

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAILA FRANCINI CORONA



INVESTIGAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA (GÊNERO *Lyssavirus*) EM ANIMAIS DO ESTADO DO PARANÁ (PR) POR PROTOCOLO LABORATORIAL MODIFICADO: UMA CONTRIBUIÇÃO À SAÚDE PÚBLICA, À SAÚDE DO TRABALHADOR E AO BEM-ESTAR ANIMAL

CURITIBA

2016

THAILA FRANCINI CORONA

INVESTIGAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA (GÊNERO *Lyssavirus*) EM ANIMAIS DO ESTADO DO PARANÁ (PR) POR PROTOCOLO LABORATORIAL MODIFICADO: UMA CONTRIBUIÇÃO À SAÚDE PÚBLICA, À SAÚDE DO TRABALHADOR E AO BEM-ESTAR ANIMAL

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dra. Eliane Carneiro Gomes
Coorientador: Prof. Dr. Walfrido Kühn Svoboda

CURITIBA

2016

Corona, Thaila Francini

Investigação do vírus da raiva (Gênero *Lyssavirus*) em animais do Estado do Paraná (PR) por protocolo laboratorial modificado : uma contribuição à saúde pública, à saúde do trabalhador e ao bem-estar animal / Thaila Francini Corona – Curitiba, 2016. 98 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Eliane Carneiro Gomes
Coorientador: Professor Dr. Walfrido Kühn Svoboda
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2016.

Inclui bibliografia

1. Raiva. 2. Diagnóstico. 3. Saúde pública. 4. Biossegurança. 5. Bem-estar animal.
I. Gomes, Eliane Carneiro. II. Svoboda, Walfrido Kühn. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.


CDD 576.6484

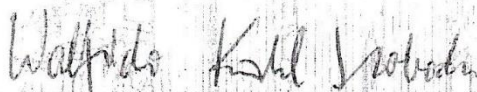
TERMO DE APROVAÇÃO

THAILA FRANCINI CORONA

Título: "Investigação do Vírus da Raiva (Gênero *Lyssavirus*) em Animais do Estado do Paraná (PR) por Protocolo Laboratorial Modificado: Uma Importante Contribuição à Saúde Pública e ao Bem-Estar Animal"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Profª. Dra. Eliane Carneiro Gomes
Orientadora


Prof. Dr. Walfrido Kuhl Svoboda
Co-orientador


Profª. Dra. Yanna Dantas Rattmann
Universidade Federal do Paraná


Profª. Dra. Silvana Krychack Furtado
Universidade Tuiuti do Paraná

Curitiba, 26 de fevereiro de 2016.

Dedico essa dissertação aos Animais, a todos os seres sencientes que ainda vivem, sobrevivem e perecem sob o jugo dos humanos, não obstante sua própria vontade.
Que esse trabalho seja mais uma ferramenta em prol da liberdade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Eliane Carneiro Gomes e Prof. Dr. Walfrido Kühn Svoboda, pela oportunidade, dedicação, paciência e atenção, e por me mostrarem o caminho das pedras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, por aceitar uma estranha no ninho e me receber como uma igual.

Ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, por me incentivar a ter a ousadia de enfrentar o desconhecido e pela competência em me fazer compreendê-lo.

Ao Laboratório Central do Estado do Paraná, especialmente à Célia Fagundes da Cruz/ Diretora Geral e à Elizabeth El Hajjar Droppa/ Chefe da Divisão dos Laboratórios de Epidemiologia e Controle de Doenças, pelo amparo técnico, estrutural e de insumos, bem como pelo estímulo ao meu aprimoramento acadêmico e, por consequência, profissional.

À Profa. Dra. Carla Forte Maiolino Molento, por ensinar o quanto somos iguais aos outros animais, mostrando que a boa luta em favor do bem-estar animal é justa e necessária.

Ao Prof. Dr. Antônio Felipe Paulino de Figueiredo Wouk, pelo brilhantismo e humildade. Tenho orgulho de ter sido sua aluna e mais orgulho ainda por hoje ser sua colega de profissão.

Aos meus amigos, pois vocês são a força motriz que não me deixa parar.

À minha família, por todo o apoio durante toda a minha vida.

Mãe, agradeço você pelas noites que passou em claro, pelo despertar nas madrugadas, pela refeição deliciosa no prato, pelos sacrifícios diários, pelo carinho, por ser modelo de resiliência, coragem e de superação, por me mostrar que não é preciso ser melhor que os outros, mas é fundamental dar o melhor de si.

À Caji, minha filhinha canina, por nesses 13 anos me esperar todos os dias com o rabinho abanando, ser companhia e trazer alegria ao meu mundo.

Por fim, agradeço ao Christiano Weirich, por me incentivar a ir adiante, a superar obstáculos e por encarar comigo a montanha-russa da vida. Não importa os altos e baixos se há alguém de bem segurando a sua mão.

“In a dark place we find ourselves, and a little more knowledge lights our way”
(Mestre Yoda)

RESUMO

A raiva – causada por um rhabdovírus neurotrópico do gênero *Lyssavirus* – é uma zoonose aguda, praticamente 100% letal e capaz de acometer todos os mamíferos. Sua transmissão geralmente ocorre pela introdução de saliva contendo vírus no interior de tecidos, comumente pela mordedura de um animal raivoso. O quadro da doença é progressivo com manifestações clínicas de alterações neurológicas que podem evoluir a partir de uma parestesia local, passando por alterações de comportamento, foto e hidrofobia, confusão, convulsão, coma e morte. O diagnóstico definitivo é laboratorial, com o uso da imunofluorescência direta como prova rápida e do isolamento viral em camundongos (prova biológica) como prova confirmatória (padrão ouro). A técnica de preparo das amostras para isolamento viral segundo o padrão ouro envolve intensa manipulação de fragmentos de tecido nervoso de animais suspeitos, além do uso de vidrarias estéreis para cada amostra processada, o que representa riscos à biossegurança e torna a metodologia laboriosa e onerosa. Ainda em relação à prova padrão ouro, estudos realizados nas últimas três décadas indicam mesma eficácia entre o isolamento viral em camundongos e em cultivo celular, sendo esta última técnica mais adequada aos princípios da bioética e bem-estar animal. Assim, este estudo comparou: (1) o desempenho da técnica de isolamento viral em cultivo celular frente ao isolamento viral em camundongos, visando bem-estar animal; e (2) o desempenho do isolamento viral feito a partir de técnica modificada de preparo de amostras frente ao isolamento viral a partir da técnica padrão ouro de preparo de amostras, visando melhorias à biossegurança em laboratórios de saúde pública. As variáveis analisadas e comparadas foram: acurácia do teste, riscos à biossegurança inerentes à metodologia, tempo dispendido na realização da técnica; custos de insumos por amostra, custos de equipamentos para a implantação da técnica, observação das premissas de bioética e bem-estar animal. Foram utilizadas 400 amostras da rotina de diagnóstico da raiva animal do Lacen-PR, todas de tecido nervoso. A técnica modificada de preparo de amostras apresentou elevada sensibilidade (100%), especificidade (100%), acurácia (100%) e concordância *Kappa* (1,00) com o padrão ouro e, ainda, foi capaz de reduzir significativamente o tempo de preparo das amostras (cerca de 5min/amostra), diminuir os gastos com insumos (até 53%) e proporcionar melhorias das condições de biossegurança por reduzir drasticamente os riscos biológicos de inalação de aerossóis contaminados. A técnica de isolamento viral em cultivo celular quando comparada ao isolamento em camundongos apresentou praticamente mesma acurácia (99,8%), menos riscos em termos de biossegurança e saúde mental dos técnicos, menor tempo decorrido entre a inoculação e obtenção dos resultados (em média 22 dias a menos), gastos inferiores com aquisição de insumos (87% menor) e com equipamentos (33% menor), e a vantagem de não fazer uso de animais, em consonância às premissas da bioética e bem-estar animal. Os resultados confirmam que o novo protocolo pode perfeitamente substituir o protocolo de diagnóstico atualmente considerado padrão ouro.

Palavras-chave: raiva, diagnóstico, saúde pública, biossegurança, bem-estar animal

ABSTRACT

Rabies – caused by a rhabdovirus, genus *Lyssavirus* – is an acute zoonotic disease, virtually 100% lethal that can affect all mammals. Its transmission usually occurs through the introduction of saliva containing the virus within tissues, commonly by the bite of a rabid animal. The infection is progressive, with clinical manifestations of neurological signs that can evolve from a local paresthesia, through behavioral changes, photophobia and hydrophobia, confusion, convulsions, coma and death. The definitive diagnosis is laboratorial, by the fluorescent antibody technique as a quick test and viral isolation in mice (biological test) as a confirmatory test (gold standard). The sample preparation technique for virus isolation in mice involves severe handling of nervous tissue fragments potentially infected and requires the use of sterile glassware for each sample processed, which poses risks to biosafety, slows the procedure and increases the technique costs. Also in relation to the gold standard test, studies conducted over the past three decades indicate that the viral isolation in mice and in cell cultures have the same effectiveness, the latter being the most appropriate technique to the principles of bioethics and animal welfare. Thus, this study compared: (1) the performance of the virus isolation technique in cell culture against the viral isolation in mice, towards animal welfare; and (2) the performance of virus isolation technique made from modified preparation of samples against the viral isolation made from the gold standard technique for sample preparation, towards of the biosafety in public health labs. The variables analyzed and compared were: accuracy, biosafety and risks, time spent in performing the technique; material costs, equipment costs for the implementation of the technique, bioethics and animal welfare evaluation. Neurological tissue samples from 400 animals within the routine of Lacen-PR were used. The modified technique of sample preparation exhibited high sensitivity (100%), specificity (100%), accuracy (100%) and *kappa* agreement (1.00) with the gold standard, and also was able to significantly reduce the sample preparation time (about 5 min/sample), to decrease material costs (up to 53%) and to provide improvements in biosecurity by dramatically reducing biological risks from inhalation of contaminated aerosols. The viral isolation in cell culture technique when compared to the isolation in mice had almost the same accuracy (99.8%), less risks that affect biosafety and mental health of the lab technicians. Other advantages were obtained as reduction of the period between inoculation and obtaining the results (average of 22 days less), much lower material costs (87% less) and equipment costs (33% less), and the advantage of not making use of animals which suits the premises of bioethics and animal welfare. The results confirm that the new protocol can perfectly replace the diagnostic protocol currently considered the gold standard.

Keywords: rabies, diagnostic, public health, biosafety, animal welfare

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	CHAVE DE IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA/ <i>RABIES VIRUS</i> (RABV)	22
FIGURA 2 -	REPRESENTAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA	23
FIGURA 3 -	CICLOS DE TRANSMISSÃO DA RAIVA	25
FIGURA 4 -	<i>IMPRINTS</i> EM LÂMINA DE MICROSCOPIA, ORIGINÁRIAS DE UMA AMOSTRA DA ROTINA DE DIAGNÓSTICO DO LACEN-PR.32	32
FIGURA 5 -	LÂMINA DE AMOSTRA POSITIVA PARA RAIVA NA IFD, CORADA COM CONJUGADO ANTIRRÁBICO FLUORESCENTE	33
FIGURA 6 -	INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGO	34
FIGURA 7 -	REPRESENTAÇÃO DA MODIFICAÇÃO DA TÉCNICA DE PREPARO DE AMOSTRAS DE ENCÉFALO PARA DIAGNÓSTICO DA RAIVA EM ANIMAIS	53
FIGURA 8 -	AMOSTRA DE ENCÉFALO DE MORCEGO POSITIVA PARA RAIVA NO IVCC	56
FIGURA 9 -	REPRESENTAÇÃO DA SUBSTITUIÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGOS PELO ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR PARA O DIAGNÓSTICO DA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS	58
FIGURA 10 -	MODELO DE TABELA 2X2 PARA TESTES DE ACURÁCIA	64
FIGURA 11 -	ESCALA DE CONCORDÂNCIA <i>KAPPA</i>	65
FIGURA 12 -	MACRO-INTERVENÇÕES E SUBDIVISÕES DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS (PARANÁ)	66
FIGURA 13 -	AMOSTRA DE ENCÉFALO DE MORCEGO POSITIVA PARA RAIVA NO ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR E NEGATIVA NO ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGOS, DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ	77

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	VARIANTES ANTIGÊNCIAS (AgV) DO VÍRUS DA RAIVA E SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS	23
QUADRO 2 -	CASOS DE RAIVA HUMANA POR ESTADO E REGIÕES DO BRASIL, 1990 A 2015	29
QUADRO 3 -	NÚMERO DE AMOSTRAS UTILIZADAS POR ETAPA DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ	47
QUADRO 4 -	AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS UTILIZADAS NA PESQUISA DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA, POR MUNICÍPIO E ESPÉCIE, ESTADO DO PARANÁ	51
QUADRO 5 -	DIAGNÓSTICO DE BEM-ESTAR ANIMAL CONFORME AS CINCO LIBERDADES, GRUPO CONTROLE 3 DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ	80

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - TEMPO DE PREPARO DE AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS PARA DIAGNÓSTICO DA RAIVA, GRUPO CONTROLE 1 E GRUPO TESTE 1, ESTADO DO PARANÁ67
- GRÁFICO 2 - TEMPO DE PREPARO DE AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS PARA DIAGNÓSTICO DA RAIVA, GRUPO CONTROLE 2 E GRUPO TESTE 2, ESTADO DO PARANÁ72
- GRÁFICO 3 - TEMPO ENTRE INOCULAÇÃO E OBTENÇÃO DE RESULTADOS, EM DIAS, GRUPO TESTE 1 DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	RESULTADOS DO GRUPO TESTE 1 FRENTE AO GRUPO CONTROLE 1 DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ	67
TABELA 2 -	CUSTOS DE INSUMOS PARA REALIZAÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGOS PARA 3.200 AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS DO ESTADO DO PARANÁ, CONFORME PROTOCOLO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE.....	69
TABELA 3 -	CUSTOS DE INSUMOS PARA REALIZAÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGOS PARA 3.200 AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS DO ESTADO DO PARANÁ, CONFORME PROTOCOLO MODIFICADO	70
TABELA 4 -	RESULTADOS DO GRUPO TESTE 2 FRENTE AO GRUPO CONTROLE 2 DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ	71
TABELA 5 -	CUSTOS DE INSUMOS PARA REALIZAÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR PARA 3.200 AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS DO ESTADO DO PARANÁ, CONFORME PROTOCOLO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE.....	73
TABELA 6 -	CUSTOS DE INSUMOS PARA REALIZAÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR PARA 3.200 AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS DO ESTADO DO PARANÁ, CONFORME PROTOCOLO MODIFICADO	74
TABELA 7 -	RESULTADOS DO GRUPO TESTE 3 FRENTE AO GRUPO CONTROLE 3 DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ	76
TABELA 8 -	CUSTOS DE EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS PARA IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGOS	82
TABELA 9 -	CUSTOS DE EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS PARA IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR	83

TABELA 10 -	RESULTADOS DO GRUPO TESTE 4 FRENTE AO GRUPO TESTE 1 DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ	84
-------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Ac	- acurácia
AcMs	- anticorpos monoclonais
ADAPAR	- Agência de Defesa Agropecuária do Paraná
AgV	- <i>antigenic variant</i> (variante antigênica)
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCN	- cérebro de camundongo normal
CDC	- <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEUA	- Comissão de Ética no Uso de Animais
CFMV	- Conselho Federal de Medicina Veterinária
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CVS	- <i>Challenge virus standard</i>
E	- especificidade
EUA	- Estados Unidos da América
FAWC	- <i>Farm Animal Welfare Committee</i>
h	- hora
K	- <i>Kappa</i>
Kg	- quilograma
IFD	- imunofluorescência direta
ICTV	- <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IVCC	- isolamento viral em cultivo celular
Lacen-PR	- Laboratório Central do Estado do Paraná
min	- minuto
mL	- miliLitro
MS	- Ministério da Saúde
N	- tamanho amostral
NB	- nível de biossegurança
nm	- nanômetro
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PB	- prova biológica
PBS	- <i>phosphate buffered saline</i>
pH	- potencial hidrogeniônico

pcte	- pacote
q.s.p.	- quantidade suficiente para
quant.	- quantidade
®	- marca registrada
RABV	- <i>rabies virus</i> (vírus da raiva)
rpm	- rotações por minuto
s	- segundo
S	- sensibilidade
SNC	- sistema nervoso central
Tecpar	- Instituto de Tecnologia do Paraná
U	- unidades
VPN	- valor preditivo negativo
VPP	- valor preditivo positivo
vs.	- versus (contra)
WHO	- <i>World Health Organization</i>
µL	- microLitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVO GERAL	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 ZONOSSES E A SAÚDE PÚBLICA.....	21
2.2 RAIVA.....	22
2.2.1 Raiva no Brasil	28
2.2.2 Diagnóstico laboratorial da raiva animal.....	30
2.2.2.1 Técnica de imunofluorescência direta	31
2.2.2.2 Prova biológica por inoculação intracerebral em camundongos	33
2.2.2.3 Isolamento do vírus da raiva em cultivo celular.....	35
2.3 BIOSSEGURANÇA	36
2.3.1 Níveis de biossegurança	37
2.3.2 Biossegurança no diagnóstico da raiva animal	38
2.4 USO DE ANIMAIS EM LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA.....	39
2.5 SAÚDE DO TRABALHADOR NA PESQUISA COM ANIMAIS.....	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 AMOSTRAS	46
3.1.1 Tamanho amostral nas etapas com uso de camundongos	47
3.1.2 Tamanho amostral nas etapas sem experimentação animal	48
3.2 LOCAL DA PESQUISA	49
3.3 DESENHO DO ESTUDO	52
3.3.1 Modificação do preparo das amostras.....	52
3.3.1.1 Isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em camundongos por técnica modificada de preparo das amostras	54
3.3.1.2 Isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica modificada de preparo das amostras	55
3.3.2 Substituição do isolamento viral em camundongos pelo isolamento viral em cultivo celular (IVCC)	58

3.3.2.1 Isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde	59
3.3.2.2 Isolamento viral em camundongos por técnica modificada de preparo das amostras vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica modificada de preparo das amostras.....	61
3.4 PARCERIAS.....	62
3.5 ASPECTOS ÉTICOS NA PESQUISA COM O USO DE ANIMAIS.....	62
3.6 VARIÁVEIS E COLETA DE DADOS	63
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1 ANÁLISE DE RESULTADOS DA SUBDIVISÃO I	66
4.2 ANÁLISE DE RESULTADOS DA SUBDIVISÃO II	71
4.3 ANÁLISE DE RESULTADOS DA SUBDIVISÃO III	76
4.4 ANÁLISE DE RESULTADOS DA SUBDIVISÃO IV	84
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
REFERÊNCIAS.....	89
GLOSSÁRIO.....	96
ANEXO	97

1 INTRODUÇÃO

A raiva é uma zoonose transmitida ao homem pela inoculação do vírus rábico – um vírus RNA da família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus* – contido na saliva de mamíferos infectados, principalmente por meio de mordeduras. É uma encefalite aguda, que leva as vítimas ao óbito em praticamente 100% dos casos após o surgimento dos sinais e sintomas, sendo uma das mais antigas doenças conhecidas. Ainda nos dias atuais, a raiva representa um sério problema de saúde pública e produz grandes prejuízos econômicos à pecuária (BRASIL, 2008a; WHO, 2014a).

Trata-se de uma doença relativamente rara embora muitos animais possam tornar-se infectados e transmiti-la. As típicas exposições humanas se dão de duas formas gerais: urbana e silvestre. A forma urbana resulta comumente da exposição a um cão, gato e outros animais domésticos doentes. A forma silvestre resulta da exposição a animais selvagens, tais como guaxinim, gambá, morcego, entre outros. Em geral, a forma silvestre e a urbana ocorrem concomitantemente e, assim, o aumento de casos entre animais pode elevar a ocorrência de casos humanos. É essencial para as ações de saúde pública, portanto, o conhecimento dos animais potencialmente envolvidos no ciclo de transmissão da doença em determinada região, bem como mundialmente. (CDC, 2015; SLAVEN; STONE; LOPEZ, 2007).

Uma das ferramentas da vigilância epidemiológica da raiva é o diagnóstico laboratorial, que é de fundamental importância para o tratamento profilático humano pós-exposição, mediante a aplicação de imunobiológicos específicos, bem como para a adoção de medidas visando ao controle da doença nas populações de animais domésticos, evitando a ocorrência de epizootias com a identificação das áreas com circulação viral (BRASIL, 2009a).

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico *post mortem* em animais suspeitos/ agressores ou que fazem parte das ações de vigilância da raiva. O diagnóstico rápido da infecção animal é realizado pelo exame de tecido encefálico, utilizando-se anticorpos fluorescentes contra o vírus rábico, na técnica de imunofluorescência direta (IFD). Como exame confirmatório, o Ministério da Saúde preconiza a prova biológica (PB) para o isolamento viral, seja por inoculação em camundongos ou em cultivo celular (BRASIL, 2008a; LEVINSON, 2010).

No Laboratório Central do Estado do Paraná/ Lacen-PR, as amostras de animais passam por dois testes para diagnóstico da raiva: imunofluorescência direta e prova biológica por inoculação intracerebral em camundongos.

O preparo do material para inoculação, conforme a técnica preconizada pelo Ministério da Saúde (MS), envolve intensa manipulação de fragmentos de sistema nervoso central (SNC) de animais potencialmente infectados, além do uso de vidrarias estéreis para cada amostra processada (BRASIL, 2008a), situações estas que elevam os riscos à biossegurança, tornam a metodologia demasiado laboriosa e aumentam o tempo da técnica.

Ainda em relação à prova biológica, a Organização Mundial de Saúde (OMS) compilou e analisou estudos que indicam eficácia semelhante entre o isolamento do vírus da raiva por inoculação em camundongo e o isolamento viral em cultivo celular (IVCC), prevendo a substituição daquela técnica nos laboratórios de saúde pública (WHO, 1996).

Assim, o presente estudo foi pautado no desenvolvimento de metodologia que ofereça melhores condições de biossegurança para o isolamento do vírus da raiva por meio de modificação do preparo das amostras, bem como avaliação e proposta de novo protocolo diagnóstico da raiva, substituindo a prova biológica por meio de inoculação intracerebral em camundongos pelo isolamento viral em cultivo celular.

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença do vírus da raiva (Gênero *Lyssavirus*) em animais do Estado do Paraná (PR) por protocolo laboratorial modificado.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver metodologia para preparo de amostras utilizadas no diagnóstico da raiva que apresente menores riscos à biossegurança dos técnicos;

- Avaliar a nova metodologia no que se refere à consistência e acurácia dos resultados, tempo de execução da técnica, biossegurança, quantidade e custo de material e equipamentos utilizados;
- Comparar os resultados obtidos com esta nova metodologia aos da metodologia preconizada pelo Ministério da Saúde;
- Realizar estudo comparativo entre as técnicas: (1) de inoculação do vírus rábico em cultivo celular e (2) inoculação intracerebral em camundongos, considerando os parâmetros consistência e acurácia dos resultados, tempo e complexidade de execução da técnica, biossegurança, período até a obtenção dos resultados, custos da técnica e bioética e bem-estar animal;
- Propor aplicação deste novo protocolo de diagnóstico da raiva ao Lacen-PR.
- Contribuir com a saúde pública, com a saúde do trabalhador e com a saúde mental dos técnicos que realizam a rotina laboratorial, como também com o bem-estar animal, pelos aspectos de bioética e de biossegurança propostos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ZONÓSES E A SAÚDE PÚBLICA

As zoonoses são doenças ou infecções naturalmente transmitidas entre animais vertebrados e humanos. São causadas por um vasto grupo de agentes patogênicos, podendo ser de origem viral, bacteriana, parasitária, fúngica e outros. A infecção em humanos pode ser adquirida diretamente dos animais, ou através da ingestão de alimentos contaminados (SHAKESPEARE, 2009; WHO, 2014b). Atualmente, são conhecidas mais de 200 doenças transmitidas mutuamente entre humanos e animais, e constituem uma ameaça importante para a saúde pública e/ou para a economia das produções animais (TOMA *et al.*, 2004; WHO, 2014c).

Cerca de 60% dos patógenos humanos estudados nas últimas cinco décadas e 75% das doenças emergentes que afetaram humanos nos últimos 10 anos são de origem zoonótica e muitas dessas doenças têm o potencial de se dispersarem a longas distâncias, tomando proporções globais. Muitas doenças transmitidas entre animais e humanos, bem conhecidas e preveníveis, como a raiva, brucelose, leishmaniose e equinococose, continuam ocorrendo em vários países, especialmente nos em desenvolvimento, onde as zoonoses afetam principalmente o segmento mais pobre da população (SILVA, 2009; WHO, 2014c).

Diversas doenças são objeto de vigilância, a qual se destina a seguir o desenvolvimento das enfermidades que se propagam no país e a vigiar o aparecimento de doenças exóticas. Cada país dispõe de uma lista de doenças humanas de notificação obrigatória, além de possuir, também no âmbito da saúde pública, redes de vigilância epidemiológica de doenças não submetidas à declaração obrigatória. No Brasil, o Ministério da Saúde dispõe da Portaria nº 1.271, de 06 de junho de 2014, que define a lista nacional de notificação compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional (TOMA *et al.*, 2004; BRASIL, 2014).

A redução à saúde pública dos riscos provocados por zoonoses e outras ameaças à saúde, na interface humano-animal-ecossistema, não é simples. O gerenciamento e redução destes riscos devem considerar a complexidade das

interações entre os seres humanos, animais e os vários ambientes em que vivem, exigindo a comunicação e a colaboração entre os setores responsáveis pela saúde humana, animal e o meio ambiente (WHO, 2014c).

2.2 RAIVA

A raiva é uma encefalopatia ou meningoencefalite viral aguda, de caráter zoonótico e que, conhecidamente, acomete um grande número de mamíferos domésticos e selvagens. A doença é causada por um rabdovírus neurotrópico que atinge o sistema nervoso central por meio dos nervos periféricos, produzindo poliencefalomielite supurativa multifocal (WHO, 1996; WHO, 2014a).

O agente etiológico da raiva pertence à ordem Mononegavirales, família Rhabdoviridae, gênero *Lyssavirus* (FIGURA 1). Atualmente, o *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) reconhece 14 diferentes espécies de *Lyssavirus*, sendo o vírus da raiva (RABV) a de maior importância mundialmente (WHO, 2013).

Ordem	Família	Gênero	Espécie
Mononegavirales	{ Rhabdoviridae	{ <i>Lyssavirus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <i>Aravan virus</i> <i>Australian bat lyssavirus</i> <i>Bokeloh bat lyssavirus</i> <i>Duvenhage virus</i> <i>European bat lyssavirus 1</i> <i>European bat lyssavirus 2</i> <i>Ikoma lyssavirus</i> <i>Irkut virus</i> <i>Khujand virus</i> <i>Lagos bat virus</i> <i>Mokola virus</i> <i>Rabies virus</i> <i>Shimoni bat virus</i> <i>West Caucasian bat virus</i>

FIGURA 1 – CHAVE DE IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA/ *RABIES VIRUS* (RABV)
 FONTE: ICTV (2016) – Modificado pelo autor (2016)

O vírus rábico é um RNA vírus neurotrópico, de aproximadamente 180 nm de comprimento por 75 nm de largura, com formato semelhante ao de um projétil, cujo genoma codifica cinco proteínas e que possui duas estruturas antigênicas principais:

uma de superfície, que constitui o envelope glicoproteico, denominada proteína G; e outra, interna, constituída por uma ribonucleoproteína helicoidal, a proteína N (FIGURA 2). A fusão do envelope viral à célula neuronal inicia o processo de infecção, com a invasão do citoplasma seguido de replicação viral (CDC, 2015; WHO, 2014a).

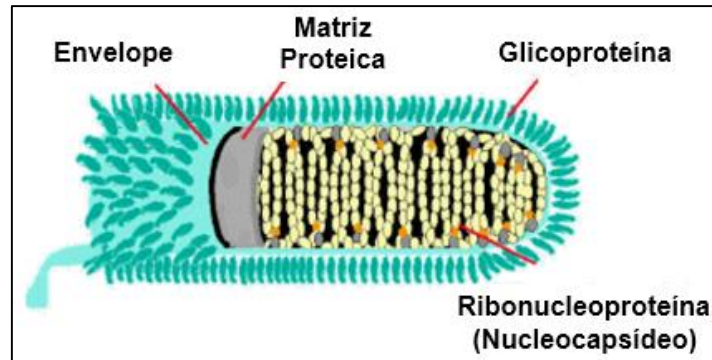


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DO VÍRUS DA RAIVA
 FONTE: CDC (2015) - Modificado pelo autor (2015)

Apesar de o RABV ser considerado muito estável antigênica e genomicamente, o vírus possui 11 variantes antigênicas (AgV) já identificadas, cada qual adaptada a diferentes reservatórios (QUADRO 1), os quais exercem papel fundamental e específico na manutenção da respectiva variante na natureza e área geográfica (LEVINSON, 2010; VELASCO-VILLA *et al.*, 2002; WHO, 2014a).

Hospedeiro	AgV
Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>); Mangusto (família Herpestidae)	1
Cão (<i>Canis lupus familiaris</i>)	2
Morcego hematófago (<i>Desmodus rotundus</i>)	3
Morcego não hematófago (<i>Tadarida brasiliensis</i>)	4
Morcego hematófago (<i>Desmodus rotundus</i>)*	5
Morcego não hematófago (<i>Lasiurus cinereus</i>)	6
Raposa cinzenta (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)	7
Gambá (diversas espécies)	8
Morcego não hematófago (<i>Tadarida brasiliensis mexicana</i>)	9
Gambá (diversas espécies)	10
Morcego hematófago (<i>Desmodus rotundus</i>)*	11

* AgV 5 e AgV 11 podem estar relacionadas a outras espécies de morcegos hematófagos, porém, não há ainda evidências científicas que comprovem essa hipótese.

QUADRO 1 – VARIANTES ANTIGÊNCIAS (AgV) DO VÍRUS DA RAIVA E SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS

FONTE: MENOZZI (2012) e VELASCO-VILLA *et al.* (2002) – Modificado pelo autor (2016)

A transmissão da raiva não ocorre somente entre hospedeiros da mesma espécie como também entre indivíduos de espécies diferentes, que não são considerados reservatórios naturais do vírus. Esse fenômeno é denominado *spillover* e resulta do contato interespécies, podendo levar à determinação de novas variantes do RABV. Um cão, por exemplo, pode entrar em contato com um morcego infectado pela AgV 4, ser agredido, adoecer e transmitir a AgV 4, por meio de mordedura, ao ser humano (JACKSON, 2013; WHO, 2013).

As características das variantes antigênicas do RABV e sua identificação por meio de anticorpos monoclonais (AcMs) específicos a partir da década de 1980 constituem ferramenta essencial na compreensão de casos individuais e dos ciclos epidemiológicos da raiva em determinada região (WHO, 2014a).

Ainda, há que se distinguir dos vírus rábicos clássicos o vírus de “rua” e o vírus “fixo”: vírus de “rua” é a denominação utilizada para cepas isoladas a partir de animais infectados em ciclos de transmissão natural e caracterizam-se por um período de incubação variável, por grande potencial de infecção em humanos e outros animais, e por não terem sofrido modificações em laboratório; já o vírus “fixo” é a denominação dada às cepas que sofreram passagens em animais de laboratório ou em cultivo celular, que apresentam curto período de incubação e menor patogenicidade (BRASIL, 2008a; CDC, 2015).

A raiva existe em todo o mundo, com a exceção da Inglaterra, Austrália, Japão, Suécia, Havaí, continente Antártico e algumas outras regiões insulares. Nos Estados Unidos (EUA), Canadá e Europa Ocidental, onde a raiva canina é controlada por meio de vacinação, a raiva é endêmica em animais selvagens, particularmente jaritacas, raposas, *racoons* (animais semelhantes ao guaxinim) e morcegos. Em anos recentes, morcegos foram a fonte da maioria dos casos humanos de raiva nos EUA. Já na Ásia, América Latina e África, a raiva é endêmica tanto em cães como animais selvagens (JONES; HUNT; KING, 2000; LEVINSON, 2010). Mundialmente, estima-se que ocorra um óbito pela enfermidade a cada 15 minutos e exposição de 300 pessoas por dia ao RABV (WHO, 2014a).

Há dois grupos básicos de transmissão do RABV – o urbano e o rural – que, didaticamente, podem ser subdivididos em quatro ciclos epidemiológicos (FIGURA 3):

- Ciclo aéreo, que envolve morcegos;
- Ciclo rural, relacionado aos animais de produção, como bovinos, equinos, ovinos, caprinos e outros;

- Ciclo urbano, em que cães e gatos estão envolvidos; e
- Ciclo silvestre terrestre, que abrange saguis, raposas, guaxinim, macacos, entre outros (BRASIL, 2009a).

Os ciclos epidemiológicos se inter-relacionam e se sobrepõem conforme a região e a existência de hospedeiros suscetíveis. Todos os mamíferos são suscetíveis à infecção pelo RABV, porém apenas algumas espécies têm importância como reservatório da doença (CDC, 2015).

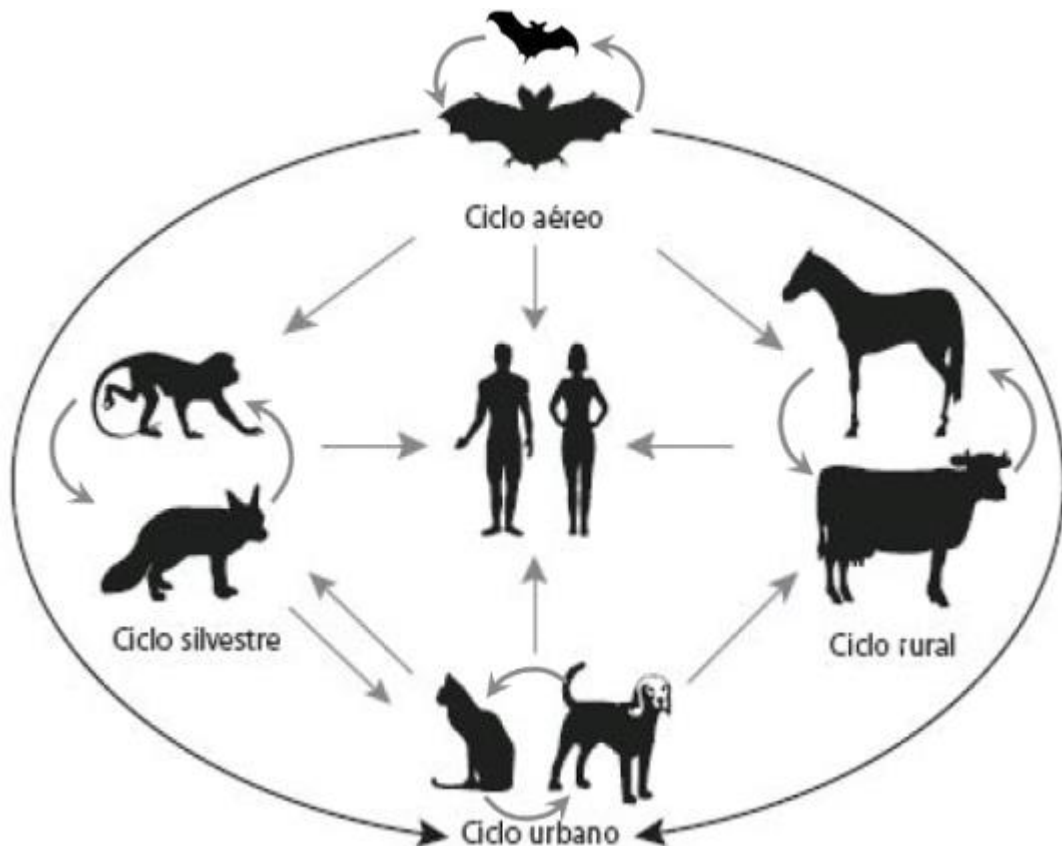


FIGURA 3 – CICLOS DE TRANSMISSÃO DA RAIVA
 FONTE: BRASIL (2009a) - Modificado pelo autor (2015)

A transmissão da doença se dá, comumente, pela penetração, no interior de tecidos, do vírus contido na saliva de um animal raivoso, principalmente por meio de mordedura. Mais raramente, a transmissão pode ocorrer pelo contato direto de material infeccioso de um animal raivoso, como saliva e tecido neurológico, com mucosas ocular, nasal, oral e genital intactas, bem como com pele ou mucosa não íntegras, por feridas, arranhaduras ou abrasões. A inalação de aerossóis que contenham o RABV também já foi descrita como fonte de infecção, constituindo risco a trabalhadores de laboratórios de diagnóstico da raiva e a indivíduos que adentrem

ambientes de caverna habitada por populações de morcegos, tais como espeleologistas, guias e excursionistas de ecoturismo (BRASIL, 2009a; CDC, 2015).

Há, na literatura, casos bem documentados de transmissão inter-humana da raiva por meio de transplantes. Foram relatados oito casos de transmissão da raiva por meio de transplantes de córneas no mundo, quatro casos de raiva humana nos Estados Unidos por meio de transplante de fígado, dois rins e artéria ilíaca a partir de um mesmo doador, e três casos na Alemanha por transplante de pulmão, rim e pâncreas também de um mesmo doador (BRASIL, 2009a, WHO, 2013).

Existe, ainda, a possibilidade de transmissão do RABV por via sexual, digestiva e vertical, porém remota (BRASIL, 2009a).

Após a exposição ao RABV, o vírus replica-se no ponto de inoculação, atinge o sistema nervoso periférico e, posteriormente, o sistema nervoso central, onde se replica, causando inflamação e, geralmente, os primeiros sinais da doença. A partir daí, dissemina-se para vários órgãos e glândulas salivares, onde também se replica, sendo eliminado pela saliva (BRASIL, 2009a, CDC, 2015). O vírus, entretanto, já pode estar presente na saliva antes do surgimento dos sinais clínicos (JONES; HUNT; KING, 2000).

O período de incubação pode variar de alguns dias até vários meses ou anos (um caso de raiva confiavelmente descrito no homem teve um período de incubação maior que seis anos), e está diretamente relacionado à localização, extensão e profundidade da mordedura ou contato com a saliva de animais infectados, à distância entre o local do ferimento e o cérebro/ troncos nervosos, à carga e cepa virais, e à espécie do hospedeiro. Em humanos, a média do período de incubação é de 45 dias e de 10 dias a dois meses em cães (BRASIL, 2009a; JONES; HUNT; KING, 2000).

Em geral, a eliminação do RABV pela saliva ocorre entre dois a cinco dias antes do aparecimento dos sinais clínicos em cães e gatos, persistindo durante toda a evolução da doença, que tem um curso médio de cinco a sete dias após o surgimento do quadro clínico nessas espécies, culminando com o óbito. Há poucos estudos que relatam o período de transmissibilidade em animais silvestres, mas se sabe que quirópteros podem albergar o vírus por um longo período, sem sintomatologia aparente (BRASIL, 2009a, CDC, 2015).

Após o período de incubação, as primeiras manifestações clínicas da raiva são muito inespecíficas e incluem mal-estar geral, febre, anorexia, cefaleia, náuseas, dor de garganta, entorpecimento, irritabilidade e inquietude. Podem ocorrer

hiperestesia e parestesia no trajeto dos nervos periféricos próximos ao local da mordedura e alterações de comportamento. Com a progressão da infecção, surgem manifestações de ansiedade e hiperexcitabilidade crescentes, confusão, aerofobia, disfagia, hiperacusia, fotofobia, desorientação, delírios, insônia, espasmos musculares generalizados e/ou convulsões. Espasmos dos músculos da laringe, faringe e língua ocorrem quando o paciente vê ou tenta ingerir líquidos, apresentando intensa sialorreia – quadro popularmente denominado de hidrofobia. Os espasmos musculares evoluem para paralisia, levando a complicações cardiorrespiratórias, retenção urinária e obstipação intestinal. O paciente se mantém consciente, com períodos de alucinações, até a evolução do quadro para coma e subsequente óbito. Após a instalação dos sinais e sintomas, a doença evolui, naturalmente, para óbito (BRASIL, 2009a; CDC, 2015; WHO, 2014a).

O diagnóstico clínico pode ser difícil, especialmente em localidades onde a raiva é incomum. Assim, o diagnóstico definitivo é fornecido a partir do diagnóstico laboratorial. A confirmação laboratorial, em vida, dos casos de raiva humana pode ser realizada pelo método de imunofluorescência direta, em impressão de córnea, raspado de mucosa lingual ou de tecido bulbar de folículos pilosos, obtidos por biópsia de pele da região cervical, contudo, a sensibilidade desta prova é limitada, levando a falsos negativos. Já as técnicas de IFD e prova biológica realizadas a partir de fragmentos de sistema nervoso central coletados *post mortem*, tanto em humanos como nas demais espécies, têm demonstrado elevada efetividade e são amplamente utilizadas nos laboratórios de saúde pública (BRASIL, 2009a).

Mesmo considerada uma virose 100% letal após o surgimento de sinais e sintomas, mundialmente são descritos alguns casos de sucesso no tratamento de pacientes com raiva humana, havendo inclusive um caso bem-sucedido no Brasil. O protocolo de tratamento – conhecido como Protocolo Milwaukee – consiste, basicamente e em tempo oportuno, na indução de coma, uso de antivirais e reposição de enzimas, além da manutenção dos sinais vitais do paciente e tratamento de suporte (BRASIL, 2009a; CDC, 2015).

Existe, entretanto, a possibilidade de prevenção da raiva humana por meio das profilaxias pré-exposição e pós-exposição. A primeira consiste em esquema vacinal indicado a pessoas com risco de exposição permanente ao RABV em suas atividades ocupacionais, tais como médicos veterinários, biólogos, profissionais e auxiliares de laboratório de virologia e anatomopatologia para raiva, estudantes de

medicina veterinária, biologia e agronomia, espeleólogos e guias de ecoturismo, pesquisadores que desenvolvem trabalhos de campo com animais silvestres, funcionários de centros de controle de zoonoses e de zoológicos. Já a profilaxia pós-exposição é indicada nos casos em que se suspeite ou esteja comprovada a exposição ao RABV e, anteriormente ao surgimento do quadro clínico, institui-se esquema vacinal, adequado tratamento local da lesão e soroterapia específica, se indicado (BRASIL, 2009a; WHO, 2013).

A prevenção e controle da raiva são prioridades para a Organização Mundial de Saúde, fazendo parte dos programas de vigilância de diversos países, inclusive do Brasil. Tais programas visam à eliminação da raiva em cães e gatos por meio de vacinação, imunização de acordo com esquema de profilaxia pré-exposição de pessoas em risco ocupacional, profilaxia pós-exposição e vigilância epidemiológica (WHO, 2014a).

2.2.1 Raiva no Brasil

Apesar de ser conhecida desde a antiguidade, a raiva continua sendo problema de saúde pública nos países em desenvolvimento.

No Brasil, o agravo é endêmico, em grau diferenciado, de acordo com a região geopolítica. A região Nordeste responde por 57,11% dos casos humanos registrados de 1990 a 2015; seguida da região Norte, com 24,92%; Sudeste, com 10%; Centro-Oeste, 7,97%; e sem registros na região Sul (QUADRO 2). No período de 1990 a 2015, cães e gatos foram responsáveis por transmitir 69,15% dos casos humanos de raiva; os morcegos, por 21,36%; outros animais (raposas, saguis, gato selvagem, bovinos, equinos, caititus, gambás, suínos e caprinos), 9,49%.

Vale salientar que, nos anos de 2004 e 2005, devido à ocorrência de surtos de raiva humana nos estados do Pará e Maranhão, o morcego passou a ser o principal responsável pelos casos de raiva humana no país, com 86,48% dos casos nesses dois anos, ultrapassando os índices de transmissão canina. No ano de 2008 foi registrado o primeiro caso de cura de raiva humana no Brasil. Desde 1987, não há registro de casos de raiva humana nos estados do Sul, sendo o último caso no Paraná, cuja fonte de infecção foi um morcego hematófago (BRASIL, 2009a; BRASIL, 2016).

	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Região Norte	7	14	9	9	4	9	9	6	12	7	9	6	5	0	24	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acre	4	0	1	1	0	0	8	2	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amapá	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	0	0	3	1	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pará	1	7	2	5	3	8	1	1	4	3	3	2	1	0	22	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rondônia	2	4	3	2	1	1	0	2	4	2	4	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tocantins	0	2	0	0	0	0	0	1	3	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Nordeste	53	49	44	25	7	12	11	12	14	11	13	10	4	15	5	26	7	1	2	2	3	2	3	5	0	1
Alagoas	11	5	4	0	1	0	2	0	1	2	0	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bahia	10	11	14	7	3	3	1	1	3	2	2	2	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceará	2	7	4	4	0	3	1	4	3	1	1	1	2	7	0	1	0	0	1	0	2	0	1	0	0	0
Maranhão	13	13	8	2	2	3	4	4	2	3	7	2	0	3	4	24	5	1	0	2	0	2	2	3	0	0
Paraíba	4	2	1	2	0	0	1	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pernambuco	6	7	10	6	1	3	2	1	3	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Piauí	5	3	3	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Rio Grande do Norte	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Sergipe	2	1	0	2	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Sudeste	4	3	3	13	9	7	0	4	1	4	0	3	1	2	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Espírito Santo	0	0	0	4	1	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Minas Gerais	2	3	2	8	8	4	0	3	1	4	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Rio de Janeiro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
São Paulo	2	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Centro-Oeste	9	4	3	3	2	3	5	3	2	4	4	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Goiás	3	3	2	3	1	3	4	1	2	3	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Mato Grosso	5	1	1	0	0	0	1	2	0	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Mato Grosso do Sul	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Região Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraná	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brasil	73	70	59	50	22	31	25	25	29	26	26	21	10	17	30	44	9	1	3	2	3	2	5	5	0	2

QUADRO 2 – CASOS DE RAIVA HUMANA POR ESTADO E REGIÕES DO BRASIL, 1990 A 2015
 FONTE: BRASIL (2016) – Modificado pelo autor (2016)

As ações dos programas de prevenção e controle da raiva no Brasil são regidas pelo Ministério da Saúde, no tocante à saúde pública, por meio do Programa Nacional de Controle da Raiva, e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no que se refere à defesa sanitária animal, por meio do Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (BRASIL, 2009a; BRASIL, 2009b).

O Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros tem como objetivo reduzir a prevalência da doença em animais de produção, herbívoros domésticos, visando à defesa sanitária animal. No Paraná, as amostras de animais de produção e morcegos hematófagos são analisadas pelo Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti/ Agência de Defesa Agropecuária do Paraná – ADAPAR (ADAPAR, 2015).

O Programa Nacional de Controle da Raiva, preconizado pelo Ministério da Saúde, visa à eliminação de casos humanos. Entre suas estratégias de atuação está o monitoramento da circulação viral por meio do envio de amostras de tecido encefálico *post mortem* de animais sentinelas, de animais suspeitos com manifestações neurológicas ou óbito por causa indeterminada, e de 0,2% da população canina estimada da região para diagnóstico laboratorial da doença. No Paraná, esse diagnóstico é realizado pelo Lacen-PR, onde são analisadas todas as amostras da rotina de vigilância epidemiológica da raiva no Estado, bem como amostras de animais suspeitos da doença e/ou agressores. O Lacen-PR processa anualmente cerca de 3.200 amostras para o diagnóstico da raiva (PARANÁ, 2015).

2.2.2 Diagnóstico laboratorial da raiva animal

O diagnóstico laboratorial da raiva é de fundamental importância para o tratamento profilático humano pós-exposição, mediante a aplicação de imunobiológicos específicos, e para a adoção de medidas visando ao controle da doença nas populações de animais domésticos, evitando a ocorrência de epizootias com a identificação das áreas com circulação viral (BRASIL, 2008a; CDC, 2015).

A raiva é uma doença que se apresenta de forma variável nas diferentes espécies de mamíferos, razão pela qual todo animal suspeito deve ter o sistema nervoso central coletado e enviado, em condições adequadas, ao laboratório de diagnóstico, para a confirmação de uma suspeita clínica (BRASIL, 2009a).

Diferentes técnicas para o diagnóstico da raiva animal são preconizadas pela Organização Mundial de Saúde e Ministério da Saúde do Brasil: técnica histológica de coloração de Sellers, técnica de imunofluorescência direta, prova para isolamento do vírus rábico em camundongos e prova para isolamento do vírus rábico em cultivo celular (BRASIL, 2008a; WHO, 1996).

As técnicas mais empregadas no Brasil em laboratórios de saúde pública, inclusive no Lacen-PR, são a imunofluorescência direta (IFD) e a prova biológica (PB) por inoculação intracerebral em camundongos. Métodos alternativos ao uso de animais, como a inoculação viral em cultivo celular, são também ferramentas importantes no diagnóstico da raiva e apresentam bons resultados quando comparados à IFD e PB em camundongos, sendo ainda mais adequados em termos de bem-estar animal por evitar sofrimento desnecessário desses animais (BONES; MOLENTO, 2012).

2.2.2.1 Técnica de imunofluorescência direta

A técnica de imunofluorescência direta com utilização de anticorpos fluorescentes (imunoglobulinas antirrábicas marcadas com isotiocianato de fluoresceína = conjugado antirrábico) constitui-se em um método rápido, sensível e específico, com custo não muito elevado. A prova se baseia no exame microscópico de impressões de fragmentos de tecido nervoso “tratados” com conjugado específico e submetidos à luz ultravioleta. O antígeno rábico da amostra, constituído pela proteína N do nucleocapsídeo viral, ao reagir com o conjugado e iluminado sob luz ultravioleta, emite uma luz esverdeada fluorescente. A sensibilidade da imunofluorescência depende da espécie animal e grau de autólise da amostra, da experiência do profissional no diagnóstico, bem como do emprego de microscópio adequado e da boa qualidade do conjugado. A técnica de IFD para o diagnóstico laboratorial da raiva pode alcançar uma efetividade 100% (BRASIL, 2008a; INSTITUTO PASTEUR, 2014).

Conforme recomendações do Ministério da Saúde e literatura pertinente (BOURHY; SUREAU; TORDO, 1990; BRASIL, 2008a; INSTITUTO PASTEUR, 2014), esta técnica é realizada no Lacen-PR da seguinte forma:

- Em cabine de segurança biológica classe II tipo A, o fragmento de SNC é pressionado contra uma lâmina de imunofluorescência, deixando a impressão ou *imprint* da amostra na lâmina. São feitas três impressões em cada lâmina para cada amostra (FIGURA 4);

- A lâmina é fixada em acetona por 45 minutos e, após a secagem, duas das impressões são cobertas com a diluição A (cérebro de camundongo normal + conjugado previamente titulado), e a terceira impressão com a diluição B (*Challenge virus standard* + conjugado previamente titulado);

- Dentro de câmara úmida, a lâmina é incubada em estufa a 37°C por 30 minutos;

- Após a incubação, a lâmina é lavada com tampão fosfato salino (PBS 7,5), ficando submersa por 10 minutos, sendo posteriormente enxaguada com água purificada por osmose reversa;

- Depois de seca, uma gota de glicerina é instilada sobre as três impressões e uma lamínula é colocada sobre a lâmina;

- Procede-se à leitura em microscópio óptico de fluorescência. Em lâmina com presença de antígeno, são observadas estruturas fluorescentes de cor verde-maçã nos poços com a diluição A (FIGURA 5). Nenhuma fluorescência deve ser observada em nos poços com a diluição B, seja em amostras positivas, negativas ou nos controles. A presença de fluorescência nos dois poços com diluição A e ausência no poço com diluição B indicam positividade desta amostra.

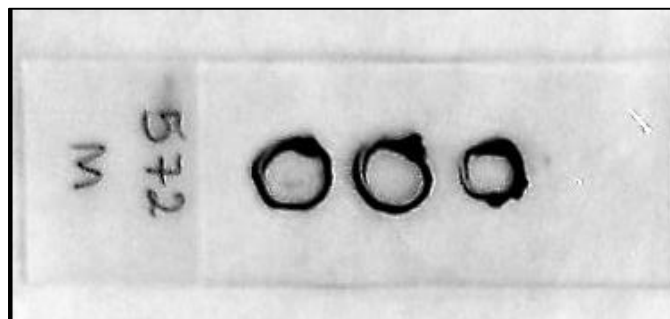


FIGURA 4 – *IMPRINTS* EM LÂMINA DE MICROSCOPIA, ORIGINÁRIAS DE UMA AMOSTRA DA ROTINA DE DIAGNÓSTICO DO LACEN-PR

FONTE: O autor (2014)

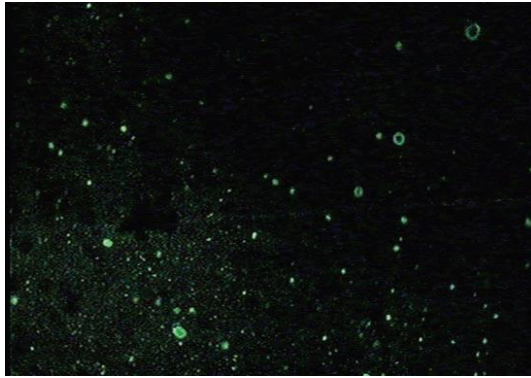


FIGURA 5 – LÂMINA DE AMOSTRA POSITIVA PARA RAIVA NA IFD, CORADA COM CONJUGADO ANTIRRÁBICO FLUORESCENTE
FONTE: BRASIL (2008a)

Na rotina do Lacen-PR, é analisada uma média de 270 amostras por mês para diagnóstico de raiva animal, totalizando mais de 3.200 ao ano. Todas passam pela técnica de IFD e pela prova biológica por inoculação em camundongos. Segundo o Manual de Envio e Coleta de Amostras Biológicas ao Lacen-PR, a partir do momento da triagem das amostras, o prazo para liberação de resultado na técnica de IFD para o diagnóstico da raiva animal é de 24 horas (PARANÁ, 2015).

Assim, a técnica de imunofluorescência direta consiste em um método de diagnóstico rápido, sensível e específico que permite o desencadeamento oportuno de medidas de controle, investigação e assistência médica, configurando uma importantíssima ferramenta de vigilância epidemiológica da raiva.

2.2.2.2 Prova biológica por inoculação intracerebral em camundongos

O método consiste na inoculação intracerebral em camundongos com material preparado a partir de fragmento de tecido de SNC de animais suspeitos. Os camundongos inoculados são observados por até 30 dias em busca de sinais clínicos de raiva (WHO, 1996).

O animal de eleição para o isolamento é o camundongo albino suíço da espécie *Mus musculus*, por ser um dos mais sensíveis ao vírus rábico. O camundongo utilizado deve ser de boa procedência e apresentar bom estado sanitário, com idade

e peso adequados. O ideal, é utilizar animais com 21 dias de idade e 11 a 14 g de peso (BRASIL, 2008a; WHO, 1996).

De acordo com o Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva/ Ministério da Saúde (BRASIL, 2008a), o mesmo fragmento de tecido nervoso utilizado para impressão em lâmina na técnica de IFD é posteriormente empregado na prova biológica, da seguinte forma:

- O fragmento é triturado em gral e pistilo estéreis;
- Ao fragmento triturado é adicionado, na proporção de 1:5, o diluente de vírus – um composto que contém 2 mL de soro normal de equino, 4 mg de sulfato de gentamicina e solução salina q.s.p. 100 mL;
- A suspensão a 20% é transferida para tubo tipo Falcon® e passa por centrifugação (3.000 rpm, durante 30 minutos, a 4°C);
- Cerca de 0,03 mL do sobrenadante obtido é, então, inoculado em camundongo, via intracerebral, com uso de seringa agulhada de 1 mL (FIGURA 6). Para cada amostra, são inoculados de 6 a 8 camundongos que, posteriormente à inoculação, são alojados em gaiolas adequadas à espécie, em sala com controle de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (50-55%);
- Os animais ficam em observação por até 30 dias, em busca de manifestações clínicas de raiva;
- Caso ocorram sinais clínicos da doença, o camundongo é submetido à eutanásia e seu sistema nervoso central é coletado e testado em IFD para confirmação do diagnóstico de raiva;
- Todo animal sem quadro clínico de raiva é submetido à eutanásia ao final do período de observação.



FIGURA 6 – INOCULAÇÃO INTRACEREBRAL EM CAMUNDONGO
FONTE: INSTITUTO PASTEUR (2014)

A técnica de inoculação em camundongos apresenta alto grau de especificidade, porém com resultados mais demorados, uma vez que o período de incubação do vírus pode variar de 7 a 30 dias. As alterações observadas nos animais inoculados com vírus rábico são: pelos arrepiados, falta de coordenação dos membros posteriores, paralisia e prostração. No entanto, estes sinais clínicos não são suficientes para que se emita um laudo, e a prova de imunofluorescência direta deve ser aplicada em impressões de tecido nervoso desses animais, para se visualizar os antígenos específicos. Mortes ocorridas antes de 48 horas não são atribuídas ao vírus da raiva, pois o período de incubação é, em geral, de 7 a 21 dias, sendo recomendada a observação dos animais inoculados por um período de até 30 dias (INSTITUTO PASTEUR, 2014; WHO, 1996).

2.2.2.3 Isolamento do vírus da raiva em cultivo celular

Embora relatos de isolamento do vírus rábico em cultivo celular datem de mais de cinco décadas atrás, apenas recentemente esta técnica passou a ser empregada na rotina laboratorial (INSTITUTO PASTEUR, 2014; WHO, 1996).

Utilizada no diagnóstico laboratorial da raiva como um segundo teste para confirmação dos resultados obtidos pela técnica de imunofluorescência direta, em casos de suspeita de raiva em animais, a técnica de isolamento e identificação viral com utilização de células de neuroblastoma de camundongo (N2A) e anticorpos fluorescentes (imunoglobulinas antirrábicas marcadas com isotiocianato de fluoresceína = conjugado antirrábico) é um método mais rápido, simples e de custo menos elevado de isolamento do vírus da raiva. A técnica se baseia na inoculação de suspensões de sistema nervoso central (SNC) em placas utilizando células, seguida pelo exame microscópico da célula “tratada” com conjugado específico e submetida à luz ultravioleta. O antígeno rábico, reagindo com o conjugado e iluminado com luz ultra (comprimento de onda de 260 nanômetros), emite uma luz esverdeada fluorescente. A sensibilidade da técnica depende do uso de célula com boa morfologia, da experiência do profissional na realização da técnica e, principalmente, da leitura das placas (BRASIL, 2008a, p. 65).

As células de neuroblastoma murino – identificadas na *American Type Culture Collection* (ATCC) como Neuro-2a CLL-131 – apresentam maior sensibilidade à infecção do vírus rábico do que outras linhagens celulares e, por isso, são utilizadas em muitos países para o diagnóstico da raiva (ATCC, 2014; BRASIL, 2008a).

O método apresenta altas sensibilidade e especificidade, menor tempo para obtenção dos resultados (72 a 96 horas), e menor custo, pois dispensa a necessidade de aquisição e manutenção de animais de laboratório, porém requer um ambiente laboratorial equipado e com pessoas treinadas em cultivo celular (INSTITUTO PASTEUR, 2014), constituindo uma barreira para a ampla implantação da metodologia em laboratórios de saúde pública, já que instalações adequadamente equipadas e pessoal treinado demandam investimento e iniciativa institucionais (BONES; MOLENTO, 2012).

Apesar de estudos comprovarem excelente acurácia e baixos custos do IVCC, a técnica vem sendo utilizada no Brasil, como parte da rotina diagnóstica da raiva em saúde pública, somente no Instituto Pasteur de São Paulo (BONES; MOLENTO, 2012; INSTITUTO PASTEUR, 2014).

No Lacen-PR, o IVCC não está na rotina de diagnóstico da raiva até o momento devido exatamente às barreiras já citadas e, ainda, pela existência de uma técnica – a de inoculação em camundongos – com acurácia muito semelhante, já implantada e consagrada, dificultando o direcionamento de esforços e recursos para a implantação de uma nova metodologia.

2.3 BIOSSEGURANÇA

A biossegurança compreende um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, mitigar ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam interferir ou comprometer a qualidade de vida, a saúde humana e o meio ambiente. Desta forma, a biossegurança caracteriza-se como estratégica e essencial para a pesquisa e o desenvolvimento sustentável, sendo de fundamental importância para avaliar e prevenir os possíveis efeitos adversos de novas tecnologias à saúde (BRASIL, 2010).

Constitui uma área de conhecimento relativamente nova, regulada em vários países por um conjunto de leis, procedimentos ou diretrizes específicas. No Brasil, a legislação de biossegurança foi criada em 1995 com a publicação da primeira lei de biossegurança, a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, posteriormente revogada pela Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005 (BRASIL, 2006; BRASIL, 2008b; BRASIL, 2010).

Medidas de biossegurança específicas devem ser adotadas por laboratórios e aliadas a um amplo plano de educação baseado nas normas nacionais e internacionais quanto ao transporte, à conservação e à manipulação de microrganismos patogênicos (BRASIL, 2006).

O termo contenção é usado para descrever os métodos apropriados ao manejo dos agentes de risco, para garantir a segurança à saúde humana, animal, vegetal e ao ambiente. A contenção primária refere-se à proteção da equipe do laboratório e do meio de trabalho contra a exposição aos agentes infecciosos, sendo proporcionada por uma boa técnica de microbiologia e pelo uso de equipamentos de segurança adequados, bem como vacinação. Já a contenção secundária remete à proteção do meio ambiente externo ao laboratório contra a exposição aos materiais infecciosos (BRASIL, 2006; BRASIL, 2012; WHO, 2014d).

A avaliação do risco do trabalho a ser realizado determinará de que forma a contenção se dará, utilizando-se de práticas e técnicas laboratoriais, equipamento de segurança/ proteção e projeto de construção das instalações (CDC, 2014; WHO, 2014d).

2.3.1 Níveis de biossegurança

Existem quatro níveis de biossegurança – níveis de biossegurança (NB) 1, 2, 3 e 4 – cada um com medidas específicas para o controle e contenção de agentes biológicos. Os riscos principais que determinam os níveis de contenção são infectividade, a gravidade da doença, a transmissibilidade e a natureza do trabalho realizado. O agente em questão, sua origem e a via de exposição/ transmissão também são importantes (CDC, 2014).

Em consonância com a classe de risco dos microrganismos manipulados, os laboratórios devem estabelecer um programa de biossegurança que terá por finalidade aperfeiçoar e disciplinar os trabalhos, objetivando minimizar os riscos mediante a execução de efetiva prevenção de acidentes (BRASIL, 2008a).

NB 1: nível de contenção laboratorial básico, sem recomendação de barreiras primárias ou secundárias especiais além de pia para lavagem das mãos e boas

práticas em geral. Aplica-se aos laboratórios de práticas básicas, em que são manipulados microrganismos pertencentes à classe de risco 1 – aqueles que representam risco individual e para a comunidade ausente ou muito baixo;

NB 2: aplica-se a laboratórios clínicos, de diagnóstico, de ensino e outros que manipulem microrganismo de classe de risco 2 – aqueles que representam risco individual moderado e baixo para a comunidade. Neste nível, são empregados, além das boas práticas, o uso de barreiras primárias e secundárias;

NB 3: refere-se a laboratórios clínicos, de diagnóstico, de ensino, de pesquisa e a instalações de larga produção, em que se manipulem microrganismos de classe de risco 3 – aqueles que representam alto risco individual e risco limitado à comunidade – ou grandes quantidades de microrganismos de classe de risco 2. Neste nível, além dos métodos adotados no NB 2, são necessários projeto e construção especiais das instalações;

NB 4: são os laboratórios de contenção máxima, onde são manipulados microrganismo de classe de risco 4 – aqueles que representam elevado risco individual e para a comunidade. Neste nível, além de toda contenção utilizada no NB 3, há necessidade de a unidade ser geográfica e funcionalmente separada de outras áreas, bem como possuir barreiras e procedimentos de segurança especiais (BRASIL, 2011; CDC, 2006).

2.3.2 Biossegurança no diagnóstico da raiva animal

Nos laboratórios de saúde pública, trabalham-se tanto com o vírus “fixo”, utilizado nas metodologias de diagnóstico da raiva como controles positivos, por exemplo, e com o vírus de “rua”, proveniente das amostras de animais infectados.

De acordo com diretrizes do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), o vírus da raiva, vírus “fixo”, é classificado como agente de classe de risco 2 e o vírus da raiva, amostras de “rua”, é considerado agente de classe de risco 3.

Algumas práticas tipo padrão e especiais são aplicáveis aos agentes designados para o nível de biossegurança 2:

- Nunca pipetar com a boca; devem ser utilizados dispositivos mecânicos.
- Não comer, beber ou fumar na área de trabalho do laboratório.
- Não armazenar alimentos nem bebidas nas áreas de trabalho.

- Não aplicar maquiagem, nem usar adereços.
- Usar os equipamentos de proteção individual, como aventais ou jalecos, protetores faciais, máscaras, óculos de proteção, luvas, sapatilhas descartáveis, entre outros.
- Limitar ou restringir o acesso ao laboratório.
- Proibir a entrada de crianças na área de trabalho do laboratório.
- Não permitir a entrada de animais que não tenham relação com os trabalhos que estejam sendo realizados.
- Realizar cuidadosamente todos os procedimentos, a fim de minimizar a criação de borrifos ou aerossóis.
- Descontaminar as superfícies de trabalho com agentes desinfetantes adequados ao final do trabalho e após qualquer vazamento ou borrifada de material viável.
- Lavar as mãos após a manipulação de materiais viáveis, após a remoção das luvas e antes de sair do laboratório.
- Colocar, na entrada do laboratório, o símbolo de risco biológico.
- Descontaminar os resíduos produzidos antes que sejam descartados. Os materiais que devem ser descontaminados fora do próprio laboratório deverão ser colocados em recipientes à prova de vazamentos e hermeticamente fechados, para que sejam transportados.
- Utilizar cabines de segurança biológica, mantidas de maneira adequada, sempre que sejam realizados procedimentos com elevado potencial de criação de aerossóis ou quando altas concentrações ou grandes volumes do agente infeccioso forem manipulados.
- Descartar os materiais perfurocortantes (tais como agulhas, lâminas, lamínulas, tubos quebrados e outros materiais utilizados) em recipientes de paredes rígidas, devidamente identificados.
- Assegurar-se de que as saídas de emergência se encontrem livres de obstáculos.
- Manter extintores para diferentes tipos de fogo, com seu correspondente controle periódico, assim como ter o número de telefone dos bombeiros em lugar visível.
- Manter a obrigatoriedade da vacinação antirrábica preventiva para todo o pessoal de laboratório e controlar periodicamente o título de anticorpos neutralizantes (BRASIL, 2008a, p. 32-33).

Tanto o Lacen-PR quando o laboratório de referência nacional para raiva, o Instituto Pasteur de São Paulo, operam com estrutura de NB 2 (INSTITUTO PASTEUR, 2014; PARANÁ, 2015).

2.4 USO DE ANIMAIS EM LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA

Desde os primórdios da humanidade, a relação do homem com os animais passou por diferentes formas de interação: primeiramente eram empregados meramente como fonte de alimentos e de vestuário; depois foram domesticados e desenvolveu-se também relação de parceria em que o animal ajudava o homem em trabalhos agrícolas, transporte, companhia, guarda e pastoreio; mais recentemente,

desempenham papel importante na busca de novos conhecimentos para a melhoria da saúde e do bem-estar, tanto de humanos quanto dos demais animais, contando, para tanto, com a experimentação animal (RIVERA; AMARAL; NASCIMENTO, 2006).

O estudo do uso e exploração de animais implica em considerações acerca das ações humanas não somente em relação à sociedade como também ao ambiente, superando os interesses meramente científicos e econômicos (PESSINI; BARCHIFONTAINE, 2002).

O cunho ético em relação ao uso de animais para o benefício humano vem sendo bastante questionado há muitos séculos, mas ganha maior dimensão a partir do final do século XIX e começo do século XX, com o advento dos sistemas de criação intensivos no meio rural, com a utilização em larga escala da experimentação animal na área de tecnologia biomédica, com o surgimento do bem-estar animal como ciência e o conceito crescente de que determinados animais fazem parte do núcleo familiar como sujeito fraternal. Esse conflito moral que toca várias áreas da sociedade, multidisciplinar e plural, alimentado pela busca de parâmetros norteadores de atitudes eticamente adequadas ao contexto atual, dá origem a um campo de estudo da ética novo e desafiador: a bioética (CLOTET; FEIJÓ; OLIVEIRA, 2005; ENGELHARDT, 2004).

O termo bioética é definido como o estudo sistemático das dimensões morais – incluindo visão, decisão, conduta e normas morais – das ciências da vida e dos cuidados à saúde, utilizando uma variedade de metodologias éticas num contexto multidisciplinar (POST, 2004).

A bioética vem ganhando espaço no meio acadêmico e na sociedade em geral em função de situações conflitantes do cotidiano que se apresentam, fruto do grande desenvolvimento científico e tecnológico de nossa era. A ética animal, aparece como uma das áreas do conhecimento que pede uma reflexão multidisciplinar sobre os limites de atuação do ser humano para com os animais não-humanos a fim de serem garantidas ações eticamente adequadas a estes seres sencientes (CLOTET; FEIJÓ; OLIVEIRA, 2005).

O conceito de senciência modificou-se muito ao longo dos anos e, atualmente, muitos estudos consideram que animais são dotados de estados emocionais, sendo capazes, desta forma, de vivenciar experiências positivas e negativas, de sentir e de sofrer. Há, entretanto, certa aceitação de senciência animal, ao menos em mamíferos,

há muitos séculos, como fica evidenciado em escrituras de Leonardo da Vinci, Shakespeare, Thomas More, entre outros (DUNCAN, 2006).

Mais recentemente, em 07 de julho de 2012, um grupo de neurocientistas mundialmente renomados se reuniu na Universidade de Cambridge, Reino Unido, para o evento *The Francis Crick Memorial Conference: Consciousness in Human and Non-Human Animals*, no qual os palestrantes abordaram, do ponto de vista anatomofisiológico, as semelhanças entre humanos e outras espécies animais. A conferência teve como produto o Manifesto de Cambridge, dedicado à consciência animal, que declara:

“A ausência de um neocórtex não parece impedir um organismo de experimentar estados afetivos. Evidência convergente indica que animais não-humanos possuem os substratos neuroanatômicos, neuroquímicos, e neurofisiológicos de estados de consciência juntamente com a capacidade de exibir comportamentos intencionais. Conseqüentemente, o peso da evidência indica que os humanos não são os únicos que possuem os substratos neurológicos que geram a consciência. Animais não-humanos, incluindo todos os mamíferos e aves, e muitas outras criaturas, incluindo polvos, também possuem esses substratos neurológicos” (THE FRANCIS CRICK MEMORIAL CONFERENCE, 2012).

Assim, consolida-se a evidência de que diversas espécies, entre elas, muitas das utilizadas em experimentação animal, são sencientes, ou seja, são capazes de experimentar sensações e emoções, tais como medo, angústia, alegria, dor e outras. O reconhecimento dos animais como seres sencientes aumenta ainda mais o dilema do seu uso pelos humanos, gerando grandes discussões em relação ao bem-estar animal e aos princípios éticos e morais na exploração animal (DUNCAN, 2006; POST, 2004).

O conceito mais aceito no meio científico é de que o bem-estar seja o estado de um indivíduo em relação às suas tentativas de adaptar-se ao meio ambiente em que vive (BROOM; FRASER, 2010). Ou seja, o bem-estar está relacionado ao grau de dificuldade que um indivíduo enfrenta para viver no meio onde se encontra.

Mesmo antes da comprovação sobre a senciência dos animais, já ocorriam manifestações acerca do bem-estar animal. Em 1964, Ruth Harrison lançou a obra *Animal Machines*, na qual a autora descreveu sistemas de criação intensiva em pecuária, expondo a realidade sobre esse sistema de produção.

O livro impulsionou o governo do Reino Unido a criar uma comissão, liderada por Roger Brambell, para investigar o bem-estar de animais criados em sistemas intensivos. O produto desta investigação, conhecido como Relatório de Brambell, deu origem ao conceito das Cinco Liberdades em 1965, sendo refinado posteriormente em

1979 e novamente em 1993 pelo *Farm Animal Welfare Committee* (FAWC) do governo britânico (HARRISON, 1964; FAWC, 2015).

Segundo FAWC (2015), as Cinco Liberdades fundamentais ao bem-estar animal são:

- Liberdade nutricional: os animais devem estar livres de sede, fome e desnutrição;
- Liberdade sanitária: os animais devem estar livres de dor, doenças e ferimentos;
- Liberdade ambiental: os animais devem ter liberdade de movimento, em instalações adequadas à sua espécie;
- Liberdade psicológica: os animais devem estar livres de medo e distresse;
- Liberdade comportamental: os animais devem ter liberdade para expressar o comportamento natural de sua espécie.

Ainda em meados do século passado, pesquisadores também procuravam melhorias na experimentação animal. Em 1959, Russell e Burch publicaram a obra *The Principles of Humane Experimental Technique*. O livro trouxe o Princípio dos 3 R's (RUSSELL; BURCH, 1992):

- *Replacement* (substituição): significa a substituição do uso de animais sencientes pelo uso de materiais não-sencientes. Ex: uso de modelos *in vitro*, uso de cultivos celulares, uso de modelos artificiais, entre outros.
- *Reduction* (redução): significa a redução do número de animais utilizados para obter a informação científica. Ex: reduzir o *N* amostral ao menor possível por meio de cálculo estatístico.
- *Refinement* (refinamento): significa a máxima diminuição da intensidade e severidade do sofrimento imposto aos animais durante a experimentação. Ex: utilizar analgesia ou anestesia previamente a procedimentos cirúrgicos.

As Cinco Liberdades e o Princípio dos 3 R's permearam não apenas os círculos da sociedade envolvidos na luta pelo bem-estar animal, mas também chegaram às esferas políticas e legislativas, e até hoje servem como base para novas normas e leis em diversos países no que se refere à exploração animal (FAWC, 2015; RUSSELL; BURCH, 1992).

No Brasil, as práticas de uso de animais em experimentação e pesquisa são regulamentadas e orientadas pela Lei Federal nº 9.605 de 12 de fevereiro de 1998, pela Resolução nº 879 de 15 de fevereiro de 2008 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), pela “Lei Arouca” (Lei Federal nº 11.794 de 08 de outubro de 2008) e pelo Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 (BRASIL, 1998; BRASIL, 2008a; BRASIL, 2009c; CFMV, 2008).

Para orientar e regular as instituições de ensino e pesquisa que realizam experimentação animal, recentemente foram criadas as comissões de ética no uso de animais – as CEUAs. Estas obedecem às diretrizes e normatização do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), ligado Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (CONCEA, 2015).

Segundo Clotet, Feijó e Oliveira (2005, p. 26), os princípios das legislações basicamente se fundamentam nos seguintes objetivos gerais:

- 1 Definir propósitos legítimos para que o animal de laboratório possa ser utilizado;
- 2 Providenciar a exigência de competência de todas as pessoas envolvidas na experimentação animal;
- 3 Limitar o uso de animais onde as alternativas são disponíveis;
- 4 Prevenir dor desnecessária ou estresse para os animais;
- 5 Providenciar para a inspeção das exigências e procedimentos;
- 6 Assegurar a responsabilidade pública.

Todas as instituições de ensino e pesquisa científica que realizam experimentação animal devem seguir as determinações da legislação vigente. As normas e leis brasileiras, entretanto, não abrangem os laboratórios de saúde pública que não sejam vinculados à pesquisa e ensino, pois nesses estabelecimentos ocorre o uso de animais somente para fins de diagnóstico e vigilância epidemiológica (CONCEA, 2015).

2.5 SAÚDE DO TRABALHADOR NA PESQUISA COM ANIMAIS

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde, cerca de 45% da população mundial e de 58% da população acima de 10 anos faz parte da força de trabalho. O trabalho desta população sustenta a base econômica e material das sociedades que, por outro lado, são dependentes da sua capacidade de trabalho.

Desta forma, a saúde do trabalhador e a saúde ocupacional são pré-requisitos cruciais para a produtividade, e são de suma importância para o desenvolvimento socioeconômico e sustentável de uma nação (OPAS, 2016).

Entende-se por saúde do trabalhador um conjunto de atividades que se destina, por meio das ações de vigilância epidemiológica e vigilância sanitária, à promoção e proteção da saúde dos trabalhadores, assim como visa à recuperação e reabilitação da saúde dos trabalhadores submetidos aos riscos e agravos advindos das condições de trabalho (BRASIL, 1990).

A saúde ocupacional e a saúde mental também estão contempladas no escopo da saúde do trabalhador e se inter-relacionam. Neste campo, busca-se identificar relações entre o ambiente, a organização, as condições de trabalho e os efeitos na saúde do trabalhador, dando diagnóstico e propondo soluções para os processos relativos à deterioração da qualidade de vida, à saúde e ao surgimento de doenças relacionadas ao trabalho (HOFMANN; STROBEL, 2011).

No Brasil, a Política Nacional de Saúde do Trabalhador do Ministério da Saúde, em vigor desde 2004, visa à redução dos acidentes e doenças relacionadas ao trabalho, mediante a execução de ações de promoção, reabilitação e vigilância na área da saúde. Suas diretrizes, descritas na Portaria nº 1.225 de 06 de julho de 2005, compreendem a atenção integral à saúde, a articulação intra e intersetorial, a estruturação da rede de informações em Saúde do Trabalhador, o apoio a estudos e pesquisas, a capacitação de recursos humanos e a participação da comunidade na gestão dessas ações (OPAS, 2016).

A legislação e normas nacionais são de cumprimento obrigatório para todas as empresas, sejam privadas ou públicas, inclusive nos dos serviços de saúde. A Norma Regulamentadora nº 32 estabelece as diretrizes básicas para implantação de medidas de proteção à saúde e segurança de trabalhadores de serviços de saúde (BRASIL, 2005c).

Dentro do grupo dos trabalhadores dos serviços de saúde, encontram-se os profissionais de biotério, os auxiliares e técnicos de laboratórios de experimentação animal. Quanto à saúde deste grupo de trabalhadores, a literatura é vasta em relação à biossegurança intrínseca ao seu ambiente de trabalho, especialmente, no tocante aos riscos biológicos (MAJEROWICZ, 2008; WHO, 2014d). No entanto, poucas pesquisas se aprofundam na temática dos aspectos psicológicos dos manipuladores,

relacionados a procedimentos capazes de impor sofrimento aos animais de experimento, bem como à eutanásia.

Esse estresse psicológico, e que pode ser acompanhado ou não de depressão, é inerente a grande parte dos experimentos com animais, já que, muitas vezes, a intervenção sofrida pelos animais durante a pesquisa é de tal gravidade que as diretrizes técnicas e a legislação impõem a terminação do sofrimento do animal ao fim do experimento, por meio da eutanásia (BRASIL, 2009C; CFMV, 2008; CONCEA, 20015; RIVERA; AMARAL; NASCIMENTO, 2006).

Estudos apontam, por exemplo, que médicos veterinários têm quatro vezes mais chances de cometer suicídio do que a população em geral, e duas vezes mais do que os demais profissionais da área da saúde. Uma das hipóteses é de que a repetida exposição dos médicos veterinários à eutanásia de animais os torne insensíveis quanto à morte, pois acabam se habituando ao processo de eutanásia, o que poderia levar à banalização da morte (WITTE; CORREIA; ANGARANO, 2013).

O estresse e a depressão, como fatores de risco ocupacional, podem provocar alterações de ordem física e mental capazes de afetar a saúde, o comportamento e o bem-estar dos profissionais envolvidos na experimentação animal, e influencia diretamente os resultados das pesquisas em que esses trabalhadores estão envolvidos. O afastamento do trabalho por depressão e seu tratamento na rede de saúde pública impactam também na economia, saúde pública e saúde do trabalhador (WHO, 2016).

Assim sendo, as pesquisas que envolvem o uso de animais devem ser muito bem fundamentadas, planejadas e justificadas, pois são capazes de causar impacto importante no bem-estar animal e no bem-estar e saúde do trabalhador (RUSSELL; BURCH, 1992; SINGER, 1993; WHO, 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras utilizadas foram cedidas pelo Lacen-PR, provenientes da rotina de diagnóstico de todo o estado do Paraná, e selecionadas após realização do exame de imunofluorescência direta (IFD) e prova biológica (PB) por inoculação em camundongos conforme preconizado pelo Ministério da Saúde.

Na etapa do estudo em que foram comparados o isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde com o isolamento viral em camundongos por técnica modificada de preparo das amostras, bem como na etapa em que foi comparado o isolamento viral em camundongos com o IVCC por técnica modificada de preparo das amostras foi necessária a utilização de animais, além dos previstos na rotina do Lacen-PR. Desta maneira, nessas fases do experimento, foi selecionado o menor número possível de amostras, que resultou no uso de um número racional de camundongos, compatível com as exigências da comissão de ética no uso de animais e que, ainda, permitiu a realização de estudos de acurácia (QUADRO 3).

Na etapa do isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. isolamento viral em cultivo celular por técnica modificada de preparo das amostras, e na de isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde foi possível ampliar o tamanho amostral, conforme o QUADRO 3, por não ser necessário o uso de animais além dos previstos na rotina do laboratório.

Etapa do experimento	Nº Amostras Positivas	Nº Amostras Negativas	TOTAL
Isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em camundongos por técnica modificada de preparo das amostras	15	5	20
Isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica modificada de preparo das amostras	86	314	400
Isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde	86	314	400
Isolamento viral em camundongos por técnica modificada de preparo das amostras vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica modificada de preparo das amostras	15	5	20

QUADRO 3 – NÚMERO DE AMOSTRAS UTILIZADAS POR ETAPA DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ

FONTE: O autor (2015)

3.1.1 Tamanho amostral nas etapas com uso de camundongos

O tamanho amostral foi calculado considerando o Princípio dos 3 R's – *Replacement, Reduction, Refinement* – que defende o uso parcimonioso de animais na experimentação e simultaneamente se encontra em conformidade com as diretrizes e legislação vigentes no que tange ao bem-estar animal (RUSSELL; BURCH, 1992).

Assim, para o cálculo do tamanho e a seleção de amostras nesta etapa do estudo considerou-se:

- A média de amostras positivas recebidas anualmente no Lacen-PR;
- A prevalência de casos positivos entre as amostras recebidas;
- As espécies animais dos casos positivos; e
- As espécies de origem dos controles utilizados na rotina.

De um total de 18.919 amostras recebidas no Lacen-PR entre 01 agosto de 2009 e 31 de agosto de 2015, 13.071 (69,09%) eram de caninos, 3.125 (16,52%) eram de quirópteros, 2.607 (13,78%) eram de felinos e 116 (0,61%) eram de outras espécies. Dentro do mesmo período, apenas 95 amostras foram positivas para raiva, o que reflete 0,5% de positividade e média anual de 16 amostras positivas. Destas, 91 (95,79%) eram amostras de morcegos, três (3,16%) eram de bovinos e uma (1,05%) era de felino.

Os controles positivos e negativos utilizados na rotina do Lacen-PR são originários de amostras bovinas (vírus de “rua”) e de camundongos (vírus “fixo”).

Desta forma, para ser possível a aplicação dos testes de acurácia propostos e ainda ser utilizado o menor número possível de animais, determinou-se a utilização de 20 amostras neste segmento do experimento, sendo 15 positivas e 5 negativas. Considerando a inoculação de 6 camundongos por amostra, o total de animais utilizados nesta etapa foi de 120 animais.

Para compor as amostras positivas, foram utilizadas 11 amostras de quirópteros, duas de bovinos e duas de camundongos. Quanto às amostras negativas, foram utilizadas cinco amostras, sendo duas originárias de caninos, duas de quirópteros e uma de felino.

As etapas em que se utilizaram 20 amostras foram:

- Isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em camundongos por técnica modificada de preparo das amostras; e

- Isolamento viral em camundongos por técnica modificada de preparo das amostras vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica modificada de preparo das amostras.

3.1.2 Tamanho amostral nas etapas sem experimentação animal

Nas outras duas etapas, em que não foram utilizados animais além da rotina do laboratório, o cálculo da amostragem foi feito considerando-se que o tratamento estatístico dos resultados obtidos no experimento visaria aos testes de acurácia, em

que se determinam a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos positivo e negativo de um novo teste frente ao padrão ouro ou ao teste de referência.

A fórmula mais apropriada para o cálculo do tamanho amostral (N) em testes diagnósticos segundo Medronho (2002) é:

$$N = Z^2 \times [P (1-P)] / D^2, \text{ em que:} \quad (1)$$

P = proporção esperada

D = semi-amplitude do intervalo de confiança

Z = 1,96 (para $\alpha=0,05$ e intervalo de confiança IC 95%)

A proporção esperada (P) de sensibilidade dos novos testes não deve ser inferior a 90% neste caso. Portanto, neste cálculo, foi utilizado P = 0,10.

O espectro do intervalo de confiança foi estipulado em 0,08 como erro máximo aceitável – precisão de 0,04 abaixo até 0,04 acima. Ou seja, D = 0,04.

O intervalo de confiança de 95% remete ao Z = 1,96.

Assim, o tamanho amostral mínimo era N = 216.

Durante a parte experimental do estudo, contudo, foi possível processar mais amostras do que o tamanho amostral mínimo. Desta forma, foi utilizado um total de 400 amostras, sendo 86 positivas (79 de quirópteros, três de bovinos, quatro de camundongos) e 314 negativas (224 de caninos, 50 de quirópteros, 40 de felinos).

As etapas que utilizaram 400 amostras foram:

- Isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica modificada de preparo das amostras; e

- Isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde.

3.2 LOCAL DA PESQUISA

As amostras utilizadas eram provenientes de animais residentes em diversos municípios paranaenses (QUADRO 4), e recebidas diretamente na rotina de diagnóstico do Lacen-PR, não sendo necessária coleta a campo.

MUNICÍPIO	BOVINO	CANINO	FELINO	QUIRÓPTERO
ANDIRA	0	1	0	0
ANTONIO OLINTO	0	0	0	2
APUCARANA	0	2	0	0
ARAPONGAS	0	2	0	0
ARAPOTI	0	0	0	1
ARAUCARIA	0	0	0	4
ASSIS CHATEAUBRIAND	0	1	0	0
BELA VISTA DO PARAISO	0	3	0	0
BITURUNA	0	1	0	4
BOA VISTA DA APARECIDA	0	0	0	1
CAMBARA	0	4	1	0
CAMBE	0	2	1	6
CAMBIRA	0	5	0	0
CAMPO LARGO	0	1	0	2
CAMPO MOURAO	0	0	0	2
CASCADEL	0	0	0	1
CENTENARIO DO SUL	0	3	0	0
CIANORTE	0	0	0	2
CONGONHINHAS	0	1	0	0
CORNELIO PROCOPIO	0	3	0	0
CORONEL VIVIDA	0	3	0	0
CURITIBA	0	50	15	10
FAZENDA RIO GRANDE	0	0	0	1
FERNANDES PINHEIRO	0	0	0	6
FIGUEIRA	0	1	1	0
FOZ DO IGUACU	0	56	15	23
FRANCISCO BELTRAO	0	0	0	2
GUAIRA	0	1	0	0
GUAPIRAMA	0	7	0	1
GUARAPUAVA	0	0	0	1
HONORIO SERPA	0	1	0	0
IBAITI	0	1	0	0
IBIPORA	0	4	0	0
IMBITUVA	0	0	0	1
IRATI	0	0	0	4
ITAMBARACA	0	1	0	0
ITAUNA DO SUL	0	0	0	1
IVAIPORA	0	0	0	2
JACAREZINHO	0	1	2	1
JAGUAPITA	0	2	0	0
JANDAIA DO SUL	0	6	0	0
JAPURA	0	2	0	0
JATAIZINHO	0	5	0	0

continua

MUNICÍPIO	BOVINO	CANINO	FELINO	QUIRÓPTERO
				conclusão
KALORE	0	1	0	0
LEOPOLIS	0	7	1	0
LONDRINA	0	6	2	12
MARECHAL CANDIDO RONDON	0	4	0	0
MARINGA	0	1	0	13
MARMELEIRO	0	1	0	0
MAUA DA SERRA	0	6	0	0
MERCEDES	0	2	0	0
ORTIGUEIRA	0	1	0	0
PALOTINA	0	3	0	1
PATO BRANCO	0	2	0	0
PAULA FREITAS	0	0	0	1
PAULO FRONTIN	0	0	0	2
PONTA GROSSA	0	0	0	2
PORECATU	0	1	0	0
PORTO VITORIA	0	0	0	2
QUATRO BARRAS	0	0	0	1
QUATRO PONTES	0	1	1	0
QUEDAS DO IGUACU	0	0	0	1
RANCHO ALEGRE	0	1	0	0
REALEZA	0	0	0	2
RIBEIRAO DO PINHAL	0	1	0	0
ROLANDIA	0	0	0	1
SANTA HELENA	0	3	1	0
SANTO ANTONIO DA PLATINA	0	3	0	0
SAO JOSE DOS PINHAIS	1	0	0	1
SAO MANOEL DO PARANA	0	1	0	0
SENGES	0	0	0	1
SERRANOPOLIS DO IGUACU	0	1	0	0
SERTANOPOLIS	2	2	0	0
SIQUEIRA CAMPOS	0	1	0	0
TAMARANA	0	4	0	0
TIJUCAS DO SUL	0	0	0	4
TOLEDO	0	0	0	4
UNIAO DA VITORIA	0	0	0	2
VITORINO	0	0	0	1
WENCESLAU BRAZ	0	1	0	0
TOTAL	3	224	40	129

QUADRO 4 – AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS UTILIZADAS NA PESQUISA DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA, POR MUNICÍPIO E ESPÉCIE, ESTADO DO PARANÁ

FONTE: PARANÁ (2015) – Modificado pelo autor (2015)

3.3 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de uma pesquisa experimental, na qual foram realizados estudos de acurácia, avaliando sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, e concordância *Kappa* de um novo protocolo de diagnóstico de raiva animal proposto ao Lacen-PR. Além disso, foi realizada análise comparativa entre o protocolo empregado atualmente e o protocolo modificado no que se refere a complexidade, tempo dispendido em cada metodologia, custos, biossegurança, bioética e bem-estar animal.

A proposta do projeto baseou-se na modificação da etapa de preparo das amostras, com inoculação do vírus rábico em cultivo celular, em substituição ao uso de camundongos.

Assim, o estudo foi fundamentado em duas frentes principais: a modificação do preparo de amostras, elevando o grau de biossegurança, e a substituição do isolamento viral em camundongos pelo isolamento viral em cultivo celular, priorizando o bem-estar animal, a saúde do trabalhador e a saúde mental dos técnicos.

3.3.1 Modificação do preparo das amostras

O Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva/MS (BRASIL, 2008a) determina que a amostra a ser utilizada para inoculação passe por trituração manual em gral e pistilo estéreis e, somente então, a seja adicionada ao diluente de vírus, em tubo tipo Falcon®. Essa mistura passa por centrifugação e o sobrenadante obtido é utilizado para inoculação. Esse processo envolve intensa manipulação de material potencialmente infectado com o vírus rábico, elevando as chances de exposição ao vírus bem como os riscos à biossegurança. Além disso, o consumo de vidrarias estéreis (gral e pistilo) para cada amostra torna a metodologia demasiado laboriosa, onerosa e demorada.

Assim, neste estudo, a preparação das amostras sofreu as seguintes modificações (FIGURA 7):

- Em cabine de segurança biológica, uma pequena fração da amostra foi separada e imediatamente adicionada ao diluente de vírus, na proporção de 1:5, em tubo tipo Falcon®.
- O tubo já contendo a amostra e devidamente fechado passou por homogeneização em agitador tipo vórtex, num processo equivalente à trituração manual preconizada pelo MS.
- Depois, o tubo foi levado normalmente à centrifugação e o sobrenadante obtido foi, então, utilizado na inoculação.



FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DA MODIFICAÇÃO DA TÉCNICA DE PREPARO DE AMOSTRAS DE ENCÉFALO PARA DIAGNÓSTICO DA RAIVA EM ANIMAIS
 FONTE: O autor (2015)

Para as análises neste estudo, foram empregadas amostras de rotina sabidamente positivas ou negativas, e previamente processadas no Lacen-PR de acordo com a metodologia recomendada pelo Ministério da Saúde.

Nesta fase, foram feitas duas comparações:

1ª) Isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em camundongos por técnica modificada de preparo das amostras; e

2ª) Isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica modificada de preparo das amostras.

3.3.1.1 Isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em camundongos por técnica modificada de preparo das amostras

Neste segmento do estudo, foram utilizadas 20 amostras previamente processadas de acordo com o recomendado pelo Ministério da Saúde, sendo:

- 15 positivas (11 de quirópteros, 2 de bovinos e 2 de camundongos);
- 5 negativas (2 de caninos, 2 de quirópteros e 1 de felino).

As amostras selecionadas foram divididas em duas alíquotas, sendo a primeira processada seguindo a rotina do laboratório, de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde (Grupo Controle 1) e a segunda alíquota processada pelo preparo modificado de amostras (Grupo Teste 1).

Para cada amostra, foram inoculados seis camundongos no grupo controle e seis camundongos no grupo teste. Cada conjunto de seis animais foi alojado em suas respectivas gaiolas, identificadas com o número de registro da amostra e com o grupo ao qual pertenciam (controle ou teste).

Os parâmetros comparados entre os grupos controle e teste foram:

- Resultados das provas biológicas e posteriores IFD confirmatórias;
- Tempo decorrido no preparo das amostras até a obtenção da suspensão para inoculação;
- Riscos ocupacionais observados durante os processos;
- Custos de insumos.

Os valores dos insumos empregados foram fornecidos pelo Lacen-PR ou por meio de pesquisa de mercado, utilizando informações de cotações com empresas nacionais especializadas no comércio desses produtos. Os valores obtidos foram extrapolados proporcionalmente para o que seria consumido processando 3.200

amostras – a média anual do Lacen-PR numa série histórica de agosto de 2009 a agosto de 2015.

Não foram considerados os valores gastos com recursos humanos – número de pessoas necessárias, capacitações e treinamentos, horas trabalhadas, encargos sociais, etc. Não foram computados também os gastos com destinação dos resíduos sólidos de saúde.

Os custos com a técnica de IFD não foram considerados pois são os mesmos independentemente da técnica empregada.

O tempo decorrido no preparo das amostras foi determinado com o uso de cronômetro calibrado. Todas as alíquotas processadas foram preparadas pela mesma pessoa. A partir dos resultados individuais, foi obtida uma média por grupo e essas medidas de tendência central foram comparadas.

Os riscos inerentes ao processamento das amostras em cada grupo foram enumerados e classificados de acordo com diretrizes da Organização Mundial de Saúde e Ministério da Saúde (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010; WHO, 2014d).

A análise estatística foi feita por testes de acurácia, com cálculo de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo do Grupo Teste 1 frente ao Grupo Controle 1 (padrão ouro). Também foi realizada análise de concordância *Kappa* entre os dois grupos.

3.3.1.2 Isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica modificada de preparo das amostras

Nesta fase do estudo, foram utilizadas as 20 amostras selecionadas na etapa anterior e mais 380 amostras da rotina do Lacen-PR, num total de 400 amostras, sendo:

- 86 positivas (79 de quirópteros, 3 de bovinos, 4 de camundongos);
- 314 negativas (224 de caninos, 50 de quirópteros, 40 de felinos).

As amostras selecionadas foram divididas em duas alíquotas, sendo a primeira processada de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde (Grupo

Controle 2) e a segunda alíquota processada pelo preparo modificado (Grupo Teste 2) descrito no item 3.3.1.

Cada suspensão contendo a alíquota já preparada foi inoculada em linhagens de células Neuro-2a, conforme protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1996) com pequenas modificações:

- Em placa de cultura celular de 96 poços, foram diluídos 40 µL de suspensão em triplicata, em 160 µL de Meio Mínimo Essencial de Eagle (E-MEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino.
- Em cada poço foram adicionados 100 µL de suspensão de células Neuro-2a em concentração prévia de 5×10^5 células/mL.
- Cada placa foi incubada a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 96 horas.
- Após esse período, o meio foi removido e o material aderido ao fundo dos poços foi fixado com acetona 80% durante 15 minutos.
- Foi adicionado, então, o conjugado antirrábico tamponado e diluído, e cada placa foi incubada a 37°C durante uma hora.
- Depois, cada placa foi lavada por imersão três vezes em PBS (pH 7,3) e três vezes em água destilada.
- Foi adicionada, então, glicerina 10% aos poços e realizada leitura em microscópio invertido de fluorescência.
- A amostra foi considerada positiva na presença de uma ou mais células infectadas detectadas por fluorescência, e negativa caso não houvesse nenhuma célula infectada detectada por fluorescência (FIGURA 8).

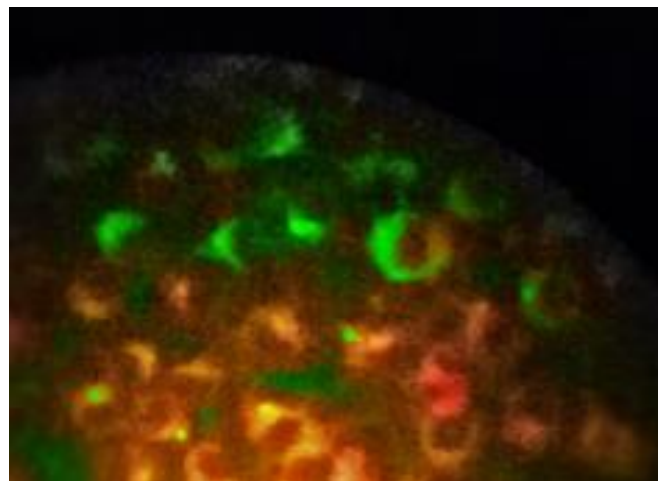


FIGURA 8 – AMOSTRA DE ENCÉFALO DE MORCEGO POSITIVA PARA RAIVA NO IVCC
FONTE: O autor (2015)

O grupo controle e o grupo teste foram comparados em relação a:

- Resultados das leituras em microscopia;
- Tempo decorrido entre o preparo das amostras até a obtenção da suspensão para inoculação;
- Riscos ocupacionais observados durante os processos;
- Custos de insumos.

Os valores dos insumos empregados foram fornecidos pelo Lacen-PR ou por meio de pesquisa de mercado, utilizando informações de cotações com empresas nacionais especializadas no comércio desses produtos. Os valores obtidos foram extrapolados proporcionalmente para o que seria consumido processando 3.200 amostras – a média anual do Lacen-PR numa série histórica de agosto de 2009 a agosto de 2015.

Não foram considerados os valores gastos com recursos humanos – número de pessoas necessárias, capacitações e treinamentos, horas trabalhadas, encargos sociais, etc. Não foram computados também os gastos com destinação dos resíduos sólidos de saúde.

Os custos com a técnica de IFD não foram considerados pois são os mesmos independentemente da técnica empregada.

O tempo decorrido no preparo das amostras foi determinado com o uso de cronômetro calibrado. Todas as alíquotas processadas foram preparadas pela mesma pessoa. A partir dos resultados individuais, foi obtida uma média por grupo e essas medidas de tendência central foram comparadas.

Os riscos inerentes ao processamento das amostras em cada grupo foram enumerados e classificados de acordo com diretrizes da Organização Mundial de Saúde e Ministério da Saúde (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010; WHO, 2014d).

A análise estatística foi feita por testes de acurácia, com cálculo de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo do Grupo Teste 2 frente ao Grupo Controle 2 (padrão ouro). Também foi realizada análise de concordância *Kappa* entre os dois grupos.

3.3.2 Substituição do isolamento viral em camundongos pelo isolamento viral em cultivo celular (IVCC)

A prova padrão ouro preconizada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008a) para o diagnóstico da raiva animal é a prova biológica, em que, para cada amostra suspeita, cerca de 6 a 8 camundongos sofrem inoculação intracerebral de suspensão contendo a amostra, e ficam em observação por 21 a 30 dias, em busca de sinais da doença. Os animais que desenvolverem sinais antes do término do período são criteriosamente avaliados e submetidos à eutanásia. Posteriormente, seus fragmentos de tecido de SNC são testados em IFD confirmatória. Os animais que não desenvolvem alterações até o fim do período de observação indicam que a respectiva amostra é negativa para raiva e são, então, submetidos à eutanásia.

Já o IVCC consiste na inoculação da suspensão de amostra em placas de cultivo celular contendo células Neuro-2a, incubação das placas por 96h, posterior preparo e leitura das placas em microscópio invertido de fluorescência, como descrito no item 3.3.1.2.

Neste segmento da pesquisa, a proposta foi de comparar as técnicas de isolamento viral em camundongos e isolamento viral em cultivo celular (FIGURA 9).



FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO DA SUBSTITUIÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGOS PELO ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR PARA O DIAGNÓSTICO DA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS

FONTE: O autor (2015)

Para as análises neste estudo, foram empregadas amostras de rotina sabidamente positivas ou negativas, e previamente processadas no Lacen-PR de acordo com a metodologia recomendada pelo Ministério da Saúde.

Nesta fase, foram feitas duas comparações:

1ª) Isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde; e

2ª) Isolamento viral em camundongos por técnica modificada de preparo das amostras vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica modificada de preparo das amostras.

3.3.2.1 Isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde

Nesta etapa do estudo, foram utilizadas as amostras da etapa anterior, sendo:

- 86 positivas (79 de quirópteros, 3 de bovinos, 4 de camundongos);
- 314 negativas (224 de caninos, 50 de quirópteros, 40 de felinos).

As amostras selecionadas foram preparadas de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde e a suspensão obtida foi fracionada em duas alíquotas: a primeira como parte da rotina de diagnóstico do Lacen-PR e foi utilizada para inoculação em camundongos (Grupo Controle 3) e a segunda foi destinada para inoculação em cultivo celular (Grupo Teste 3).

Foi comparado entre os grupos:

- Resultados obtidos em ambas as metodologias;
- Tempo decorrido desde a inoculação até a obtenção do resultado;
- Riscos ocupacionais observados durante os processos;
- Análise de bem-estar animal;
- Avaliação bioética das técnicas;
- Custos de insumos;
- Custos de equipamentos para implantação das técnicas.

Os valores dos equipamentos e insumos empregados foram fornecidos pelo Lacen-PR ou por meio de pesquisa de mercado, utilizando informações de cotações com empresas nacionais especializadas no comércio desses produtos. Os valores obtidos foram extrapolados proporcionalmente para o que seria consumido processando 3.200 amostras – a média anual do Lacen-PR numa série histórica de agosto de 2009 a agosto de 2015.

Não foram considerados os valores gastos com recursos humanos – número de pessoas necessárias, capacitações e treinamentos, horas trabalhadas, encargos sociais, etc. Não foram computados também os gastos com destinação dos resíduos sólidos de saúde.

Os custos com a técnica de IFD não foram considerados pois são os mesmos independentemente da técnica empregada.

O tempo decorrido entre a inoculação e obtenção dos resultados foi calculado em dias e horas, conforme registro em planilhas de inoculação. Todas as amostras foram processadas pela mesma pessoa.

Os riscos ocupacionais inerentes às técnicas aplicadas em cada grupo foram enumerados e classificados de acordo com diretrizes da Organização Mundial de Saúde e Ministério da Saúde (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010; WHO, 2014d).

A análise de bem-estar animal foi baseada no princípio das Cinco Liberdades, a saber: Liberdade Nutricional, Liberdade Sanitária, Liberdade Ambiental, Liberdade Comportamental e Liberdade Psicológica (BROOM; FRASER, 2010).

A avaliação bioética sobre as técnicas foi realizada considerando a legislação vigente e diretrizes nacionais e internacionais referentes ao uso de animais.

A análise estatística foi feita por testes de acurácia, com cálculo de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo do Grupo Teste 3 frente ao Grupo Controle 3 (padrão ouro). Também foi realizada análise de concordância *Kappa* entre os dois grupos.

3.3.2.2 Isolamento viral em camundongos por técnica modificada de preparo das amostras vs. Isolamento viral em cultivo celular por técnica modificada de preparo das amostras

Nesta etapa da pesquisa, foi realizada comparação entre o Grupo Teste 1 e um subconjunto do Grupo Teste 2 (o Grupo Teste 4), composto somente pelas 20 amostras utilizadas no Grupo Teste 1.

Em ambos os grupos, todas as 20 amostras foram preparadas pela técnica modificada de preparo de amostras e posteriormente fracionadas em duas alíquotas, sendo a primeira inoculada em camundongos (Grupo Teste 1) e a segunda alíquota inoculada em cultivo celular (Grupo Teste 4).

Foram comparados entre os grupos:

- Resultados obtidos em ambas as metodologias;
- Tempo decorrido desde a inoculação até a obtenção do resultado;
- Riscos ocupacionais observados durante os processos;
- Análise de bem-estar animal;
- Avaliação bioética das técnicas;
- Custos de insumos;
- Custos de equipamentos para implantação das técnicas.

Os valores dos equipamentos e insumos empregados foram fornecidos pelo Lacen-PR ou por meio de pesquisa de mercado, utilizando informações de cotações com empresas nacionais especializadas no comércio desses produtos. Os valores obtidos foram extrapolados proporcionalmente para o que seria consumido processando 3.200 amostras – a média anual do Lacen-PR numa série histórica de agosto de 2009 a agosto de 2015.

Não foram considerados os valores gastos com recursos humanos – número de pessoas necessárias, capacitações e treinamentos, horas trabalhadas, encargos sociais, etc. Não foram computados também os gastos com destinação dos resíduos sólidos de saúde.

Os custos com a técnica de IFD não foram considerados pois são os mesmos independentemente da técnica empregada.

O tempo decorrido entre a inoculação e obtenção dos resultados foi calculado em dias e horas, conforme registro em planilhas de inoculação. Todas as amostras foram processadas pela mesma pessoa.

Os riscos inerentes às técnicas aplicadas em cada grupo foram enumerados e classificados de acordo com diretrizes da Organização Mundial de Saúde e Ministério da Saúde (BRASIL, 2006; BRASIL, 2010; WHO, 2014d).

A análise de bem-estar animal foi baseada no princípio das Cinco Liberdades, a saber: Liberdade Nutricional, Liberdade Sanitária, Liberdade Ambiental, Liberdade Comportamental e Liberdade Psicológica (BROOM; FRASER, 2010).

A avaliação bioética sobre as técnicas foi realizada considerando a legislação vigente e diretrizes nacionais e internacionais referentes ao uso de animais.

A análise estatística foi feita pela análise de concordância *Kappa* entre o Grupo Teste 4 e o Grupo Teste 1.

3.4 PARCERIAS

As propostas apresentadas no presente projeto foram oriundas de demandas do Lacen-PR – laboratório de referência para diagnóstico da raiva na área de saúde pública no estado do Paraná. Neste sentido, foram almejadas inovações tecnológicas, avanços em biossegurança e respeito às práticas de bioética e bem-estar animal. Para tanto, o estudo contou com apoio financeiro e logístico do Lacen-PR no que se referiu ao fornecimento de amostras e insumos, uso de equipamentos e estrutura laboratorial, treinamentos realizados tanto no próprio local quanto no Instituto Pasteur de São Paulo, bem como ao fornecimento de informações sobre custos de insumos e equipamentos.

3.5 ASPECTOS ÉTICOS NA PESQUISA COM O USO DE ANIMAIS

Os camundongos utilizados nos grupos controle faziam parte da rotina de diagnóstico do Lacen-PR e seriam inoculados independentemente deste estudo.

Na etapa do estudo em que foram comparados o isolamento viral em camundongos por técnica de preparo das amostras preconizada pelo Ministério da Saúde com o isolamento viral em camundongos por técnica modificada de preparo das amostras, e na etapa em que foi comparado o isolamento viral em camundongos com o IVCC por técnica modificada foram utilizados animais além dos previstos na rotina do laboratório, sendo obrigatória a aprovação de uma comissão de ética no uso de animais em pesquisa para sua realização.

Foram processadas 20 amostras nessas fases do experimento. Para cada amostra, foram utilizados 6 camundongos, totalizando 120 animais.

O projeto passou por apreciação da Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sendo aprovado em 10 de fevereiro de 2015, sob certificado nº 862 (ANEXO 1).

3.6 VARIÁVEIS E COLETA DE DADOS

As amostras utilizadas no presente estudo eram provenientes de fragmentos de encéfalo de animais de diversas espécies do estado do Paraná, enviadas ao Lacen-PR como parte do Programa Nacional de Controle da Raiva/ MS.

À exceção dos camundongos – que foram utilizados para produção de vírus “fixo” e análise como controles – as demais espécies envolvidas no experimento (canina, felina, bovina e quiróptero) fazem parte da vigilância da raiva e, portanto, suas amostras foram coletadas pelas vigilâncias municipais, conforme os critérios do Programa Nacional de Controle da Raiva, e enviadas ao Lacen-PR.

Não foram obtidas informações fidedignas sobre idade, peso, sexo e histórico clínico dos animais envolvidos no estudo.

Pela natureza das amostras (fragmentos de encéfalo), considerou-se que todas as coletas foram realizadas *post mortem*, porém, não se pode afirmar com precisão se os animais foram encontrados mortos ou foram submetidos à eutanásia.

As amostras foram conservadas durante o transporte em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, mantendo-se refrigeradas até o momento do exame.

Não foram utilizadas amostras malconservadas ou autolisadas.

Em relação à prova biológica, os animais utilizados no estudo para a inoculação intracerebral eram todos camundongos da espécie *Mus musculus*, albino suíço, de 21 dias de idade, gênero masculino ou feminino, desmamados, com peso entre 11g e 14g, sem sinais de comorbidades, ou seja, livres de patógenos específicos e fornecidos pelo biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná/ Tecpar.

Foram excluídos da pesquisa os camundongos que apresentaram início de alterações clínicas entre 24h e 48h após a inoculação intracerebral, pois manifestações precoces de sinais neurológicos podem estar relacionadas a outros fatores, como trauma, imperícia na técnica de inoculação ou contaminação bacteriana (BOURHY; SUREAU; TORDO, 1990).

O mesmo profissional executou todas as técnicas analisadas em cada etapa do estudo.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados testes de acurácia e concordância *Kappa* segundo Medronho (2002).

Para os testes de acurácia, em cada etapa do estudo foi montada uma tabela 2x2, possibilitando os cálculos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo (FIGURA 10).

		TESTE PADRÃO OURO	
		Positivos	Negativos
TESTE NOVO	Positivos	A	C
	Negativos	B	D

FIGURA 10 – MODELO DE TABELA 2X2 PARA TESTES DE ACURÁCIA
FONTE: O autor (2015)

Utilizando essa tabela 2x2, a sensibilidade (S) é dada pela equação:

$$S = A / (A+B) \quad (2)$$

A especificidade (E) é:

$$E = D / (C+D) \quad (3)$$

O valor preditivo positivo (VPP) é:

$$VPP = A / (A+C) \quad (4)$$

O valor preditivo negativo (VPN) é:

$$VPN = D / (B+D) \quad (5)$$

A acurácia (Ac) do teste é:

$$Ac = (A+D) / (A+B+C+D) \quad (6)$$

Para a análise de concordância *Kappa* (*k*), foi utilizada a mesma tabela 2x2 da FIGURA 10. O índice *Kappa* foi calculado da seguinte forma:

$$k = (Po - Pe) / (1 - Pe) \quad (7)$$

Em que:

$$Po = (A+D) / (A+B+C+D) \quad (8)$$

$$Pe = [(A+C) (A+D)] + [(B+D) (C+D)] / (A+B+C+D)^2 \quad (9)$$

Foi calculado o índice *Kappa* para cada etapa do estudo e utilizada a escala de concordância de Landis e Koch, 1977 (FIGURA 11):

<i>Kappa</i>	Concordância
<0,00	Nenhuma
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1,00	Perfeita

FIGURA 11 – ESCALA DE CONCORDÂNCIA *KAPPA*
 FONTE: LANDIS e KOCH (1977) - Modificado pelo autor (2015)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor entendimento das análises, o estudo foi dividido didaticamente em duas macro-intervenções e respectivas subdivisões, conforme a FIGURA 12.

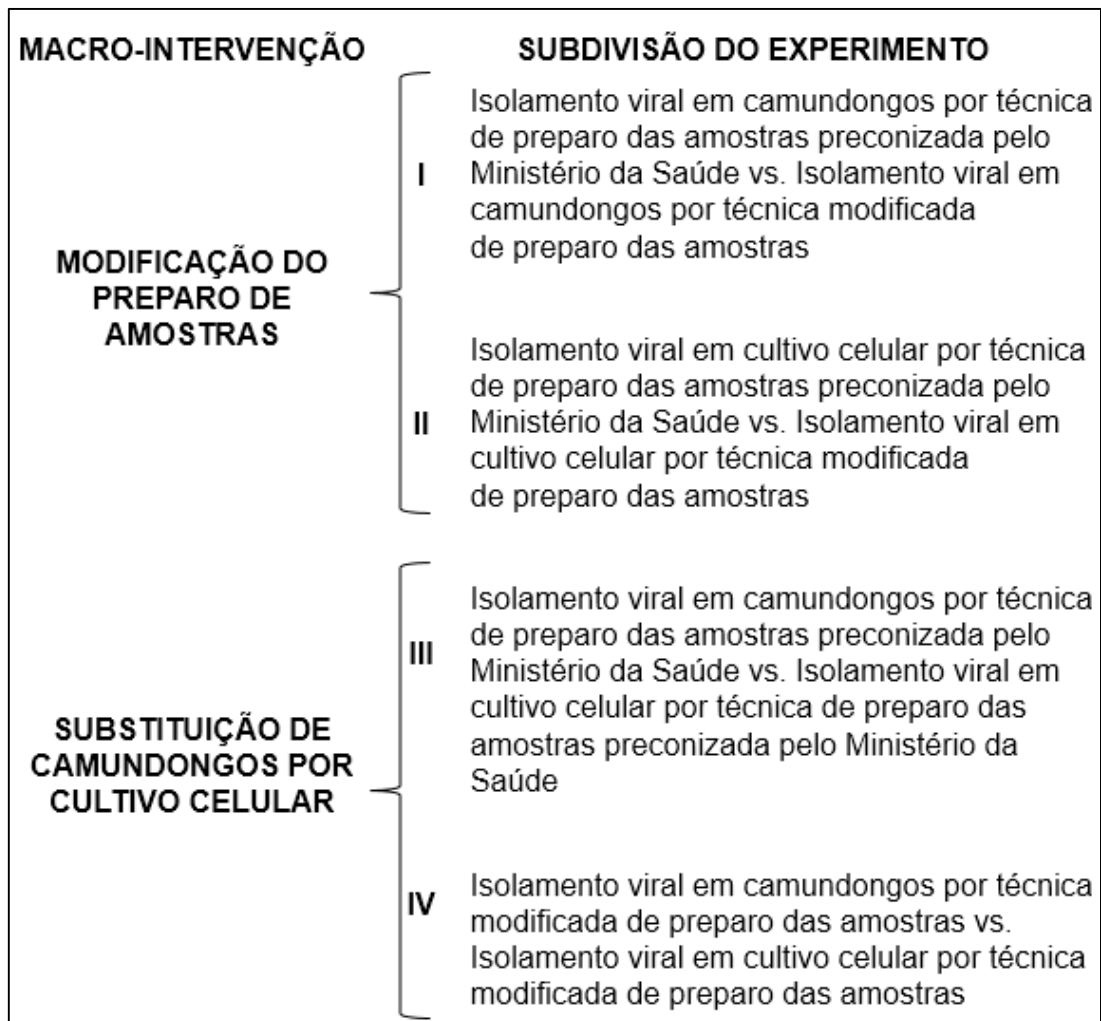


FIGURA 12 – MACRO-INTERVENÇÕES E SUBDIVISÕES DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS (PARANÁ)

FONTE: O autor (2015)

4.1 ANÁLISE DE RESULTADOS DA SUBDIVISÃO I

Nesta fase, foram utilizadas 20 amostras, cada uma fracionada em duas alíquotas, sendo a primeira processada na rotina do laboratório pela prova padrão

ouro, de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde (Grupo Controle 1) e a segunda alíquota processada pelo preparo modificado de amostras (Grupo Teste 1). Nos dois grupos, as amostras foram inoculadas em camundongos albinos suíços.

Ambos os grupos obtiveram os mesmos resultados para todas as amostras, resultando na tabela abaixo (TABELA 1):

TABELA 1 – RESULTADOS DO GRUPO TESTE 1 FRENTE AO GRUPO CONTROLE 1 DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ

		GRUPO CONTROLE 1	
		Positivos	Negativos
GRUPO TESTE 1	Positivos	15	0
	Negativos	0	5

FONTE: O autor (2015)

Com esses resultados, sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, e acurácia foram de 100%, indicando que a nova metodologia de preparo das amostras foi capaz de produzir os mesmos resultados que a recomendada pelo Ministério da Saúde para isolamento viral em camundongos, ou seja, não há diferença estatística entre as técnicas quanto à acurácia dos testes.

O índice de concordância *Kappa* ($K = 1,00$) foi perfeito, indicando que a nova metodologia é perfeitamente confiável e 100% concordante com a padrão ouro.

Foi também avaliado o tempo dispendido no preparo das amostras de cada grupo (GRÁFICO 1).

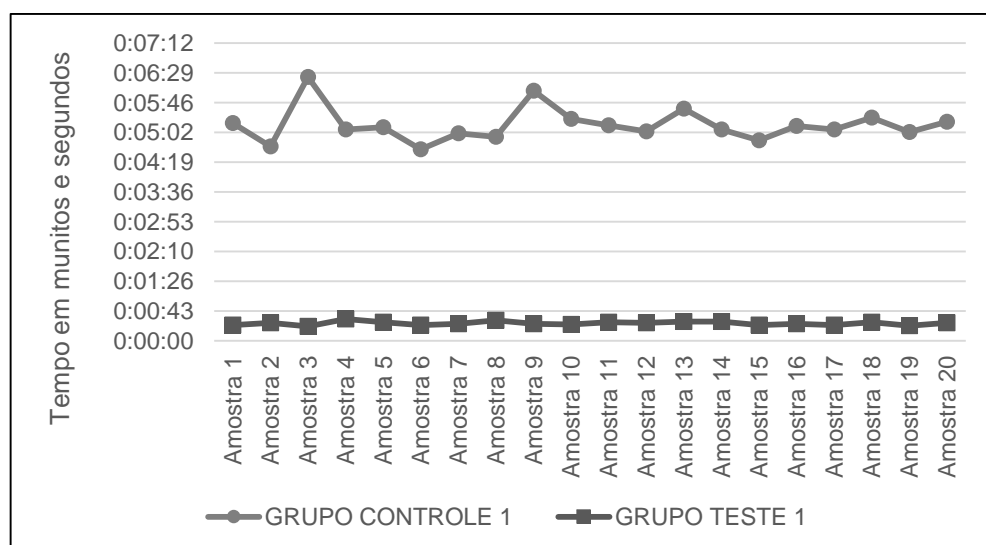


GRÁFICO 1 – TEMPO DE PREPARO DE AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS PARA DIAGNÓSTICO DA RAIVA, GRUPO CONTROLE 1 E GRUPO TESTE 1, ESTADO DO PARANÁ

FONTE: O autor (2015)

A média de tempo de preparo das amostras no Grupo Controle 1 foi de 05min14s, com tempo máximo de 06min23s e mínimo de 04min31s. Já no Grupo Teste 1, a média foi de 26s, com tempo máximo de 32s e mínimo de 21s. Em média, o tempo de preparo no Grupo Teste 1 foi 04min48s menor que no Grupo Controle 1. O tempo total dispendido para o preparo das 20 amostras no Grupo Controle 1 foi de 01h44min34s, no Grupo Teste 1 foi de 08min31s.

Considerando-se que, diariamente, o Lacen-PR processa em média 15 amostras para o diagnóstico da raiva, a nova metodologia reduziria o tempo de preparo do total de amostras em mais de uma hora por dia.

Em relação à biossegurança, um dos pontos críticos em laboratórios de virologia da raiva é a etapa de preparo das amostras que, mesmo realizada dentro de cabine de segurança biológica, oferece grandes riscos ao profissional envolvido pela formação de aerossóis que podem carrear altas cargas virais do RABV. No Grupo Teste 1, a amostra, assim que fracionada, foi imediatamente colocada em tubo tipo Falcon® e fechada com tampa de rosca. Todo o processo de homogeneização da amostra ocorreu no interior do tubo fechado, reduzindo drasticamente os riscos em termos de biossegurança.

Quanto aos custos, foram arrolados todos os insumos utilizados para o processamento de uma amostra e feita extrapolação para um total de 3.200 amostras – a média anual do Lacen-PR. Foram contabilizados os insumos utilizados para processamento de amostras do Grupo Controle 1 (TABELA 2) e os insumos utilizados para o Grupo Teste 1 (TABELA 3). Os equipamentos utilizados são os mesmos em ambos os grupos e, portanto, não foram cotados para a comparação de custos.

No Grupo Controle 1, o valor total dos insumos calculados para o processamento de 3.200 amostras ao ano foi de R\$ 272.319,90. O custo por amostra seria de R\$ 85,10. Já no Grupo Teste 1, o valor total seria de R\$ 252.876,22, custando R\$ 79,02 por amostra – uma redução de 8% nos custos por amostra.

Em síntese, os resultados sugerem que a modificação da técnica de preparo de amostras conforme o descrito nesta etapa poderia levar à redução do tempo de preparo de amostras (em média, redução de cerca de 5min por amostra e mais de uma hora por dia), à diminuição dos gastos com insumos (8% a menos) e à melhoria das condições de biossegurança por reduzir drasticamente, senão, anular os riscos biológicos de inalação de aerossóis carregados de partículas virais, tudo isso mantendo a mesma qualidade de desempenho e acurácia.

TABELA 2 – CUSTOS DE INSUMOS PARA REALIZAÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGOS PARA 3.200 AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS DO ESTADO DO PARANÁ, CONFORME PROTOCOLO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE

ITEM	DESCRIÇÃO	VALOR UNITÁRIO	QUANT.	VALOR TOTAL
Abaixador de língua	100 unidades	R\$ 3,30	67	R\$ 221,10
Acetona P.A.	1 L	R\$ 70,00	1	R\$ 70,00
Álcool líquido 70°	1 L	R\$ 4,49	208	R\$ 933,92
Algodão	500 g	R\$ 10,70	12	R\$ 128,40
Avental de tecido	unidade	R\$ 50,00	9	R\$ 450,00
Camundongo albino suíço	unidade	R\$ 8,00	26968	R\$ 215.744,00
Caneta de tinta indelével	unidade	R\$ 3,30	5	R\$ 16,50
Carga de cilindro de CO ₂ 25 kg	unidade	R\$ 160,00	2	R\$ 320,00
Cepilho de madeira	15 Kg	R\$ 30,00	450	R\$ 13.500,00
Crachá com presilha	100 unidades	R\$ 71,42	5	R\$ 357,10
Detergente neutro	5L	R\$ 21,20	10	R\$ 212,00
Fita para autoclave em rolo	unidade	R\$ 9,00	10	R\$ 90,00
Gaze	500 unidades	R\$ 25,60	36	R\$ 921,60
Glicerina	100 mL	R\$ 200,00	1	R\$ 200,00
Gorro descartável	100 unidades	R\$ 9,00	6	R\$ 54,00
Gral e pistilo plásticos	unidade	R\$ 4,61	3350	R\$ 15.443,50
Hipoclorito de sódio 10%	5 L	R\$ 17,50	10	R\$ 175,00
Lâmina para microscopia	50 unidades	R\$ 50,00	2	R\$ 100,00
Lamínula para microscopia	100 unidades	R\$ 6,00	1	R\$ 6,00
Luvas de procedimento não cirúrgico	100 unidades	R\$ 18,28	60	R\$ 1.096,80
Máscara descartável	100 unidades	R\$ 10,00	3	R\$ 30,00
Óculos de proteção	unidade	R\$ 3,00	6	R\$ 18,00
Papel toalha	1250 unidades	R\$ 21,30	24	R\$ 511,20
Pipeta sorológica 1 mL	50 unidades	R\$ 29,50	3	R\$ 88,50
Pipeta sorológica 5 mL	50 unidades	R\$ 39,00	2	R\$ 78,00
Placa de Petri descartável	10 unidades	R\$ 9,00	335	R\$ 3.015,00
Propé®	100 unidades	R\$ 20,00	12	R\$ 240,00
Ração para camundongos	20 Kg	R\$ 78,80	170	R\$ 13.396,00
Saco para autoclave 20 L	20 unidades	R\$ 29,17	6	R\$ 175,02
Saco para autoclave 60 L	20 unidades	R\$ 58,26	6	R\$ 349,56
Seringa agulhada 1 mL	100 unidades	R\$ 24,90	35	R\$ 871,50
Seringa de 5 mL	100 unidades	R\$ 24,90	35	R\$ 871,50
Solução salina	100 mL	R\$ 1,00	140	R\$ 140,00
Soro fetal bovino SFB	500 mL	R\$ 227,00	1	R\$ 227,00
Sulfato de gentamicina 40mg/mL	1 mL	R\$ 3,20	55	R\$ 176,00
Tampão PBS pH 7,5	20 L	R\$ 216,70	1	R\$ 216,70
Tubo tipo Falcon® 15 mL	50 unidades	R\$ 28,00	67	R\$ 1.876,00
CUSTO TOTAL DE INSUMOS:				R\$ 272.319,90

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Cotações realizadas em agosto de 2015 com empresas nacionais especialistas no comércio de insumos para laboratórios – sem concessão de permissão para divulgar a identificação das empresas

TABELA 3 – CUSTOS DE INSUMOS PARA REALIZAÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGOS PARA 3.200 AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS DO ESTADO DO PARANÁ, CONFORME PROTOCOLO MODIFICADO

ITEM	DESCRIÇÃO	VALOR UNITÁRIO	QUANT.	VALOR TOTAL
Abaixador de língua	100 unidades	R\$ 3,30	67	R\$ 221,10
Acetona P.A.	1 L	R\$ 70,00	1	R\$ 70,00
Álcool líquido 70°	1 L	R\$ 4,49	208	R\$ 933,92
Algodão	500 g	R\$ 10,70	12	R\$ 128,40
Avental de tecido	unidade	R\$ 50,00	9	R\$ 450,00
Camundongo albino suíço	unidade	R\$ 8,00	26968	R\$ 215.744,00
Caneta de tinta indelével	unidade	R\$ 3,30	5	R\$ 16,50
Carga de cilindro de CO ₂ 25 kg	unidade	R\$ 160,00	2	R\$ 320,00
Cepilho de madeira	15 Kg	R\$ 30,00	450	R\$ 13.500,00
Crachá com presilha	100 unidades	R\$ 71,42	5	R\$ 357,10
Detergente neutro	5L	R\$ 21,20	10	R\$ 212,00
Fita para autoclave em rolo	unidade	R\$ 9,00	6	R\$ 54,00
Gaze	500 unidades	R\$ 25,60	36	R\$ 921,60
Glicerina	100 mL	R\$ 200,00	1	R\$ 200,00
Gorro descartável	100 unidades	R\$ 9,00	6	R\$ 54,00
Hipoclorito de sódio 10%	5 L	R\$ 17,50	10	R\$ 175,00
Lâmina para microscopia	50 unidades	R\$ 50,00	2	R\$ 100,00
Lamínula para microscopia	100 unidades	R\$ 6,00	1	R\$ 6,00
Luvas de procedimento não cirúrgico	100 unidades	R\$ 18,28	60	R\$ 1.096,80
Máscara descartável	100 unidades	R\$ 10,00	3	R\$ 30,00
Óculos de proteção	unidade	R\$ 3,00	6	R\$ 18,00
Papel toalha	1250 unidades	R\$ 21,30	24	R\$ 511,20
Pipeta sorológica 1 mL	50 unidades	R\$ 29,50	3	R\$ 88,50
Pipeta sorológica 5 mL	50 unidades	R\$ 39,00	3	R\$ 117,00
Propé®	100 unidades	R\$ 20,00	12	R\$ 240,00
Ração para camundongos	20 Kg	R\$ 78,80	170	R\$ 13.396,00
Saco para autoclave 20 L	20 unidades	R\$ 29,17	2	R\$ 58,34
Saco para autoclave 60 L	20 unidades	R\$ 58,26	6	R\$ 349,56
Seringa agulhada 1 mL	100 unidades	R\$ 24,90	35	R\$ 871,50
Solução salina	100 mL	R\$ 1,00	140	R\$ 140,00
Soro fetal bovino SFB	500 mL	R\$ 227,00	1	R\$ 227,00
Sulfato de gentamicina 40mg/mL	1 mL	R\$ 3,20	55	R\$ 176,00
Tampão PBS pH 7,5	20 L	R\$ 216,70	1	R\$ 216,70
Tubo tipo Falcon® de 15 mL	50 unidades	R\$ 28,00	67	R\$ 1.876,00
CUSTO TOTAL DE INSUMOS:				R\$ 252.876,22

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Cotações realizadas em agosto de 2015 com empresas nacionais especialistas no comércio de insumos para laboratórios – sem concessão de permissão para divulgar a identificação das empresas

4.2 ANÁLISE DE RESULTADOS DA SUBDIVISÃO II

Neste segmento da pesquisa, foram analisadas 400 amostras, cada uma fracionada em duas alíquotas, sendo a primeira processada de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde (Grupo Controle 2) e a segunda alíquota processada pelo preparo modificado (Grupo Teste 2). Em ambos os grupos, as amostras foram inoculadas em cultivo de linhagens de células Neuro-2a.

Os resultados obtidos para realização dos cálculos de acurácia do Grupo Teste 2 estão demonstrados na TABELA 4:

TABELA 4 – RESULTADOS DO GRUPO TESTE 2 FRENTE AO GRUPO CONTROLE 2 DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ

		GRUPO CONTROLE 2	
		Positivos	Negativos
GRUPO TESTE 2	Positivos	86	0
	Negativos	0	314

FONTE: O autor (2015)

Novamente, os resultados revelam sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, e acurácia de 100%, o que sugere não haver diferenças estatísticas entre empregar a técnica do Ministério da Saúde ou a técnica modificada para preparo de amostras no isolamento viral em cultivo celular.

O índice *Kappa* também foi de 1,00, indicando uma concordância perfeita entre os dois grupos.

Quanto ao tempo dispendido no preparo das amostras, foram obtidas as curvas de dispersão dos dois grupos (GRÁFICO 2).

Os resultados foram muito semelhantes aos encontrados na etapa anterior, mesmo havendo uma diferença amostral de 20 para 400 amostras.

A média de tempo de preparo para cada amostra no Grupo Controle 2 foi de 05min12s, com tempo máximo de 06min26s e mínimo de 04min21s. Já no Grupo Teste 2, assim como na etapa anterior, a média foi de 26s, com tempo máximo de 34s e mínimo de 19s. Em média, o tempo de preparo no Grupo Teste 2 foi 04min46s menor que no Grupo Controle 2. O tempo total dispendido para o preparo das 400 amostras no Grupo Controle 2 foi de 34h40min34s, no Grupo Teste 2 foi de 02h55min46s.

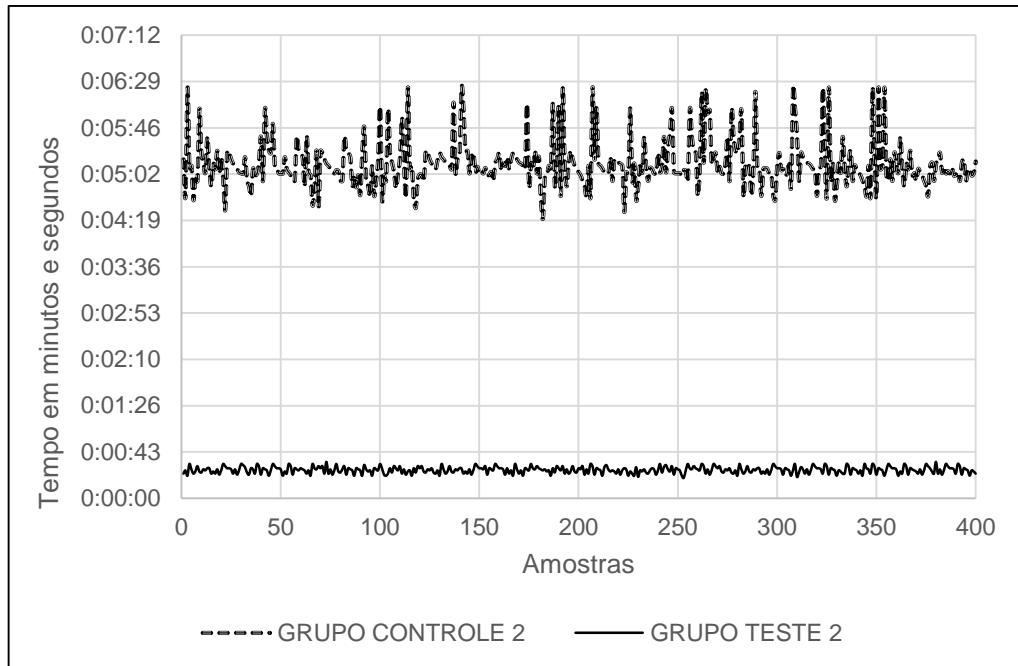


GRÁFICO 2 – TEMPO DE PREPARO DE AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS PARA DIAGNÓSTICO DA RAIVA, GRUPO CONTROLE 2 E GRUPO TESTE 2, ESTADO DO PARANÁ

FONTE: O autor (2015)

Em relação à biossegurança, foram constatados riscos no preparo de amostras do Grupo Controle 2 da mesma forma que no Grupo Controle 1, pois em ambos o preparo da amostra envolveu a trituração manual de fragmentos de tecido nervoso potencialmente contaminados em gral e pistilo, proporcionando a formação de aerossóis capazes de carrear altas cargas virais do RABV. No Grupo Teste 2, bem como no Grupo Teste 1, a amostra, assim que fracionada, foi imediatamente colocada em tubo tipo Falcon® e fechada com tampa de rosca. Todo o processo de homogeneização da amostra ocorreu no interior do tubo fechado, reduzindo drasticamente os riscos em termos de biossegurança.

Quanto aos custos envolvidos nas duas técnicas, foram arrolados todos os insumos utilizados para o processamento de uma amostra e feita extrapolação para um total de 3.200 amostras – a média anual do Lacen-PR. Foram contabilizados os insumos utilizados para processamento de amostras do Grupo Controle 2 (TABELA 5) e os insumos utilizados para o Grupo Teste 2 (TABELA 6). Os equipamentos utilizados são os mesmos em ambos os grupos e, portanto, não foram cotados para a comparação de custos.

No Grupo Controle 2, o valor total dos insumos calculados para o processamento de 3.200 amostras ao ano foi de R\$ 36.833,95. O custo por amostra

seria de R\$ 11,51. Já no Grupo Teste 2, o valor total seria de R\$ 17.349,93, custando R\$ 5,42 por amostra. Ou seja, o custo para o processamento de amostras no Grupo Teste 2 foi cerca de 53% menor do que no Grupo Controle 2.

TABELA 5 – CUSTOS DE INSUMOS PARA REALIZAÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR PARA 3.200 AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS DO ESTADO DO PARANÁ, CONFORME PROTOCOLO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE

ITEM	DESCRIÇÃO	VALOR UNITÁRIO	QUANT.	VALOR TOTAL
Abaixadores de língua	100 unidades	R\$ 3,30	67	R\$ 221,10
Acetona P.A.	1 L	R\$ 70,00	2	R\$ 140,00
Álcool líquido 70º	1 L	R\$ 4,49	52	R\$ 233,48
Aminoácidos não essenciais	100 mL	R\$ 70,00	1	R\$ 70,00
Avental de tecido	unidade	R\$ 50,00	3	R\$ 150,00
Azul de Evans	10 g	R\$ 250,26	1	R\$ 250,26
Bicarbonato de sódio	1 Kg	R\$ 137,00	1	R\$ 137,00
Câmara de Neubauer	unidade	R\$ 66,41	1	R\$ 66,41
Canaleta plástica	10 unidades	R\$ 11,00	10	R\$ 110,00
Caneta de tinta indelével	unidade	R\$ 3,30	5	R\$ 16,50
Carga de cilindro de CO ₂ 25 kg	unidade	R\$ 160,00	4	R\$ 640,00
DMSO (crioconservante)	50 mL	R\$ 18,50	1	R\$ 18,50
Fita para autoclave em rolo	unidade	R\$ 9,00	6	R\$ 54,00
Garrafa para cultura celular 25 cm ²	10 unidades	R\$ 26,68	43	R\$ 1.147,24
Gaze	500 unidades	R\$ 25,60	20	R\$ 512,00
Glicerina	100 mL	R\$ 200,00	1	R\$ 200,00
Gorro descartável	100 unidades	R\$ 9,00	3	R\$ 27,00
Gral e pistilo plásticos	unidade	R\$ 4,61	3350	R\$ 15.443,50
Hipoclorito de sódio 2,5%	1 L	R\$ 5,50	52	R\$ 286,00
Lamínula para câmara de Neubauer	10 unidades	R\$ 12,50	4	R\$ 50,00
Luvas de procedimento não cirúrgico	100 unidades	R\$ 18,28	20	R\$ 365,60
Meio de cultura E-MEM	1 L	R\$ 8,90	20	R\$ 178,00
Microtubo criogênico 2 mL	50 unidades	R\$ 79,50	1	R\$ 79,50
Papel alumínio em rolo	unidade	R\$ 3,00	6	R\$ 18,00
Papel toalha	1250 unidades	R\$ 21,30	12	R\$ 255,60
Pipeta de Pasteur de 3 mL	100 unidades	R\$ 15,00	1	R\$ 15,00
Pipeta sorológica de 1 mL	50 unidades	R\$ 29,50	4	R\$ 118,00
Pipeta sorológica de 5 mL	50 unidades	R\$ 39,00	32	R\$ 1.248,00
Pipeta sorológica de 10 mL	100 unidades	R\$ 82,00	9	R\$ 738,00
Pipeta sorológica de 25 mL	100 unidades	R\$ 169,00	10	R\$ 1.690,00
Placa de petri descartável	10 unidades	R\$ 9,00	335	R\$ 3.015,00
Placa para cultura celular c/ 96 poços	unidade	R\$ 5,40	133	R\$ 718,20
Ponteira universal 2-200 µL	1000 unidades	R\$ 12,42	40	R\$ 496,80
Propé®	100 unidades	R\$ 20,00	6	R\$ 120,00

Continua

TABELA 5 – CUSTOS DE INSUMOS PARA REALIZAÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR PARA 3.200 AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS DO ESTADO DO PARANÁ, CONFORME PROTOCOLO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE
conclusão

ITEM	DESCRIÇÃO	VALOR UNITÁRIO	QUANT.	VALOR TOTAL
Saco para autoclave 20 L	20 unidades	R\$ 29,17	8	R\$ 233,36
Seringa de 5 mL	100 unidades	R\$ 24,90	35	R\$ 871,50
Sistema de membrana filtrante a vácuo	12 unidades	R\$ 457,00	5	R\$ 2.285,00
Solução salina	100 mL	R\$ 1,00	500	R\$ 500,00
Soro fetal bovino SFB	500 mL	R\$ 227,00	5	R\$ 1.135,00
Sulfato de gentamicina 40 mg/mL	1 mL	R\$ 3,20	55	R\$ 176,00
Tampão PBS pH 7,3	20 L	R\$ 216,70	2	R\$ 433,40
Tripsina 0,25% EDTA	500 mL	R\$ 165,00	3	R\$ 495,00
Tubo tipo Falcon® de 15 mL	50 U	R\$ 28,00	67	R\$ 1.876,00
CUSTO TOTAL DE INSUMOS:				R\$ 36.833,95

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Cotações realizadas em agosto de 2015 com empresas nacionais especialistas no comércio de insumos para laboratórios – sem concessão de permissão para divulgar a identificação das empresas

TABELA 6 - CUSTOS DE INSUMOS PARA REALIZAÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR PARA 3.200 AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS DO ESTADO DO PARANÁ, CONFORME PROTOCOLO MODIFICADO

ITEM	DESCRIÇÃO	VALOR UNITÁRIO	QUANT.	VALOR TOTAL
Abaixadores de língua	100 unidades	R\$ 3,30	67	R\$ 221,10
Acetona P.A.	1 L	R\$ 70,00	2	R\$ 140,00
Álcool líquido 70°	1 L	R\$ 4,49	52	R\$ 233,48
Aminoácidos não essenciais	100 mL	R\$ 70,00	1	R\$ 70,00
Avental de tecido	unidade	R\$ 50,00	3	R\$ 150,00
Azul de Evans	10 g	R\$ 250,26	1	R\$ 250,26
Bicarbonato de sódio	1 Kg	R\$ 137,00	1	R\$ 137,00
Câmara de Neubauer	unidade	R\$ 66,41	1	R\$ 66,41
Canaleta plástica	10 unidades	R\$ 11,00	10	R\$ 110,00
Caneta de tinta indelével	unidade	R\$ 3,30	5	R\$ 16,50
Carga de cilindro de CO ₂ 25 kg	unidade	R\$ 160,00	4	R\$ 640,00
DMSO (crioconservante)	50 mL	R\$ 18,50	1	R\$ 18,50
Fita para autoclave em rolo	unidade	R\$ 9,00	4	R\$ 36,00
Garrafa para cultura celular 25 cm ²	10 unidades	R\$ 26,68	43	R\$ 1.147,24
Gaze	500 unidades	R\$ 25,60	20	R\$ 512,00
Glicerina	100 mL	R\$ 200,00	1	R\$ 200,00
Gorro descartável	100 unidades	R\$ 9,00	3	R\$ 27,00
Hipoclorito de sódio 2,5%	1 L	R\$ 5,50	52	R\$ 286,00
Lamínula para câmara de Neubauer	10 unidades	R\$ 12,50	4	R\$ 50,00
Luvas de procedimento não cirúrgico	100 unidades	R\$ 18,28	20	R\$ 365,60

Continua

TABELA 6 - CUSTOS DE INSUMOS PARA REALIZAÇÃO DO ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR PARA 3.200 AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS DO ESTADO DO PARANÁ, CONFORME PROTOCOLO MODIFICADO

				conclusão
ITEM	DESCRIÇÃO	VALOR UNITÁRIO	QUANT.	VALOR TOTAL
Meio de cultura E-MEM	1 L	R\$ 8,90	20	R\$ 178,00
Microtubo criogênico 2 mL	50 unidades	R\$ 79,50	1	R\$ 79,50
Papel alumínio em rolo	unidade	R\$ 3,00	6	R\$ 18,00
Papel toalha	1250 unidades	R\$ 21,30	12	R\$ 255,60
Pipeta de Pasteur de 3 mL	100 unidades	R\$ 15,00	1	R\$ 15,00
Pipeta sorológica de 1 mL	50 unidades	R\$ 29,50	4	R\$ 118,00
Pipeta sorológica de 5 mL	50 unidades	R\$ 39,00	33	R\$ 1.287,00
Pipeta sorológica de 10 mL	100 unidades	R\$ 82,00	9	R\$ 738,00
Pipeta sorológica de 25 mL	100 unidades	R\$ 169,00	10	R\$ 1.690,00
Placa para cultura celular c/ 96 poços	unidade	R\$ 5,40	133	R\$ 718,20
Ponteira universal 2-200 µL	1000 unidades	R\$ 12,42	40	R\$ 496,80
Propé®	100 unidades	R\$ 20,00	6	R\$ 120,00
Saco para autoclave 20 L	20 unidades	R\$ 29,17	2	R\$ 58,34
Sistema de membrana filtrante a vácuo	12 unidades	R\$ 457,00	5	R\$ 2.285,00
Solução salina	100 mL	R\$ 1,00	500	R\$ 500,00
Soro fetal bovino SFB	500 mL	R\$ 227,00	5	R\$ 1.135,00
Sulfato de gentamicina 40 mg/mL	1 mL	R\$ 3,20	55	R\$ 176,00
Tampão PBS pH 7,3	20 L	R\$ 216,70	2	R\$ 433,40
Tripsina 0,25% EDTA	500 mL	R\$ 165,00	3	R\$ 495,00
Tubo tipo Falcon®	50 unidades	R\$ 28,00	67	R\$ 1.876,00
CUSTO TOTAL DE INSUMOS:				R\$ 17.349,93

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Cotações realizadas em agosto de 2015 com empresas nacionais especialistas no comércio de insumos para laboratórios – sem concessão de permissão para divulgar a identificação das empresas

Os resultados desta fase do estudo indicam que a modificação da técnica de preparo de amostras para o isolamento viral em cultivo celular poderia levar à redução do tempo de preparo de amostras (quase 5min por amostra em média) quando comparada com o isolamento viral em cultivo celular realizado pela técnica de preparo de amostras preconizada pelo Ministério da Saúde, mantendo a mesma qualidade de desempenho e acurácia.

Observou-se, também, potencial de diminuição dos gastos com insumos (cerca de 53% a menos no Grupo Teste 2 em relação ao Grupo Controle 2).

Ainda, o emprego da técnica modificada de preparo de amostras para isolamento viral em cultivo celular pode resultar em melhorias em termos de biossegurança por reduzir drasticamente, senão, anular os riscos biológicos de inalação de aerossóis carregados de partículas virais.

4.3 ANÁLISE DE RESULTADOS DA SUBDIVISÃO III

Neste segmento da pesquisa, foram analisadas 400 amostras, todas preparadas conforme preconizado pelo Ministério da Saúde e posteriormente fracionadas em duas alíquotas – a primeira foi inoculada em camundongos na rotina do laboratório, considerada a prova padrão ouro (Grupo Controle 3), e a segunda alíquota inoculada em cultivo de linhagens de células Neuro-2a (Grupo Teste 3).

Os resultados obtidos para realização dos cálculos de acurácia do Grupo Teste 3 frente ao padrão ouro estão demonstrados na TABELA 7:

TABELA 7 – RESULTADOS DO GRUPO TESTE 3 FRENTE AO GRUPO CONTROLE 3 DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ

		GRUPO CONTROLE 3	
		Positivos	Negativos
GRUPO TESTE 3	Positivos	86	1
	Negativos	0	313

FONTE: O autor (2015)

Neste caso, a sensibilidade no Grupo Teste 3 foi de 100%. A especificidade foi de 99,7%. O valor preditivo positivo foi de 98,9%. O valor preditivo negativo foi de 100%. A acurácia no Grupo Teste 3 frente ao Grupo Controle 3 foi de 99,8%.

Os indicadores de desempenho no Grupo Teste 3 revelaram que a técnica de isolamento viral em cultivo celular para o diagnóstico da raiva pode ser tão acurada quanto o isolamento viral pela inoculação em camundongos.

O índice *Kappa* foi de 0,985 – muito próximo a 1,00, que seria a concordância perfeita. Isso indica que ambos os testes têm uma concordância ótima e que o isolamento viral em cultivo celular é uma prova tão confiável quanto a prova padrão ouro.

Uma amostra originária de morcego, e que foi negativa na prova biológica por inoculação em camundongo, apresentou-se positiva no isolamento viral em cultivo celular (FIGURA 13). Essa amostra foi inoculada repetidas vezes em cultivo celular e foi positiva em todas as leituras. Repetiu-se, também, a IFD, que se manteve negativa. Foi sugerido, então, o envio dessa amostra ao laboratório de referência nacional – Instituto Pasteur de São Paulo – para estudos de biologia molecular, visando confirmar ou descartar a amostra como positiva.

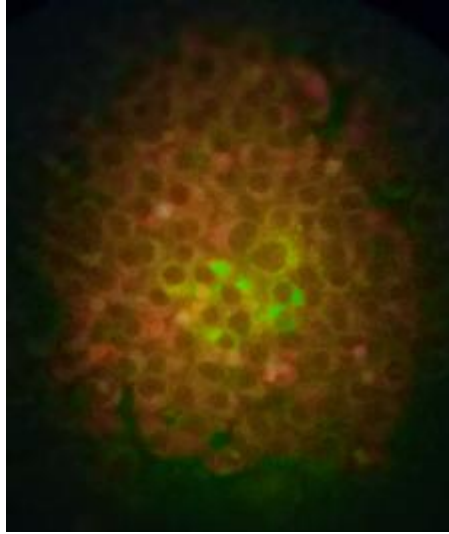


FIGURA 13 – AMOSTRA DE ENCÉFALO DE MORCEGO POSITIVA PARA RAIVA NO ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR E NEGATIVA NO ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGOS, DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ
 FONTE: O autor (2015)

A princípio, essa amostra foi considerada um falso positivo, o que refletiu na pequena diminuição da especificidade, valor preditivo positivo, acurácia e concordância *Kappa* do Grupo Teste 3 frente ao Grupo Controle 3.

Em relação ao tempo decorrido entre a inoculação e a obtenção de resultados nos dois grupos, todas as amostras do Grupo Teste 3 levaram 96h para estarem prontas para leitura.

No Grupo Controle 3, todas as amostras negativas (314 amostras) levaram 30 dias desde a inoculação até a confirmação do diagnóstico, pois os animais não adoeceram durante o período de observação, que é de no máximo 30 dias, e foram submetidos à eutanásia ao final do período observação. Já as amostras positivas (86 amostras) apresentaram períodos diferentes até que os animais exibissem sinais clínicos e fossem submetidos à eutanásia para realização de IFD confirmatória, com média de 13 dias, máximo de 20 dias e mínimo de 7 dias.

O período médio entre a inoculação e a obtenção de resultados em todo o Grupo Controle 3 foi de 26 dias, contra 96 horas (4 dias) no Grupo Teste 3, ou seja, no Grupo Teste 3 o período médio foi de 22 dias a menos que no Grupo Controle 3.

Acerca dos riscos observados, um risco comum aos dois grupos é aquele já citado, inerente ao preparo de amostras da forma como é recomendada pelo Ministério da Saúde: risco biológico.

No Grupo Controle 3, ainda foi possível identificar outros riscos:

- Para a inoculação em camundongos, faz-se necessário retirar a suspensão já preparada de dentro dos tubos de Falcon® com seringa de 1 mL agulhada. Neste momento, existe a possibilidade de inoculação acidental do técnico com a amostra suspeita, representando riscos biológico e de acidentes.
- No momento da inoculação intracerebral, o técnico faz a contenção do camundongo com uma das mãos e com a outra introduz a agulha no crânio do animal, inoculando a suspensão contendo a amostra suspeita. O Ministério da Saúde não preconiza que os camundongos recebam analgésicos ou anestésicos antes do procedimento (BRASIL, 2008a) e eles, portanto, tentam fugir da contenção. O animal pode conseguir morder o técnico, bem como o técnico pode acidentalmente se inocular pelo movimento brusco, representando risco biológico e de acidentes.
- Durante as trocas das camas dos camundongos inoculados, os animais são removidos da gaiola suja para uma gaiola limpa. Neste momento, podem ocorrer agressões por mordedura, representando risco biológico e de acidentes.
- Ainda durante as trocas das camas, pode haver formação de névoas de gases pela amônia contida no cepilho impregnado por urina, representando risco químico. O próprio cepilho novo, ao ser colocado nas gaiolas limpas, provoca suspensão de partículas de serragem irritantes quando inaladas, constituindo risco físico.
- Dentro do infectório, uma grande quantidade de animais inoculados e, portanto, potenciais transmissores da raiva, pode levar à formação de aerossóis contendo grande carga viral tal qual em ambientes de cavernas, representando risco biológico. Ainda, os exaustores produzem ruídos altos e constantes, constituindo risco físico.
- No momento da eutanásia, em que se deve colocar os camundongos dentro de câmara de CO₂, há risco de acidentes ao manipular os animais quando da sua remoção para a câmara. Ainda, o cilindro de CO₂ utilizado na eutanásia representa risco de explosão.

- Tanto a inoculação como o procedimento de eutanásia são fatores psicológicos extremamente estressantes para o técnico envolvido, riscos estes que podem afetar tanto a saúde física quanto a mental do trabalhador.

No Grupo Teste 3, foram observados os seguintes riscos:

- No momento da inoculação em cultivo celular, pode haver formação de aerossóis quando da manipulação das suspensões contendo amostras. O risco é bastante reduzido, já que todo o processo é realizado dentro de cabine de segurança biológica, porém, ainda representa risco biológico.
- A fixação das amostras nas placas, previamente à leitura em microscópio, é feita com acetona. O procedimento ocorre dentro de capela de segurança química, porém, ainda representa risco químico.

Vários dos riscos observados no isolamento viral em camundongos são, portanto, inerentes à própria técnica, podendo ser anulados apenas com a mudança de metodologia de diagnóstico. Já os riscos observados no isolamento viral em cultivo celular podem facilmente ser prevenidos pelo uso correto dos equipamentos de proteção e de contenção primária e secundária.

O diagnóstico de bem-estar animal nesta fase, feito de acordo com As Cinco Liberdades (FAWC, 2015), foi realizado pela observação acerca do provimento de cada uma das cinco liberdades. Cada liberdade foi classificada ou como RESTRITA, caso não estivesse sendo provida, MODERADAMENTE RESTRITA, caso estivesse sendo moderadamente provida, ou RESPEITADA, caso fosse plenamente provida. Somente o Grupo Controle 3 foi avaliado (QUADRO 5), pois no Grupo Teste 3 não houve uso de animais.

Foi observado que os camundongos recebiam alimentação e água *ad libitum*, com bebedouros limpos e ração e água trocados duas vezes por semana. Essas são condições excelentes de bem-estar animal no que se refere à liberdade nutricional. Essa liberdade, contudo, foi a única classificada como respeitada, uma vez que as outras quatro não foram sequer moderadamente respeitadas.

A maior parte das restrições às Liberdades, neste caso, é inerente à técnica de isolamento viral pela inoculação intracerebral em camundongos e somente poderia ser evitada pela mudança de metodologia para o diagnóstico da raiva no Lacen-PR.

LIBERDADES	OBSERVAÇÕES	DIAGNÓSTICO
Liberdade Nutricional	<ul style="list-style-type: none"> - Fornecimento de ração e água <i>ad libitum</i>; - Ração específica para camundongos; - Limpeza e reabastecimento dos bebedouros, e troca da ração duas vezes por semana. 	RESPEITADA
Liberdade Sanitária	<ul style="list-style-type: none"> - Animais livres de patógenos específicos; - Porém, todos animais são inoculados com amostras suspeitas de raiva; - Presença diária de médico veterinário, porém, frente a alterações clínicas, somente realiza eutanásia. 	RESTRITA
Liberdade Ambiental	<ul style="list-style-type: none"> - Gaiolas de 30x20x13cm com 6 animais, durante toda a vida do camundongo; - Iluminação artificial não respeita o período de 12h acesa e 12h apagada; - Grandes variações de temperatura e umidade; - Ruído contínuo dos exaustores, todos os dias, durante toda a vida dos animais. 	RESTRITA
Liberdade Comportamental	<ul style="list-style-type: none"> - Ambiente artificial e altamente restrito durante toda a vida do animal; - Convívio social pobre; - Não há estruturas para esconderijo e proteção contra ameaças externas nas gaiolas; - Não há espaço suficiente dentro das gaiolas para separação das áreas de repouso, auto higiene, excretas e alimentação; - Não há ambiente para ser explorado, nem para busca de alimentos. 	RESTRITA
Liberdade Psicológica	<ul style="list-style-type: none"> - Animais perturbados pela presença de humanos, sem possibilidade de fuga ou esconderijo; - Sinais de desconforto psicológico, como andar em círculos, canibalismo, brigas. 	RESTRITA

QUADRO 5 – DIAGNÓSTICO DE BEM-ESTAR ANIMAL CONFORME AS CINCO LIBERDADES, GRUPO CONTROLE 3 DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ

FONTE: O autor (2015)

Um dos princípios da bioética é de substituir, sempre que possível, o uso de animais em experimentação, seja por modelos artificiais, simulações de computador, tecidos e cultivos celulares ou outros. A premissa disso não é apenas o bem-estar animal, mas também a evolução tecnológica, que nos levaria a resultados mais confiáveis e menos sensíveis a interferências indesejadas.

Após as comparações entre Grupo Controle 3 e Grupo Teste 3, ficou evidente ser possível a substituição da técnica de isolamento viral em camundongos pelo isolamento em cultivo celular, pois esta apresentou ótima concordância com o padrão ouro, resultados em menor tempo e, principalmente, não fez o uso desnecessário de animais.

Considerando-se que, no Lacen-PR, são analisadas anualmente 3.200 amostras para raiva em média e que, para cada amostra, são inoculados de 6 a 8 camundongos, são utilizados cerca de 22.400 camundongos por ano. Existem laboratórios centrais em todos os estados do Brasil e apenas o Instituto Pasteur de São Paulo utiliza a metodologia de IVCC na rotina de diagnósticos da raiva em saúde pública, o que levanta questões, especialmente, sobre os custos desta técnica pois, se o IVCC tem o mesmo desempenho e acurácia que o isolamento em camundongos, por que não é amplamente empregada no país?

Para tentar responder essa pergunta, nesta etapa da pesquisa foi realizado estudo comparativo dos custos envolvidos nas duas técnicas. Foram arrolados todos os insumos utilizados para o processamento de uma amostra e feita extrapolação para um total de 3.200 amostras – a média anual do Lacen-PR. Também foram listados e cotados todos os equipamentos utilizados em cada técnica, para uma avaliação aproximada dos custos para implantação de cada uma.

O custo de insumos utilizados no isolamento viral em camundongos pela técnica de preparo de amostras preconizada pelo Ministério da Saúde está demonstrado na TABELA 2, com total de R\$ 272.319,90 para 3.200 amostras, ou R\$85,10 por amostra.

O custo de insumos utilizados no isolamento viral em cultivo celular pela técnica de preparo de amostras preconizada pelo Ministério da Saúde está demonstrado na TABELA 5, com total de R\$ 36.833,95 para 3.200 amostras, ou R\$11,51 por amostra.

Apenas comparando os custos com insumos, concluiu-se que os gastos no isolamento viral em cultivo celular representaram somente 13,52% dos gastos com a inoculação viral em camundongos – uma economia de 86,48%.

Os custos de equipamentos para implantação da técnica de isolamento viral em camundongos são demonstrados na TABELA 8 e os custos de equipamentos para implantação da técnica de isolamento viral em cultivo celular são demonstrados na TABELA 9.

TABELA 8 – CUSTOS DE EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS PARA IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE ISOLAMENTO VIRAL EM CAMUNDONGOS

ITEM	VALOR UNITÁRIO	QUANT.	VALOR TOTAL
Agitador de vórtex	R\$ 399,00	1	R\$ 399,00
Almotolia de 250 mL	R\$ 3,45	8	R\$ 27,60
Autoclave 303 L (p/ gaiolas e bebedouros)	R\$ 57.212,00	1	R\$ 57.212,00
Autoclave 75 L (p/ cepilho e carcaças)	R\$ 7.752,00	1	R\$ 7.752,00
Balança semi-analítica	R\$ 2.932,00	1	R\$ 2.932,00
Bancada de aço inox com pia	R\$ 2.350,00	2	R\$ 4.700,00
Banqueta para laboratório	R\$ 190,00	2	R\$ 380,00
Becker graduado de 1000 mL	R\$ 21,00	2	R\$ 42,00
Cabo de bisturi	R\$ 8,98	2	R\$ 17,96
Cabine de segurança biológica	R\$ 48.560,00	1	R\$ 48.560,00
Cabine para raspagem de gaiolas e troca de camundongos	R\$ 32.000,00	1	R\$ 32.000,00
Calculadora	R\$ 5,00	1	R\$ 5,00
Câmara científica 2°C a 8°C	R\$ 23.600,00	2	R\$ 47.200,00
Câmara científica -30°C +10°C	R\$ 22.247,00	2	R\$ 44.494,00
Câmara científica -80 °C	R\$ 23.800,00	1	R\$ 23.800,00
Câmara de CO ₂ para eutanásia + conexões	R\$ 855,00	1	R\$ 855,00
Carrinho de aço	R\$ 230,00	1	R\$ 230,00
Centrífuga refrigerada	R\$ 3.990,00	1	R\$ 3.990,00
Despertador de bancada	R\$ 7,00	1	R\$ 7,00
Escova para limpeza das gaiolas	R\$ 8,55	4	R\$ 34,20
Escova espiral para lavagem de bebedouros	R\$ 6,90	2	R\$ 13,80
Espátula para raspagem de gaiolas	R\$ 11,00	2	R\$ 22,00
Estante para gaiolas (50 gaiolas/estante)	R\$ 2.682,00	7	R\$ 18.774,00
Estante para tubos	R\$ 12,00	10	R\$ 120,00
Estufa bacteriológica de 27 L	R\$ 1.654,00	1	R\$ 1.654,00
Estufa de 85 L para esterilização e secagem	R\$ 2.060,99	1	R\$ 2.060,99
Exaustor (quarentena e infectório)	R\$ 592,00	4	R\$ 2.368,00
Gaiolas completas com grade e bebedouro	R\$ 82,25	600	R\$ 49.350,00
Micropipetador monocanal 20-200 µL	R\$ 490,00	1	R\$ 490,00
Microscópio de fluorescência	R\$ 19.984,00	1	R\$ 19.984,00
Pálete para ração e cepilho	R\$ 73,00	4	R\$ 292,00
Pinça anatômica	R\$ 11,74	2	R\$ 23,48
Pinça dente de rato	R\$ 16,33	2	R\$ 32,66
Pipetador automático	R\$ 769,00	1	R\$ 769,00
Proveta graduada 100 mL	R\$ 7,50	1	R\$ 7,50
Recipiente para armazenamento de ração	R\$ 75,00	1	R\$ 75,00
Sistema de climatização (quarentena e infectório)	R\$ 17.934,00	2	R\$ 35.868,00
Termo-higrômetro digital (quarentena e infectório)	R\$ 68,50	2	R\$ 137,00
Termômetro digital	R\$ 44,00	8	R\$ 352,00
Tesoura cirúrgica	R\$ 14,00	2	R\$ 28,00
Ultrapurificador de água	R\$ 13.220,00	1	R\$ 13.220,00
CUSTO TOTAL DE EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS:			R\$ 420.279,19

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Cotações realizadas em outubro de 2015 com empresas nacionais especialistas no comércio de equipamentos para laboratórios – sem concessão de permissão para divulgar a identificação das empresas

TABELA 9 – CUSTOS DE EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS PARA IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA DE ISOLAMENTO VIRAL EM CULTIVO CELULAR

ITEM	VALOR UNITÁRIO	QUANT.	VALOR TOTAL
Agitador de vórtex	R\$ 399,00	1	R\$ 399,00
Almotolia de 250 mL	R\$ 3,45	2	R\$ 6,90
Balança semi-analítica	R\$ 2.932,00	1	R\$ 2.932,00
Bancada de aço inox com pia	R\$ 2.350,00	1	R\$ 2.350,00
Banho-maria à 37°C	R\$ 1.105,00	1	R\$ 1.105,00
Banqueta para laboratório	R\$ 190,00	2	R\$ 380,00
Becker graduado de 100 mL	R\$ 6,00	2	R\$ 12,00
Becker graduado de 1000 mL	R\$ 21,00	2	R\$ 42,00
Botijão de nitrogênio líquido de 50 L	R\$ 4.500,00	1	R\$ 4.500,00
Cabo de bisturi	R\$ 8,98	2	R\$ 17,96
Cabine de segurança biológica	R\$ 48.560,00	1	R\$ 48.560,00
Calculadora	R\$ 5,00	1	R\$ 5,00
Câmara científica 2°C a 8°C	R\$ 23.600,00	2	R\$ 47.200,00
Câmara científica -30°C +10°C	R\$ 22.247,00	2	R\$ 44.494,00
Câmara científica -80 °C	R\$ 23.800,00	1	R\$ 23.800,00
Capela de exaustão de gases	R\$ 1.753,69	1	R\$ 1.753,69
Centrífuga refrigerada	R\$ 3.990,00	1	R\$ 3.990,00
Cuba plástica 1 L	R\$ 8,00	4	R\$ 32,00
Despertador de bancada	R\$ 7,00	1	R\$ 7,00
Estante para tubos	R\$ 12,00	10	R\$ 120,00
Estufa de 85 L para esterilização e secagem	R\$ 2.060,99	1	R\$ 2.060,99
Gelo reciclável	R\$ 2,00	10	R\$ 20,00
Incubadora de CO ₂ à 37°C	R\$ 26.500,00	1	R\$ 26.500,00
Medidor de pH portátil	R\$ 266,00	1	R\$ 266,00
Micropipetador monocanal 2-20 µL	R\$ 490,00	1	R\$ 490,00
Micropipetador monocanal 20-200 µL	R\$ 490,00	1	R\$ 490,00
Micropipetador multicanal 20-200 µL	R\$ 695,00	1	R\$ 695,00
Microscópio de fluorescência invertido	R\$ 51.787,00	1	R\$ 51.787,00
Microscópio óptico invertido	R\$ 4.718,00	1	R\$ 4.718,00
Pinça anatômica	R\$ 11,74	2	R\$ 23,48
Pinça dente de rato	R\$ 16,33	2	R\$ 32,66
Pipetador automático	R\$ 769,00	1	R\$ 769,00
Proveta graduada 100 mL	R\$ 7,50	1	R\$ 7,50
Proveta graduada 1000 mL	R\$ 34,80	1	R\$ 34,80
Termômetro digital	R\$ 44,00	8	R\$ 352,00
Tesoura cirúrgica	R\$ 14,00	2	R\$ 28,00
Ultrapurificador de água	R\$ 13.220,00	1	R\$ 13.220,00
CUSTO TOTAL DE EQUIPAMENTOS E UTENSÍLIOS:			R\$ 283.200,98

FONTE: O autor (2015)

NOTA: Cotações realizadas em outubro de 2015 com empresas nacionais especialistas no comércio de equipamentos para laboratórios – sem concessão de permissão para divulgar a identificação das empresas

O gasto calculado com equipamentos e utensílios diversos para a implantação da técnica de IVCC foi de R\$ 283.200,98, já o da técnica de isolamento em camundongos foi de R\$ 420.279,19, ou seja, 48% superior ao do IVCC.

Assim, a análise de custos revela enorme superioridade na utilização do IVCC sobre o isolamento do RABV em camundongos. Também não são os custos, portanto, que impedem a substituição da inoculação em camundongos pelo IVCC.

Os resultados desta etapa do estudo indicam que o isolamento viral em cultivo celular em relação à técnica de isolamento em camundongos apresenta mesma qualidade de desempenho e acurácia (99,8%), menos riscos que afetariam a biossegurança e saúde mental dos técnicos, menor tempo decorrido entre a inoculação e obtenção dos resultados (em média, 22 dias a menos), gastos muito inferiores com insumos (86,48% a menos) e com a aquisição de equipamentos para implantação (32,61% menor), e a vantagem de não fazer uso de animais, em consonância às premissas da bioética e bem-estar animal.

4.4 ANÁLISE DE RESULTADOS DA SUBDIVISÃO IV

Nesta etapa da pesquisa, foi realizada comparação entre o Grupo Teste 1 e um subconjunto do Grupo Teste 2 (o Grupo Teste 4), composto somente pelas 20 amostras também utilizadas no Grupo Teste 1.

Em ambos os grupos, todas as 20 amostras foram preparadas pela técnica de preparo de amostras modificada e posteriormente fracionadas em duas alíquotas, sendo a primeira inoculada em camundongos (Grupo Teste 1) e a segunda alíquota inoculada em cultivo celular (Grupo Teste 4).

Os resultados obtidos para realização dos cálculos de concordância entre os dois grupos estão demonstrados na TABELA 10:

TABELA 10 – RESULTADOS DO GRUPO TESTE 4 FRENTE AO GRUPO TESTE 1 DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ

		GRUPO TESTE 1	
		Positivos	Negativos
GRUPO TESTE 4	Positivos	15	0
	Negativos	0	5

FONTE: O autor (2015)

Neste caso, o teste estatístico coerente é o de concordância *Kappa*, pois se busca avaliar a concordância de um teste frente ao outro, e não ao padrão ouro ou grupo controle. O índice *Kappa* obtido foi de 1,00, ou seja, os resultados em ambos os grupos foram idênticos, indicando que não há diferença estatística entre eles.

Em relação ao tempo decorrido entre a inoculação e a obtenção de resultados, o Grupo Teste 1 teve variações, conforme apresentado no GRÁFICO 3. Já para as amostras do Grupo Teste 4, o período foi de 96h (quatro dias) para todas as amostras.

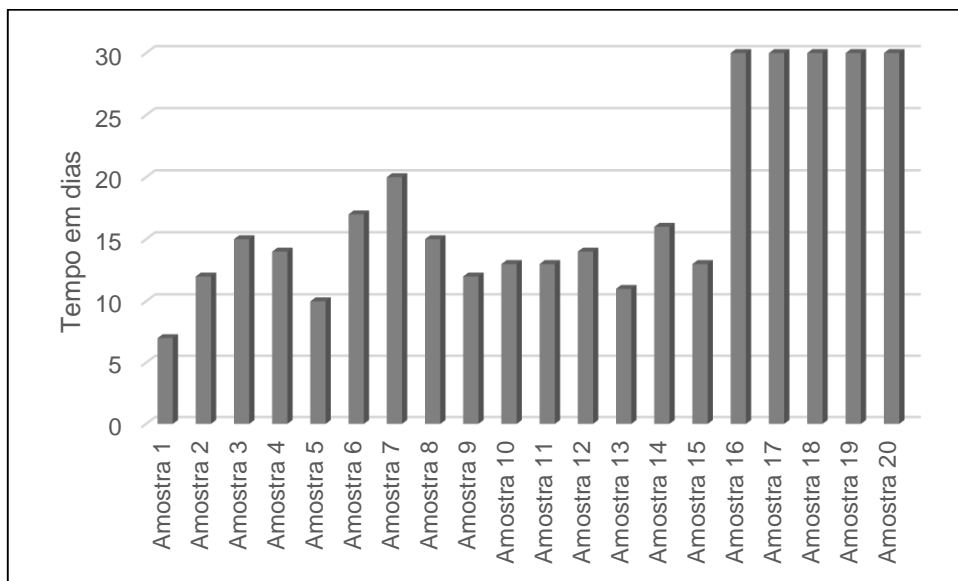


GRÁFICO 3 - TEMPO ENTRE INOCULAÇÃO E OBTENÇÃO DE RESULTADOS, EM DIAS, GRUPO TESTE 1 DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS PARA RAIVA EM AMOSTRAS DE ENCÉFALO DE ANIMAIS, ESTADO DO PARANÁ
 FONTE: O autor (2015)

No Grupo Teste 1, todas as 5 amostras negativas levaram 30 dias desde a inoculação até a confirmação do diagnóstico, pois os animais não adoeceram durante o período de observação, que é de no máximo 30 dias, e foram submetidos à eutanásia ao final do período observação. Já as 15 amostras positivas apresentaram períodos diferentes até que os animais exibissem sinais clínicos e fossem submetidos à eutanásia para realização de IFD confirmatória, com média de 13 dias, máximo de 20 dias e mínimo de 7 dias.

A média em todo o Grupo Teste 1 foi de 17 dias, com período máximo de 30 dias e mínimo de 7 dias, ou seja, 13 dias a mais que no Grupo Teste 4.

Quanto aos riscos, o isolamento viral em camundongos pelo preparo modificado de amostras (Grupo Teste 1) apresentou os mesmos relacionados ao Grupo Controle 3, com exceção dos riscos referentes à maceração das amostras.

O isolamento viral em cultivo celular pelo preparo modificado de amostras (Grupo Teste 4) apresentou os mesmos riscos relacionados ao Grupo Teste 3, com exceção dos riscos referentes à maceração das amostras.

Acerca do bem-estar animal e bioética, as considerações foram as mesmas da etapa anterior na comparação do isolamento viral em camundongos (Grupo Teste 1) com o isolamento em cultivo celular (Grupo Teste 4).

O custo de insumos relacionados à técnica empregada no Grupo Teste 1 estão demonstrados na TABELA 3, em que o custo total estimado de insumos foi de R\$ 252.876,22 para 3.200 amostras, ou R\$ 79,02 por amostra.

O custo de insumos relacionados à técnica empregada no Grupo Teste 4 estão demonstrados na TABELA 6, em que o custo total estimado de insumos foi de R\$ 17.349,93 para 3.200 amostras, ou R\$ 5,42 por amostra, ou seja, 93,14% menor que no Grupo Teste 1.

Neste cenário, para cada amostra processada pela técnica de isolamento em camundongos poderiam ser processadas mais de 14 amostras pela técnica de IVCC.

Os equipamentos e utensílios utilizados para a implantação do isolamento viral em camundongos por técnica de preparo modificado de amostras são os mesmos da TABELA 8 (R\$ 420.279,19). Os utilizados para o isolamento viral em cultivo celular por técnica de preparo modificado de amostras são os mesmos da TABELA 9 (R\$ 283.200,98).

Novamente, a análise de custos revela enorme superioridade na utilização do IVCC sobre o isolamento do RABV em camundongos.

Os resultados desta etapa do estudo indicam que o isolamento viral em cultivo celular em relação à técnica de isolamento em camundongos apresenta concordância perfeita de resultados ($k = 1,00$), menos riscos que afetariam a biossegurança e saúde mental dos técnicos, menor tempo decorrido entre a inoculação e obtenção dos resultados (em média, 13 dias a menos), gastos muito inferiores com insumos (93,14% a menos) e com a aquisição de equipamentos para implantação (32,61% menor), e a vantagem de não fazer uso de animais, em consonância às premissas da bioética e bem-estar animal.

O isolamento do RABV em cultivo celular pela técnica de preparo de amostras modificada mostrou-se extremamente promissor para utilização na rotina de laboratórios de saúde pública, principalmente, pela excelente acurácia, praticidade da técnica, rapidez até obtenção dos resultados e baixos custos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Logo no início deste trabalho, contatou-se o Lacen-PR em busca de parceria para o desenvolvimento da parte prática do experimento e para desenvolver estudos sobre a implantação da nova metodologia, caso os resultados do “projeto-piloto” atendessem as expectativas. A princípio, a ideia de se substituir uma técnica que vem sendo utilizada há mais de 30 anos, e com muita eficácia, não foi bem recebida, já que implicaria em investimentos na aquisição de insumos e equipamentos, na reestruturação física e de fluxo laboratorial, na capacitação e treinamento de técnicos, mas, principalmente, implicaria na mudança de paradigmas, do *status quo*.

Para tentar ultrapassar essas barreiras – tanto a financeira quanto a da “inércia” – um ponto muito peculiar foi exposto aos gestores de forma sucinta e concisa: existem estudos preliminares que indicam que a nova técnica pode ser até oito vezes mais econômica que a técnica utilizada atualmente. E aí foi ultrapassada a barreira financeira.

A barreira da “inércia” – que está relacionada ao esforço pessoal do técnico ao “ter que” aprender uma nova metodologia e todas as implicações de se passar por uma capacitação (como viajar até o local do treinamento, deixar a família e outros compromissos, o “estresse” da aprendizagem, entre outros) – caiu rapidamente quando me ofereci para passar pelos treinamentos e me comprometi a replicar as informações recebidas com os demais técnicos do laboratório.

Assim, este projeto foi possível e foi desenvolvido com total apoio do Lacen-PR, que proporcionou a realização de toda a parte prática do experimento, possibilitando as seguintes considerações e conclusões:

- A técnica de preparo de amostras modificada, como descrita neste trabalho, é perfeitamente capaz de substituir a técnica preconizada pelo Ministério da Saúde pela elevada sensibilidade (100%), especificidade (100%), acurácia (100%) e concordância ($k = 1,00$) com o padrão ouro. É superior ao padrão ouro por ser capaz de reduzir significativamente o tempo de preparo das amostras (cerca de 5min/amostra), diminuir os gastos com insumos (até 53% a menos) e proporcionar melhorias das condições de biossegurança por reduzir drasticamente, senão anular os riscos biológicos de inalação de aerossóis carregados de partículas virais.

- A técnica de isolamento viral em cultivo celular quando comparada ao isolamento em camundongos apresenta alta qualidade de desempenho e acurácia (99,8%), menos riscos que afetariam a biossegurança e saúde mental dos técnicos, menor tempo decorrido entre a inoculação e obtenção dos resultados (média de 22 dias a menos), gastos muito inferiores com insumos (cerca de 87% menores) e aquisição de equipamentos para implantação (33% menores), e a vantagem de não fazer uso de animais, em consonância às premissas da bioética e bem-estar animal.

- A técnica de isolamento viral em cultivo celular com o preparo modificado das amostras é inovadora e extremamente promissora para substituir a prova padrão ouro hoje preconizada pelo Ministério da Saúde.

- Atualmente, a técnica de isolamento viral em cultivo celular com o preparo modificado de amostras está em fase de implantação no Lacen-PR. A estimativa é de que a metodologia esteja plenamente implantada até o final de 2016.

- O Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti mostrou grande interesse após analisar a proposta desta nova técnica e solicitou treinamento e capacitação para também poderem implantá-la em seu laboratório (início do treinamento previsto para março/2016).

Desta forma, com o desenvolvimento e aplicação bem-sucedidos do protocolo laboratorial modificado proposto, entende-se que foram feitas contribuições à Saúde Pública, à Saúde Mental dos técnicos da rotina laboratorial e ao Bem-Estar Animal.

REFERÊNCIAS

ADAPAR. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná: Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti. Disponível em:
< <http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=82>>.
Acesso em 25/04/2015.

ATCC. American Type Culture Collection: Neuro-2a (ATCC® CLL-131™). Disponível em: <<http://www.atcc.org/Products/All/CCL-131.aspx#generalinformation>>. Acesso em: 28/07/2014.

BONES, V. C; MOLENTO, C. F. M. Alternativa ao uso de animais de laboratório no Brasil. **Veterinária em foco**. Canoas: Editora ULBRA, 2012.

BOURHY, H.; SUREAU, P.; TORDO, N. Selection by direct immunofluorescence technique on fresh specimens. In: BOURHY, H.; SUREAU, P. **Laboratory methods for rabies diagnosis**. Paris: Unite de la Rage de L'Institute Pasteur, 1990. p. 169-170.

BRASIL. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 11, de 16 de fevereiro de 2012. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 36, p. 23, 22 fev. 2012. Seção 1, pt. 1.

_____. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 134, p. 2, 16 jul. 2009c. Seção 1, pt. 1.

_____. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 182, p. 1, 20 set. 1990. Seção 1, pt. 1.

_____. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 31-E, p. 25, 13 fev. 1998. Seção 1, pt. 1.

_____. Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 196, p. 1, 09 out. 2008b. Seção 1, pt. 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico 2009**. Brasília: Mapa/ACS, 2009b.

_____. Ministério da Saúde. **Doenças relacionadas ao trabalho**: manual de procedimentos para os serviços de saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia**. 3. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Raiva**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2009a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Raiva. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/raiva>>. Acesso em 06/01/16.

_____. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana de Saúde. **Biossegurança em saúde: prioridades e estratégias de ação**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

_____. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.271, de 06 de junho de 2014. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 108, p. 67, 09 jun. 2014. Seção 1, pt. 1.

_____. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.125, de 06 de julho de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 127, p. 49, 07 jul. 2005b. Seção 1, pt. 1.

_____. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.914, de 09 de agosto de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 154, p. 74, 11 ago. 2011. Seção 1, pt. 1.

_____. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria nº 485, de 11 de novembro de 2005. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 219, p. 80, 16 nov. 2005c. Seção 1, pt. 1.

BROOM, D.M.; FRASER, A. F. **Comportamento e bem-estar de animais domésticos**. 4. ed. Barueri: Manole, 2010.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Biosafety in microbiological and biomedical laboratories**. 5th ed. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, 2009.

_____. Centers For Disease Control And Prevention: Bioefity – Recognizing the biosafety levels. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/training/quicklearns/biosafety/>>. Acesso em: 31/07/2014.

_____. Centers For Disease Control And Prevention: Rabies Homepage. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/rabies/index.html/>>. Acesso em: 19/01/2015.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução nº 879, de 15 de fevereiro de 2008. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, n. 79, p. 109-110, 25 fev. 2008. Seção 1, pt. 1.

CLOTET, J.; FEIJÓ, A.; OLIVEIRA, M. G. **Bioética: uma visão panorâmica**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2005.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal: CONCEA. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2014/11/concea-aprova-orientacao-sobre-uso-animais>>. Acesso em: 11/10/2015.

DUNCAN, I. J. H. The changing concept of animal sentience. **Applied Animal Behaviour Science**, Elsevier, v. 100, n. 1, p. 11-19, 2006.

KALISTE, E. **The welfare of laboratory animals**. Norwell: Kluwer Academic, 2004.

ENGELHARDT, H. T. **Fundamentos da bioética**. 2. ed. São Paulo: Edições Loyola, 2004.

FAWC. Farm Animal Welfare Committee: Animal Welfare. Disponível em: <<http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20121007104210/http://www.fawc.org.uk/freedoms.htm>>. Acesso em 20/10/2015.

HARRISON, R. **Animal machines**. London: Vincent Stuart Publishers, 1964.

HOFMANN, F.; STROBEL, U. Occupational health in health care workers. **Public Health Forum**, vol. 9, n. 3, 2011.

ICTV. International Committee On Taxonomy Of Viruses: Current taxonomy releases. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em 02/01/2016.

INSTITUTO PASTEUR: Manual técnico do Instituto Pasteur, nº8. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/instituto-pasteur/pdf/manuais/manual_08.pdf>. Acesso em: 26/07/2014.

JACKSON, A. **Rabies: scientific basis of the disease and its management**. 3. ed. San Diego: Elsevier, 2013.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole, 2000.

LANDIS J. R.; KOCH G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics [International Biometric Society]**, 1977; vol. 33, nº 1. p. 159-174.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAJEROWICZ, J. **Boas práticas em biotérios e biossegurança**. 1.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

MANUAL MERCK DE VETERINÁRIA. 9. ed. São Paulo: Roca, 2008.

MEDRONHO, R. A. **Epidemiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

MENOZZI, B. D. **Caracterização antigênica e genotípica de isolados do vírus rábico, de quirópteros da cidade de Botucatu-SP e região**. 72 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. vol. 2. Rio de Janeiro: EPSJV – IOC, 2010.

OPAS. Organização Pan-Americana de Saúde: Saúde do Trabalhador. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=378%3A%20saude-trabalhador&catid=990%3A%20abra-03-b-principal&Itemid=595>. Acesso em 15/01/2016.

PARANÁ. Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. Laboratório Central do Estado do Paraná: Manual de coleta e envio de amostras biológicas ao Lacen/PR. Disponível em: <http://www.lacen.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Manuais/Manual_de_Coleta_e_Envio_de_Amostras.pdf>. Acesso em: 15/12/2015.

POST, S. G. **Encyclopedia of Bioethics**. 3. ed. New York: MacMillan Reference, 2004.

PESSINI, L.; BARCHIFONTAINE, C. P. **Problemas atuais de bioética**. 6. ed. São Paulo: Edições Loyola, 2002

ROUQUAYROL, M. Z. **Epidemiologia & saúde**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999.

RIVERA, E. A. B.; AMARAL, M. H.; NASCIMENTO, V. P. **Ética e bioética aplicadas à Medicina Veterinária**. Gioânia: [s.n.], 2006.

RUSSELL, W. M. S; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. Special edition published by Universities Federation for Animal Welfare (UFAW). London: Methuen & Co, 1992.

SHAKESPEARE, M. **Zoonoses**. 2. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

SILVA, P. L. Zoonoses emergentes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AVICULTURA, 21., 2009, Porto Alegre. **Anais do 21º Congresso Brasileiro de Avicultura**. Porto Alegre: CBA, 2009.

SINGER, P. **Practical ethics**. Cambridge: Cambridge University, 1993.

SLAVEN, E. M.; STONE, S. C.; LOPEZ, F. A. **Doenças Infecciosas: Diagnóstico e Tratamento no Setor de Emergência**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 2007.

TECPAR. Instituto de Tecnologia do Paraná: Laboratório de Modelos Biológicos. Disponível em: <<http://portal.tecpar.br/index.php/pt/producao-bioindustrial/laboratorio-de-modelos-biologicos>>. Acesso em: 20/07/2014.

THE FRANCIS CRICK MEMORIAL CONFERENCE: CONSCIOUSNESS IN HUMAN AND NON-HUMAN ANIMALS, 07 jul. 2012, Cambridge, Reino Unido. **The Cambridge declaration on consciousness in non-human animals**. Disponível em: <<http://fcmconference.org/img/CambridgeDeclarationOnConsciousness.pdf>>. Acesso em 07/08/2015.

TOMA, B.; DUFOUR, B.; SANAA, M.; BENET, J.J.; SHAW, A.; MOUTOU, F.; LOUZÃ, A. **Epidemiologia aplicada**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

VELASCO-VILLA, A.; GOMEZ-SIERRA, M.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, G.; JUAREZ-ISLAS, V.; MELENDEZ-FELIX, A.; VARGAS-PINO, F.; VELASQUEZ-MOMROY, O.; FLISSER, A. Antigenic diversity and distribution of rabies virus in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology**. 2002; vol.40, nº 3. p. 951-958.

WHO. World Health Organization. In: **Emerging issues in water and infectious disease**. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/emerging.pdf>. Acesso em: 03/08/2014b.

_____. World Health Organization. In: **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva, 1996.

_____. World Health Organization. In: **Laboratory biosecurity guidance**. Disponível em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EPR_2006_6.pdf>. Acesso em: 31/07/2014d.

_____. World Health Organization. In: **WHO Expert Consultation on Rabies**. 2nd report. WHO Technical Report Series nº 982. Geneva, 2013.

_____. World Health Organization. Media Centre – Rabies. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>>. Acesso em: 15/07/2014a.

_____. World Health Organization. Mental Health – Depression. Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/management/depression/en/>. Acesso em: 26/01/2016.

_____. World Health Organization. Veterinary public health – Zoonoses. Disponível em: <<http://www.who.int/zoonoses/vph/en/>>. Acesso em: 03/08/2014c.

WITTE, T. K.; CORREIA, C. J.; ANGARANO, D. Experience with Euthanasia is Associated with Fearlessness about Death in Veterinary Students. **Suicide and Life-Threat Behavior**, 2013, vol. 43, nº 2, p. 125-138.

GLOSSÁRIO

Aerofobia: horror ou fobia do movimento do ar (WHO, 2014a).

Anticorpos monoclonais: anticorpos derivados de uma única célula ou pertencente a um único clone celular (BRASIL, 2008a).

Autólise: desintegração espontânea de uma célula pela ação de suas próprias enzimas (BRASIL, 2008a).

Disfagia: dificuldade para se alimentar (BRASIL, 2016).

Distresse: estresse excessivo e negativo, capaz de causar sofrimento e desencadeado por estímulos percebidos como ameaça (BROOM; FRASER, 2010).

Entorpecimento: ausência de resposta a estímulos normais ou ordinários (JONES; HUNT; KING, 2000).

Estresse: estado gerado pela percepção de estímulos que provocam excitação emocional e, ao perturbarem a homeostasia, levam o organismo a disparar um processo de adaptação caracterizado pelo aumento da secreção de adrenalina, com várias consequências sistêmicas (BROOM; FRASER, 2010).

Fotofobia: alta sensibilidade ou intolerância à luz (WHO, 2014a).

Hidrofobia: aversão ou horror mórbido a líquidos (WHO, 2014a).

Hiperacusia: exaltação da acuidade auditiva, ou sensibilidade dolorosa a sons (BRASIL, 2016).

Imprint: impressão deixada em lâmina de microscopia por fragmento de tecido pressionado contra esta lâmina (BRASIL, 2008a).

Neocórtex: região do córtex cerebral mais recentemente derivada (SLAVEN; STONE; LOPEZ, 2007).

Obstipação: aumento no intervalo entre as evacuações, acompanhada de fezes ressecadas e dificuldade na eliminação destas (SLAVEN; STONE; LOPEZ, 2007).

Parestesia: desordem neurológica focal ou local, caracterizada por sensações anormais e anomalias sensoriais (WHO, 2014a).

Quiróptero: Ordem de mamíferos que compreende os morcegos, caracterizados pela adaptação ao voo, sendo seus membros anteriores em forma de asas (BRASIL, 2016).

Sialorreia: salivação excessiva; ptialismo (BRASIL, 2016).

Zoonose: doença transmissível entre seres humanos e outros animais (SHAKESPEARE, 2009).

ANEXO

ANEXO 1 – CERTIFICADO CEUA/BIO - UFPR Nº 862/ 2015 98

ANEXO 1

CERTIFICADO CEUA/BIO - UFPR Nº 862/ 2015



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 862

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.


PROCESSO/PROCESS: 23075.059243/2015-71

APROVADO/APPROVAL: 10/02/2015 – R.O. 01/2015

TÍTULO/TITLE: Investigação do vírus da raiva (Gênero *Lyssavirus*) em animais do Estado do Paraná (PR) por protocolo laboratorial modificado: uma importante contribuição à Saúde Pública e bem-estar animal

AUTORES/AUTHORS: Eliane Carneiro Gomes, Walfrido Kühn Svoboda, Thaila Francini Corona, Themis Valéria de Souza Baptista

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Saúde Comunitária / PPG em Ciências Farmacêuticas - UFPR


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA