



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE -
MEDICINA VETERINÁRIA

WILLYANNE DARLINE FERNANDES DE LIMA

**RELATÓRIO DE DESCRIÇÃO DE ATIVIDADES DO PROGRAMA DE
RESIDÊNCIA**

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA CINOMOSE (CDV)
EM CANINOS DE ABRIGOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE,
PE**

RECIFE

2021

WILLYANNE DARLINE FERNANDES DE LIMA

**RELATÓRIO DE DESCRIÇÃO DE ATIVIDADES DO PROGRAMA DE
RESIDÊNCIA**

**PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA CINOMOSE (CDV) EM
CANINOS DE ABRIGOS DA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE, PE**

Trabalho de Conclusão de
Residência apresentado ao Programa de
Residência em Área Profissional da Saúde
da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como requisito à obtenção de
título de Especialização na área de
Virologia Veterinária.

TUTOR: Prof. José Wilton Pinheiro Junior

RECIFE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

W742r Lima, Willyanne Darline Fernandes de
RELATÓRIO DE DESCRIÇÃO DE ATIVIDADES DO PROGRAMA DE RESIDÊNCIA :
PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA CINOMOSE (CDV) EM CANINOS DE ABRIGOS
DA REGIÃO METROPOLITANA
DO RECIFE, PE / Willyanne Darline Fernandes de Lima. - 2021.
48 f. : il.

Orientador: Jose Wilton
Pinheiro Junior. Inclui
referências e apêndice(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Residência) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Residência em Área Profissional de Saúde em Medicina Veterinária, Recife, 2021.

1. Viroses. 2. Cinomose. 3. Prevalência . 4. virologia. 5. Medicina Veterinária Preventiva. I. Junior,
Jose Wilton Pinheiro, orient. II. Título

CDD 636.089

Trabalho apresentado em 22 de fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Departamento de Medicina Veterinária
(UFRPE)
Presidente da Banca/Tutor

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Carvalho Maia
Departamento de Medicina Veterinária
(UFRPE)

Dr. Sérgio Alves do Nascimento
Departamento de Medicina Veterinária
(UFRPE)

Dr^a. Amanda Mota Vieira
Bióloga
Membro suplente

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo.

A minha mãe Maria que sempre acreditou em mim e me apoio em todos os momentos, a meus irmãos Yure e Chesma que torcem por mim, aos meus sobrinhos Luiza e Diego que me inspiram a buscar ser sempre melhor, as minhas tias Francisca, Bethania, Lilia, Tania, e tios Manoel, Damião, Geraldo que estão sempre me mandando energias positivas, a meus primos e a todos os meus familiares.

A minha vizinha Lúiza *in memoriam*, a senhora sempre teve orgulho de mim e sei que está muito feliz por essa conquista.

A Larissa por sempre estar me apoiando, incentivando, ajudando e me dando força nessa caminhada, por tudo que conquistamos.

A equipe do LAVIAN, Inês, Sérgio, Davi, Kleber, Rita, Wilton, Bruno, Giselle, vocês foram muito importante na minha conquista, eu amo vocês e sou eternamente grata por tudo que vivemos. A professora Andrea Alice e a seu orientado Thiago, agradeço pelo aprendizado. A Amanda por toda ajuda.

Aos residentes que compartilharam as felicidades e as dores comigo, vocês são incríveis e vão chegar muito longe.

A Sandra, Cleide, Erika, Queila e todos os terceirizados por toda ajuda que sempre nos dedica.

A Doutora Marta e toda a equipe do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA/PE), antigo LANAGRO, por ter me dado à primeira oportunidade na área da virologia e por tudo que me ensinaram.

A meus amigos e amigas que me deram força e que me ajudaram.

As protetoras que aceitaram participar da pesquisa.

A todos os professores que me ensinaram.

A professora Erika Samiko e professor Rinaldo e toda a equipe do Laboratório de Bacteriose pelos ensinamentos e aprendizados.

A equipe de Vigilância em Saúde do Distrito Sanitário 2, por ter me recebido tão bem e ter me ensinando tanto.

A equipe do NASF de Camaragibe que me recebeu de braços abertos e me ensinou muito.

SUMÁRIO

Capítulo I: Descrição das atividades do Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária	1
1. Atividades desenvolvidas no Laboratório de Virologia Animal – LAVIAN	1
1.1. Preparo de insumos utilizados na rotina do LAVIAN	1
1.2. Boas Práticas Laboratoriais	2
1.2.2. Preparação, higienização e esterilização de vidrarias	2
1.3. Diagnóstico Laboratorial	2
1.3.1. Isolamento Viral	2
1.3.1.1. Cultivo Celular	2
1.3.1.2. Isolamento Viral	3
1.2.2. Titulação Viral	4
1.2.3. Virusneutralização	4
1.2.4. Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)	5
1.2.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	5
1.2.6. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)	6
1.3. Biossegurança Laboratorial	8
1.3.1. Biossegurança e Manutenção	8
1.3.2. Elaboração dos Procedimentos Operacionais Padrão	8
1.3.3. Elaboração de Instruções de Trabalho (IT)	8
1.3.4. Coleta, preservação, transporte, recebimento e envio de amostras.	8
1.3.5. Banco de Amostras Biológicas	9
1.4. Atividades de Ensino, Pesquisa e Extensão	10
1.4.1.1. Participação em Aulas Práticas	10
1.4.1.2. Seminários apresentados à equipe do LAVIAN	10
1.4.1.3. Organização de Eventos	10

1.4.1.3.1. Simpósio de Viroses Emergentes no Contexto da Saúde Única	10
1.4.2.1. Projetos de Pesquisa	12
1.4.2.2. Teste imunocromatográfico para detecção dos anticorpos (IgG) anti-Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e antígeno da Leucemia Felina (FeLV)	12
1.4.2.3. Teste imunocromatográfico para detecção do Antígeno da Cinomose Canina	12
1.4.3. Projeto de Extensão – Ano 2020	13
2. Atividades realizadas no Sistema Único de Saúde - Vigilância em Saúde e Núcleo Ampliado de Saúde da Família (NASF)	14
2.1. Vigilância Ambiental	15
2.2. Vigilância Epidemiológica	17
2.3. Vigilância Sanitária	20
2.4. Atividades em Saúde Pública – NASF durante a pandemia da COVID-19	22
• Capítulo II – Prevalência da Infecção pelo Vírus da Cinomose (CDV) em Caninos de Abrigos na Região Metropolitana do Recife, PE	23
RESUMO	23
ABSTRACT	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30
APÊNDICE I	34
APÊNDICE II	40
APÊNDICE III	46
APÊNDICE IV	47

Capítulo I: Descrição das atividades do Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária

O Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) tem a duração de 24 meses, com carga horária de 5.760 horas. As atividades práticas correspondem a 80% (4.608 horas) e as atividades teórico-práticas a 20% (1.152 horas).

As atividades referentes ao Programa de Residência em Área Profissional em Saúde são desempenhadas no Hospital Escola Veterinário da UFRPE, contando com a colaboração de 36 Médicos Veterinários Residentes, sendo eles 18 R1 (residentes no primeiro ano) e 18 R2 (residentes no seu segundo ano), distribuídos de acordo com a área específica. As áreas de atuação são: Clínica Médica de Pequenos Animais; Anestesiologia Veterinária; Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais; Patologia Clínica Veterinária; Diagnóstico por Imagem; Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes Animais; Patologia Veterinária; Bacterioses; Virose; Doenças Parasitárias e Saúde Pública. No ano de 2020, com a pandemia ocasionada pelo SARS-Cov-2, o Hospital Escola Veterinário foi fechado a partir do dia 13 de março e só retornou às atividades em 1 de dezembro de 2020. Neste período todos os residentes foram realocados para atuar no Sistema Único de Saúde (SUS), onde os R1 foram atuar na Vigilância em Saúde e os R2 atuaram no Núcleo Ampliado de Saúde da Família (NASF).

No ano de 2019 foram ofertadas as disciplinas de Núcleo Comum Obrigatório, incluindo Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva, Metodologia Científica, Políticas Públicas de Saúde, Práticas em Políticas Públicas, Bioestatística, Integração Ensino-Serviço. As disciplinas específicas para os residentes de virose foram Boas Práticas Laboratoriais e Biossegurança, Tópicos Especiais em Virose dos Animais Domésticos. No ano de 2020, as disciplinas obrigatórias foram ofertadas por videoconferência, Bioética e Ética Profissional em Medicina Veterinária, Políticas Públicas em Saúde (Residência 2). Nos dois anos foi também ofertada a disciplina de Seminário de Conclusão de Residência e a disciplina optativa de Dermatologia de caninos e felinos.

1. Atividades desenvolvidas no Laboratório de Virologia Animal – LAVIAN

O Laboratório de Virologia Animal (LAVIAN) localiza-se no Departamento de Medicina Veterinária, sediado na Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52.171-900 - Recife/Pernambuco. O LAVIAN possui uma equipe multidisciplinar, formada por dois técnicos, dois residentes, sendo um R1 e outro R2, dois professores que ministram a disciplina de Viroses dos Animais Domésticos, e alunos de mestrado, doutorado, Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) e monitores da disciplina de Viroses dos Animais Domésticos.

As atividades do LAVIAN são direcionadas para os três pilares da Universidade (ensino, pesquisa e extensão) e são desenvolvidas de forma planejada com o objetivo de proporcionar aos discentes o máximo de conhecimento dentro da área de Virologia Veterinária.

Durante a vivência da residência diferentes atividades foram executadas, abaixo serão descritas as atividades e os princípios básicos das mesmas.

1.1. Preparo de insumos utilizados na rotina do LAVIAN

Os insumos utilizados na rotina do LAVIAN são produzidos no laboratório, como o meio de cultura Meio Mínimo Essencial (MEM), que é uma solução nutritiva padrão utilizada para cultura de células e possui nutrientes básicos para a manutenção celular, o MEM é fabricado e esterilizado por filtração no LAVIAN.

O gel de agarose é produzido no LAVIAN, para uso no diagnóstico por Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA).

As soluções mãe de salinas, *tween*, *triton*, PBS, entre outros insumos também são preparados na rotina. O conhecimento sobre a preparação de materiais cria competência para os residentes ao concluir a residência obter capacidade técnica para gerenciar um laboratório e empreender.

1.2. Boas Práticas Laboratoriais

1.2.2. Preparação, higienização e esterilização de vidrarias

As vidrarias usadas na rotina do LAVIAN são higienizadas, embaladas e esterilizadas no próprio laboratório. O cuidado com a vidraria faz parte do treinamento, aprender a manusear e limpar corretamente, contribuindo para a formação do profissional adquirindo *Know-how* ao final da residência.

1.3. Diagnóstico Laboratorial

1.3.1. Isolamento Viral

1.3.1.1. Cultivo Celular

O cultivo celular é uma técnica da virologia clássica, sendo a base para o diagnóstico de diversas infecções virais. A técnica consiste na replicação *in vitro* do vírus em células para diversos ensaios. No LAVIAN uma das principais técnicas utilizadas é o diagnóstico virológico por meio de isolamento viral, soroneutralização e titulação viral. A célula de linhagem contínua utilizada é a MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*), originada de rim bovino.

A cultura primária é estabelecida a partir de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática, as células que sobrevivem ao processo aderem à garrafa formando a primeira monocamada. Se essas células possuírem as características do tecido de origem, poderão crescer em cultura por determinado período de tempo e serão chamadas de células primárias. Essas células possuem um tempo de vida curto (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Células de linhagem contínua são aquelas que não perderam as características do tecido de origem à medida que são replicadas e possuem alta proliferação. São muito utilizadas em pesquisas, pois podem ser mantidas em cultura por longos períodos de tempo quando comparadas às células primárias. Muitas linhagens contínuas podem ser replicadas sem perder suas características por até oitenta passagens (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

1.2.1.2. Isolamento Viral

Os vírus, só se replicam em células vivas, seu isolamento apenas é possível quando se utiliza um hospedeiro vivo, como a cultura de células, animais de laboratório e ovos embrionados (STEPHENS et al., 2010).

O isolamento viral em cultivo celular é considerado a prova ouro (*gold standard*) em diagnóstico virológico. A escolha de um tipo celular para o isolamento ou multiplicação do vírus está, muitas vezes, associada com a espécie de origem do material e com o histórico clínico da enfermidade. Geralmente, são utilizadas células originárias da espécie animal de origem do vírus. A sensibilidade à infecção com alguns vírus pode ser inferior nas linhagens celulares contínuas em comparação com os cultivos primários, porém a maioria dos laboratórios dá preferência a células de linhagem contínua devido à sua uniformidade, estabilidade e facilidade de manuseio. Os materiais usados para a tentativa de isolamento são tecidos, excreções e secreções. Apresenta como vantagens a disponibilidade do agente, uma vez que o mesmo ficará disponível para estudos posteriores, implementação e execução relativamente simples. É um método demorado, são necessárias pelo menos três passagens em células e cada passagem podem durar até 72 horas, alguns vírus não produzem efeito citopático, podem ser necessários procedimentos adicionais incluindo o uso de anticorpos específicos e o sequenciamento genético. Além disso, essa técnica somente detecta vírus que estejam viáveis, as culturas celulares podem ser contaminadas facilmente por fungos e bactérias (FLORES, 2007).

Na rotina de trabalho do LAVIAN utiliza-se a cultura de células para isolamento viral. A maceração dos órgãos é realizada para liberação das partículas virais, seguida de introdução de meio de cultura, antibiótico e antifúngico, esse material deve ficar em tubo *falcon* para centrifugação, após a centrifugação ocorre à inoculação do sobrenadante na cultura celular. São realizadas pelo menos três passagens em células, a cada 72 horas.

No período da residência foram processadas no LAVIAN, 67 amostras para tentativa de isolamento viral do Herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (BoAHV 1 e 5), foram isoladas 5 amostras.

1.2.2. Titulação Viral

A realização das técnicas virológicas requer o conhecimento da quantidade aproximada das partículas víricas presentes no material biológico, essa técnica de quantificação é denominada titulação viral, e o valor obtido é o título viral. A técnica direta é baseada na contagem das partículas virais presentes em uma amostra observada ao microscópio eletrônico, essa técnica é capaz de informar o número preciso de partículas, porém não diferencia as partículas infecciosas das não infecciosas, por essa razão esse método não é utilizado na rotina (FLORES, 2007).

As técnicas indiretas têm como base a infectividade do vírus, essa técnica requer o cultivo celular, que será o sistema biológico de replicação do agente. O material é submetido a diluições seriadas, cada diluição será inoculada na camada células, quanto maior o número de réplicas, mais preciso será. Essa técnica utiliza placa de microtitulação com 96 cavidades, cada diluição do material é inoculado em 8 poços. O processo dura em média 48 horas, dependendo do vírus, e o título é expresso como a maior diluição capaz de provocar reação específica em 50% dos cultivos celulares e a unidade utilizada é TCID₅₀ (Dose Infectante em Cultura de Células). Os valores obtidos são submetidos a cálculos matemáticos, o método de Reed e Muench é o mais difundido para o cálculo de título viral (FLORES, 2007).

A fim de facilitar o entendimento da técnica e tendo em vista que o Laboratório ainda não possuía um material semelhante, foi desenvolvido a instrução de trabalho (IT) dessa técnica, para que todos os profissionais do LAVIAN possam executar a prova. A IT é um passo a passo da técnica, detalhando inclusive os equipamentos e insumos necessários para execução da mesma. A IT possui exemplos práticos de como fazer o cálculo do título, é um material que irá auxiliar os próximos residentes no entendimento e execução da técnica (apêndice I).

1.2.3. Virusneutralização

É um teste sorológico que visa a neutralização do vírus pela presença de anticorpos neutralizantes, o soro do animal em diluições crescentes é exposto ao vírus, se há presença de anticorpo não será observado efeito citopático (ECP) na célula, porém se não há presença de anticorpo ocorrerá efeito citopático. A presença de anticorpos neutralizantes na amostra previne a infecção das células e consequentemente o ECP (FLORES, 2007).

Essa técnica exige cultivos celulares; tem como limitação a toxicidade do soro; detecta somente anticorpos neutralizantes. Possui aplicação para todos os vírus que replicam em células (FLORES, 2007).

A técnica é utilizada para diagnóstico de Peste Suína Clássica, herpesvírus bovino, diarreia viral bovina, anemia infecciosa das galinhas, panleucopenia felina, febre aftosa, estomatite vesicular. No LAVIAN essa técnica foi utilizada a título de conhecimento para os residentes.

A fim de facilitar o entendimento da técnica e tendo em vista que o Laboratório ainda não possuía um material semelhante, foi desenvolvida a instrução de trabalho (IT) dessa técnica, para que todos os profissionais do LAVIAN possam executar a prova (APÊNDICE II).

1.2.4. Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)

Baseia-se na detecção de anticorpos presentes no soro, essa detecção ocorre através da migração do antígeno presente no soro do animal, em um meio semi-sólido com a formação de uma linha de precipitação (MOTTA, 2007).

É uma técnica de simples execução, baixo custo, sensibilidade razoável, com resultados no período de 24 a 72 horas. Tem como limitações reações inespecíficas, sensibilidade limitada, qualidade do antígeno é crítica e não permite quantificar os anticorpos (FLORES, 2007).

No LAVIAN o IDGA é utilizado para o diagnóstico da Artrite Encefalite Caprina (CAE) e Maedi-Visna.

Foram testadas 671 amostras para o diagnóstico das lentivirose de pequenos ruminantes no período da residência.

1.2.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de cópias de fragmentos específicos de ácidos nucleicos, onde a partir de uma única molécula de DNA molde, é possível gerar até cem bilhões de moléculas similares em uma reação (MULLIS, FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988; MULLIS, 1990).

A técnica é composta basicamente em três etapas: a dupla fita de DNA é desnaturada pelo calor; em seguida, cada *primer* (senso e anti-senso) anela a uma das fitas simples do DNA e após, ocorre o processo de extensão e polimerização da fita, a partir da adição de nucleotídeos e ação da Taq DNA polimerase (ERLICH, 1995).

No processo da PCR, o DNA é desnaturado a 94-97°C, os *primers* são hibridizados a 50-65°C e, posteriormente, a síntese de DNA é realizada com DNA-polimerase e desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) a 72°C. A repetição dessas etapas, ocorre entre 25 a 45 ciclos e permite a amplificação de milhares de segmentos específicos de DNA (PASSAGLIA; ZAHA, 2001).

É uma técnica específica, sensível, necessita de quantidades mínimas de material biológico, potencialmente aplicável para todos os vírus, rápida, e automatizável, apresenta como desvantagem o alto custo e a necessidade de equipamentos e pessoal treinado (FLORES, 2007).

No LAVIAN a técnica é utilizada para fins de pesquisa e ensino, seu uso na rotina é impossibilitado tendo em vista os custos operacionais. Foi possível acompanhar essa técnica com o discente de doutorado do LAVIAN, para pesquisa de BoAHV 1 e 5, com processamento de 180 amostras, e para pesquisa de *Helicobacter* sp., com processamento de 51 amostras.

1.2.6. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

O teste imunoenzimático (ELISA) pode ser utilizado para a detecção de antígenos virais e também de anticorpos. É uma técnica que apresenta vantagens, tais como: a boa sensibilidade, especificidade, baixo custo, repetibilidade e versatilidade (FLORES, 2007).

O princípio básico do ELISA é utilizar uma enzima para detectar ligações de antígenos (Ag) e anticorpos (Ac). A enzima converte um substrato incolor (cromógeno) em um produto colorido, indicando a reação Ag-Ac. Geralmente, é usada placa de superfície inerte com poços onde serão adsorvidos os antígenos ou anticorpos de interesse juntamente com um tampão de carbonato, esse processo é a sensibilização, depois é realizada uma lavagem, posteriormente é feito bloqueio com uma proteína, para que esta ocupe os espaços livres em cada poço da placa, reduzindo os sítios inespecíficos que podem gerar falsos-positivos ou negativos. Na realização

do teste uma nova lavagem é realizada, a superfície é exposta a amostra contendo antígenos ou anticorpos alvos e a reação antígeno-anticorpo ocorre (POSSAS, 2014).

É uma técnica rápida, sensível, automatizável, disponível em *kits* comerciais, pode detectar classes específicas (IgG, IgM, etc.). Suas limitações são necessidade de equipamentos, *kits* comerciais podem ter alto custo, não disponível para todos os vírus, qualidade do antígeno é crítica (FLORES, 2007)

Foi possível acompanhar essa técnica com a discente de doutorado, no processamento de 460 amostras para diagnóstico de Schmallerberg.

1.3. Biossegurança Laboratorial

1.3.1. Biossegurança e Manutenção

Os cuidados básicos de biossegurança são realizados diariamente, sendo uma disciplina obrigatória da residência.

A manutenção com relação à limpeza dos equipamentos é realizada periodicamente, seguindo as etapas descritas nos Procedimentos Operacionais Padrão (POP's).

A organização do espaço físico do laboratório, também é uma atribuição de toda a equipe.

1.3.2. Elaboração dos Procedimentos Operacionais Padrão

Os POP's são procedimentos escritos de forma objetiva que estabelecem instruções sequenciais para a realização de operações rotineiras e específicas (BRASIL, 2004).

Durante o período de residência, foi necessário a elaboração de POP's para otimização dos processos e melhor funcionamento do LAVIAN.

1.3.3. Elaboração de Instruções de Trabalho (IT)

A Instrução de Trabalho é uma ferramenta para documentar ou padronizar tarefas específicas e operacionais. Com ela você faz a descrição e também a ilustração de como fazer determinado processo. Fornece padronização das atividades, mantém o trabalho sendo realizado sempre da mesma forma, maior qualidade na execução das tarefas (SEBRAE, 2018).

Durante a vivência foram elaboradas IT's de duas das principais técnicas do laboratório, Virusneutralização e Titulação Viral (Apêndices I e II).

1.3.4. Coleta, preservação, transporte, recebimento e envio de amostras.

Durante a vivência da residência, os residentes aprendem sobre coleta, preservação, transporte e envio de amostras biológicas, bem como quais critérios para o recebimento devem ser adotados.

1.3.5. Banco de Amostras Biológicas

Iniciamos o banco de soros do LAVIAN, para possibilitar e facilitar pesquisas posteriores, até o momento o banco conta com 44 amostras de soros felinos, provenientes de felinos do projeto de pesquisa “Estudo epidemiológico das infecções virais de cães e gatos atendidos no Hospital Escola Veterinário da UFRPE em Recife, Pernambuco”.

O banco de amostras biológicas está previsto no projeto de pesquisa “Estudo epidemiológico das infecções virais de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE em Recife, Pernambuco”, as amostras após o processamento e realização do diagnóstico são armazenadas a uma temperatura de -20°C. São identificadas com nome ou número do animal, data da coleta e cadastradas no sistema contendo as informações sobre o animal e tutor, fornecendo assim a rastreabilidade da amostra.

1.4. Atividades de Ensino, Pesquisa e Extensão

1.4.1. Ensino

1.4.1.1. Participação em Aulas Práticas

Durante o período de residência foi possível participar e auxiliar as aulas práticas dos discentes do 8º período de Medicina Veterinária, na disciplina de Víruses dos Animais Domésticos, nos turnos diurno e vespertino. Os discentes de graduação usaram os Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) e puderam conhecer as instalações do LAVIAN e praticar algumas técnicas, como IDGA, ELISA e fazer treinamentos de precisão, executando a pipetagem com corante, sem nenhum risco biológico.

1.4.1.2. Seminários apresentados à equipe do LAVIAN

Mensalmente, a equipe do LAVIAN se reunia para apresentação de seminários, o R1 abordava o tema do seminário e o R2 resolvia um caso clínico referente ao tema do seminário. Diversos temas foram abordados, tais como: PCR, ELISA, IDGA, cultivo celular, soroneutralização, isolamento viral, biossegurança.

1.4.1.3. Organização de Eventos

Uma das atribuições do Residente do LAVIAN é organizar um evento por ano em conjunto com os residentes da Saúde Pública.

1.4.1.3.1. Simpósio de Víruses Emergentes no Contexto da Saúde Única

O I Simpósio de Víruses Emergentes no Contexto da Saúde Única ocorreu nos dias 03 e 04 de dezembro de 2019, no Auditório da Biblioteca Setorial Manuel Correia de Andrade (BSMCA), localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco.

O público alvo do evento foi estudantes de Medicina Veterinária, Médicos Veterinários e demais profissionais da área de saúde com o objetivo de promover educação contínua e continuada em saúde. Muitos profissionais da Vigilância em Saúde do Recife estiveram presentes.

Foram ministradas palestras com os temas: Morcegos, Áreas Urbanas e Raiva: Desafios e Perspectivas na Otimização da Vigilância Epidemiológica; Desafios no Controle da Hantavirose; Manejo Integrado de Escorpiões e Programa de Controle de Roedores no Município do Recife. O evento foi um sucesso. No ato do credenciamento cada participante levou 1kg de alimento não perecível que foi posteriormente doado ao Lar Batista para Anciãos, localizado na Rua Azeredo Coutinho, n 287, Várzea, Recife-PE.

O evento é sempre acolhido pela comunidade acadêmica e por trabalhadores da Secretaria de Saúde do Recife, principalmente os Agentes de Saúde Ambiental e Controle de Endemias (ASACE), e muitos Médicos Veterinários de diversas áreas.

No ano de 2020 infelizmente não foi possível à organização do evento devido à pandemia.

1.4.2. Pesquisa

1.4.2.1. Projetos de Pesquisa

O projeto de pesquisa intitulado “Estudo epidemiológico das infecções virais de cães e gatos atendidos no Hospital Escola Veterinário da UFRPE em Recife, Pernambuco”, foi elaborado em parceria com os residentes de viroses, graduandos e professores. O projeto foi aprovado e está em plena execução por um bolsista de Iniciação Científica e colaboração dos residentes.

1.4.2.2. Teste imunocromatográfico para detecção dos anticorpos (IgG) anti-Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e antígeno da Leucemia Felina (FeLV)

Alere FIV/FeLV *test kit*®, é um teste rápido para detecção de anticorpo (IgG) anti-FIV e antígeno da FeLV, o teste foi introduzido na rotina clínica do Hospital Escola Veterinário (HOVET) no mês de dezembro de 2020. Foi elaborado um protocolo com os critérios de inclusão e exclusão para realização dos testes e disponibilizado para os clínicos do HOVET.

Foi elaborado um questionário epidemiológico para aplicação junto aos tutores que ajudará na elucidação de fatores de riscos dessas infecções.

Os testes imunocromatográficos auxiliam os clínicos em suas rotinas e os residentes de viroses, que estreitam a relação com a parte clínica da residência.

1.4.2.3. Teste imunocromatográfico para detecção do Antígeno da Cinomose Canina

Alere Cinomose Ag *Test Kit*® é um teste rápido para detecção de antígeno da Cinomose canina que utiliza o método imunocromatográfico. O teste foi introduzido na rotina clínica do HOVET no mês de dezembro de 2020. Foi elaborado um protocolo com os critérios de inclusão e exclusão para realização dos testes e disponibilizado para os clínicos do HOVET.

A cinomose é uma das principais doenças de caninos filhotes, a introdução desses testes aumenta a vivência dos residentes com relação à clínica da doença, além de aperfeiçoar a

capacidade técnica do residente, proporcionando o conhecimento de técnicas utilizadas na rotina da clínica.

1.4.3. Extensão

1.4.3. Projeto de Extensão – Ano 2020

Foi possível contribuir para a elaboração de projetos. O projeto “Capacitação dos produtores de caprinos com aptidão leiteira da região Agreste de Pernambuco sobre a Artrite-encefalite Caprina”, foi aprovado e não entrou em execução por causa da pandemia, conta com o apoio dos residentes como colaboradores.

2. Atividades realizadas no Sistema Único de Saúde - Vigilância em Saúde e Núcleo Ampliado de Saúde da Família (NASF)

Os residentes desenvolveram atividades na Vigilância em Saúde, e desta forma contribuíram com o SUS. O período de vivência foi de três meses, passando quatro semanas na Vigilância Ambiental, quatro semanas na Vigilância Epidemiológica e quatro semanas na Vigilância Sanitária. O Médico Veterinário na Vigilância em Saúde trabalha com promoção e prevenção à saúde, orientando, promovendo educação permanente e continuada em saúde, coordenando as ações e pensando em estratégias. Várias atividades de visitação e orientações foram realizadas em cada uma das vigilâncias, com o olhar voltado à saúde da população, e sem esquecer a saúde do trabalhador e o equilíbrio ambiental. Buscou-se minimizar os riscos e promover saúde à população. As vivências refletem de forma positiva na experiência do Médico Veterinário e da sua visão do Sistema Único de Saúde (SUS), além de poder observar na prática como atua um Médico Veterinário na Vigilância em Saúde.

O Distrito Sanitário II abrange os 18 bairros relatados a seguir: Alto Santa Terezinha, Água Fria, Arruda, Beberibe, Bomba do Hemetério, Campo Grande, Cajueiro, Campina do Barreto, Dois Unidos, Fundão, Hipódromo, Linha do Tiro, Ponto de Parada, Porto da Madeira, Peixinhos, Rosarinho, Torreão e Encruzilhada. Este possui uma área de 1430km², população residente de 235045 habitantes. É dividido em 3 micro regiões: micro região 1, micro região 2 e micro região 3 (RECIFE, 2018).

O tempo de estágio foi dividido em três partes: As quatro primeiras semanas (22/04/2019 - 17/05/2019) foram dedicadas à Vigilância Ambiental. Nas quatro semanas subsequentes as atividades foram desenvolvidas na Vigilância Epidemiológica (20/05/2019 - 14/06/2019). As quatro últimas semanas (17/06/2019 - 12/07/2019) foram reservadas para funções na Vigilância Sanitária.

2.1. Vigilância Ambiental

O setor de Vigilância Ambiental do Distrito Sanitário II possui uma equipe multidisciplinar composta por: 1 técnica de saneamento, 1 Médica Veterinária, 1 supervisora de logística, 11 supervisores de campo e 4 supervisores de monitoramento. Conta ainda com alguns agentes de combate a endemias (ASACEs).

Dentre as funções do setor de Vigilância Ambiental, destacam-se o combate a endemias, controle de pragas, monitoramento e bloqueio de arboviroses e monitoramento das águas para consumo humano pelo Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (VIGIAGUA).

As atividades exercidas são divididas em: atividades internas e atividades de campo/externas realizadas mediante o conhecimento de demandas pelas denúncias de ouvidorias e pessoalmente, bem como pelas informações coletadas pelos ASACEs.

Abaixo são pontuadas as principais atividades internas e externas:

Atividades internas:

- Alimentação de dados de arboviroses e filariose;
- Planejamento de atividades;
- Levantamento de materiais necessários para execução das atividades de campo;
- Articulações com setores interligados como coordenação de saúde do idoso e a Unidade de Vigilância de Zoonoses (UVZ);
- Planejamento de campanhas de vacinação antirrábica;
- Redação de relatórios das visitas técnicas;

Atividades externas:

- Visitas a acumuladores/criatório de animais;

- Visitas a acumuladores de lixo;
- Coletas de amostras de água e aferição do cloro total;
- Abastecimento de material na UVZ para trabalho de campo que vão desde larvicidas a objetos necessários para execução dos trabalhos;
- Dedetização;
- Entrega de materiais em pontos de apoio dos ASACES;

O Médico Veterinário na Vigilância em Saúde não exerce a função de clínico, necessitando de articulações com a Médica Veterinária que atua na clínica da UVZ. Essa articulação permite o diagnóstico e tratamento de algumas doenças observadas, como sarna, rinotraqueíte viral felina, bem como a infestação de pulgas e carrapatos. Durante a vivência foram observadas a prescrição de alguns medicamentos para algumas dessas doenças pela Médica Veterinária da UVZ.

Dentre as atividades desenvolvidas, o mapeamento dos criatórios, realizado no *software* Excel®, com endereço, quantidade de animais, contato de familiares, entre outras informações, aumenta a possibilidade do controle do território, mantendo constante a visitação nesses pontos. É importante salientar que o ato de acumular animais sem as mínimas condições de bem estar animal é um distúrbio psicológico que precisa de acompanhamento constante.

O VIGIAGUA faz o monitoramento das águas. São 25 subsistemas avaliados. São realizadas 16 coletas mensais, utilizando sacos estéreis de 500mL e 100mL (com tiosulfato de sódio), para análise físico-química e microbiológica. As coletas são realizadas diretamente da torneira de chegada (na torneira que vem direto da Companhia Pernambucana de Saneamento (COMPESA) é realizada a limpeza da torneira com álcool e algodão), também é realizada análise direta do nível de cloro na água com *kit* cloro livre total portátil. A pesquisa do *Vibrio cholerae* é feita por uma técnica de amarrar em um fio de *nylon* uma estrutura estéril chamada de mecha e submersão no canal. A cada 15 dias a mecha é jogada em vários pontos de canais pelo território, retirada após três dias e enviada para o Laboratório Municipal do Recife Julião Paulo.

2.2. Vigilância Epidemiológica

O setor da Vigilância Epidemiológica do Distrito Sanitário II possui equipe multidisciplinar, formada por: 1 dentista, 1 enfermeira, 1 médica, 1 bióloga, 2 técnicas de enfermagem, 1 técnica de saúde bucal e 1 digitador. Dentre as funções da Vigilância Epidemiológica, destaca-se a detecção, prevenção e controle de doenças ou agravos. Constitui-se como instrumento de planejamento, organização e operacionalização dos serviços de saúde. As atividades exercidas são divididas em atividades internas e externas.

Atividades internas:

- Análise e preenchimento de fichas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN);
- Planejamento de atividades, como bloqueios;
- Análise de dados;
- Agendamento de coletas e investigações diversas;
- Acompanhamento de tratamento antirrábico;
- Discussão de óbito materno infantil/fetal;
- Investigação de doenças;
- Discussão de óbito por tuberculose;
- Investigação de óbitos por tuberculose;

Atividades externas:

- Coletas de amostras;
- Bloqueio territorial de agentes causadores de doenças;

- Investigação de óbito;
- Investigação de abandono de tratamento tuberculose e hanseníase;
- Investigação de doenças;
- Busca ativa de pacientes;
- Busca de contactantes;

Protocolo antirrábico, quando o usuário é mordido por cão ou gato, ainda que o animal seja do usuário, dependendo do local da mordida (ferimentos na cabeça, face, pescoço, mãos, polpas digitais e plantar do pé) o usuário deve ser vacinado e receber o soro. A observação de animais só é recomendada nos casos de caninos e felinos, pois o ciclo do vírus nesses animais é previamente estabelecido. Os animais são observados por dez dias, e é fornecida pelo menos duas doses da vacina. Se em dez dias o animal não fugir impedindo a observação, nem for a óbito, o esquema pode ser suspenso. Em casos dos óbitos dos animais são administradas as quatro doses da vacina (nos dias 0, 3, 7, 14). O atendimento antirrábico humano gera uma ficha de notificação do SINAN sendo realizado o acompanhamento das pessoas que são mordidas. Acidentes leves (ferimentos superficiais, pouco extensos, geralmente únicos), lava-se com água e sabão, e o animal é observado por 10 dias. Se em 10 dias o animal permanecer sadio, este não precisa tomar vacina (BRASIL, 2014). Se o animal desaparecer ou se tornar raivoso administra-se quatro doses da vacina no usuário. Após a vivência do SUS, precisaram de ajuda para a campanha antirrábica do ano de 2019 no Distrito Sanitário II, foram vacinados mais de 300 animais no posto de apoio.

O acompanhamento desses atendimentos é realizado para averiguar se os usuários estão indo tomar as vacinas. Liga-se perguntando o estado de saúde do usuário, se o animal está vivo (quando há a possibilidade de observação do animal), caso o animal esteja vivo depois dos 10 dias de observação e orienta-se a suspender a vacinação. Nos casos de re-exposição, de acordo com a quantidade de doses já tomadas, recomenda-se apenas a complementação das doses.

Na Vigilância Epidemiológica a equipe atua como investigadora de doenças e seus ciclos epidemiológicos, atuando para eliminar esses ciclos. A atualização tem que ser constante, saber os sintomas das doenças, fazer bloqueios de contactantes, investigar óbitos, conhecer o território. A monitoração das Doenças Diarreicas Agudas (DDA) é realizada semanalmente, os mais afetados são crianças e idosos, porém a ficha não especifica idosos de adultos,

apresentando uma lacuna para investigação mais detalhada. As fichas de notificações de sífilis são geradas com base na tabela recebida e enviadas para o nível central. A organização dos arquivos de casos de tuberculose e sífilis também são atividades da equipe.

O preenchimento correto das fichas de notificação é um ponto crucial para o trabalho. A falta de um contato telefônico pode significar a necessidade de uma busca ativa desses usuários.

Durante a vivência na VE foi possível acompanhar investigações de óbitos por tuberculose, visitou-se a residência do usuário, foi realizada a busca por contactantes e solicitação para que procurem Unidade Básica de Saúde (UBS) e façam os exames pertinentes. Ligações para pacientes com Infecção Latente de Tuberculose (ILTb) foram realizadas com o objetivo de saber se estão dando continuidade ao tratamento, quantas doses tomaram, e se tinham data de reavaliação marcada. Essas ligações servem de reforço para que os usuários não desistam do tratamento. A falta de organização da numeração em algumas ruas dificulta as buscas ativas, números repetidos, complicam e muito o trabalho de busca da vigilância.

Discussões de óbito por tuberculose foram realizadas, três óbitos foram discutidos. Discussões de óbitos fetais e neonatais também foram realizadas. Os pontos mais importantes foram evidências de que o aumento de óbito se deve à sífilis e infecção do trato urinário, problemas que poderiam ser evitados. O intuito das reuniões são detectar falhas e estabelecer estratégias. A reunião não tem caráter punitivo, buscam-se falhas na infraestrutura ou profissionais e tenta-se corrigi-las.

2.3. Vigilância Sanitária

O setor de Vigilância Sanitária do Distrito Sanitário II possui uma equipe multidisciplinar composta por: 2 técnicos de saneamento, 4 Médicos Veterinários , 2 farmacêuticas, 1 química e 1 enfermeira. Dentre as funções do setor de Vigilância Sanitária, podemos destacar a promoção e proteção à saúde da população, eliminação, diminuição ou prevenção de riscos à saúde individual e coletiva, intervenção nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção, da circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde.

As atividades exercidas foram divididas em: atividades internas e atividades de externas realizadas mediante o conhecimento de demandas pelas denúncias telefônicas, buscas ativas e renovação de licenças.

Atividades internas:

- Formação de processo;
- Planejamento de atividades;
- Recebimento e conferência de documentação;

Atividades externas:

- Visitas estabelecimentos;
- Buscas ativas;
- Elaboração de auto de infração;
- Entregas de auto de infração;

Por possuir carro próprio, a Vigilância Sanitária, diferente das demais, realizava visitas diárias, mais precisamente de segunda a sexta. Estabelecimentos como farmácias, padarias, academias, lojas de conveniência, restaurantes, bares, escolas, bombonieres, depósitos de água mineral, salões de beleza, consultórios médicos, clínicas populares, consultórios dentários, supermercados, entre outros estabelecimentos são visitados diariamente. As visitas são realizadas sem aviso prévio e tem como objetivo observar as condições físicas e higiênicas do ambiente. Possíveis riscos à saúde do trabalhador também devem ser levados em consideração. Os banheiros devem estar limpos, deve haver insumos que possibilitem higienização desses profissionais como: presença de pia, sabão líquido, papel toalha. A água mineral sobre estrado, janelas teladas e localização adequada da copa.

As irregularidades observadas geraram autos de infração. O responsável pelo estabelecimento deve cumprir todos os requisitos pontuados no período pré-estabelecido, que dependendo da irregularidade pode variar de 15 a 30 dias. Os tempos mais curtos são aplicados nos casos em que a falta de higiene oferece alto risco à população. A inspeção da documentação é realizada pelos fiscais, assim como a observação da validade e acomodação dos produtos.

2.4. Atividades em Saúde Pública – NASF durante a pandemia da COVID-19

Durante a pandemia da COVID-19, como parte das atividades do programa da residência na área profissional de saúde em Medicina Veterinária, foram desenvolvidas atividades de maio a novembro de 2020 em Saúde Pública, na cidade de Camaragibe, no Núcleo Ampliado de Saúde da Família - NASF do território 3, composto por 9 unidades de Saúde da Família, são elas São João e São Paulo, Santana, Paulo Afonso, João Paulo II, Celeiro, Céu azul, Expansão Timbi, Burrione e Timbi. A equipe do NASF 3 é composta por 2 educadores físicos, 2 fisioterapeutas, 1 psiquiatra, 1 psicóloga, 1 fonoaudióloga e 1 nutricionista.

A pandemia proporcionou a observação de atividades atípicas, porém foi diante da adversidade que conseguimos ver o papel fundamental que o NASF tem na saúde da população. Na cidade de Camaragibe, o NASF é pilar da atenção básica, fornecendo o apoio para as atividades diárias de diversos profissionais. O NASF proporciona à população melhores condições de saúde, em uma relação estreita com o território. Trata-se de uma equipe que conhece detalhadamente o território e os problemas enfrentados.

A realocação dos residentes para o Serviço de Saúde foi motivada para atender as demandas da população em meio à pandemia da COVID-19.

As atividades de orientação à população com relação ao uso correto dos Equipamentos de Proteção Individuais (EPI's) foi uma das principais atividades, sala de espera, ainda que para uma única pessoa, reuniões em grupo, acompanhamento dos profissionais e visitas domiciliares. O cadastro do E-sus também foi uma atividade bem corriqueira da equipe.

Muitos casos suspeitos de esporotricose foram observados, necessitando do diagnóstico confirmatório, que é realizado por profissional da Vigilância em Saúde, assim como o acompanhamento do caso. O tratamento é de total responsabilidade do tutor, assim como os custos com medicamentos. Nota-se que a situação se complica por falta de transporte para que os responsáveis pelos testes consigam atender a demanda em tempo.

Os residentes forneceram apoio para o NASF no momento crítico da pandemia, e foram incluídos na estratégia “O Brasil conta comigo”, pois passaram a desenvolver estratégias de combate ao coronavírus, em forma de material de apoio como vídeos, panfletos, conversas e orientações à população.

- **Capítulo II – Prevalência da Infecção pelo Vírus da Cinomose (CDV) em Caninos de Abrigos na Região Metropolitana do Recife, PE**

RESUMO

Objetivou-se com esta pesquisa avaliar a prevalência da infecção pelo Vírus da Cinomose Canina (CDV) em caninos de abrigos na região metropolitana do Recife, Pernambuco. Foram visitados dois abrigos e 45 caninos foram amostrados, por conveniência. Foram coletados *swabs* de secreção ocular para pesquisa de antígeno viral e os testes foram realizados no Laboratório de Virologia Animal (LAVIAN). Utilizou-se o teste comercial Alere Cinomose Antígeno (Ag) Test Kit®. A prevalência geral foi de 13,33% e a prevalência por abrigo foi de 21,46% no abrigo A e 0% no abrigo B. Considerando os resultados obtidos, observa-se a ocorrência da infecção pelo CDV em caninos de um dos abrigos da região metropolitana do Recife. Desta forma, medidas de manejo como a introdução de quarentena devem ser implementadas com o intuito de diminuir os riscos da ocorrência da doença.

PALAVRA-CHAVE: Cinomose, Vírus da Cinomose Canina, cão, abrigo, prevalência.

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the prevalence of Canine Distemper Virus (CDV) infection in canines from shelters in the metropolitan region of Recife, Pernambuco. Two shelters were visited and 45 dogs were sampled by convenience. Ocular secretion swabs were collected for viral antigen testing and the tests were performed at the Laboratory of Animal Virology (LAVIAN). The commercial Alere Cinomose Antigen (Ag) Test Kit® was used. The overall prevalence was 13.33% and the prevalence per shelter was 21.46% in shelter A and 0% in shelter B. Considering the results obtained, we observed the occurrence of CDV infection in canines from one of the shelters in the metropolitan region of Recife. Thus, management measures such as the introduction of quarantine should be implemented in order to reduce the risks of the occurrence of the disease.

KEY WORDS: Canine distemper, canine distemper virus, dog, shelter, prevalence.

INTRODUÇÃO

A cinomose é uma doença infecciosa altamente contagiosa, possui distribuição mundial e mantém altos índices de mortalidade. Acomete geralmente os animais da ordem Carnívora, entre eles: caninos, raposas, guaxinins, gambás, jaguatirica, lobos, hienas, leões, tigres, pandas, focas, entre outros (CUBAS et al., 2014; JERICÓ et al., 2015). O vírus da Cinomose Canina (CDV) é um RNA vírus da família *Paramyxoviridae*, do gênero *Morbillivirus*, de fita simples, simetria helicoidal e envelopada (RIMA, 2019).

O CDV possui um largo espectro de hospedeiros, sendo capaz de acometer diversas espécies de mamíferos (GREENE; APPEL, 2006). Acomete caninos e uma ampla variedade de animais terrestres e aquáticos (CARVALHO et al., 2012).

A escassez de estudos epidemiológicos e, conseqüentemente, de informações sobre a ocorrência dessa infecção, dificulta a adoção de novos métodos de controle contra a doença (DEZENGRINI, 2006; MARTINO et al., 2004). Estudos epidemiológicos realizados no Brasil indicam uma prevalência variando de 3,54% (FREITAS-FILHO et al., 2014) a 90,38% (LÚCIO et al., 2014). No estado de Pernambuco duas pesquisas foram realizadas, no município de Garanhuns, onde 90,38% (94 /104) das amostras analisadas foram positivas (LÚCIO et al., 2014) e em Recife, onde detectou-se uma prevalência de 27,4% (40/146) pela RT-PCR, em caninos atendidos no Hospital Escola Veterinário da UFRPE (SILVA et al., 2018).

Os animais acometidos pelo vírus da cinomose canina eliminam o agente nas excreções corporais, como urina, fezes, saliva, placenta e secreção respiratória, podendo ou não apresentar sinais clínicos, tornando-se importantes na cadeia epidemiológica da doença como fonte de infecção para animais saudáveis (AMUDE et al., 2006; SAITO et al., 2006; NEGRÃO et al., 2007).

A enfermidade ocorre mais em animais não vacinados, e é mais frequente quando cessa a imunidade passiva transmitida pela mãe via colostro, geralmente entre os 60 e 90 dias de vida, e não há imunização adequada. Entretanto, o vírus pode infectar animais em qualquer faixa etária e não há predileção por raça ou sexo, de modo que infecção pode ser observada em qualquer idade, raça e sexo (FREITAS-FILHO et al., 2014).

Abrigos, canis, lojas de animais e clínicas veterinárias constituem ambientes propícios à disseminação do vírus, devido às condições de estresse e adensamento populacional de animais nestes locais (BIRCHARD e SHERDING, 2003). Objetivou-se com esta pesquisa determinar a prevalência da infecção pelo CDV em caninos de abrigos da região metropolitana do Recife, tendo em vista que não há dados e os animais em situação de rua e de abandono são os mais infectados pelo CDV.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética ao Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), segundo a Resolução n. 436/2005 (Licença 7025070520) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), segundo a Resolução 466/2012-CNS/CONEP (CAAE: 32096720.4.0000.9547; parecer nº 4112652).

Área de estudo

O estudo foi realizado em dois abrigos de animais na região metropolitana do Recife, um dos abrigos no bairro de Aldeia, cidade de Camaragibe e outro no bairro de Cajueiro, cidade do Recife, PE. A escolha dos abrigos foi realizada por conveniência não probabilística.

Desenho amostral

A cidade do Recife Latitude: -8.05428, Longitude: -34.8813 8° 3' 15" Sul, 34° 52' 53" Oeste, possui população estimada em 1.537.704 habitantes, superfície 218,843 km². Densidade demográfica de 7039,64 hab/Km².

A cidade de Camaragibe Latitude: 8° 1' 14" Sul, Longitude: 34° 58' 54" Oeste, possui população estimada em 158.899 habitantes, 51,2 km². Densidade demográfica é de 2.818,46 hab/km².

Para compor a amostra do estudo da prevalência foi considerado um total de 180 mil caninos e gatos no total (Prefeitura da Cidade do Recife, 2018) e uma prevalência esperada de

90,38 (LÚCIO et al., 2014), utilizando o intervalo de confiança de 95% e margem de erro estatístico de 10%. O tamanho total mínimo de amostra a ser coletado foi 34 animais. Para esta pesquisa foram amostrados 45 caninos., 28 no abrigo A e 17 no abrigo B.

Escolha dos animais

Foram realizados 45 testes em caninos de abrigos da região metropolitana do Recife, sendo escolhidos animais que apresentaram um ou mais sinais clínicos da doença, ou que tiveram contato com animais doentes. Para preservar a identidade dos cuidadores identicou-se os abrigos em A e B.

Os animais foram escolhidos para a realização do teste rápido quando atenderam os seguintes critérios: contato com animais positivos, ou quando apresentavam um ou mais sinais clínicos (mioclonia, secreção ocular ou conjuntivite, sinais respiratórios, sinais neurológicos, vômito ou diarreia).

Crítérios de inclusão: animais que tiveram contato com animais sabidamente positivos ou caninos com um ou mais sinais clínicos sugestivos da infecção pelo CDV.

Crítérios de exclusão: para o estudo não foram incluídos critérios de exclusão.

Coleta de amostras biológicas

A coleta de secreção ocular foi realizada com *swab* embebido de solução salina (cloreto de sódio 0,9%) na conjuntiva do animal, o método de coleta foi minimamente invasivo, o *swab* foi introduzido na conjuntiva embebido com a solução salina e realizou-se movimentos giratórios no sentido horário e anti horário . Posteriormente a amostra foi colocada em recipiente térmico contendo bateria de gelo reutilizável e encaminhada ao Laboratório de Virologia Animal (LAVIAN), para a realização do teste.

Realização dos testes diagnósticos

Foram utilizados testes imunocromatográficos (testes rápidos) para o diagnóstico de Cinomose (ALERE®), usando o Alere Cinomose Ag *Test Kit*®, seguindo todas as especificações e recomendações do fabricante. Os testes foram realizados no LAVIAN.

Para análise dos resultados foram calculadas as frequências relativa e absoluta dos resultados obtidos nos testes imunocromatográficos de acordo com Sampaio (1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras analisadas, 13,33% (6/45) foram reagentes. Esses resultados são inferiores aos relatados por Lúcio et al (2014), que determinaram uma prevalência de 90,38% (94/104) em caninos da cidade de Garanhuns, tais divergências podem ser justificadas pela diferença nos métodos de diagnóstico, visto que Lúcio et al. (2014) realizaram métodos indiretos para detectar anticorpos para o CDV, diferente desse estudo que detectou antígeno. , O diagnóstico clínico é sugestivo, porém do ponto de vista epidemiológico e virológico, a confirmação deve ser realizada por métodos laboratoriais.

Ao analisar a distribuição da prevalência por abrigos observou-se maior prevalência no abrigo A, onde foram testados 28 animais, sendo 6 (21,43%) reagentes para o CDV e no abrigo B 0% (0/17). Dos 28 animais testados no abrigo A 11 (39,29%) eram filhotes de até um ano de idade e 17 (60,71%) eram adultos. Dos 6 animais positivos, 5 (cinco) (83,33%) eram filhotes (até um ano de idade) e 1 (16,67%) era adulto (de 1 a 9 anos de idade), de acordo com a literatura internacional (GOLDSTON; HOSKINS, 1999). Os caninos do abrigo A e seus pais não possuíam histórico de vacinação polivalente. A predominância da infecção em filhotes está de acordo com Jóźwik e Frimus (2002), onde afirmam que filhotes são mais susceptíveis. A perda da imunidade passiva derivada da mãe provavelmente é a causa dessa maior susceptibilidade.

No abrigo A apesar de alguns animais estarem separados por boxes, outros ficavam soltos no terreno, tendo acesso a casa e a rua, pois os animais pulavam o muro. O animal sabidamente positivo para cinomose do abrigo ficava trancado em um dos quartos da casa, porém os animais de trânsito irrestrito tinham acesso a casa, aumentando a chances de contato com vírus por aerossóis.

A vacina é o método profilático mais indicado, vacinar os filhotes entre 6 e 8 semanas de idade, com intervalos a cada 3 a 4 semanas até completarem 14 a 16 semanas de idade, totalizando quatro doses da vacina. Na anamnese foram fornecidas informações relevantes, entre elas que no abrigo A não fazia esquema de quarentena e não possuía um lugar isolado para realizar quarentena, os animais estavam sem vacinação. Os prejuízos decorrentes do

adoecimento dos animais e o risco de morte superam as prováveis questões financeiras, a vacinação deve sempre ser uma prioridade.

No abrigo B foram testados 17 animais (10 filhotes e 7 adultos) e nenhum dos animais foi positivo (0%). O abrigo B teve histórico de casos positivos em dezembro, alguns animais apresentavam hiperkeratose do focinho e de coxins plantares, porém essas lesões não são patognomônicas de cinomose. Os resultados negativos para o antígeno da cinomose não significam que os animais não tiveram contato com o vírus, para aprofundar a investigação clínica-epidemiológica se faz necessária a testagem dos animais quanto à presença de anticorpos para cinomose. No abrigo B todos os animais ficavam em boxes separados, não tinham acesso à rua, a área do abrigo contava com um terreno amplo com duas casas separadas, uma principal onde a cuidadora mora e outra casa ao lado do canil com térreo e primeiro andar. Em dezembro/2020 quando ocorreram os casos houve o isolamento dos animais positivos, e todos os outros animais ficaram concentrados nos dois últimos boxes com uma distância razoável, houve o fechamento para novos animais. Todo o canil foi limpo com solução com cloro, que ainda hoje vem sendo usada no terreno, também foi utilizado o desinfetante Herbalvet®, a base de cloreto de benzalcônio. Os animais infectados liberam o vírus por todas as secreções e excreções, por isso a desinfecção do ambiente é de extrema importância.

Nesse estudo não foi possível avaliar a predisposição racial, pois os animais dos abrigos em sua maioria são sem raça definida (SRD) resgatados da rua, segundo Borba et al. (2002) há indícios que os caninos de rua, em comparação aos caninos de raça são provavelmente mais susceptíveis à infecção pelo vírus da cinomose, essa maior susceptibilidade se deve ao fato de animais de rua não serem bem cuidados, não são vacinados e apresentam maior probabilidade de entrar em contato com partículas virais proveniente de outros caninos infectados.

Dos animais avaliados 51,11% (23/45) eram machos e 48,89% (22/45) eram fêmeas, entre os positivos 66,66% (4/45) eram machos e 33,33% (2/45) eram fêmeas, há considerável variação entre machos e fêmeas, diferente do achado por Borba et al. (2002), que não observaram predominância sexual. Apesar de encontrarmos diferenças significativas por sexo, vários autores já discutiram sobre o tema e não encontraram preferência por sexo. As medidas de manejo tomadas por um dos abrigos conseguiram interromper a cadeia de transmissão da doença, isso mostra que as medidas sanitárias tem importância fundamental para cessar a cadeia

de transmissão. A vacinação segue sendo a principal alternativa de prevenção, nos dois abrigos a vacinação ainda não é feita.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos, observou-se a ocorrência da infecção pelo CDV em caninos de um dos abrigos da região metropolitana do Recife. Desta forma, medidas de manejo como a introdução de quarentena devem ser implementadas com o intuito de diminuir os riscos da ocorrência da doença. A introdução de novos animais sem testagem prévia é um risco, desta forma, sugere-se que o teste de imunocromatografia pode ser adotado antes de introduzir novos animais nos abrigos.

REFERÊNCIAS

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo Celular. *In*: EPSJV (Ed.). . **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde**. [s.l: s.n.]. v. 2p. 215–253.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Antemortem Diagnosis of CDV Infection by RT-PCR in Distemper Dogs with Neurological Deficits without the Typical Clinical Presentation. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 6, p. 679–687, jul. 2006.

BARBOSA, J. M.; PASSOS, R. F. B. ANÁLISE DOS CASOS DE CINOMOSE NO H.V. SÃO FRANCISCO DE ASSIS DA FACULDADE LATINO AMERICANA - ANÁPOLIS-GO. **Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. XII, p. 139–150, 2008.

BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. **Manual Saunders - clinica de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 2003. 1783p.

BORBA, T. R. *et al.* Cinomose: dados epidemiológicos Maringá-PR (1998-2001). **Iniciação Científica - CESUMAR**, v. 4, n. 1, p. 53–56, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC no 216, de 15 de setembro de 2004**. Aprova o regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. Diário Oficial da União, Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Esquema para profilaxia da raiva humana pós-exposição com vacina de cultivo celular**, 2014. Disponível em: <https://sbim.org.br/images/files/esquema-de-profilaxia-da-raiva-humana.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2021.

CARVALHO, O. V. *et al.* Immunopathogenic and neurological mechanisms of canine distemper virus. **Advances in Virology**, v. 2012, 2012.

CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R. & DIAS, J. L. C. **Tratado de animais selvagens-medicina veterinária**. 2. Ed. São Paulo, Editora Roca, 2014.

DEZENGRINI R. 2006. **Soroprevalência de infecções víricas em caninos de Santa Maria, RS; e seleção e caracterização de linhagens celulares resistentes ao vírus da diarreia viral bovina.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006. 62p.

ERLICH. A.E. PCR. Tecnologic. In MEYERS, R.A. **Molecular biology and biotechnology.** A comprehensive desk reference. New York: Vch, 1995. p.641-648.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária.** Santa Maria: Editora UFSM, 2007.

FREITAS-FILHO, E. G.; ROBERTO, M. F. A.; DIAS, M. PREVALÊNCIA, FATORES DE RISCO E ASSOCIAÇÕES LABORATORIAIS PARA CINOMOSE CANINA EM JATAÍ-GO. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v. 10, p. 2356–2365, 2014.

GOLDSTON, R.T; HOSKINS, J. D. **Geriatrics e gerontologia em caninos e gatos.** São Paulo: Roca, 1999.

GREENE C.E. & APPEL M. Canine distemper. In: Greene C.E. (ed.) **Infectious Diseases of the Dog and Cat.** 3 rd ed. Elsevier, Amsterdam, 2006. p.25-41.

JERICÓ, M. M.; KOGIKA, M. M. & ANDRADE NETO, J. P. **Tratado de medicina interna de caninos e gatos.** Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2015.

JÓŹWIK, A.; FRYMUS, T. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 49, n. 9, p. 413–414, 2002.

KIM, D.; JEOUNG, S. Y.; AHN, S. J.; LEE, J. H.; PAK, S. I.; KWON, H. M., 2006. **Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs.** **Journal of Veterinary Medical Science** , 2006. 68 (8), 877–879.

LÚCIO, É. C. *et al.* Análise epidemiológica da infecção pelo vírus da cinomose, em cães do município de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p. 1323–1330, 2014.

MARTINO, P. E. *et al.* Serological survey of selected pathogens of free-ranging foxes in

southern Argentina, 1998-2001. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v. 23, n. 3, p. 801–806, 2004.

MOTTA, P. M. C. **Comparação da IDGA, ELISA e "NESTED" PCR no diagnóstico da anemia infecciosa em equinos, asininos e muarens**. 2007. 29f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2007.

MULLIS, K. B.; FALOONA, FRED A. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 579–582, 1987.

MULLIS, K.B. **Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction**. *Annales de Biologie Clinique*, 1990. v. 48, n. 8, p. 579-582.

NEGRÃO, F. J.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 253–257, 2007.

PASSAGLIA, L.M.P.; ZAHA, A. **Técnicas de DNA recombinante**. In: ZAHA, A. *Biologia molecular básica*. Porto Alegre: Mercado aberto, 2001. cap. 15, p. 307-331.

POSSAS, J. L. S. **Aplicação do conceito do erro total, dos perfis de exatidão e dos índices de exatidão na validação em uso de um imunoensaio para detecção de ovoalbumina em vacina contra febre amarela**. 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

RECIFE, Governo Municipal, Secretaria de Saúde do Recife, Secretaria Executiva de Coordenação Geral, **Plano Municipal de Saúde 2018 - 2021** / Governo Municipal, Secretaria de Saúde do Recife, Recife. Secretaria Executiva de Coordenação Geral, Diretoria Executiva de Planejamento, Orçamento e Gestão da Informação. _ 1ª. Ed. - Secretaria de Saúde do Recife, 2018. Disponível em:
http://www2.recife.pe.gov.br/sites/default/files/plano_municipal_de_saude_2018-2021_4.pdf. Acesso em: 13 jan. 2020

RIMA, B.; BALKEMA-BUSCHMANN, A.; DUNDON, W. G.; DUPREX, P.; EASTON, A.; FOUCHIER, R.; KURATH, G.; LAMB, R.; LEE, B.; ROTA, P.; WANG, L. and ICTV Report Consortium, 2019, ICTV Virus Taxonomy Profile: **Paramyxoviridae**, *Journal of General Virology*, 100:1593–1594.

SAIK, R. K. *et al.* Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, v. 239, n. 29, p. 487–491, 1987.

SAITO, T. B. *et al.* Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. **Research in Veterinary Science**, v. 80, n. 1, p. 116–119, 2006.



SILVA, V. C. L. DA *et al.* Detecção molecular, análise epidemiológica e de fatores de risco associados à infecção pelo vírus da cinomose canina em Recife, Pernambuco. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2018.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 1nd ed. Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. P. 221.

SEBRAE-RS - Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas do Estado do Rio Grande do Sul, **Instrução de Trabalho**, 2018. Disponível em: https://sebraers.com.br/wp-content/uploads/2019/01/e-book_-processos-instrucao-de-trabalho.pdf. Acesso em: 28 jan. 2021.

STEPHENS, Paulo Roberto Soares ; OLIVEIRA, Maria Beatriz Siqueira Campos de; RIBEIRO, Flávia Coelho; CARNEIRO, Leila Abboud Dias .Virologia. In: **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. v. 4. p. 125-220.

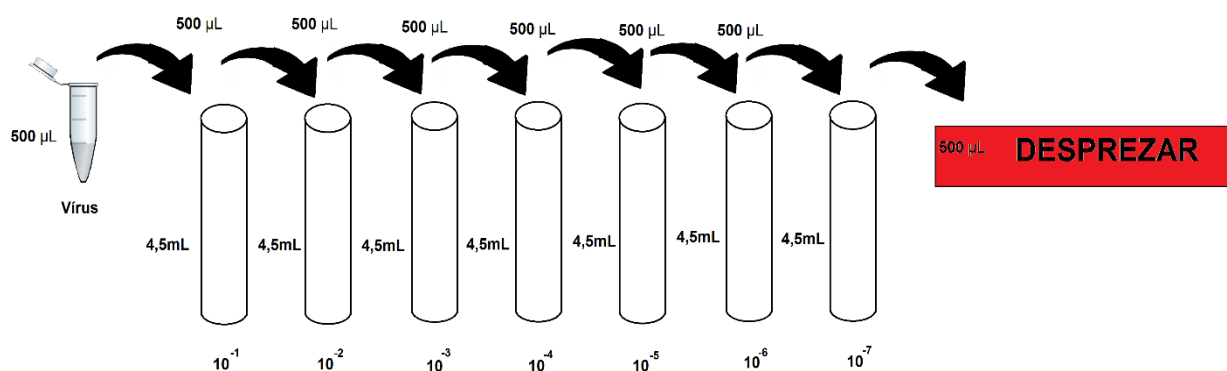
APÊNDICE I

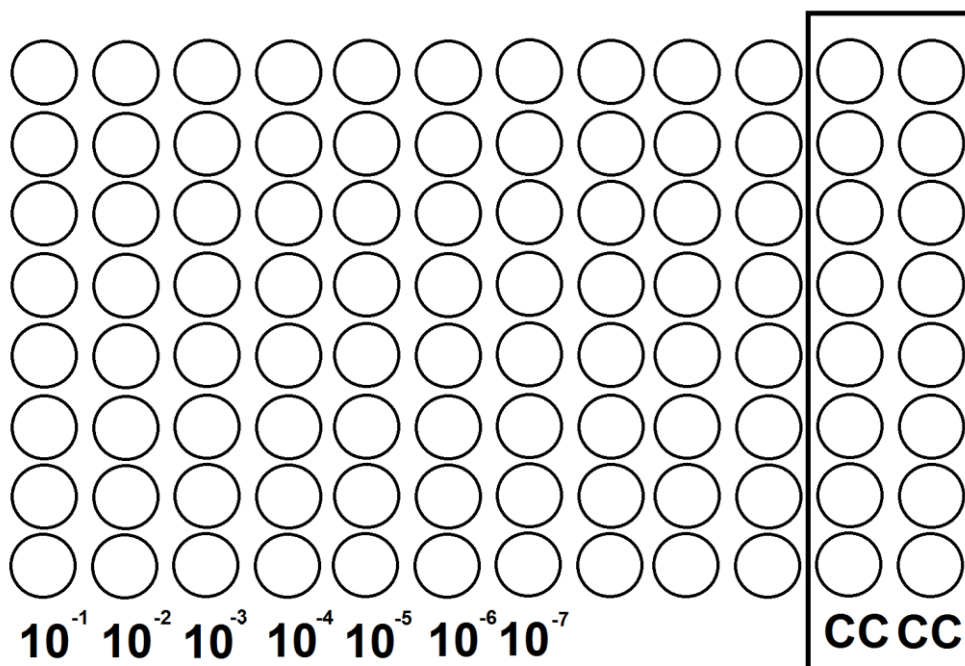
	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA - DMV ÁREA DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA LABORATÓRIO DE VIROLOGIA ANIMAL - LAVIAN	
INSTRUÇÃO DE TRABALHO		
Técnica: Titulação Viral		Nº: 001
Elaborador por: Willyanne Fernandes	Revisado por:	Data: 25/07/2019
<p>Definição: Têm como base a infectividade do vírus, essa técnica requer o cultivo celular, que será o sistema biológico de replicação do agente. O material é submetido a diluições seriadas, cada diluição será inoculada na camada células, quanto maior o número de réplicas, mais preciso será. Essa técnica utiliza placa de microtitulação com 96 cavidades, cada diluição do material é inoculado em 8 poços. O processo dura em média 48 horas, dependendo do vírus, e o título é expresso como a maior diluição capaz de provocar reação específica em 50% dos cultivos celulares e a unidade utilizada é TCID₅₀ (<i>Dose Infectante em Cultura de Células</i>). Os valores obtidos são submetidos a cálculos matemáticos, o método de Reed e Muench é o mais difundido para o cálculo de título viral.</p> <p>OBJETIVO: - Determinar o número de doses infectantes.</p> <p>APLICAÇÃO: - Diagnóstico.</p> <p>MATERIAIS:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Microplaca de 96 orifícios ● Pipeta de 10 mL ● Pipetador ● MEM ● Ponteiras de 200 µL 		

- Ponteiras de 1000 μL
- Caçapas / Calhas
- Tubo de ensaio de Vidro 10 x 100
- Agitador magnético
- Pipetador de 1000 μL
- Pipetador de 50 μL
- Pipetador multicanal
- Banho de gelo
- Lápis piloto
- Células
- Descarte

MÉTODOS:

- Numerar os tubos de ensaio de vidro de -1 até -7 e colocar no banho de gelo.
- Pipetar em cada tubo de ensaio 4,5 mL de meio (MEM).
- Desenhar na microplaca de -1 a -7 e deixar uma coluna no mínimo para controle celular (CC).





- Descongelar o vírus e agitar no agitador magnético.
- Retirar 500 μL do vírus e dispensar na 10^{-1} .
- Agitar com o agitador magnético, com cuidado para não derramar.
- Retirar 500 μL da 10^{-1} e dispensar na 10^{-2} .
- Agitar com o agitador magnético, com cuidado para não derramar.
- Trocar a ponteira, retirar 500 μL da 10^{-2} e dispensar na 10^{-3} .
- Agitar com o agitador magnético, com cuidado para não derramar.
- Trocar a ponteira, retirar 500 μL da 10^{-3} e dispensar na 10^{-4} .
- Agitar com o agitador magnético, com cuidado para não derramar.
- Trocar a ponteira, retirar 500 μL da 10^{-4} e dispensar na 10^{-5} .
- Agitar com o agitador magnético, com cuidado para não derramar.
- Trocar a ponteira, retirar 500 μL da 10^{-5} e dispensar na 10^{-6} .
- Agitar com o agitador magnético, com cuidado para não derramar.
- Trocar a ponteira, retirar 500 μL da 10^{-6} e dispensar na 10^{-7} .
- Agitar com o agitador magnético, com cuidado para não derramar.
- Retirar 500 μL da 10^{-7} e desprezar.
- Colocar na placa, 50 μL de cada diluição, de -7 até -1 na microplaca, usar todos os poços em cada diluição, não precisa trocar as ponteiras, já que começaremos da menor diluição para a maior.
- Colocar para incubar na estufa de CO_2 a 37°C por uma hora.

- Após uma hora retirar a placa e adicionar 50 µl de célula em cada poço a começar pelos poços de controle celular, em seguida nos poços contendo o vírus.
- Incubar por 72 horas na estufa de CO₂ a 37°C°.
- Fazer leitura diária anotando a confluência das células.
- Ao final das 72 horas, retirar a placa e fazer leitura.
- Anotar os resultados no formulário.
- O calculo é feito da seguinte maneira, é anotado em cada diluição a quantidade de efeito citopático e não efeito.
- Fazer o acumulado de não efeito somando de cima para baixo.
- Fazer o acumulado de efeito somando de baixo para cima.
- Somar efeitos + não efeito
- Dividir efeitos por (não efeito + efeito) e multiplicar por 100, para obter o valor em porcentagem.
- Fazer o seguinte calculo: (% de infectados imediatamente superior a 50%) – 50% dividido por (% de infectados imediatamente superior a 50%) – (% de infectados imediatamente inferior a 50%).
- O resultado da distancia somado a diluição imediatamente superior a 50% é a nossa dose infectante, DL₅₀.
- É comum trabalharmos com 100 doses infectantes, para tal temos que fazer o seguinte calculo, titulo viral subtraído de 100TCID₅₀.
- 100TCID₅₀ será igual a 2, o que significa dizer que para termos 100 doses infectantes temos que subir duas diluições, por exemplo: para um título de 10^{-5.5} as nossas 100 doses infectantes vão estar em 10^{-3.5}.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E	E	E	E	E	NE	NE				CC	CC
B	E	E	E	E	E	E	NE				CC	CC
C	E	E	E	E	NE	NE	NE				CC	CC
D	E	E	E	E	E	E	NE				CC	CC
E	E	E	E	E	E	NE	NE				CC	CC
F	E	E	E	E	E	E	NE				CC	CC
G	E	E	E	E	E	NE	NE				CC	CC
H	E	E	E	E	NE	NE	NE				CC	CC

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}				CC	CC
-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	--	--	--	----	----

- Usando como exemplo o título acima $10^{-5.5}$. A nossa 100TCID_{50} será o antilog de 0.5, que é equivalente a 3.16, isso significa que usaremos 1mL da diluição 10^{-3} para 2.16 mL de meio, nessas condições temos 100TCID_{50} .

DILUIÇÃO	CULTIVO CELULAR		ÍDICES ACUMULADOS			PORCENTAGEM(%) = [EFEITO/(NÃO EFEITO + EFEITO)]
	NÃO EFEITO	EFEITO	NÃO EFEITO ↓	EFEITO ↑	NÃO EFEITOS + EFEITOS	
10 ⁻¹	0	8	0	40	40	100%
10 ⁻²	0	8	0	32	32	100%
10 ⁻³	0	8	0	24	24	100%
10 ⁻⁴	0	8	0	16	16	100%
10 ⁻⁵	2	6	2	8	10	80%
10 ⁻⁶	6	2	8	2	10	20%
10 ⁻⁷	8	0	16	0	16	0

$$\frac{\% \text{ MAIOR QUE } 50\% - 50\%}{\% \text{ MAIOR QUE } 50\% - \% \text{ MENOR QUE } 50\%} = \frac{80 - 50}{80 - 20} = \frac{30}{60} = 0,5$$

$$-\text{LOG. DO TÍTULO DL}_{50} = -\text{LOG. DA DILUIÇÃO MAIOR QUE } 50\% + \text{DISTANCIA PROPORCIONAL} = -5 + (-0,5) = -5,5$$

-5,5
 10
 EQUIVALE A 1(UMA) DOSE INFECTANTE DO VÍRUS

CALCULO DE DOSES:

PRECISAMOS DE 100 DOSES INFECTANTES

$$100\text{TCID}_{50} = 2$$

$$-5,5 - 2 = -3,5$$

USAREMOS 10⁻³

$$\text{CALCULA-SE O ANTILOG DE } 0.5 = 3.16$$

$$\text{SUBTRAÍMOS 1 DO NÚMERO ENCONTRADO (3.16-1 = 2.16)}$$

DESSA FORMA DILUIREMOS O VIRUS ATÉ 10⁻³, RETIRA-SE

1mL DESSA DILUIÇÃO E ACRESCEMOS 2,16 mL DE MEIO

REFERENCIAS:

FLORES, Eduardo Furtado (Org.). Virologia veterinária. Santa Maria, RS: UFSM, 2007. 888 p.

ROVOZZO, Grace C.; BURKE, Carroll N. A manual of basic virological techniques. Englewood Cliffs, Prentice-hall, Inc. 1973.

































































APÊNDICE II

	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA - DMV ÁREA DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA LABORATÓRIO DE VIROLOGIA ANIMAL - LAVIAN	
INSTRUÇÃO DE TRABALHO		
Técnica: Virusneutralização		Nº: 002
Elaborador por: Willyanne Fernandes	Revisado por:	Data: 26/07/2019
<p>Definição: É um teste sorológico que visa a neutralização do vírus pela presença de anticorpos neutralizantes, o soro do animal em diluições crescentes é exposto ao vírus, se há presença de anticorpo não será observado efeito citopático (ECP) na célula, porém se não há presença de anticorpo ocorrerá efeito citopático.</p> <p>OBJETIVO: - Determinar presença ou ausência de anticorpos neutralizantes na amostra, esta técnica também permite quantificar os anticorpos presentes na amostra.</p> <p>APLICAÇÃO: - Diagnóstico.</p> <p>MATERIAIS:</p> <p style="margin-left: 40px;">MATERIAIS:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Microplaca de 96 orifícios ● Pipeta de 10 mL ● Pipetador ● MEM ● Ponteiras de 200 µL ● Ponteiras de 1000 µL ● Caçapas / Calhas ● Tubo de ensaio de Vidro 10 x 100 ● Tubo de ensaio de vidro 15 x 1000 ● Agitador magnético ● Pipetador de 100 a 1000 µL ● Pipetador de 5 a 50 µL 		

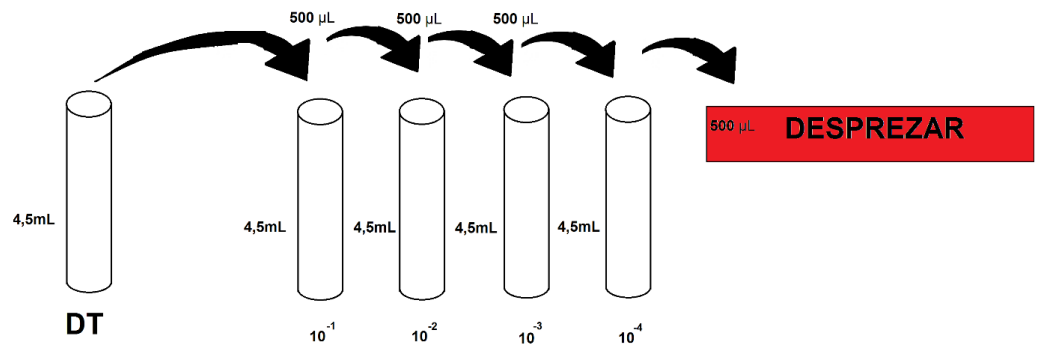
- Pipetador de 2 a 20 μL
- Pipetador multicanal
- Banho de gelo
- Lápis piloto
- Células
- Descarte
- Controle Positivo(CP)
- Controle Negativo(CN)
- 1,5 mL do soro a ser testado(20 μL)

MÉTODOS:

1. Inativar o soro em banho Maria a $58^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, após inativado o soro deve permanecer armazenado a -18°C .
2. Desenhar a placa, identificando detalhadamente na microplaca os espaços para controle positivo (CP), controle negativo (CN), os soros a serem testados, o controle celular (CC) e o controle de dose (CD), que vai de -1 a -4, essas doses partirão da nossa diluição de trabalho(DT), que corresponde ao título viral menos 100 TCID₅₀(que é igual a 2), a diluição de trabalho será o antilog desse valor. Ex.: Para um título viral de 5.5(em 5.5 temos 1(uma) dose infectante do vírus, ou seja 5.5 é a nossa DL₅₀), a quantidade de vírus usada, para 100TCID₅₀ será $5.5 - 2 = 3.5$, isso significa que usaremos a diluição de 10^{-3} , retiramos o antilog de 0.5, o antilog de 0.5 é igual a 3,16 ; isso significa que usaremos 1mL da diluição 10^{-3} para 2,16 mL de meio, e isso equivale a nossa 100TCID₅₀.
3. Distribuir em duplicata as amostras a serem testadas.
4. Reservar os primeiros poços para controle de toxicidade (CT).
5. Os soros serão diluídos em diluições crescentes na base 2 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128). Animais com anticorpos neutralizantes em 1:2 já são considerados positivos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			CT	CT	CT	CT						
B			1:2	1:2	1:2	1:2						
C			1:4	1:4	1:4	1:4						
D			1:8	1:8	1:8	1:8						
E			1:16	1:16	1:16	1:16						
F			1:32	1:32	1:32	1:32						
G			1:64	1:64	1:64	1:64						
H			1:128	1:128	1:128	1:128						
	CP	CN	SORO 1	SORO 1	SORO 2	SORO 2	DT 10 ⁻¹	DT 10 ⁻¹	DT 10 ⁻¹	DT 10 ⁻¹	CC	CC

6. Numerar os tubos de ensaio de vidro de -1 até -4 e colocar no banho de gelo.
7. Pipetar em cada tubo de ensaio 4,5 mL de meio (MEM).
8. Em pose do título viral calcular a diluição de trabalho (DT), a diluição de trabalho será inoculada nos poços contendo o soro e os controles.
9. Inocular na placa 50 µl da diluição de trabalho em todos os poços contendo soro e nos controles, não inocular no controle de toxidade e nem no Controle celular.
10. Deixar uma coluna no mínimo para controle celular (CC).
11. Retirar 500 µL da diluição de trabalho para fazer a retro titulação, a retro titulação parte da nossa diluição de trabalho, numerar os tubos de -1 a -4, distribuir 4,5 mL de meio em cada tudo, colocar 500 µL da diluição de trabalho na 10⁻¹.
12. Agitar com o agitador magnético, com cuidado para não derramar.
13. Trocar a ponteira, retirar 500 µL da 10⁻¹ e dispensar na 10⁻².
14. Agitar com o agitador magnético, com cuidado para não derramar.
15. Trocar a ponteira, retirar 500 µL da 10⁻² e dispensar na 10⁻³.
16. Agitar com o agitador magnético, com cuidado para não derramar.
17. Trocar a ponteira, retirar 500 µL da 10⁻³ e dispensar na 10⁻⁴.
18. Agitar com o agitador magnético, com cuidado para não derramar.
19. Retirar 500 µL da 10⁻⁴ e desprezar.



20. Incubar na estufa de CO₂ a 37C° por uma hora.
21. Após uma hora retirar a placa e adicionar 50 µl de célula em cada poço a começar pelos poços de controle celular, em seguida nos poços contendo o vírus.
22. Incubar por 72 horas na estufa de CO₂ a 37C°.
23. Fazer leitura diária anotando a confluência das células.
24. Ao final das 72 horas, retirar a placa e fazer leitura.
25. Anotar os resultados no formulário.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NE	E	NT	NT	NT	NT	E	NE	NE	NE	CC	CC
B	NE	E	E	E	NE	NE	E	E	NE	NE	CC	CC
C	NE	E	E	E	NE	NE	E	E	NE	NE	CC	CC
D	NE	E	E	E	NE	NE	E	NE	NE	NE	CC	CC
E	E	E	E	E	NE	NE	E	E	NE	NE	CC	CC
F	E	E	E	E	E	E	E	NE	NE	NE	CC	CC
G	E	E	E	E	E	E	E	E	NE	NE	CC	CC
H	E	E	E	E	E	E	E	E	NE	NE	CC	CC
	CP	CN	SORO 1	SORO 1	SORO 2	SORO 2	CD 10'	CD 10'	CD 10'	CD 10'	cc	cc

E = EFEITO
NE = NÃO EFEITO
TO = TÓXICO
NT = NÃO TÓXICO
CC = CONTROLE CELULAR

SORO 1 = NEGATIVO
SORO 2 = POSITIVO 1:16

26. Fazer o cálculo da retro titulação.
27. O cálculo da retro titulação é feito da seguinte maneira:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NE	E	NT	NT	NT	NT	E	NE	NE	NE	CC	CC
B	NE	E	E	E	NE	NE	E	E	NE	NE	CC	CC
C	NE	E	E	E	NE	NE	E	E	NE	NE	CC	CC
D	NE	E	E	E	NE	NE	E	NE	NE	NE	CC	CC
E	E	E	E	E	NE	NE	E	E	NE	NE	CC	CC
F	E	E	E	E	E	E	E	NE	NE	NE	CC	CC
G	E	E	E	E	E	E	E	E	NE	NE	CC	CC
H	E	E	E	E	E	E	E	E	NE	NE	CC	CC

CP	CN	SORO 1	SORO 1	SORO 2	SORO 2	CD 10'	CD 10'	CD 10'	CD 10'	CC	CC
----	----	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	----	----

DILUIÇÃO	CULTIVO CELULAR		ÍDICES ACUMULADOS			PORCENTAGEM(%) = [EFEITO/(NÃO EFEITO + EFEITO)]
	NÃO EFEITO	EFEITO	NÃO EFEITO ↓	EFEITO ↑	NÃO EFEITOS + EFEITOS	
10 ⁻¹	0	8	0	13	13	100%
10 ⁻²	3	5	3	5	8	62,5%
10 ⁻³	8	0	11	0	11	0
10 ⁻⁴	8	0	19	0	19	0

$$\frac{\% \text{ MAIOR QUE } 50\% - 50\%}{\% \text{ MAIOR QUE } 50\% - \% \text{ MENOR QUE } 50\%} = \frac{62,5 - 50}{62,5 - 0} = \frac{12,5}{62,5} = 0,2$$

$$-\text{LOG. DO TÍTULO DL}_{50} = -\text{LOG. DA DILUIÇÃO MAIOR QUE } 50\% + \text{DISTÂNCIA PROPORCIONAL} = -2 + (-0,2) = -2,2$$

ANTILOG DE 2,2 = 158,48

28. Para encontrar a distancia proporcional, anotamos no formulário a quantidade de efeitos e não efeitos em cada diluição, em segui fazemos os acumulados de não efeito somando de cima para baixo, e os acumulados de efeito somando de baixo pra cima, como no exemplo, em seguida somamos os acumulados de não efeitos mais os efeitos, após, dividir o índice acumulado de efeito pela soma dos não efeitos mais os efeitos em cada diluição.
29. Ao final desses cálculos chegaremos a porcentagem, usaremos a formula % maior que 50% - 50% dividido por % maior que 50% - % menor que 50%, esse resultado é a nossa distância proporcional.
30. O título da nossa retro titulação será o log da diluição maior que 50% + a distância proporcional.
31. Para verificar se nossa prova foi validade, fazemos o antilog do nosso título e de acordo com o manual da OIE esse valor tem que estar dentro de um intervalo já estimado.

DILUIÇÃO	CULTIVO CELULAR		ÍDICES ACUMULADOS			PORCENTAGEM(%) = [EFEITO/(NÃO EFEITO + EFEITO)]
	NÃO EFEITO	EFEITO	NÃO EFEITO ↓	EFEITO ↑	NÃO EFEITOS + EFEITOS	
10 ⁻¹	0	8	0	13	13	100%
10 ⁻²	3	5	3	5	8	62,5%
10 ⁻³	8	0	11	0	11	0
10 ⁻⁴	8	0	19	0	19	0

$$\frac{\% \text{ MAIOR QUE } 50\% - 50\%}{\% \text{ MAIOR QUE } 50\% - \% \text{ MENOR QUE } 50\%} = \frac{62,5 - 50}{62,5 - 0} = \frac{12,5}{62,5} = 0,2$$

$$-\text{LOG. DO TÍTULO DL}_{50} = -\text{LOG. DA DILUIÇÃO MAIOR QUE } 50\% + \text{DISTANCIA PROPORCIONAL} = -2 + (-0,2) = -2,2$$

ANTILOG DE 2,2 = 158,48

REFERÊNCIAS:

FLORES, Eduardo Furtado (Org.). Virologia veterinária. Santa Maria, RS: UFSM, 2007. 888 p.
 ROVOZZO, Grace C.; BURKE, Carroll N. A manual of basic virological techniques. Englewood Cliffs, Prentice-hall, Inc. 1973.

ELABORAÇÃO, REVISÃO E APROVAÇÃO:

Elaborado por: Willyanne Darline Fernandes de Lima – Residente em Medicina Veterinária Preventiva – Vírus

Revisado por:

Aprovado por:

Data da aprovação:

ELABORADO POR
 Willyanne Darline Fernandes de Lima
 Residente em Med. Vet. prev. - Vírus

REVISADO POR

APROVADO POR

