



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DE ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O PROGRAMA
DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DE SAÚDE EM MEDICINA
VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

JERLANE TARCILIA GOMES TELLES



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DE ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O PROGRAMA
DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DE SAÚDE EM MEDICINA
VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

Trabalho de Conclusão de Residência apresentado ao Programa de Residência em Área Profissional de Saúde em Medicina Veterinária da UFRPE como requisito para a obtenção do título de Especialização em Medicina Veterinária Preventiva – Área de Concentração: Víruses dos Animais Domésticos, sob orientação da Prof^a. Dra. Rita De Cássia Carvalho Maia e preceptoria do Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior.

Recife-PE, 2024

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)

T274r

TELLES, JERLANE

RELATÓRIO DE ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA
PROFISSIONAL DE SAÚDE EM MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO / JERLANE TELLES. - 2024.

42 f. : il.

Orientadora: RITA DE CASSIA CARVALHO MAIA.

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, 2024.

1. Residência. 2. Virose . 3. Veterinária . 4. Preventiva . I. MAIA, RITA DE CASSIA CARVALHO, orient. II.
Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DE ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O PROGRAMA
DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DE SAÚDE EM MEDICINA
VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

Relatório elaborado por

JERLANE TARCILIA GOMES TELLES

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rita de Cássia Carvalho Maia

Prof. Dr. Huber Rizzo

Msc. Maria de Nazaré Santos Ferreira

Davi dos Santos Rodrigues

Recife-PE, 2024

AGRADECIMENTOS

Programa de Residência em Área Profissional de Saúde em Medicina Veterinária da UFRPE; Laboratório de Virologia Animal (LAVIAN)- UFRPE; Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos (LDIC)- UFRPE; Equipe eMulti- Camaragibe; Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA)- Recife; família e amigos.

"Mas o que salva a humanidade é que não há quem cure a curiosidade."

(Tom Zé)

APRESENTAÇÃO

O presente relatório dispõe sobre as atividades desenvolvidas durante o período da residência em Área Profissional de Saúde em Medicina Veterinária, área de concentração - Virose dos Animais Domésticos, a qual se deu no período de dois anos (2022 - 2024). Durante a residência houve diversos momentos, tais quais: disciplinas teóricas, vivências no Sistema Único de Saúde (SUS), estágio em laboratório externo (LFDA-PE), participação em eventos e, por fim, as atividades específicas do Laboratório de Virologia Animal, com ênfase em diagnóstico. Desta forma, este relatório é constituído em três capítulos, o primeiro descreve as atividades desenvolvidas na vivência do SUS, onde se subdivide em momentos na Vigilância em Saúde e momentos no eMulti, ambos em Camaragibe-PE, totalizando quatro meses de experiência no SUS. No segundo capítulo há a descrição das atividades na área de concentração, incluindo-se as atividades desenvolvidas em laboratório interno e externo, bem como contribuições em eventos e disciplinas cursadas e outras atividades. Por fim, o terceiro capítulo descreve uma pesquisa intitulada: Produção de Antígeno de Leucose Enzoótica Bovina a Partir de Células de Linhagem FLK Persistentemente Infectadas Para Uso em Imuno diagnóstico.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA - Ácido desoxirribonucleico
BLV - Vírus da Leucose Enzoótica Bovina
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
eMulti - Equipe Multiprofissional
FIV- Imunodeficiência Viral Felina
FeLV - Leucemia Viral Felina
FLK - Células de rim fetal ovino
HOVET - UFRPE - Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco
IDGA – Imunodifusão em Gel de Ágar
LAVIAN – Laboratório de Virologia Animal
LEB – Leucose Enzoótica Bovina
LFDA - PE – Laboratório Federal de Devesa Agropecuária - Pernambuco
MDBK – Células de Rim Fetal Bovino
NASF - AB - Núcleo de Apoio à Saúde Família e Atenção Básica
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
PBS - Solução salina tamponada com fosfato
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PEG – Polietilenoglicol
pH - Potencial Hidrogeniônico
OMSA – Organização Mundial de Saúde Animal
PMSF - Fluoreto de Fenilmetanosulfonil
RNA - Ácido ribonucleico
RPMI 1640 - Meio Gibco Roswell Park Memorial Institute 1640
SUS – Sistema Único de Saúde
UBS – Unidade Básica de Saúde
SFB – Soro Fetal Bovino

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – Relatório Descritivo das Atividades Acompanhadas no Sistema Único de Saúde - SUS.

Figura 1	Equipe realizando visitas em domicílio	12
Figura 2	Acúmulo de entulhos em escola	12
Figura 3	Acondicionamento de amostras realizado por agentes de endemias	13
Figura 4	Caracterização de larvas enviadas	13
Figura 5	Coleta de água para análise	13
Figura 6	Amostras acondicionadas para testagens	13
Figura 7	Acúmulo de objetos em casa	14
Figura 8	Equipe conduzindo animal para caminhão de apreensão	14
Figura 9	Fiscais realizando apreensão de medicamentos vencidos em estabelecimento de saúde	15
Figura 10	Profissional de enfermagem realizando protocolo vacinal antirrábico em paciente	15
Figura 11	Educação Permanente sobre profilaxia da raiva humana com equipes de saúde de UBS	16
Figura 12	Educação em saúde sobre cuidados com os alimentos em sala de espera de UBS	16

CAPÍTULO II- Atividades Desenvolvidas na Área De Concentração -Virologia Animal.

Figura 13	Laboratório - área destinada a cultivo celular e IDGA	29
Figura 14	Laboratório - área destinada à biologia molecular	29
Figura 15	Esquema demonstrando onde são inoculados o antígeno, controles positivos e soros de animais testados	30
Figura 16	Teste IDGA com resultados positivos	31
Figura 17	Celulas cultivadas observadas em microscópio	31
Figura 18	Termociclador utilizado nas reações de PCR	32
Figura 19	Cuba de eletroforese em funcionamento	33
Figura 20	Resultado de PCR pós leitura em fotodocumentador. Amostras positivas para FeLV	33
Figura 21	Teste imunocromatográficos com resultado negativo e positivo para cinomose canina	34

CAPÍTULO III- Produção de Antígeno de Leucose Enzoótica Bovina a Partir de Células de Linhagem FLK Persistentemente Infectadas Para Uso em Imunoagnóstico.

Figura 22	Resultados do teste IDGA com formação de linhas reagentes	40
-----------	---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO- Programa de Residência.....

CAPÍTULO I – Relatório Descritivo das Atividades Acompanhadas no Sistema Único de Saúde- SUS.

1. Vigilância em Saúde	11
1.1 Vigilância Ambiental	11
1.2 Vigilância Sanitária.....	14
1.3 Vigilância Epidemiológica.....	15
2. Emulti	15
3. Produtos Desenvolvidos.....	17
4. Anexos	18
5. Referências.....	27

CAPÍTULO II – Atividades Desenvolvidas na Área de Concentração- Virologia Animal.

1. Disciplinas Coursadas.....	29
2. Descrição do Laboratório e Equipe.....	29
3. Atividades em Laboratório	30
4. Eventos Realizados e Outras Atividades	34
5. Referências.....	35

CAPÍTULO III – Produção de Antígeno de Leucose Enzoótica Bovina a Partir de Células de Linhagem FLK Persistentemente Infectadas Para Uso Em Imunoagnóstico. 37

Considerações finais	42
-----------------------------------	-----------

**CAPÍTULO I: RELATÓRIO DESCRITIVO DAS
ATIVIDADES ACOMPANHADAS NO SISTEMA ÚNICO DE
SAÚDE**

INTRODUÇÃO

O Programa de Residência em Área Profissional de Saúde em Medicina Veterinária da UFRPE é destinado aos profissionais graduados em Medicina Veterinária, possuindo a duração de dois anos. A sua carga horária divide-se em atividades teóricas e práticas, totalizando uma carga horária mínima de 5.760 horas. Além das atividades específicas da área de atuação escolhida pelo residente, há a obrigatoriedade do cumprimento de horas no SUS, sendo dedicada do total de 5.760 horas citadas, 720 horas a atuação na Vigilância em Saúde e 240 horas ao Emulti.

Quanto as áreas específicas de atuação, os residentes atuam no treinamento em serviço, sendo acompanhados por um tutor e preceptor, executando atividades em uma das onze áreas de concentração, sendo estas: Clínica Médica de Pequenos Animais; Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais; Anestesiologia Veterinária; Clínica, Cirurgia e Reprodução de Grandes Animais; Diagnóstico por Imagem; Patologia Clínica Veterinária; Patologia Veterinária Geral e Medicina Veterinária Preventiva (Bacterioses, Doenças Parasitárias, Saúde Pública e Viroses)

1. VIGILÂNCIA EM SAÚDE

A Vigilância em Saúde tem por objetivo a observação e análise permanentes da situação de saúde da população, articulando-se em um conjunto de ações destinadas a controlar determinantes, riscos e danos à saúde de populações que vivem em determinados territórios, garantindo-se a integralidade da atenção, o que inclui tanto a abordagem individual como coletiva dos problemas de saúde. Algumas das vertentes da Vigilância em Saúde são as Vigilâncias Ambiental, Sanitária e Epidemiológica (BRASIL, 2010). Desta forma, foi realizada uma vivência de três meses (abril a julho de 2022) na Vigilância em Saúde no município de Camaragibe - PE, sendo esse tempo subdividido entre Vigilância Ambiental, Sanitária e Epidemiológica (um mês em cada vigilância).

1.1 VIGILÂNCIA AMBIENTAL

A Vigilância Ambiental é contituida por um conjunto de ações que proporciona o conhecimento e a detecção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e controle dos fatores de risco ambientais relacionados às doenças ou outros agravos à saúde (BRASIL, 2002).

Deste modo, as atividades vivenciadas foram: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose; controle de população de animais sinantrópicos e peçonhentos; controle de vetores; controle da qualidade da água para consumo humano; acumuladores; maus-tratos contra animais; apreensão de animais. Abaixo descrição das atividades vivenciadas:

Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose

Neste programa, a equipe se direcionava de porta em porta com intuito de abordagem da população. Havia breve explicação sobre a esquistossomose, englobando a importância do diagnóstico e tratamento precoce. Por fim, em caso de concordância do comunitário, eram deixados frascos para coleta de fezes. No dia seguinte, havia o retorno da equipe para o recebimento das amostras de fezes da população. Essas amostras eram processadas e analisadas em laboratório. Os resultados positivos eram enviados para as unidades de saúde próximas aos indivíduos acometidos, e esta se encarregava da abordagem ao paciente seguido de tratamento, inclusive abastecendo o paciente dos medicamentos necessários para a conclusão de todo tratamento. Também eram realizados dados epidemiológicos com os resultados (figuras 1).



Figura 1: Equipe realizando visitas em domicílios (arquivo pessoal)

Controle de População de Animais Sinantrópicos e Peçonhentos

A equipe visitava casas e instituições, à pedido da população ou sob forma de busca ativa com objetivo de diagnóstico e controle da presença de animais sinantrópicos e peçonhentos. Havia orientações específicas para a resolução das situações e em casos necessários, uma equipe exterminadora era enviada ao local. Sempre eram realizados retornos às casas e instituições para averiguar se houve a resolução definitiva do problema (figura 2).



Figura 2: Acúmulo de entulhos em escola (arquivo pessoal).

Controle de Vetores

Foram realizados levantamentos do índice de *Aedes Aegypti*. Os agentes de endemias faziam visitas domiciliares e além de coleta de dados e orientação a população, levavam as larvas encontradas para análise em laboratório. Estas eram analisadas com o objetivo de quantificar quantas destas eram do mosquito *Aedes Aegypti* (figuras 3 e 4)



Figura 3: Acondicionamento de amostras realizado por agentes de endemias (arquivo pessoal).



Figura 4: Caracterização das larvas enviadas (arquivo pessoal).

Controle da Qualidade da Água Para Consumo Humano

Os profissionais visitavam estabelecimentos sob demanda da população ou busca ativa. Eram realizadas coletas das águas utilizadas para consumo humano. As amostras eram analisadas em laboratório através dos testes de teor de cloro, turbidez da água, presença de coliformes totais e *Escherichia coli*. Nos casos de contaminação da água, eram realizadas buscas com propósito de diagnosticar a fonte de contaminação (figuras 5 e 6).



Figura 5: Coleta de água para análise (arquivo pessoal).



Figura 6: Amostras acondicionadas para testagens (arquivo pessoal).

Acumuladores

Foram efetuadas visitas a pessoas em situação de acumulação tanto de objetos, quanto de animais. A equipe fazia orientações no local e seguia-se com as providências necessárias para cada caso (figura 7)



Figura 7: Acúmulo de objetos em casa (arquivo pessoal)

Apreensão de Animais

Uma equipe contratada recolhia animais errantes a pedido da população ou sob busca ativa. Estes eram levados para abrigo e seguia-se com tratamento médico (caso necessário), doação ou recuperação do animal pelo proprietário, respeitando-se prazo e aplicando-se multa (figura 8).



Figura 8: Equipe conduzindo animal para caminhão de apreensão (arquivo pessoal).

1.2 VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Vigilância Sanitária é definida como um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse à saúde (BRASIL, 1990).

Foram acompanhadas as atividades de adesão a licença sanitária, além de fiscalizações sob busca ativa e denúncias. Eram visitados estabelecimentos que tenham interesse da saúde, tais como: alimentícios, casas geriátricas, casas de recuperação, cosméticos, escolas, espaços para festas, laboratórios de diagnóstico e assistência hospitalar, consultórios odontológicos e clínicas médicas. Eram realizados relatórios contendo as irregularidades encontradas nos ambientes. Também ocorriam apreensões de alimentos ou produtos impróprios para o consumo, além da aplicação de multas ou interdições, quando necessário (figura 9)



Figura 9: Fiscais realizando apreensão de medicamentos vencidos em estabelecimento de saúde (arquivo pessoal).

1.3 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA

Vigilância Epidemiológica é definida como um conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças ou agravos (BRASIL, 1990).

Durante o período de um mês, foram acompanhados, através de ligações telefônicas, pacientes em processo de profilaxia antirrábica humana ou em tratamento contra esporotricose. As ligações eram realizadas diretamente para os pacientes em atendimento, durante a chamada, eram realizadas orientações acerca da interrupção, continuidade do tratamento ou busca por unidade de saúde. Também foi realizado um período de acompanhamento de atendimento antirrábico humano por enfermeiros do Hospital Aristeu-Camaragibe (figura10).



Figura 10: Profissional de enfermagem realizando protocolo vacinal antirrábico em paciente (arquivo pessoal).

2. eMULTI

As eMulti, antigo NASF-AB, são definidas como equipes multiprofissionais e interdisciplinares formadas por profissionais da saúde, complementares às equipes que atuam na Atenção Básica, atuando de maneira integrada para dar suporte (clínico, sanitário e pedagógico) aos profissionais das equipes de Saúde da Família (BRASIL, 2023). As atividades acompanhadas e desenvolvidas no eMulti deram-se no mês de setembro de 2023.

Camaragibe tem cinco equipes de eMulti, cada uma responsável por auxiliar em uma fração do território, além de haver uma variação de profissionais da saúde que compõem as equipes de acordo com as necessidades prioritizadas pela gestão. A equipe eMulti acompanhada contava com uma psicóloga, uma fonoaudióloga, uma nutricionista, duas fisioterapeutas e duas assistentes sociais. As profissionais prestavam assistência a nove Unidades Básicas de Saúde.

Foram acompanhadas atividades como assistência em saúde a população tanto em forma de visitas domiciliares como na unidade básica de saúde, além de oficinas nas unidades básicas; participação em grupo de mulheres; curso de acolhimento e reuniões, estas com as UBS, entre os eMulti e com o Conselho Municipal de Saúde. Aproveitando os momentos de reunião com as equipes e os momentos de sala de espera, foram realizadas formações permanentes e educação em saúde abordando temas da medicina veterinária de interesse da saúde pública, tais como: Raiva e Profilaxia da raiva humana, esporotricose e cuidados com os alimentos (figuras 11 e 12).



Figura 11: Educação Permanente sobre profilaxia da raiva humana com equipes de saúde de UBS (arquivo pessoal).



Figura 12: Educação em saúde sobre cuidados com os alimentares em sala de espera de UBS (arquivo pessoal).

3. PRODUTOS DESENVOLVIDOS

Durante os três meses na Vigilância em Saúde de Camaragibe, além das atividades supracitadas, dois produtos foram desenvolvidos, tais foram: um boletim epidemiológico sobre arboviroses (Dengue, Zika e Chikungunya) nos anos de 2011- 2021 no município de Camaragibe, contendo dados como: situação epidemiológica das arboviroses; distribuição de casos por localidade; métodos de diagnósticos utilizados; faixa etária e sexo das pessoas acometidas e distribuição mensal dos casos de arboviroses. Esses dados puderam ser utilizadas pela vigilâncias para futuras ações no enfrentamentos de tais afecções (apêndice I).

Também foi realizado um esquema de profilaxia da raiva humana, que foi distribuído para as equipes de saúde. O esquema contém as informações necessárias para fornecer ao profissional de saúde, de forma rápida e prática, a conduta correta para cada acidente envolvendo ataque de mamíferos a humanos (apêndice II).

Por fim, foi confeccionado um panfleto com tema “O Que Pode Ter no Alimentos?”, utilizado em rodas de conversas com a população que aguardava atendimento com a nutricionista. Durante as conversas eram abordadas as principais doenças transmitidas por alimento, bem como a correta higiene de frutas e verduras, além dos cuidados ao adquirir produtos de origem animal (apêndice III).

4. APÊNDICE

Boletim Arboviroses – Camaragibe

Vigilância Ambiental | Prefeitura de Camaragibe junho / 2022

Monitoramento dos casos de arboviroses (Dengue, Zika e Chikungunya) transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*, entre os anos 2011 e 2021

Sumário

¹Monitoramento dos casos de arboviroses (Dengue, Zika e Chikungunya) transmitidas pelo mosquito *Aedes aegypti*, entre os anos 2011 e 2021

²Situação Epidemiológica das Arboviroses

²Distribuição de Casos por Localidade

³Métodos de Diagnósticos

³Faixa etária e sexo

⁴Distribuição mensal dos casos de arboviroses

As informações sobre Dengue apresentadas neste boletim são referentes às notificações ocorridas entre 2011 e 2021 (10 anos), obtidas através do Sinan Online. Os casos de Chikungunya também foram extraídos do Sinan Online, mas com notificações a partir de 2015 por não haver notificação nos anos anteriores. Os dados de Zika foram extraídos do Sinan Net, no período de 2015 a 2021, pelo mesmo motivo anterior.

No município de Camaragibe há casos de Dengue no Sinan desde 2006, e de Zika e Chikungunya desde 2015. Sabe-se que a partir de 2020 os casos notificados diminuíram e entende-se que houve uma imensa quantidade de casos subnotificados devido ao momento de pandemia (COVID-19).

O objetivo deste boletim é mostrar o comportamento das principais arboviroses, nos últimos dez anos, em Camaragibe, dando ênfase ao seu comportamento em diferentes grupos de bairros (estratos*), bem como métodos de diagnóstico, casos confirmados, sexo e faixa etária dos pacientes, tornando-se um instrumento para identificação de bairros, grupos de riscos e focos, que irão servir de base para promoção de ações de educação em saúde.

*Os estratos são grupos de bairros, selecionados com base na situação socioeconômica, cultural e fatores físicos, utilizados para realização de levantamento de índice do *Aedes aegypti* por meio do Programa LIRAA (Tabela 1).

ESTRATO 1	ESTRATO 2	ESTRATO 3
Santa Terezinha Nossa Senhora do Carmo Santa Mônica Viana Alto Santo Antônio	São João e São Paulo Santana João Paulo II Estação Nova Açussena Burrione	Céu Azul Timbí Privê Vermont
ESTRATO 4	ESTRATO 5	ESTRATO 6
Tabatinga Aldeia de Cima Aldeia de Baixo Vila da Fábrica Alto da Boa Vista Coimbral	Cosme e Damião Areiro Bairro Novo Padre Cicero Novo Carmelo Carmelitas Jardim Teresópolis Bairro dos Estados Areinha	Nazaré Inabi Vale das Pedreiras Jardim Primavera Macacos Concape Lot. São Pedro

Tab. 1 – Identificação dos bairros que compõem cada estrato, utilizados para levantamento de dados de *Aedes aegypti*

Situação Epidemiológica das Arboviroses

Foram notificados 17.126 casos de Dengue nos últimos dez anos (5.010 confirmados, 8.498 descartados e 3.596 não definidos ou inconclusivos), sendo os anos de 2015 e 2016 os anos com maiores picos, com 8.899 e 3.451 casos, respectivamente (Figura 1).

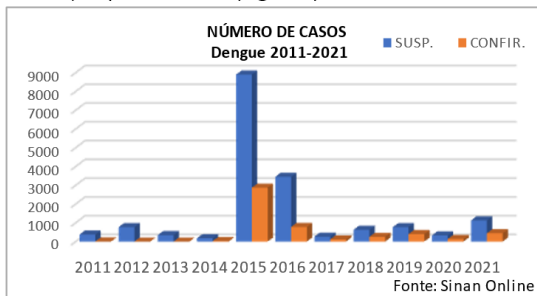


Fig. 1 - Número de casos suspeitos e confirmados de Dengue, no município de Camaragibe, no período de 2011 a 2021.

Em relação a Zika, nos últimos sete anos, foram notificados 81 casos (seis confirmados, 64 descartados e 11 não definidos), sendo os anos de 2020 e 2021 os anos de maiores picos, com 18 e 23 casos, respectivamente (Figura 2).

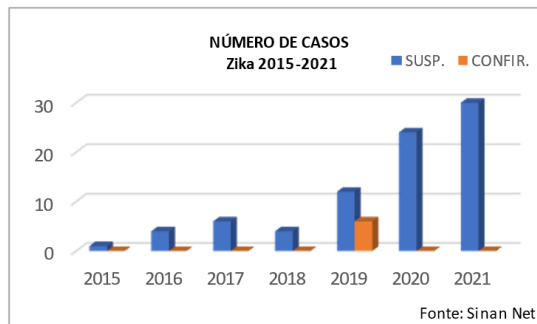


Fig. 2 - Número de casos suspeitos e confirmados de Zika, no município de Camaragibe, no período de 2015 a 2021.

E quanto a Chikungunya, nos últimos sete anos foram notificados 3.385 casos (3.300 confirmados, 1.219 descartados e 866 não definidos ou inconclusivos), sendo os anos de 2016 e 2021 os anos com maiores picos, com 1.588 e 1.265 casos, respectivamente (Figura 3).

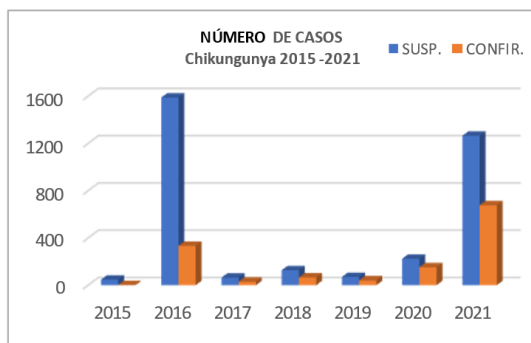


Fig. 3 - Número de casos suspeitos e confirmados de Chikungunya, no município de Camaragibe, no período de 2015 a 2021.

Distribuição de Casos por Localidade

Os bairros representados pelos estratos 3, 4 e 5 foram os que tiveram o maior número de casos de Dengue, numa perspectiva geral, tendo seu ápice nos anos de 2015 e 2016 (Figura 4).

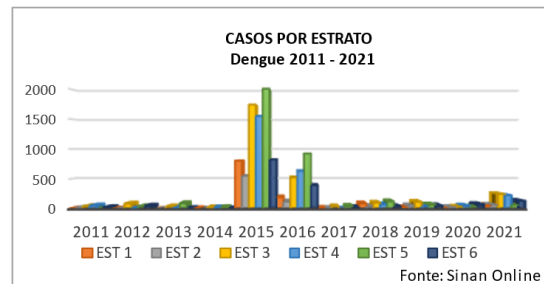


Fig. 4 - Número de casos notificados de Dengue, por estrato, no município de Camaragibe, no período de 2011 a 2021.

Na Zika, o estrato 6 foi o de maior destaque nos últimos anos, seguido do estrato 4 (Figura 5).

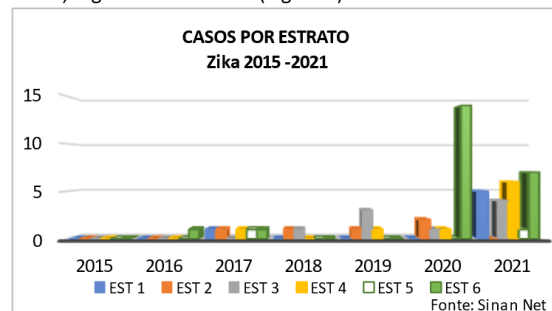


Fig. 5 - Número de casos notificados de Zika, por estrato, no município de Camaragibe, no período de 2015 a 2021.

Já na Chikungunya, os estratos 3 e 4 foram os que tiveram o maior número de casos numa perspectiva geral, tendo seu ápice nos anos de 2016 e 2021 (Figura 6).

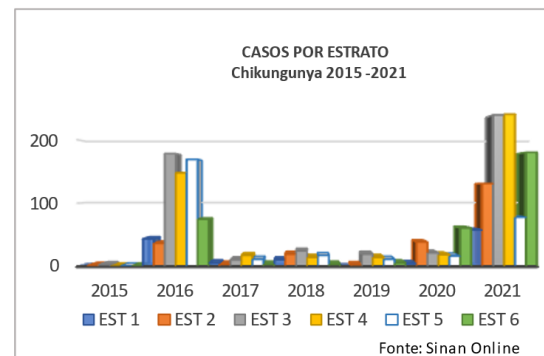


Fig. 6 - Número de casos notificados de Chikungunya, por estrato, no município de Camaragibe, no período de 2015 a 2021.

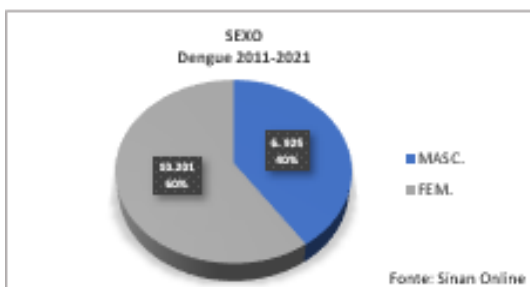


Fig. 13 - Sexo identificado nos casos notificados de Dengue, no município de Camaragibe, no período de 2011 a 2021.

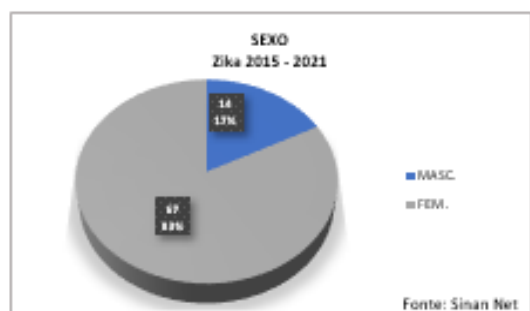


Fig. 14 - Sexo identificado nos casos notificados de Zika, no município de Camaragibe, no período de 2015 a 2021.

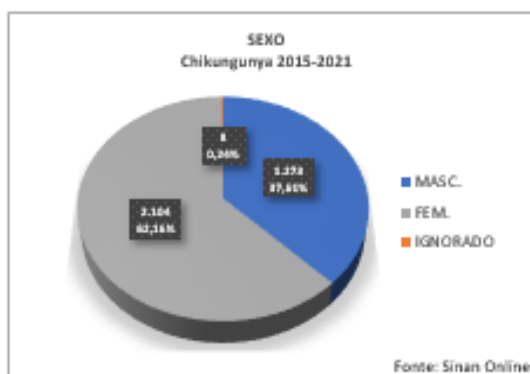


Fig. 15 - Sexo identificado nos casos notificados de Chikungunya, no município de Camaragibe, no período de 2015 a 2021.

Distribuição mensal dos casos de arboviroses

Juntando todos os casos de Dengue dos últimos dez anos avaliados, é possível observar que houve um pico nos casos durante o primeiro semestre, principalmente nos meses de março e abril (Figura 16).

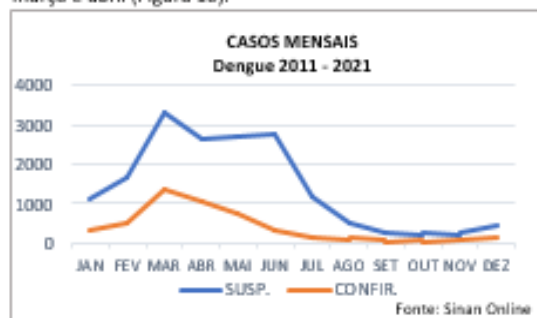


Fig. 16 - Casos mensais suspeitos e confirmados de Dengue, no município de Camaragibe, no período de 2011 a 2021.

Nos casos de Zika, é possível observar que ocorreu um pico nos casos durante os meses de maio, junho e agosto (Figura 17).

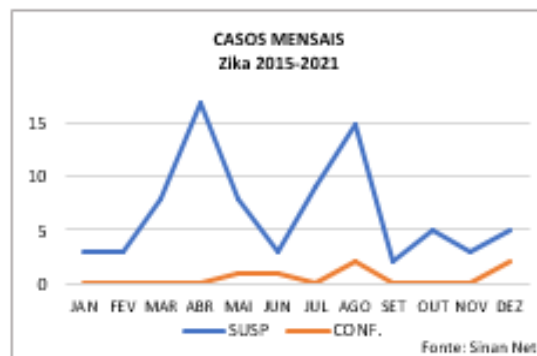


Fig. 17 - Casos mensais suspeitos e confirmados de Zika, no município de Camaragibe, no período de 2015 a 2021.

Nos casos de Chikungunya, nota-se uma crescente que se iniciou no mês de março e atingiu o ápice no mês de maio (Figura 18).

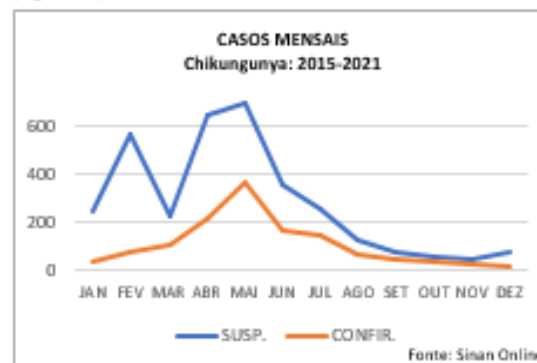


Fig. 18 - Casos mensais suspeitos e confirmados de Chikungunya, no município de Camaragibe, no período de 2015 a 2021.

Com relação aos óbitos em decorrência das arboviroses, foi relatado apenas na dengue, o que não exclui o óbito nas outras doenças, principalmente devido a subnotificação, já que existe uma grande quantidade de evoluções ignoradas (Figura 19).

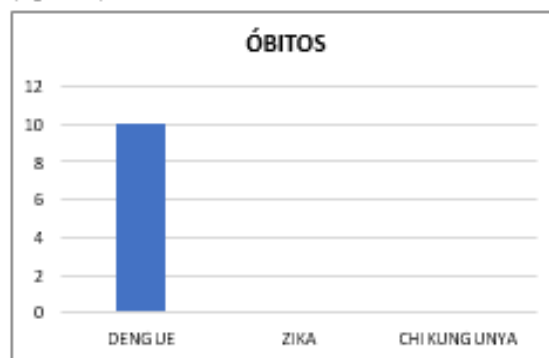


Fig. 19 - Número de óbitos pelas Arboviroses, no município de Camaragibe, no período de 2011 a 2021.

Métodos de Diagnósticos

Quanto a forma de diagnóstico, na Dengue o método clínico-epidemiológico foi o mais utilizado, seguido dos não preenchidos no sistema (vazio) e por último o diagnóstico laboratorial (Figura 7).

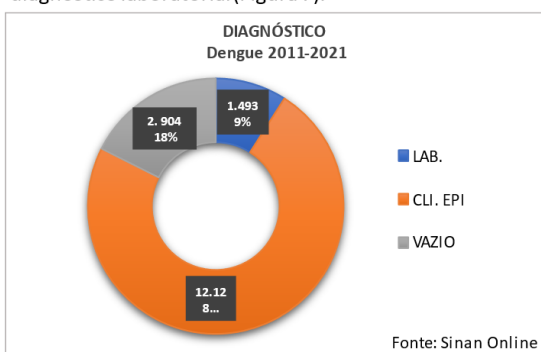


Fig. 7 - Métodos de diagnóstico utilizados nos casos notificados de Dengue, no município de Camaragibe, no período de 2011 a 2021.

Na Zika, o diagnóstico, o laboratorial representou a maioria, seguido do diagnóstico clínico-epidemiológico e por fim o "vazio" (não preenchido no sistema) (Figura 8).

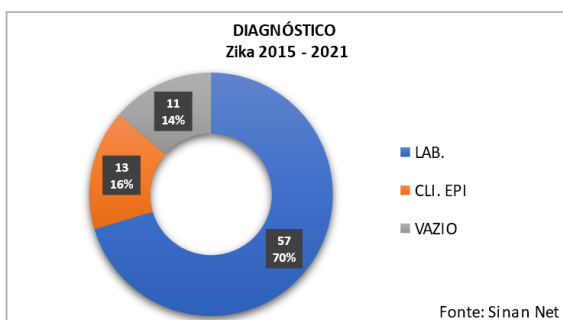


Fig. 8 - Métodos de diagnóstico utilizados nos casos notificados da Zika, no município de Camaragibe, no período de 2015 a 2021.

Quanto a forma de diagnóstico da Chikungunya o método clínico-epidemiológico foi o mais utilizado, seguido dos não preenchidos no sistema (vazio) e por último o diagnóstico laboratorial (Figura 9).

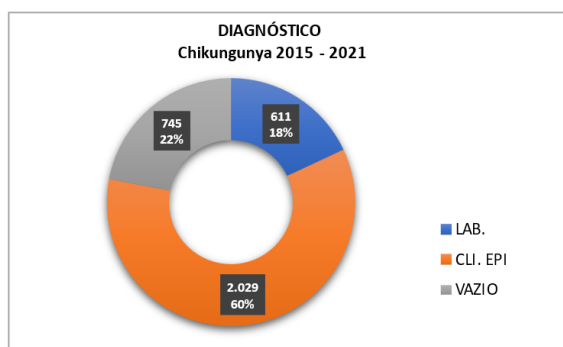


Fig. 9 - Métodos de diagnóstico utilizados nos casos notificados da Zika, no município de Camaragibe, no período de 2015 a 2021.

Faixa etária e sexo

Em relação a faixa etária e ao sexo dos pacientes, houve predominância de adultos (Figuras 10, 11 e 12) e do sexo feminino (Figuras 13, 14 e 15) nas três arboviroses.

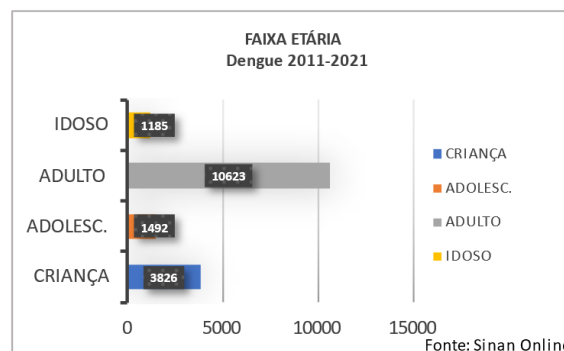


Fig. 10 - Faixa etária identificada nos casos notificados de Dengue, no município de Camaragibe, no período de 2011 a 2021.

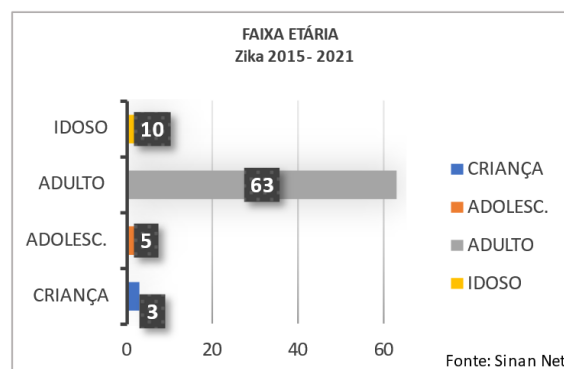


Fig. 11 - Faixa etária identificada nos casos notificados de Zika, no município de Camaragibe, no período de 2015 a 2021.

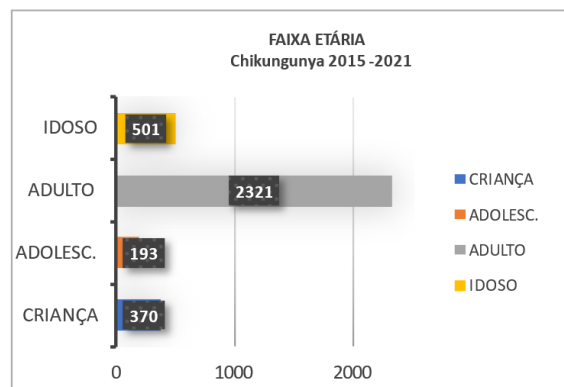


Fig. 12 - Faixa etária identificada nos casos notificados de Chikungunya, no município de Camaragibe, no período de 2015 a 2021.

O LIRAA é um sistema de Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* que permite identificar focos, indicando o risco de transmissão de Dengue, Zika e Chikungunya. Com base nisso, obteve-se o levantamento realizado em 2020 onde todos os estratos apresentaram risco médio a alto (Figura 20).

RISCO		ESTRATOS						CICLOS
		1	2	3	4	5	6	
Baixo	< 1%	-	-	-	-	-	-	
Médio	1,0 a 3,9%	1	-	1,6	-	1	-	
Alto	> 3,9%	2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	2, 3, 4, 5	1, 2, 3, 4, 5, 6	2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	

Fig. 20 – Estratos em risco pelo índice de infestação por *Aedes aegypti*, no município de Camaragibe, no ano de 2020.

principalmente nos estratos 2, 4 e 6 (Figura 21).

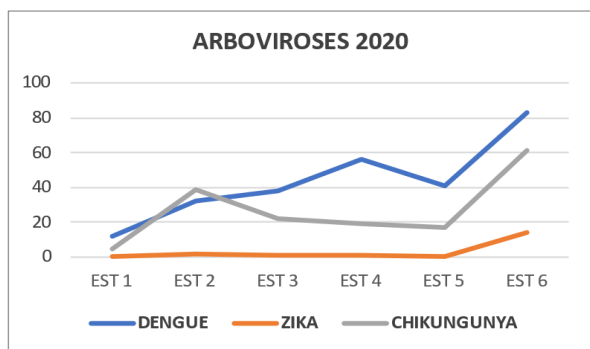


Fig. 21 – Casos de arboviroses por estrato, no município de Camaragibe, no ano de 2020.

RISCO		CICLOS						ESTRATOS
		1	2	3	4	5	6	
Baixo	< 1%	-	-	-	-	-	-	
Médio	1,0 a 3,9%	1	-	-	-	-	-	
Alto	> 3,9%	2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	

Fig. 22 – Estratos em risco pelo índice de infestação por *Aedes aegypti*, no município de Camaragibe, no ano de 2021.

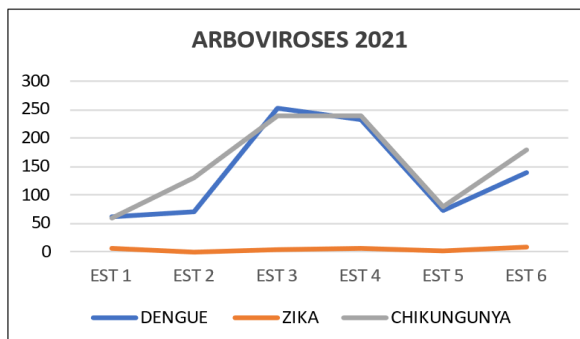


Fig. 23 – Casos de arboviroses por estrato, no município de Camaragibe, no ano de 2021.

Os principais tipos de recipientes no ano de 2020, foram depósitos de armazenamento de água a nível do solo (Figura 24), principalmente pela facilidade de acesso a essas estruturas, o que também ocorreu no ano seguinte (Figura 25).

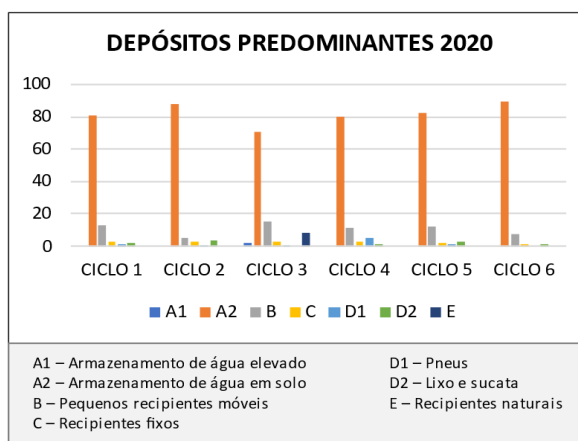


Fig. 24 – Depósitos predominantes nos seis ciclos do LIRAA, no município de Camaragibe, no ano de 2020.

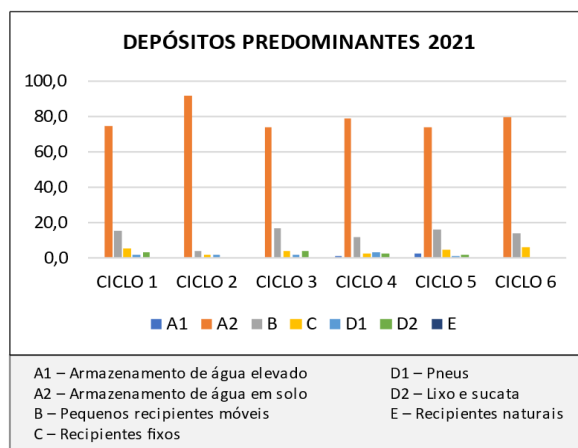


Fig. 25 – Depósitos predominantes nos seis ciclos do LIRAA, no município de Camaragibe, no ano de 2021.

Referências

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Levantamento Rápido de Índices para *Aedes Aegypti* (LIRAA) para vigilância entomológica do *Aedes aegypti* no Brasil: metodologia para avaliação dos índices de Breteau e Predial e tipo de recipientes. **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis** – Brasília, 2013.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Agravos de Notificação - Sinan, Brasília: Ministério da Saúde. 2022. Disponível em: <http://sinan.saude.gov.br/sinan/login/loginjsf>

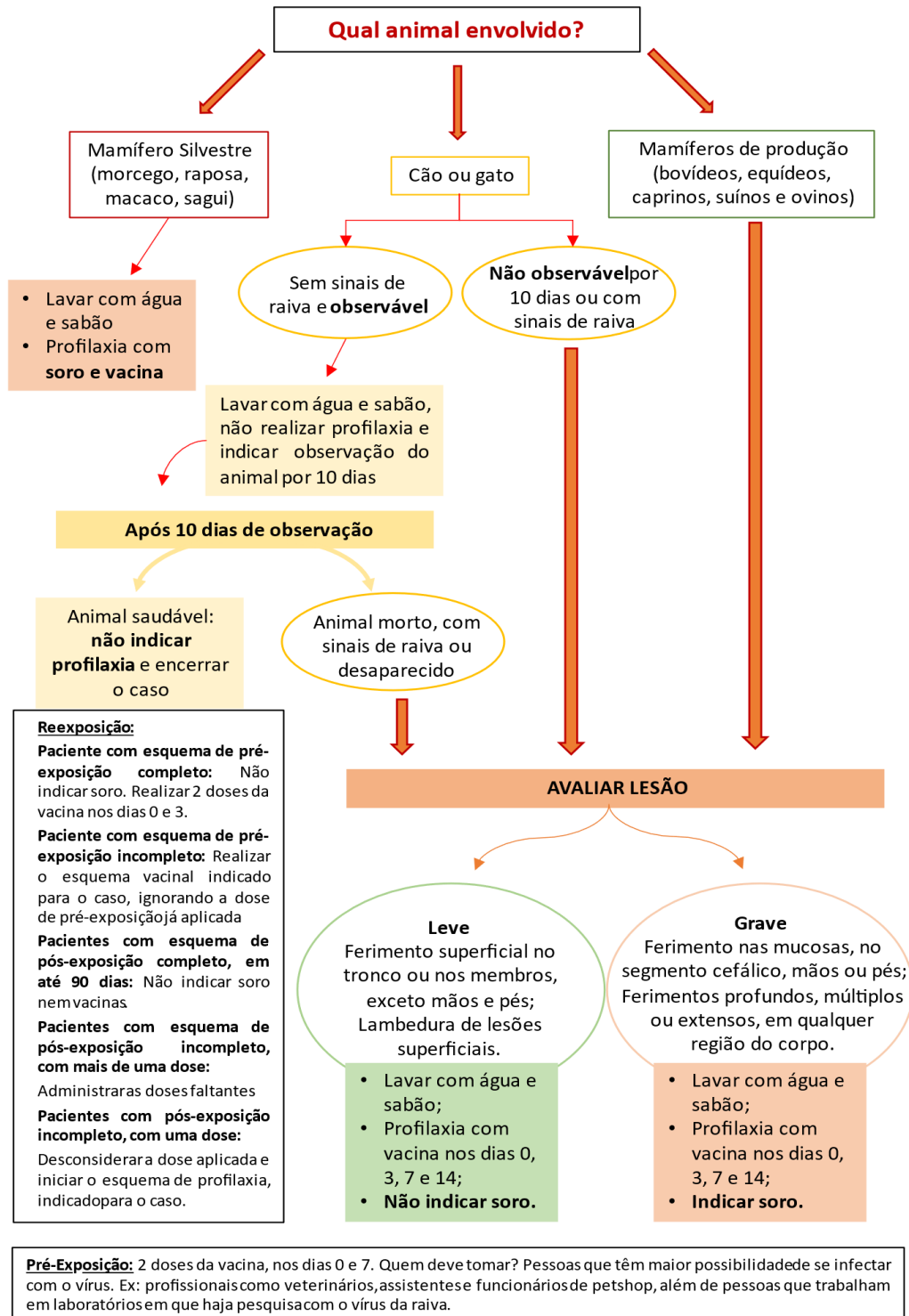
Equipe Executora

Jerlane Tarcilia Gomes Telles
Lucilene Martins Trindade Gonçalves

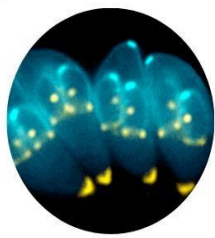
Apêndice I: Boletim Epidemiológico- Arboviroses em Camaragibe (2011 – 2021). Página 6 de 6 (arquivo pessoal).

PROFILAXIA DA RAIVA HUMANA

NOTA TÉCNICA Nº 8/2022-CGVZ/DEIDT/SVS/MS



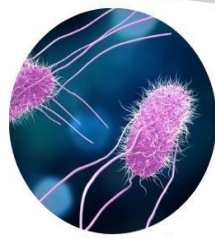
O QUE PODE TER NOS ALIMENTOS ?



Toxoplasma



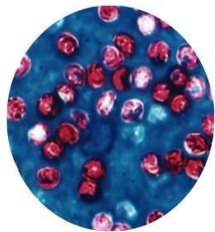
Brucella



Salmonella



Tênia



Cryptosporidium



Mycobacterium



Listeria



streptococcus

Os alimentos contaminados podem ter todos esses micróbios e vários outros e nos causar diversas doenças!

As doenças podem nos causar desde diarreia, vômitos, febre e mal estar até problemas neurológicos graves. Para evitá-las basta ter uma boa higiene na preparação dos alimentos, tais como carnes bem cozidas e verduras e frutas bem lavadas.

Imagens: google

COMO HIGIENIZAR FRUTAS E VERDURAS?

Frutas e verduras de casca dura, que serão descascadas para consumo, deve-se lavar apenas com água e detergente, enxaguando bem.



Já as frutas e verduras de casca mole, que serão consumidos sem descascar, deve-se usar uma mistura de hipoclorito e água. Você deve olhar o rotundo do produto que será utilizado, caso tenha escrito **“hipoclorito de sódio a 1%”**, deve-se usar 2 colheres de sopa em cada 1 litro de água. Caso o produto tenha escrito **“hipoclorito de sódio a 2,5%”**, deve-se usar 1 colher de sopa em cada 1 litro de água. Em ambos os casos, deve-se deixar em descanso por meia hora e em seguida enxaguar bem.



Importante lembrar que as carnes devem ser sempre bem passadas para evitar o consumo de micróbios que possam nos causar doenças. Observar também se há o selo de inspeção sanitária municipal (SIM), estadual (SIE) ou federal (SIF).

1. REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes Nacional da Vigilância em Saúde, 2010, disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_vigilancia_saude.pdf. Data de acesso: 18/12/2023

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância Ambiental em Saúde, 2002, disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_sinvas.pdf. Data de acesso: 18/12/2023

BRASIL. Lei 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Brasília, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 635, de 22 de maio de 2023. Institui, define e cria incentivo financeiro federal de implantação, custeio e desempenho para as modalidades de equipes Multiprofissionais na Atenção Primária à Saúde. Brasília, 2023.

CAPÍTULO II: ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO-VIROLOGIA ANIMAL

1. DISCIPLINAS CURSADAS

Foi realizado um mês de disciplinas teóricas obrigatórias a todos os residentes, incluindo-se Bioética e Ética Profissional em Medicina Veterinária, Bioestatística, Epidemiologia e Medicina Veterinária preventiva, Metodologia Científica, Integração Ensino e Serviço e Políticas Públicas de Saúde. Além disso, também foram cursadas disciplinas obrigatórias para a área de concentração, sendo estas: Boas práticas Laboratoriais e Biossegurança e Tópicos Especiais em Vírus dos Animais Domésticos.

2. DESCRIÇÃO DO LABORATÓRIO E EQUIPE

O laboratório conta com duas áreas físicas, uma destinada as técnicas de cultivo celular, ELISA e IDGA prioritariamente e a outra destinada a biologia molecular (figuras 13 e 14). A equipe é composta por dois professores titulares, dois técnicos, uma pós-doutoranda, uma doutoranda, dois mestrandos, duas residentes, quatro alunas de graduação orientados em pesquisa.



Figura 13: Laboratório - área destinada a cultivo celular e IDGA (arquivo pessoal).



Figura 14: Laboratório - área destinada a biologia molecular (arquivo pessoal).

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS EM LABORATÓRIO

A área de concentração Medicina Veterinária Preventiva - Viroses dos Animais Domésticos, tem como foco o diagnóstico laboratorial. Desta forma foram realizados treinamentos em IDGA, cultivo celular, concentração de imunoglobulinas, PCR-CONVENCIONAL, ELISA e Testes imunocromatográficos. Técnicas descritas a seguir:

Imunodifusão em Gel de Ágar- IDGA

O IDGA trata-se de um teste sorológico, onde o antígeno entra em contato com o anticorpo do soro dos animais que se deseja testar. O teste busca anticorpo neutralizante que aparece no soro dos animais infectado (Gonçalves *et al.*, 2005). Esta técnica é utilizada para o diagnóstico de diversas enfermidades, incluindo-se anemia infecciosa equina, leucose enzoótica bovina, língua azul, lentivírus de pequenos ruminantes, influenza aviária.

Para a realização da técnica, prepara-se um gel de agarose a 1%, este é disposto em laminas de vidro ou placas de petri. Após a polimerização do gel, perfura-se os poços e por fim, os poços, são inoculados com antígeno, soros controles positivos e soros dos animais a serem testados nas posições pré estabelecidas (figura 15). As placas ou laminas inoculadas são colocadas para incubar em recipiente úmido em temperatura ambiente. Os soros e antígenos migram de forma radial, nos casos de soros positivos (com anticorpos presentes contra o antígeno do teste), será formada uma linha de precipitação visível a olho nu, que pode ser visibilizada quando a placa ou lamina é posta contra luz, após 24-28h de incubação (figura 16).

No LAVIAN, o IDGA é utilizado para o diagnóstico de leucose enzoótica bovina e lentivírus de pequenos ruminantes. Durante o período da residência, foram testados 1.399 animais, destes, 151 para leucose enzoótica bovina (36 positivos) e 1.248 para lentivírus de pequenos ruminantes (134 positivos). Os testes utilizados são produzidos “*in house*” através de cultivo celular para a obtenção de antígenos e precipitação de imunoglobulinas de soros sabidamente reagentes para obtenção de soro controle positivo.

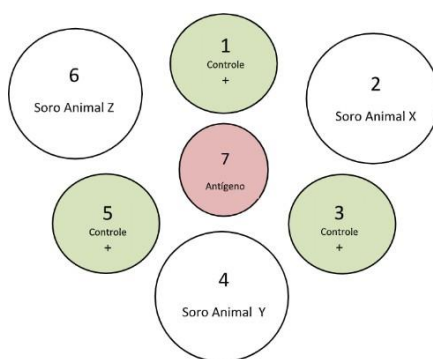


Figura 15: Esquema demonstrando onde são inoculados o antígeno, controles positivos e soros de animais testados (arquivo pessoal).

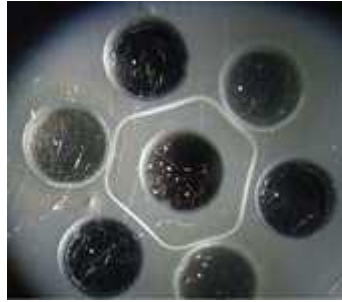


Figura 16: Teste IDGA com resultados positivos (www.uky.edu).

Cultivo Celular

O cultivo celular trata-se de uma técnica que permite manter e estudar o comportamento de células vivas fora do organismo. Ocorre a partir do isolamento de células de um determinado tecido, sendo este animal ou vegetal. Há a manutenção da viabilidade e proliferação dessas células em um sistema *in vitro* constituído de nutrientes e fatores essenciais à sobrevivência, sob condições controladas de temperatura, pH e osmolaridade (Barbosa *et al.*, 2015).

No laboratório trabalha-se com dois tipos celulares: a linhagem MDBK (oriundas de rim bovino fetal) e células FLK (originadas de rim fetal ovino). Essa são utilizadas para diagnóstico viral a partir observação do efeitos citopáticos de células inoculadas com material biológico suspeito, bem como para a produção de antígenos através do cultivo de células persistentemente infectadas e retirada de sobrenadante com partículas virais (figura 17).



Figura 17: Células cultivadas observadas em microscópio (arquivo pessoal).

Concentração de Imunoglobulinas

No LAVIAN realiza-se a concentração de imunoglobulinas para a realização de IDGA *in house*. Utiliza-se soros sanguíneos de animais comprovadamente positivos para o antígeno a ser utilizado. Esse “pool” de soros é inativado a 56°C durante 60 min, em seguida precipitado com solução saturada de sulfato de amônia, reconstituído em PBS e dialisado contra PBS. Para a diálise, utiliza-se uma membrana microporosa, onde uma dentro da membrana coloca-se o precipitado de imunoglobulinas e esta membrana é imersa em uma solução concentrada com PBS, diante da diferença de concentração de soluto entre uma solução e outra, através do equilíbrio osmótico, a solução de imunoglobulinas perde líquido para o meio através dos microporos da membrana até que se atinga a concentração ideal.

PCR - Convencional

A PCR tem por objetivo a identificação de DNA específico presente na amostra. Para a realização da técnica primeiro se obtém o DNA na amostra. As amostras utilizadas são diversas, incluindo-se solo, água, sobrenadante de cultivo celular, crostras, órgãos e sangue de animais. São utilizados kits e protocolos comerciais para a obtenção do material genético a partir das amostras. Nos casos de vírus na forma de RNA, este é convertido em DNA através do uso da enzima transcriptase reversa. A quantidade de DNA obtida é quantificada através do aparelho *Nanodrop*® e partir do resultado obtido, o DNA será concentrado ou diluído para a realização da técnica.

Para a realização da PCR, o DNA obtido é misturado aos reagentes necessários para a reação, são estes: os primers, que indicam a fração de DNA viral a ser multiplicado; o MasterMix, contendo as bases de DNA que serão utilizadas para a montagem dos clones; a TAQ- Polimerase, enzima responsável pela síntese das novas fitas de DNA e água livre de nucleases, se necessário. Essa mistura é posta no termociclador, aparelho que replica os ciclos necessários de temperatura e tempo para que ocorra todas as fases para a multiplicação do fragmento de DNA genético pesquisado - desnaturação, anelamento e extensão – (figura 18).



Figura 18: Termociclador utilizado nas reações de PCR (arquivo pessoal).

Após a multiplicação do DNA pesquisado realizada no termociclador, prepara-se o gel para a inoculação das amostras. O gel com as amostras, segue para a cuba de eletroforese, onde a corrente elétrica força a migração das mostras por entre a malha do gel (figura 19). Por fim segue-se com a leitura através do fotodocumentador, onde o peso das bases de DNA encontradas são reveladas em um programa de computador através de luz ultravioleta, há um poço com os pesos das bases para ser utilizado como referência, bem como controle negativo (para assegurar que não houve contaminação), o controle positivo, para ser utilizado como referência para amostras positivas, seguidas das amostras a serem testadas (figura 20).



Figura 19: Cuba de eletroforese em funcionamento (arquivo pessoal).

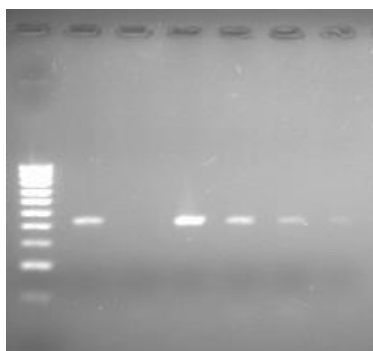


Figura 20: Resultado de PCR pós leitura em fotodocumentador. Amostras positivas para FeLV (Cordeiro, 2023).

ELISA

A técnica de ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática) tem como princípio a ligação de antígenos (AG) com anticorpos (AC), que é evidenciada por uma reação enzimática subsequente, que gera mudança de coloração. Há variações dos tipos de ELISA, podendo ser direto (identifica o antígeno) ou indireto (identifica o anticorpo), tornando o método versátil tanto para análises qualitativas como quantitativas (Midhun *et al.*, 2021). O protocolo utilizado para a realização do teste varia de acordo com o tipo de elisa, fabricante do kit utilizado e patologia ou substâncias a serem pesquisadas. No LAVIAN foram, a título de treinamento foram realizados os dois métodos de ELISA, direto e indireto.

Testes imunocromatograficos

Os testes imunocromatograficos, conhecidos como “testes rápidos” são testes

de fácil execução e interpretação que são amplamente utilizados na clínica de pequenos animais principalmente. O teste pode ser direto (pesquisa antígeno) ou indireto (pesquisa anticorpo). A execução e interpretação do método pode variar de acordo com o fabricante, mas as variações são mínimas.

Os testes utilizados no LAVIAN foram do tipo fluxo lateral direto e indireto. A estrutura é formada por um cassete contendo uma membrana interna impregnada com antígeno (no caso de pesquisa de anticorpo) ou com anticorpo (no caso de pesquisa de antígeno). Há duas letras no cassete, a letra “T”, que indica a linha de teste, caso amostra utilizada for positiva forma-se um linha colorida, havendo a formação de imunocomplexos; a letra “C”, representa o controle do teste, esta está impregnada com anticorpo anti antígeno (nos casos de teste indireto) ou anticorpo anti-anticorpo específico (nos casos de teste direto), também chamado de conjugado, este comprova a validade do teste (figura 21).



Figura 21: Cassete de cima mostra resultado negativo, cassete abaixo exibe resultado positivo, ambos para o vírus da cinomose canina (arquivo pessoal).

Os testes foram realizados na rotina ambulatorial do HOVET-UFRPE a partir de requisições de residentes na área de clínica médica e cirúrgica de cães e gatos. Foram realizados 19 testes imunocromatográficos, destes 8 para FIV e FeLV (1 caso positivo para FeLV) e 3 para parvovirose e coronavirose (todos negativos).

EVENTOS REALIZADOS E OUTRAS ATIVIDADES

Foram realizadas três campanhas de vacinação antirrábica em parceria com a prefeitura do Recife. Houve momentos informativos acerca das principais viroses de cães e gatos com foco na prevenção das afecções para o público do hospital- escola do UFRPE. Também foi realizado o Evento da Saúde Única, abordando diversos temas com foco em saúde Única. Houve produção de material didático para os alunos da graduação com a criação de podcasts, vídeos e estudos de casos a serem utilizados na disciplina da graduação, além da ministração de aulas práticas de IDGA e ELISA. Por fim, foi realizado um treinamento de um mês no LFDA - Recife sobre PCR em tempo real e validação de protocolos.

4. REFERÊNCIAS

GONÇALVES, C. M.; RIBEIRO, R. M. G.,. Anemia Infecciosa Equina: Revisão de Literatura. Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária, n. 4, Jan. 2005.

BARBOSA, B. S.; SANTOS, F. A.; PIMENTEL, M. M. L.; FERNANDES, D. P.; PREXEDES, E. A.; BEZERRA, M. B. Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, v. 9, 334-347, 2015.

MIDHUN, N.; SONIA BAI, J. K.; CHAKRAPANI, K. V.; HARIPRIYA, G.; PATHURI, C.K. V. S.; RAMALAKSHMI, N. S.; Enzyme linked immunosorbant assay - lab diagnosis: A review. Indian J Microbiol Res, 2021; 8(1): p. 10-14.

CAPÍTULO III

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENO DE LEUCOSE ENZOÓTICA
BOVINA A PARTIR DE CÉLULAS DE LINHAGEM FLK
PERSISTENTEMENTE INFECTADAS PARA USO EM
IMUNODIAGNÓSTICO**

Produção de Antígeno de Leucose Enzoótica Bovina a Partir de Células de Linhagem
FLK Persistentemente Infectadas Para Uso Em Imuno diagnóstico

[*Production of Bovine Enzootic Leukoses Antigen in Persistently Infected FLK Lineage
Cells for Use in Immunodiagnosics*]

RESUMO

A Leucose Enzoótica Bovina é uma enfermidade ocasionada por um retrovírus oncogênico, Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV). É uma doença infecto-contagiosa de notificação compulsória e ocasiona grande impacto econômico negativo na produção. Quanto ao seu diagnóstico, a OIE preconiza alguns métodos, sendo o ELISA e o IDGA os mais indicados. O IDGA, trata-se de um teste sorológico onde o antígeno entra em contato com o anticorpo proveniente do soro dos animais que se deseja testar, formando uma linha de imunoprecipitação nos casos positivos. Neste contexto, o trabalho tem como objetivo relatar como foi realizada a obtenção de antígeno a partir de células FLK persistentemente infectadas com o BLV, podendo este ser utilizado para composição futura de um teste de IDGA *in house*. Para a obtenção do antígeno foram empregadas células da linhagem FLK (rim fetal ovino) persistentemente infectadas. A cada 7 dias os sobrenadantes das culturas eram coletados e estes foram congelados e descongelados três vezes, em seguida clarificados por centrifugação e concentrado em 40X. Foi realizada PCR para caracterização de antígeno e amostra de soro utilizada no teste e seguiu-se com o teste de IDGA. Ao final de dois meses, obteve-se cerca de três litros de sobrenadante com partículas virais. O sobrenadante foi concentrado em 40X para realização do teste de imunodifusão, havendo formação de linhas imunoprecipitantes após 24h de inoculação. Desta forma, comprovando a presença de partículas virais viáveis no antígeno obtido. No entanto, este precisa passar por mais testes de concentração, além de realização de sua purificação e de testes para definição de sensibilidade e especificidade.

Palavras chaves: Cultivo celular, células FLK, IDGA, retrovírus oncogênico.

ABSTRACT

Bovine Enzootic Leukosis is a disease caused by an oncogenic retrovirus, Bovine Enzootic Leukosis Virus (BLV). It is a compulsorily notifiable infectious disease that causes a major negative economic impact on production. Regarding its diagnosis, the OIE recommends some methods, with ELISA and IDGA being the most recommended. IDGA is a serological test where the antigen comes in contact with the antibody from the serum of the animals to be tested, forming an immunoprecipitation line in positive cases. In this context, the article aims to report how antigen was obtained from FLK cells persistently infected with BLV, which can be used for the future composition of an

in-house IDGA test. To obtain the antigen, persistently infected cells of the FLK (fetal ovine kidney) lineage were used. Every 7 days, culture supernatants were collected and frozen and thawed three times, then clarified by centrifugation, and concentrated at 40X. PCR was performed to characterize the antigen and serum sample used in the test and resistance to the IDGA test. At the end of two months, around three liters of supernatant with viral particles were obtained. The supernatant was concentrated at 40X to perform the immunodiffusion test, with immunoprecipitating lines forming after 24 hours of inoculation. In this way, proving the presence of viable viral particles without enhancements. However, this needs to undergo more concentration tests, in addition to purification and tests to define sensitivity and specificity.

Keywords: Cell culture, FLK cells, IDGA, oncogenic retrovirus.

INTRODUÇÃO

A Leucose Enzoótica Bovina é uma doença infecto-contagiosa de notificação compulsória ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e a Organização Mundial da Saúde Animal (OMSA). Essa enfermidade é ocasionada por um retrovírus oncogênico, Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV), do gênero *Deltaretrovirus* da família *Retroviridae* (Moratorio *et al.*, 2010). Tal enfermidade ocasiona um impacto econômico negativo na produção devido a perdas diretas com decréscimo na produção e indiretas com restrições na importação de animais e produtos derivados oriundos de áreas infectadas (Marawan *et al.*, 2021). Além de perdas importantes devido aos efeitos da infecção subclínica causando quedas da produção do animal infectado, sobretudo na produção leiteira e no desempenho reprodutivo (Szcotk *et al.*, 2022).

Quanto ao diagnóstico da enfermidade, a OIE (2018) preconiza alguns métodos, tais como isolamento viral, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA). Sendo o ELISA e IDGA os mais indicados por apresentarem algumas vantagens, tais como: demonstrar a ausência de infecção na população bovina e confirmação de casos clínicos. No que se refere ao IDGA, é considerado específico para a detecção de anticorpos em amostras individuais de soro. Trata-se de um teste simples de fácil execução, não requer infraestrutura sofisticada e equipamentos caros, sendo utilizado de forma rotineira em diferentes países como base para programas de controle e erradicação da doença. No Brasil, a imunodifusão em gel de ágar é utilizada de forma rotineira para a realização de pesquisas sobre a prevalência da LEB em rebanhos bovinos, devido a sua praticidade, baixo custo e a boa especificidade (Galinari, 2014), trata-se de um teste sorológico onde o antígeno entra em contato com o anticorpo proveniente do soro dos animais que se deseja testar. O teste busca anticorpos precipitantes que estão presentes no soro dos animais infectados (Gonçalves *et al.*, 2005).

Neste contexto, o trabalho tem como objetivo relatar como foi realizada a obtenção de antígeno a partir de células FLK persistentemente infectadas com o BLV, podendo este ser utilizado para composição futura de um teste de IDGA *in house*.

MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção das partículas virais foram empregadas células da linhagem FLK (rim fetal ovino). Estas estavam persistentemente infectadas com o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina e livres de Herpesvírus, Pestivírus e *Mycoplasma spp.* Para o povoamento de células, foram utilizados frascos em poliestireno com superfície de 225cm², o meio de cultivo utilizado foi RPMI 1640 contendo penicilina, estreptomicina, anfotericina B e suplementados com 2% de SFB. Estas foram mantidas em estufa com a temperatura regulada a 37°C. A partir do 7º dia pós cultivo e a cada 7 dias, o sobrenadante das culturas foram coletados e realizadas novas passagens das monocamadas.

Os sobrenadantes foram congelados e descongelados três vezes, em seguida clarificados por centrifugação a 3.500g por 30 minutos, a 4°C e dialisados em membrana 12.000 kDa, contra polietilenoglicol (PEG 6.000) a 40% em PBS (pH 7,6), a 4°C durante 72h até a concentração de aproximadamente 40 vezes. Em seguida, o antígeno foi tratado com Triton X-100 até a concentração final 0,1%, 2 x 10⁻⁴ M de PMSF e armazenado a -20°C. Por fim, o antígeno foi diluído em PBS (pH 7,6) e testado frente ao soro controle positivo de referência.

Além do teste em IDGA, foi realizada a caracterização do antígeno e do sangue do animal controle utilizado através de PCR. Para tal, o DNA genômico do antígeno e do sangue foi extraído utilizando o kit *QIAGEN DNAeasy Extraction Blood and Tissue* da QIAGEN®. A amplificação do gene gp 51 do VLB foi realizada utilizando os seguintes primers: env5032 forward (5' - TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3') e env5608reverse (5' - AACAAACACCTCTGGGAAGGGT-3'). A reação final foi realizada com 0.4 mM dNTPs, 1X tampão PCR (Thermo Scientific R), 3 mM MgCl₂ e 1U de Taq DNA polymerase (invitrogen).

As condições para amplificação por PCR foram as seguintes: Desnaturação inicial: 94 °C por 5 min, 40 ciclos de: 94°C por 30 s, 60°C por 30 s e 72°C por 1 min; Extensão final: 72°C por 5 min. Com produto final de 444 pb. O produto amplificado será submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% a 100 V e 400mA por 40 min (obtido de ASFAW et al., 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi recebido um frasco de 25 cm³ com células FLK persistentemente infectadas com o BVL, ao final de dois meses, realizando-se passagens, obteve-se cerca de três litros de sobrenadante com partículas virais. O sobrenadante utilizado no teste IDGA foi concentrado em 40X. Este foi testado em IDGA por imunodifusão dupla frente ao soro de animal sabidamente positivo. Há a confirmação de que houve reação conforme a formação da linha que se deu em 24h pós inoculação nos poços (figura 22). O resultado da PCR realizada evidenciou, de forma clara, a presença no antígeno no sobrenadante da cultura, com o aparecimento de bandas nítidas e condizentes com o controle positivo. Também foi realizada PCR com sangue do animal utilizado em teste, obtendo-se uma reação positiva.

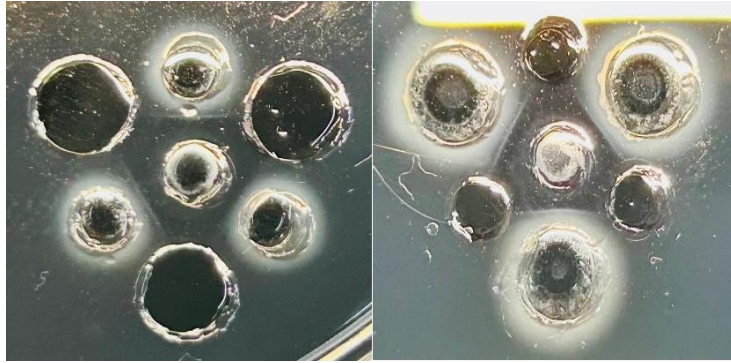


Figura 22: Resultados do teste IDGA com formação de linhas reagentes. Na imagem a esquerda, o soro de referência foi utilizado nos poços de soro controle. Na imagem a direita, o soro de referência foi utilizado na condição de amostra. (Nascimento, 2023).

A utilização de células FLK persistentemente infectadas para obtenção do BVL, é uma técnica consolidada e utilizada a bastante tempo. Em 1976, Van Der Maaten e Miller estabeleceram uma cultura de longo prazo por inoculação de células FLK com o vírus da BLV. Em um estudo comparativo, realizado por Onuma *et al.*, 1981, foi comprovado que as células FLK persistentemente produzem antígenos de melhor qualidade quando comparadas a células produzidas a partir de um rim com linfossarcoma juvenil bovino desmostrando a alta eficiência das células FLK (Onuma *et al.*, 1981).

No presente artigo foi comprovado que houve a obtenção do antígeno através do cultivo das células FLK persistentemente infectadas, constatando-se através da formação de linha no teste de IDGA, além da comprovação em PCR da presença do DNA viral. No entanto a linha formada na imunoprecipitação foi notadamente espessa e borrada, havendo um ponto a ser considerado: o soro do animal utilizado estava lipídico, aspecto que contribuiu com esta condição.

Além disso, nota-se que quando o soro foi utilizado na condição de amostras, as linhas ficaram mais nítidas e iluminadas, isso se deu devido a maior quantidade de material depositada no poço quando comparada a quantidade de soro utilizada nos poços de soro de referência, sendo esta três vezes menor. No entanto, em se tratando do antígeno, este precisa passar por mais testes de concentração, além de realização de sua purificação e realização de testes para definição de sensibilidade e especificidade. Para tal é necessário ampliar o número de amostras de soros de bovinos infectados para serem utilizadas nos estudos.

CONCLUSÃO

A Leucose Enzoótica bovina, é uma doença de notificação compulsória de grande importância econômica, mas que não tem kit de diagnóstico comercial desenvolvido no Brasil. Desta forma, há grande necessidade de pesquisas que venham a viabilizar o desenvolvimento de testes que possam ser utilizados em pesquisas ou no controle das doenças no rebanho. O trabalho teve seu objetivo cumprido, pois foi

alcançada a obtenção de antígeno reagente ao soro bovino sabidamente positivo na reação de IDGA, além disso, foi devidamente caracterizado através de PCR. Se faz necessário maiores estudos e experimentos para padronização do antígeno e soros controles positivos para sua utilização no diagnóstico da LEB através do IDGA.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não existir conflito de interesse

REFERÊNCIAS

GALINARI, Grazielle Cossenzo Florentino. Leucose enzoótica bovina: isolamento de amostras brasileiras do vírus e obtenção de antígeno. 2014. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

GONÇALVES, C. M.; RIBEIRO, R. M. G., Anemia Infecciosa Equina: Revisão de Literatura. Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária, n. 4, Jan. 2005.

MARAWAN, M. A.; ALOUFFI, A.; EL TOKHY, S.; BADAWY, S. *et al.* Bovine Leukaemia Virus: current epidemiological circumstance and future prospective. Viruses, 13, n. 11, p. 2167, 2021.

M. Onuma, K. Matsumoto, R. Moriguchi, Y. Fujimoto, Y. Miyake, T. Mikami and H. Izawa, Transformed Phenotypes in Long-term Cultures Persistently Infected with Bovine Leukemia Virus. Can. J. comp. Med. 45: 154-15, Abril. 1981

MORATORIO, G.; OBAL, G.; DUBRA, A.; CORREA, A. *et al.* Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. Archives of virology, 155, p. 481- 489, 2010.

OIE. Enzootic bovine leucosis (Chapter 3.4. 9). : World Organization for Animal Health (OIE) Paris: 1113-1124 p. 2018.

SZCZOTKA, M.; KUŹMAK, J. Expression of bovine leukaemia virus (BLV) gp51 protein in blood and milk cells of cows with leukosis. Journal of Veterinary Research, 2022.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização da residência foi uma experiência bastante enriquecedora, visto que, como demonstrado no decorrer do trabalho, houve o acompanhamento e participação em uma gama de experiências contemplando a medicina veterinária, tanto no aspecto de diagnóstico virológico, como em outras atividades em equipe, além das atividades no SUS.

Em relação a experiência da área de concentração, foi um momento de bastante acolhimento e ensinamento, eu havia chegado de uma outra área da medicina veterinária (clínica de cães e gatos) e, apesar da minha pouca de experiência em laboratório, consegui adquirir boa vivencia unindo bem a teoria e prática em laboratório, mostrando uma equipe segura e dedicada ao ensinar. Sou grata a toda dedicação da equipe em busca do meu crescimento profissional. Por fim, além da experiência acadêmica e conhecimento científico adquirido de forma geral, obtive um bom desenvolvimento nas relações interpessoais.