquear a placa, era da marca comercial Molico®. As fitas eram bloqueadas

com leite 5% diluído em Tampão Fosfato Salino (TBS) tween, e permaneciam sob agitação constante por uma hora em temperatura ambiente. Ao término do bloqueio eram realizadas três lavagens consecutivas com TBS Tween + leite 5%, com duração de dez minutos a primeira, e cinco minutos a segunda e terceira lavagem. Durante as lavagens as placas permaneciam sob agitação constante através de um agitador orbital.

Ao final das três lavagens, adicionava-se o primeiro anticorpo, a amostra de soro, que é o que se liga ao antígeno presente na membrana. Este era diluído em TBS tween + leite 5%, deixando sob agitação constante por uma hora e 30 minutos em temperatura ambiente. Após, as placas eram submetidas às mesmas três lavagens mencionadas acima, com o mesmo tempo de duração.

Ao final, adicionava-se o conjugado diluído em TBS tween + leite 5%, deixando sob agitação por uma hora e 30 minutos, após este tempo as mesmas três lavagens eram repetidas.

Ao término de todo esse processo, era adicionado o substrato cromógeno, responsável pela coloração das bandas, no qual este era preparado com 60 mg de Diaminobenzidina (DAB), 30 mL de água ultra pura e 60 µL de água oxigenada. Após a adição do substrato cromógeno, homogeneizava-se de forma manual por um tempo não específico, até que aparecessem as bandas e a ponto de que não manchasse a fita por completo, a reação era parada com água destilada.

Por fim, as fitas eram deixadas para secar sob papel absorvente e após eram coladas em papel sulfite para serem medidas com uma régua, para que se pudesse determinar a altura das bandas coradas, e posteriormente os dados eram passados para um programa estatístico.

2.2.3.2 Manutenção de cepas de *Toxoplasma gondii*

Dentre a rotina do laboratório, incluía semanalmente, às segundas, quartas e sextas-feiras a manutenção de cepas de *T.gondii in vivo*.

As cepas eram mantidas em camundongos suíços, albinos, fêmeas, com 60 dias de idade sendo realizada a manutenção no infectório, que está localizado no isolamento do Hospital Veterinário. As cepas mantidas são: AS-28, N, CN, VPS, CPI, OH, S-11, HV-3, LIV-4, RH, LIV-5 (Figura 23).

Figura 23 - Fluxo, localizado no infectório da UEL, onde são mantidos os camundongos para a manutenção de cepas de *T. gondii*



As cepas são mantidas para uso interno dos Laboratórios de Zoonoses e Saúde Pública e Protozoologia.

O procedimento era realizado dentro de um fluxo (Figura 24), onde a pessoa que o realizava deveria utilizar equipamentos de proteção individual (luvas, óculos de proteção) e iniciava-se com a eutanásia dos camundongos inoculados com taquizoítas de *T.gondii* há dois dias, em câmara saturada com éter e após era feito o deslocamento cervical (Figura 25), posteriormente, os animais eram fixados com agulhas nos membros anteriores e posteriores em uma cortiça de madeira em decúbito dorsal. Preparava-se a região abdominal com álcool iodado e tracionava-se a pele do abdômen no sentido cabeça e cauda, com o objetivo de rompê-la e expor a camada muscular abdominal (Figura 26 - A), então uma solução de salina estéril (2 mL) era inoculada via intraperitoneal evitando-se tocar as vísceras (Figura 26 - B). Com o auxílio da pinça dente de rato a solução era espalhada dentro do abdômen e após, era aspirado o exsudato peritoneal (Figura 26 - C). As amostras obtidas do lavado peritoneal eram analisadas em microscópico óptico no aumento de 400 vezes, onde observava-se a viabilidade e, principalmente, a quantidade dos taquizoítas (Figura 27). Este exsudato obtido era então inoculado em outros dois camundongos (0,2 mL para cada camundongo).

Figura 24 - Fluxo, para a realização da manutenção de cepas de *T. gondii*



Figura 25 - Camundongo em câmara saturada com éter



Figura 26 - (A) Camundongo fixado em cortiça e com a cama muscular exposta. (B) Inoculação, em camundongo eutanasiado, de solução salina estéril. (C) Aspiração do exsudato peritoneal de camundongo

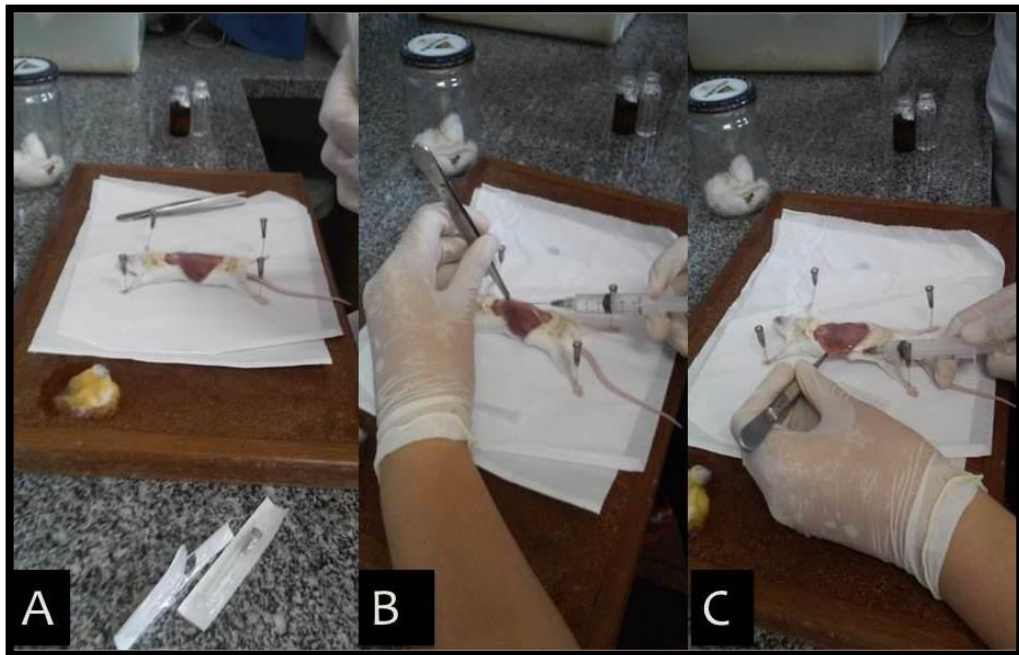
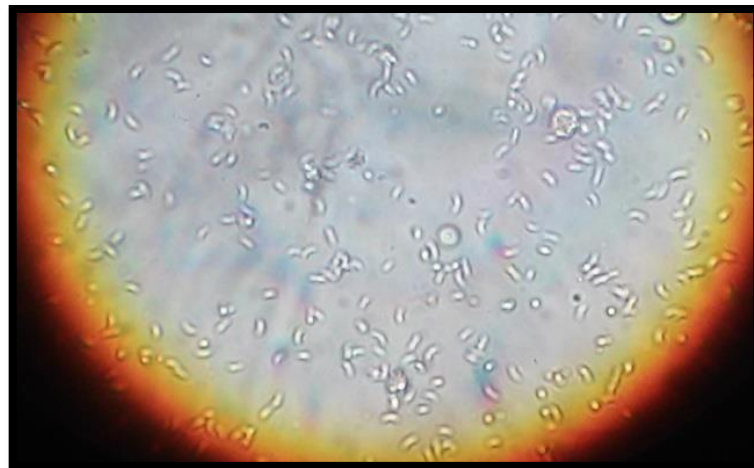


Figura 27 - Observação dos taquizoítas de *T. gondii* aspirados de camundongo



Em casos de situações problemáticas como presença de grande número de taquizoítas no exsudato, passava-se duas vezes pela agulha 27 G com o objetivo de lisar algumas células. Na presença de poucos taquizoítas, recomenda-se centrifugar a 2000 rotações por minuto (rpm) por 5-10 minutos e desprezar o sobrenadante e proceder a contagem em câmara de Neubauer.

2.2.3.3 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A Reação de Imunofluorescência Indireta é considerada um exame sorológico de boa especificidade e sensibilidade, uma técnica prática e segura para a rotina laboratorial, uma vez que utiliza antígenos preservados e fixados em lâminas de microscopia (COSTA et al, 2007).

Para Pagliari (2011), a RIFI também é uma técnica sensível, específica e de prática realização, porém a leitura e interpretação são consideradas subjetivas.

É um exame sorológico onde se pesquisa a presença de anticorpos específicos contra um determinado parasita. É um exame que necessita de um conjugado, que é uma anti-imunoglobulina, marcado com isotiocianato de fluoresceína, no qual este vai se ligar ao complexo Antígeno-Anticorpo produzindo assim uma reação de fluorescência permitindo a visualização da interação Antígeno-Anticorpo (PAGLIARI, 2011).

O soro analisado será considerado reagente se ao entrar em contato com o antígeno produzir uma reação fluorescente, indicativo da presença de anticorpos. O resultado positivo não indica, necessariamente, a doença clínica e sim um contato prévio do animal com o patógeno. O exame é considerado negativo quando não produzir uma reação fluorescente (CALDART, 2009).

2.2.3.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para diagnóstico de *Toxoplasma gondii*

A técnica utilizada para verificar a presença de anticorpos anti-*T.gondii* no Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, é a RIFI como descrito por Camargo et al. (1968). As lâminas utilizadas para este procedimento foram adsorvidas com taquizoítas da amostra RH, inativados e devidamente fixados em lâmina.

Iniciava-se a RIFI com a separação dos soros e os controles positivos (TP) e negativos (TN) que eram utilizados, e o aquecimento da câmara úmida (Figura 28) na estufa a 37°C. Em uma microplaca com fundo achatado eram demarcados os poços a serem utilizados, com fita crepe, e pipetados em cada poço 150 µL de Tampão Fosfato Salino (TBS) pH 7,2. Para a diluição do soro, eram pipetados 20 µL da amostra de soro no poço da primeira diluição (1:16) e homogeneizado, a diluição do soro era feita na base 4, iniciando-se em 1:16 e terminando em 1:4096.

Figura 28 - Lâminas para RIFI, em câmara úmida



Para melhor controle e organização da técnica, há um formulário para anotações da quantidade de lâminas e soros a serem utilizados (Figura 29).

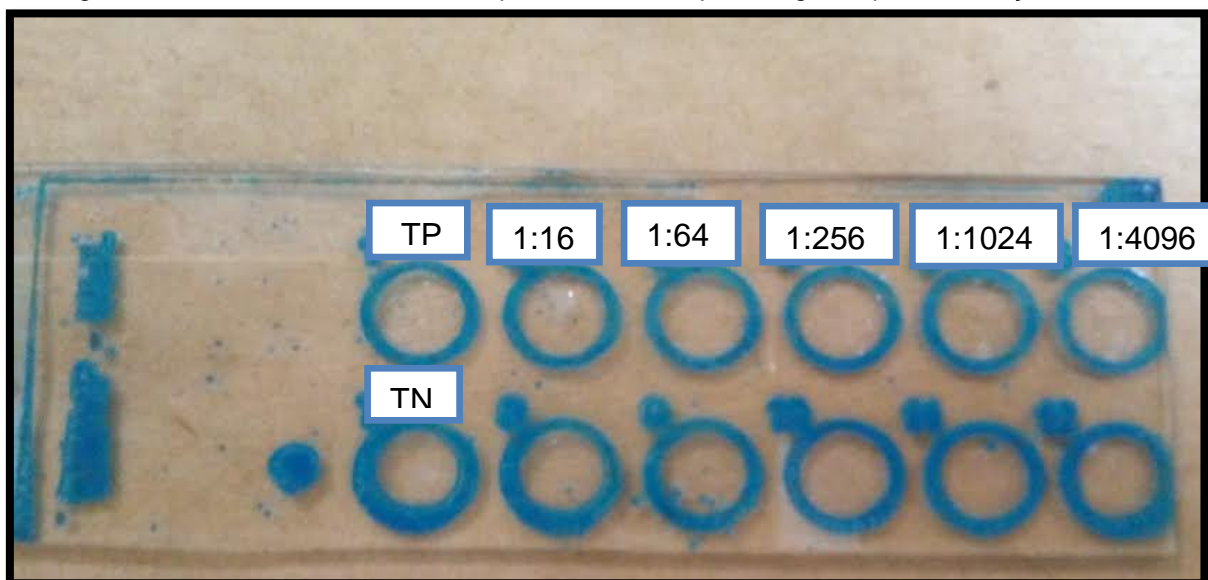
Figura 29 - Mapa organizativo das lâminas a serem usadas na RIFI

Após esta etapa eram feitas as diluições dos soros, transferindo 50 μ L da primeira diluição para o poço da segunda diluição e assim por diante, até o último

poço, sempre homogeneizando. Em dois poços individuais eram colocados 10 µL de TP e TN em 150 µL de PBS, utilizando somente a primeira diluição de 1:16.

As lâminas contêm 12 poços no total, os poços um e sete ficavam reservados para o TP e TN respectivamente (Figura 30). De cada diluição feita na microplaca, eram pipetados 10 µL nos poços dois a seis das lâminas, sempre começando da maior diluição para a menor, a fim de evitar que concentre-se as diluições, para TP e TN eram pipetados os mesmos valores. Uma mesma lâmina era utilizada para o exame de duas amostras distintas, ficando os poços oito a doze destinados à outra amostra. Após esta etapa, as lâminas eram colocadas em câmara úmida e incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos visando à ligação dos anticorpos do soro aos antígenos da lâmina. Ao término deste tempo, eram realizadas três lavagens das lâminas com PBS pH 7,2 1 vez concentrado, com duração de dez minutos, posteriormente era deixada secando na estufa a 37°C.

Figura 30 - Lâmina adsorvida com taquizoítas de *Toxoplasma gondii* para realização da RIFI



O conjugado utilizado era espécie específico anti-IgG, a diluição do conjugado era padronizada para todas as RIFIs realizadas no referido laboratório (*Toxoplasma*, *Leishmania* e *Neospora*). Periodicamente, o valor padronizado poderia sofrer alterações, caso o valor antigo da diluição não estivesse mais fornecendo o resultado esperado, uma vez que o congelamento e descongelamento do TP e TN e do próprio conjugado pode acabar degradando e interferindo na diluição padrão (Tabela 1).

Tabela 1 – Diluição do conjugado de acordo com a espécie animal para realização de RIFI.
Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, UEL

<i>Espécie animal</i>	<i>Diluição conjugado</i>
Camundongo	1:250
Cão	1:350
Ovino	1:700
Bovino	1:300
Macaco	1:600
Felino	1:300
Humano	1:500
Caprino	1:3750
Suíno	1:1100
Equino	1:900

Fonte: Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública – UEL, 2014

Eram pipetados em cada poço da lâmina 10 μ L de conjugado, após devidamente diluído com base na espécie animal para qual está sendo realizada a técnica, e incubadas novamente a 37°C por 30 minutos para que ocorresse a ligação do conjugado ao anticorpo que se aderiu à lâmina. Ao término deste tempo eram feitas as mesmas três lavagens de 10 minutos com TBS pH 7,2 1 vez concentrado, as lâminas eram colocadas para secar na estufa a 37°C por um tempo indeterminado e depois de secas eram montadas com glicerina tamponada pH 8,0 e lamínula 50 x 24 mm.

Após montadas, as lâminas eram embrulhadas em papel absorvente e papel alumínio, e caso a leitura não fosse imediata, colocava-se as lâminas sob refrigeração. A leitura da técnica era realizada em uma sala específica escura, no microscópio de epifluorescência (Figura 31), em um aumento de 400 vezes, localizado no Laboratório de Protozoologia. Primeiro, observava-se o teste positivo (Figura 32) para constatar se a reação ocorreu e depois o teste negativo (Figura 33) para visualizar se houve alguma contaminação e/ou erro de técnica.

Figura 31 - Microscópio de epifluorescência para leitura de RIFI

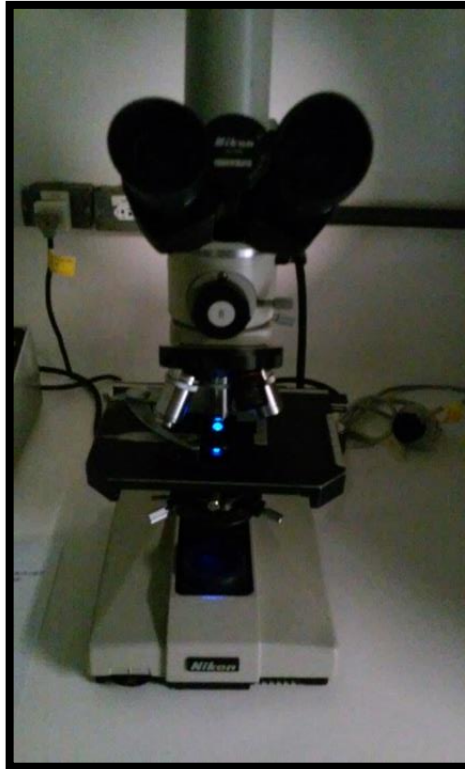


Figura 32 - Observação do teste positivo em microscópio de epifluorescência no aumento de 400 vezes

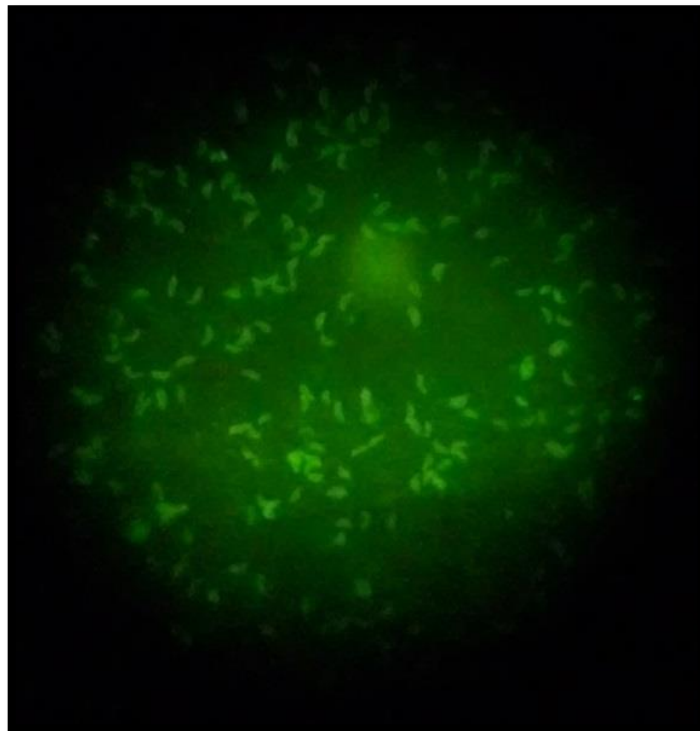
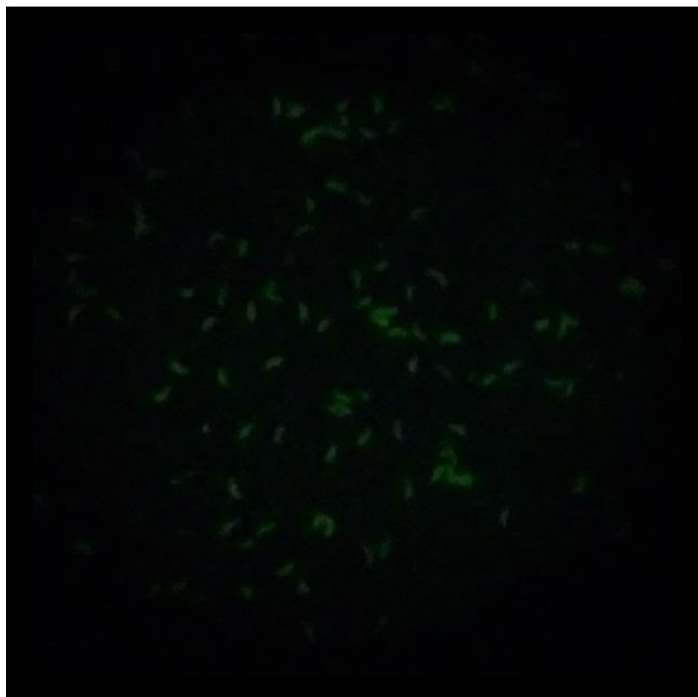


Figura 33 - Observação do teste negativo em microscópio de epifluorescência no aumento de 400 vezes



Em casos onde a quantidade de amostras de soro a ser analisada era muito grande, ou em casos de projetos de pesquisa, com o intuito de otimizar as lâminas, estas amostras eram submetidas a triagem, onde na lâmina com 12 poços, ficavam destinados dois poços no sentido vertical, para cada amostra, podendo portanto ser feita a triagem de seis amostras por lâmina. Na triagem, eram feitas as mesmas etapas mencionadas anteriormente, e eram feitas as diluições 1:16 e 1:64 por amostra, as que forem reagentes na diluição 1:64 são consideradas positivas e irão ser submetidas a diluição completa (até 1:4096) para assim poder ver a intensidade da reação fluorescente.

1.2.3.3.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para diagnóstico de *Leishmania* sp.

A técnica utilizada para verificar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. no Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, é a RIFI segundo Oliveira et al. (2008). As lâminas utilizadas para este procedimento são adsorvidas com promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis*, inativados e devidamente fixados.

A técnica possui as mesmas etapas que a de RIFI para diagnóstico de *Toxoplasma gondii*, divergindo na referência do protocolo, no tempo de incubação, sendo que para *Leishmania* sp. é de 40 minutos e são feitas apenas 2 lavagens das lâminas nos intervalos entre as incubações e na diluição do soro, que neste caso é feita na base 2.

Na Figura 34 estão demonstradas a lâminas utilizada e as diluições que eram feitas, iniciando-se em 1:40 e terminando em 1:640. As lâminas eram lidas no microscópio de epifluorescência, onde na Figura 35 observa-se a reação de fluorescência.

Figura 34 - Lâmina adsorvida com promastigotas de *Leishmania* sp. para realização da RIFI

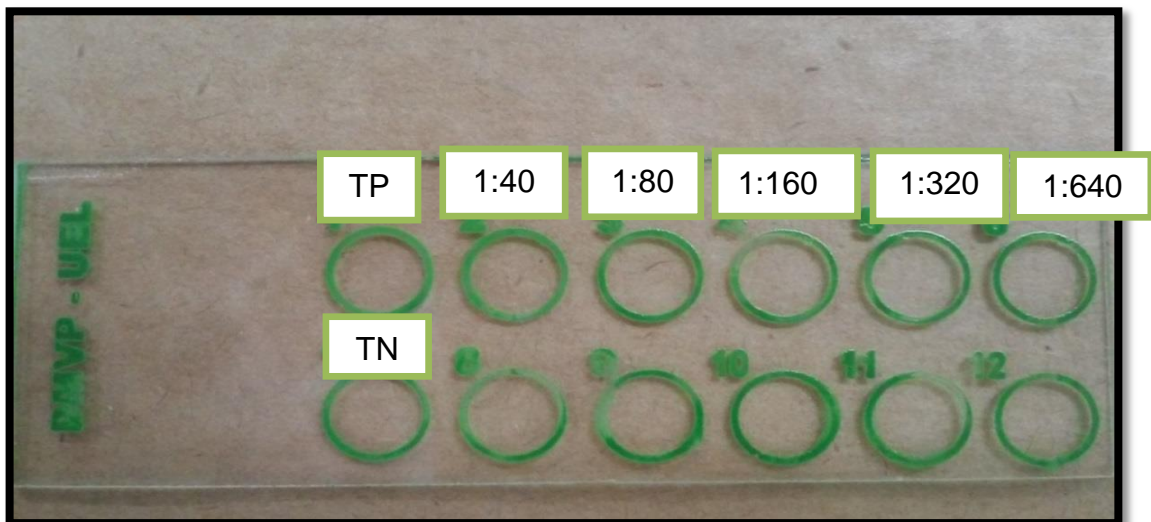
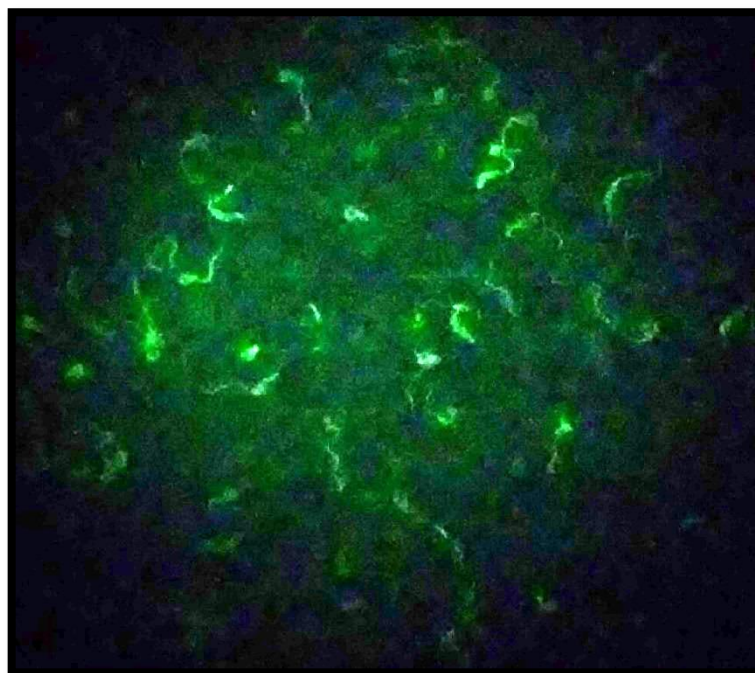


Figura 35 - Observação de reação de fluorescência em microscópio de epifluorescência no aumento de 400 vezes



2.2.3.4 Coloração de Ziehl-Neelsen modificada

Os gêneros *Cryptosporidium spp.* são protozoários intracelulares obrigatórios que parasitam, principalmente, a superfície epitelial do trato gastrointestinal de seus hospedeiros (CHAKO et al., 2010).

A criptosporidiose é uma doença que causa diarreia devido a multiplicação de parasitas no intestino delgado. Nos seres humanos, a criptosporidiose é mais comumente causada por *C. Hominis* (CHALMERS et al., 2013).

A investigação laboratorial da criptosporidiose é realizada através da pesquisa de oocistos nas fezes, utilizando principalmente um método de coloração especial, sendo os procedimentos álcool-ácidos resistentes os mais conhecidos (CARVALHO ALMEIDA, 2004).

Esta coloração foi utilizada para a pesquisa de *Cryptosporidium* em fezes de bezerros com histórico de diarreia há mais de um mês. A técnica foi desenvolvida como descrito por Henriksen et al. (2006).

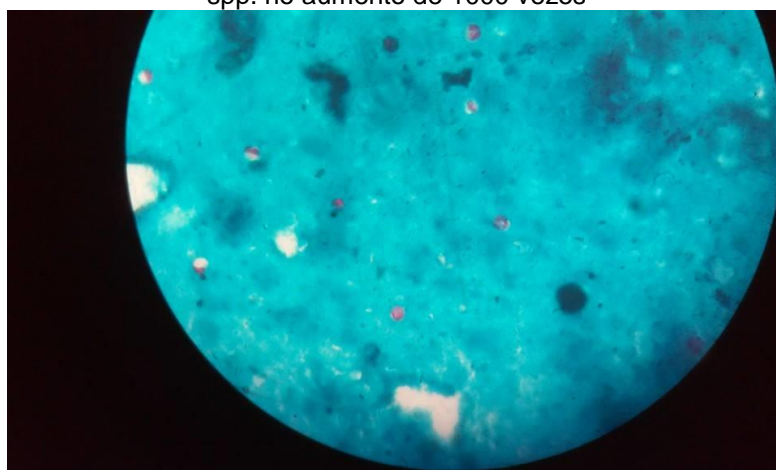
Foram feitos esfregaços das fezes em duplicatas em lâminas, com o auxílio de bastões de vidro. As lâminas contidas com as fezes foram fixadas em metanol durante cinco minutos e posteriormente secadas em chama incandescente.

Após foram submetidas à fucsina fenicada por 30 minutos e depois lavadas em água corrente. Foram colocadas também no ácido sulfúrico 5% durante um minuto, depois no verde malaquita por cinco minutos e lavadas em água corrente.

Ao término desta sequência de coloração, as lâminas foram colocadas para secar em temperatura ambiente, e após devidamente secas, foram submetidas à leitura no aumento de 400 vezes e posteriormente no aumento de 1000 vezes com uma fina camada de óleo de imersão.

Na leitura avaliava-se a quantidade de oocistos de *Cryptosporidium* spp. por campo (Figura 36), onde os scores variavam de uma cruz para até três oocistos por lâmina, duas cruzes para mais de três oocistos por lâminas e até cinco oocistos por campo, três cruzes para cinco a dez oocistos por campo e quatro cruzes para mais de dez oocistos por campo.

Figura 36 - Visualização de lâmina com esfregaço de fezes, contendo oocistos de *Cryptosporidium* spp. no aumento de 1000 vezes



3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio curricular supervisionado proporcionou um grande aprendizado tanto na parte prática como teórica, além de ser uma etapa de grande valia para a formação do acadêmico, pois é através deste que podemos colocar em prática todo o aprendizado adquirido ao longo dos anos de graduação, vivenciar experiências muitas vezes inéditas e com isso acrescentar em nossa vida profissional e pessoal.

A escolha pela área de saúde pública e zoonoses foi devido à importância que esta área possui tanto na vida animal, como na vida humana.

Ter realizado o estágio curricular supervisionado em dois locais que envolvem a área de saúde pública, porém ao mesmo tempo distintos, me permitiu ter um conhecimento mais amplo sobre duas rotinas, e conhecer o trabalho do médico veterinário tanto na área de vigilância sanitária como na laboratorial.

O estágio na SESA, em especial na Divisão de Alimentos, não pode me acrescentar muito no que diz respeito à parte prática, visto que na maior parte do tempo não havia atividades práticas a serem desenvolvidas, e com isso não pude executar o que tenho de acumulado de experiências, bem como aprender novas técnicas. O estágio na UEL foi de grande valia, pois neste eu pude colocar em prática meu aprendizado adquirido durante a graduação, e também aprender outras técnicas que não conhecia.

Considerando o fato de ser um estágio curricular, e que este constitui uma das últimas oportunidades que o acadêmico possui de poder estagiar, é de extrema importância que este estágio envolva na sua maioria a parte prática, onde o aluno possa executar seus conhecimentos e adquirir novos outros.

4 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.N.; DE PAULA, C.M.S.; SVOBODA, W.K.; LOPES, M.O.; PILONETOO, M.P.; ABRAHÃO, W.M.; GOMES, E.C. Perfil epidemiológico de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Paraná, Brasil. Semina: Ciências biológicas e da Saúde, Londrina, v.34, n.1, p.97-106, jan./jul., 2013.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado no Paraná-Brasil no período de 1978 a 2000. Ciênc. Agrotec., Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez., 2006.

BONSING, B.A.; COVER, W.E.; GORSIRA, M.C.B.; VAN VLIET, M.; OUD, P.S.; CORNELISSE, C.J.; FLEUREN, G.J. Specific of seven Monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy and flow cytometry. Cytometry. 1997;28:11-24.

BRASIL, Lei nº 8.080 de 19 de Setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências.

BRASIL. Ministério da saúde. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. 2010.

BRASIL, Portaria nº 104 de 25 de Janeiro de 2011. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde.

BRASIL. Secretaria da saúde do estado do Paraná. Histórico da vigilância sanitária. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=141>>. Acesso em: 12 de outubro de 2014a.

BRASIL. Secretaria da saúde do estado do Paraná. Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=2796>>. Acesso em: 12 de outubro de 2014b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de informação de agravos de notificação. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>>. Acesso em: 30 de outubro de 2014c.

BRASIL. ANVISA. Guia de Alimentos e Vigilância Sanitária. 2014d.

CALDART, E. T. Relatório de estágio curricular. Estágio realizado na Universidade de São Paulo – USP na área de Biologia Molecular. Faculdade de Veterinária, Universidade federal do Rio Grande do Sul. Disciplina de estágio curricular em Medicina Veterinária. Porto Alegre, 2009.

CAMARGO, M. E. Introdução as técnicas de imunofluorescência. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, v.10, n.3, p.87-107, 1974.

CARVALHO ALMEIDA, T.T Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporidae) em amostras fecais, extração do DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase). 2004 131 p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública da Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

CHAKO C. Z, TYLER J. W, SCHULTZ L.G, CHIGUMA L, BEEMTSEN B.T Cryptosporidiosis in people: it's not just about the cows. *J Vet Intern Med* 2010,24:37–43.

CHALMERS, R. M.; KATZER, F. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends in Parasitology*, v. 29, n. 5, p. 237-251, 2013.

COSTA, L.D.; SILVIA, M.G.; RODRIGUES, I.M.X.; BARBARESCO, A.A.; AVELINO, M.M.; CASTRO, A.M. Diagnóstico Clínico e Laboratorial da Toxoplasmose. *NewsLab*, ed. 85, p. 88-104, 2007.

DIAS, I.C.L. Prevenção de zoonoses ocupacionais em abatedouros de bovinos. *Vivências*, v.08, n.15, p.89-98, 2012.

HENRIKSEN, S.A.; POHLENZ, J.F.L. Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 22, p.594-596, 1981; CIMERMAN, S. Avanços em Criptosporidiose. *Revista Panamericana de Infectologia*, v.8, p.3, 2006;

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P.I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R.Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

PAGLIARI, S. Diagnóstico Molecular da Toxoplasmose congênita e gestacional: Revisão bibliográfica. 40f. Monografia (Especialização em Saúde Coletiva e Saúde da Família) - Centro Universitário Filadélfia (UniFil), Londrina, 2011.

PINHEIRO, R.R. Vírus de Artrite Encefalite Caprina: Desenvolvimento padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará. 2001. 115f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, Vol. 76, Nº. 9, pp. 4350-4354, Setembro, 1979.

UEL. Universidade Estadual de Londrina. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Disponível em: <<http://www.uel.br/cca/dmvp/pages/residentes.php>>. Acesso em: 12 de outubro de 2014.

UEL. Universidade Estadual de Londrina. Plano Diretor. Disponível em: <http://www.uel.br/proplan/plano_diretor_2010_2015/texto_numerado_Plano_Diretor.pdf>. Acessado em: 12 de outubro de 2014.

WHO. The control of neglected zoonotic diseases. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/zoonoses/control_neglected_zoonoses/en/>. Acesso em: 14 de outubro de 2014a.

WHO. Zoonoses and the Human-Animal-Ecosystems Interface. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/zoonoses/en/>>. Acesso em: 14 de outubro de 2014b.