

Júlia Rebecca Saraiva

**Biofilmes orais em bovinos e sua importância na
doença periodontal
Relatório de Estágio Curricular Obrigatório
Trabalho de Conclusão de Curso**



Júlia Rebecca Saraiva

Trabalho de Conclusão de Curso

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araçatuba, para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Tit. Iveraldo dos Santos Dutra

**Araçatuba – São Paulo
2016**

Encaminhamento

Encaminhamos o presente Trabalho de Conclusão de Curso para que o Conselho de Estágios Curriculares tome as providências cabíveis às bancas examinadoras do mesmo.

Júlia Rebecca Saraiva**Estagiária**

Prof. Titular Iveraldo dos Santos Dutra**Supervisor****Araçatuba****Novembro 2016**

Aos meus pais e irmãos e aos meus
tios e primos.

Ao meu Orientador e a minha Co-
orientadora de Iniciação Científica
Doutoranda Ana Carolina Borsanelli

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me são concedidas, pelas pessoas que são colocadas em minha vida e pela certeza que carrego de que não caminhamos sozinhos.

Agradeço aos meus pais pela garra e incentivo, pelo apoio e os esforços que fizeram/fazem para que eu alcance os meus sonhos. Vocês são o meu motivo.

Agradeço aos meus tios Lucimara e Rinaldo, e aos meus primos Rodolfo e Duda por me acolherem em suas vidas, pelo amor e carinho que recebi morando com vocês, por dividirem a casa, o coração e um pedaço da minha história.

Agradeço a todas as pessoas que cruzaram minha vida deixando marcas boas e ensinamentos. Todos têm algo a ensinar.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Titular Iveraldo dos Santos Dutra por todo exemplo de profissionalismo, pela paciência e pelos ensinamentos e por ser fundamental no meu crescimento profissional.

Agradeço à Doutoranda Ana Carolina Borsanelli por toda dedicação, pela atenciosa co-orientação, pelo estímulo e apoio, e por ser uma referência profissional e pessoal a qual me inspiro.

Agradeço à equipe do Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos animais da UNESP de Araçatuba pela convivência e pelo trabalho mútuo que aprendo com vocês.

Agradeço aos amigos que reconheci pelo caminho da vida, por tornarem minha caminhada mais leve, feliz e esperançosa. “A amizade é um amor que nunca morre.”

Agradeço por todos os animais os quais pude dividir um pouquinho da minha jornada até agora, por ensinarem o real significado do amor e da pureza e por me motivarem a ser um ser humano melhor, em especial aos meus cães pelo afago, pelo afeto e pelo amor incondicional.

“Somos todos anjos de uma só asa, e só podemos voar quando nos abraçamos uns aos outros.”

Luciano de Crescenzo

Sumário

Resumo	1
Introdução	2
Material e Métodos	4
Resultados e Discussões	5
Conclusão	8
Referências	8
Relatório de Estágio Supervisionado.....	12
Introdução.....	14
Laboratório de Análise de Alimentos e Água.....	14
Atividades Complementares.....	20
Laboratório de Leptospirose.....	21
Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública.....	23
Outras atividades desenvolvidas.....	25
Recomendação e Conclusão.....	26
Referências.....	27

Biofilmes orais em bovinos e sua importância na doença periodontal

Júlia Rebecca Saraiva; Iveraldo S. Dutra

Resumo

A periodontite é uma enfermidade infecciosa multifatorial de importância econômica e sanitária em diversas espécies animais. Em bovinos, a doença é conhecida popularmente como “cara inchada” e afeta principalmente animais em fase de dentição. Durante as décadas de 1960 a 1980 incidiu severamente em rebanhos bovinos principalmente em áreas recém-formadas ou reformadas para pastejo, ocorrendo em episódios e declinando naturalmente com o decorrer do tempo. A presença de micro-organismos periodontopatogênicos aliados a algum fator alimentar determinante ou modificador torna-se imprescindível para a ocorrência da doença. O acúmulo de bactérias na superfície dentária leva à formação da placa dental supra ou subgengival, uma verdadeira comunidade bacteriana também conhecida como biofilme. O biofilme alberga inúmeras espécies bacterianas e dentre elas os anaeróbios estritos e facultativos que predominam na microbiota humana e animal associadas à periodontite. Em humanos, as bactérias do complexo vermelho são consideradas os principais periodontopatógenos envolvidos na etiologia da doença periodontal. Em bovinos com “cara inchada” *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Treponema* spp., são alguns dos micro-organismos detectados em bolsas periodontais. Neste contexto, o presente trabalho objetiva focar a importância da presença do biofilme oral em bovinos com a doença periodontal. Foram utilizados um total de 31 artigos, além do uso de capítulos de livros para complementar a revisão. Pode-se deduzir que a periodontite é uma enfermidade relativamente comum nos rebanhos brasileiros sendo responsável por grandes perdas econômicas nas suas formas endêmicas e epidêmicas. A caracterização e análise da microbiota envolvida da etiologia da periodontite são de importância para se estabelecer a etiologia, o tratamento e a profilaxia da doença. Assim o biofilme em homeostase favorece a permanência desses periodontopatógenos, enquanto que a sua disbiose está associada à periodontite. Podemos concluir que a periodontite é uma enfermidade complexa decorrente do acúmulo de biofilme bacteriano específico no sulco gengival dos animais.

Palavras-chaves: biofilme, bovino, cálculo dental, periodontite, placa bacteriana

Introdução

Os dentes apresentam uma superfície dura não descamativa favorecendo o desenvolvimento de depósitos bacterianos, o que significa que o acúmulo e o metabolismo de bactérias sobre as superfícies dentárias são considerados os principais motivos para a ocorrência de doenças periodontais, cáries, gengivites e estomatites (LANG; MOMBELLI; ATTSTRÖM, 2010). Quando ocorre o acúmulo de depósitos bacterianos sobre os dentes, inicia-se resposta inflamatória nos tecidos gengivais locais de tal forma que quando removidos ocorre o desaparecimento dos sinais clínicos (LÖE et al., 1965; THEILADE et. al., 1966). Denomina-se placa dental ou placa bacteriana o acúmulo de bactérias na superfície dental, implicando um risco à saúde bucal e integridade dos dentes do indivíduo.

Segundo Wilderer & Charaklis (1989), a palavra biofilme descreve toda e qualquer comunidade microbiana que se deposita em algum material duro não descamativo, podendo associar-se à superfície do dente. Gristina (1987) e Marshall (1992) descrevem que a formação dos biofilmes é consideravelmente rápida em sistemas fluidos, uma vez que fontes de nutrientes são fornecidas às bactérias facilitando a multiplicação e adesão das mesmas, e que ainda, os biofilmes protegem-nas dos agentes antimicrobianos exigindo, assim, que seja feita a remoção mecânica para que se atinja sucesso no tratamento.

Estruturalmente, os biofilmes apresentam variações em seu arranjo e na espessura dos micro-organismos aderidos, podendo apresentar-se em forma de paliçada, a qual prevalecem os cocos, bastonetes e bactérias filamentosas, especialmente as Gram-negativas, e também em forma de espiga de milho, quando a camada superficial é composta principalmente de alguns cocos e Gram-negativos associados a micro-organismos filamentosos (LANG; MOMBELLI; ATTSTRÖM, 2010).

Embora diversas bactérias presentes no biofilme não sejam efetivamente patogênicas, a interação entre elas influencia o processo da doença por oferecerem assistência aos micro-organismos patogênicos contidos no biofilme microbiano. O que se pode inferir a partir disso é que esses supostos micro-organismos “comensais” podem assegurar o potencial de virulência de outros micro-organismos justamente por oferecer fatores defensivos e condições específicas para a permanência e multiplicação de bactérias periodontopatogênicas (KINANE; BERGLUNDH; LINDHE, 2010).

As doenças periodontais são infecções resultantes a partir de um desequilíbrio perante a presença de micro-organismos que colonizam supra ou subgengivalmente

a superfície dental. Normalmente a relação ecológica entre o hospedeiro e a microbiota oral não apresenta distúrbios, entretanto um subgrupo de espécies bacterianas pode ser introduzido no local e após multiplicarem-se ou após exibirem novas propriedades, passam a lesionar e provocar a destruição do periodonto (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2010).

Essa transição que ocorre de saúde para doença periodontal é resultante de alterações na simbiose da microbiota oral geralmente composta por micro-organismos facultativos, para uma comunidade microbiana disbiótica capacitada à destruição do periodonto. O processo inflamatório altera a homeostase local e estimula respostas imunes específicas do hospedeiro criando condições condescendentes para o crescimento e multiplicação bacteriana (HAJISHENGALLIS, 2015).

A “cara inchada” dos bovinos caracteriza-se por ser uma periodontite purulenta progressiva que resulta em formação de bolsa periodontal, de forma que, em casos mais avançados, os animais apresentam mal estado nutricional por não se alimentarem adequadamente, tornam-se suscetíveis a outras doenças e podem morrer por inanição (DUTRA et al., 1986). A enfermidade ocorre em episódios, declinando naturalmente em períodos variáveis e reincide em áreas anteriormente endêmicas após a reforma de pastagem ou quando os animais são alimentados com forrageiras cultivadas em áreas anteriormente endêmicas para a doença (DUTRA, et. al., 1993). Inicialmente a ideia equivocada de que a “cara inchada” era causada por deficiência ou desequilíbrio mineral foi amplamente difundida, entretanto não há evidências que relacione essa enfermidade com deficiência mineral (DÖBEREINER et al., 2004).

As lesões geralmente iniciam-se entre os segundos e terceiros pré-molares maxilares, resultando em formação de bolsa periodontal que acumulam restos alimentares e material untuoso de mau cheiro, característico do envolvimento de bactérias anaeróbias Gram-negativas que podem ser isoladas a partir destas lesões. A destruição dos alvéolos decorre do processo inflamatório na gengiva marginal, que leva ao afrouxamento e perda dos dentes. Alguns animais acometidos apresentam abaulamento facial justificando o nome popular da “cara inchada” (DÖBEREINER et al., 2004).

Bactérias anaeróbias são predominantes na microbiota de seres humanos com periodontite (SOCRANSKY et al., 1998) e nos animais. Os estudos a respeito dos aspectos bacteriológicos da “cara inchada” dos bovinos demonstraram a natureza infecciosa da doença (DÖBEREINER et al., 2004). O biofilme representa uma verdadeira comunidade proporcionando a muitas bactérias condições adequadas

para crescerem e colonizarem a estrutura dental. Além de formar um “escudo” protetor contra micro-organismos competitivos, fatores ambientais (como mecanismos de defesa do hospedeiro) e contra substâncias que possuem potencial letal, o biofilme também facilita a absorção e troca de nutrientes, além da excreção de produtos metabólicos potencialmente danosos bem como a otimização físico-química do ambiente (LANG; MOMBELLI; ATTSTRÖM, 2010). Pode-se deduzir que os biofilmes orais possuem capacidade de albergar os micro-organismos causadores da doença periodontal, além de fornecer propriedades metabólicas para a permanência, multiplicação e crescimento das espécies bacterianas.

Com base no que foi anteriormente apresentado, o presente trabalho de revisão sistemática de literatura tem como objetivo enfatizar qual o papel do biofilme oral e sua importância em bovinos com periodontite.

Material e Métodos

O presente trabalho trata-se de uma revisão sistemática de literatura que teve por objetivo analisar a importância do biofilme oral em bovinos com periodontite. O levantamento dos dados foi realizado no período de fevereiro a junho de 2016 utilizando como bancos de dados Google Acadêmico, Portal de Periódicos da Capes/Mec e PubMed. A pesquisa foi embasada na seguinte questão: *Qual a importância da presença do biofilme oral em bovinos com periodontite?*

Com base na pergunta utilizaram-se as seguintes palavras-chaves: *periodontitis in bovine* e *oral biofilm in animals*. Com base nessas palavras-chaves foram encontrados um total de 226 artigos, sendo selecionados com base na leitura de resumos e o tema de interesse um total de 31 artigos. Alguns artigos foram incorporados a partir da bibliografia dos selecionados e após terem sido encontrados pelos bancos de dados e analisados foram incluídos na revisão.

Para complementar a revisão também foi realizada uma busca sistemática nos seguintes livros: Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral (LINDHE, LANG, KARRING, 2010); Doença dos Ruminantes e Equídeos, 2ª edição (RIET-CORREA, F. et al.; 2001).

Não foi realizado critério de exclusão por tempo na busca com o intuito de obter maior abrangência e atualização de informações relacionadas à importância do biofilme oral em bovinos com doença periodontal. Sendo assim, o período de abrangência foi entre 1960 a 2015.

Resultados e Discussão

A doença periodontal já foi descrita em diversas espécies e comumente afeta animais adultos (MIKKELSEN et al., 2008), sendo que em cães é considerada uma doença da civilização, pois cães submetidos ao regime de domesticação apresentam quadros mais severos de periodontite (HARVEY, 1998). Também já foi descrita em animais selvagens, em cativeiro ou vida livre (MIKKELSEN et al., 2008), em bovinos, ovinos, caprinos e felinos.

Em diversos países como Nova Zelândia e Reino Unido relata-se a ocorrência de uma periodontite em ovinos conhecida com “broken-mouth”. Essa periodontite é caracterizada por afetar os incisivos permanentes dos animais resultando em afrouxamento e perda progressiva dos mesmos (SPENCE et al., 1988).

No Brasil, durante as décadas de 1960 e 1980 a enfermidade apresentou maior relevância sanitária e econômica na pecuária em áreas reformadas e em áreas que passaram pelo processo de reforma de pastagem, afetando bovinos e ficando popularmente conhecida como “cara inchada” (DÖBEREINER et al., 2000).

As doenças periodontais são infecções ocasionadas perante a presença de micro-organismos que colonizam a superfície dentária supra ou subgengival. A concentração microbiana em sítio subgengival varia em sulcos rasos (sadios) e em bolsas periodontais profundas, sendo maior em indivíduos com periodontite (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2010).

A maioria das bactérias possui capacidade de adesão às superfícies (MERGENHAGEN & ROSAN, 1985), de maneira que algumas possuem estruturas específicas, como polímeros extracelulares e fímbrias, que aumentam e facilitam essa adesão. Outras precisam ser expostas por maior período de tempo para se unirem às estruturas e a partir daí sintetizarem novos componentes de matriz celular. O acúmulo dessa massa bacteriana torna-se cada vez mais espesso, dificultando a difusão de oxigênio por este biofilme e gerando um ambiente anaeróbio nas camadas mais profundas dos depósitos bacterianos (MARSHALL, 1992).

A colonização bacteriana do dente é bastante heterogênea, de modo que inicialmente predominam as bactérias Gram-positivas facultativas, sendo *Streptococcus sanguis* o micro-organismo de maior prevalência neste momento. A partir de então ocorre a agregação de cocos e bastonetes Gram-positivos facultativos que se multiplicam e permitem a aderência dos Gram-negativos à placa. Os micro-organismos Gram-negativos possuem pouca capacidade de aderir-se diretamente à estrutura dentária, sendo fundamental a presença de cocos e bastonetes para que se fixem. À medida em que a placa bacteriana envelhece, outras bactérias Gram-

negativas anaeróbias estritas se aderem, aumentando o potencial patogênico do biofilme formado (LANG; MOMBELLI; ATTSTRÖM, 2010).

A placa dental tem como consequência a formação de um processo inflamatório nos tecidos moles alterando toda a ecologia local e promovendo ainda mais o crescimento de bactérias Gram-negativas. A disponibilidade de sangue, saliva, do líquido gengival, associado às interações e trocas de nutrientes entre as bactérias e seus metabólitos demonstram a formação de uma típica comunidade em que o mutualismo beneficia a permanência, persistência e multiplicação desta microbiota, representando a formação de um biofilme verdadeiro (LANG; MOMBELLI; ATTSTRÖM, 2010).

Estruturalmente a placa dental pode classificar-se em supragengival ou subgengival. Normalmente, o dente é revestido por uma fina película composta por glicoproteínas que se acredita desempenhar um papel ativo na aderência bacteriana a superfície dentária (BRECX et al., 1981). Além dessa película, a presença de gengivite também contribui para formação da placa mais rapidamente; que com o passar do tempo torna-se cada vez mais complexa e consolidada (SAXTON, 1973; HILLAM & HULL, 1977; BRECX et al., 1980). Os primeiros micro-organismos a se aderirem sobre a superfície do dente são cocos, células epiteliais e leucócitos polimorfonucleares formando pequenas colônias (BRECX et al., 1981). A partir de então, a presença de micro-organismos de diferentes espécies aderindo-se nos micro-organismos já presentes e a estrutura dentária, contribuem para formação heterogênea da placa supragengival.

A placa subgengival assemelha-se à placa supragengival, sendo composta principalmente por cocos Gram-positivos e Gram-negativos, bastonetes e organismos filamentosos. Também podem aparecer espiroquetas e micro-organismos flagelados sendo que os leucócitos ficam interpostos entre placa e camada epitelial do sulco gengival (LISTGARTEN, 1976). Em cães em que a higiene oral é interrompida, a placa subgengival pode se desenvolver dentro de poucos dias (MATSSON & ATTSTRÖM, 1979; TEN NAPEL et al., 1983). Acredita-se que as bactérias localizadas subgengivalmente são capacitadas de invadir os túbulos dentinários e consequentemente podem provocar uma reabsorção inflamatória dirigida ao cimento (ADRIAENS et al., 1988).

Quando a placa bacteriana em humanos se mineraliza, ela forma o cálculo dental que se apresenta como uma massa de coloração branco-amarelada ou amarelo-acastanhada, sendo encontrada principalmente próxima à saída dos ductos excretores das glândulas salivares quando supragengival. Em contrapartida, o cálculo subgengival não é visível a olho nu, uma vez que sua formação ocorre abaixo da

margem gengival. A importância do cálculo se dá pelo fato de servir como meio para maior aderência bacteriana (ZANDER et al., 1960; SCHOROEDER, 1969), e por possuir capacidade em aumentar o efeito da placa bacteriana, pois mantém em íntimo contato os depósitos bacterianos com os tecidos adjacentes (FRISKOPP & HAMMARSTROM, 1980). Em bovinos não há literatura relacionada à ocorrência do cálculo dental o que aponta a necessidade em se investigar as relações entre a presença de cálculo dental com a doença periodontal nessa espécie.

A periodontite é uma enfermidade multifatorial complexa que ocorre devido o acúmulo de placa bacteriana ou biofilme no sulco gengival. O biofilme é composto por um agregado de bactérias, dentre elas se encontram complexos de bactérias periodontopatogênicas que são responsáveis por causar um processo inflamatório e destruição tissular (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2010; LOESCHE, 1993).

Botteon et al. (1993) caracterizaram e isolaram os micro-organismos anaeróbios de lesões periodontais da “cara inchada”, considerando-se os seus aspectos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos e de cultivo. Os resultados evidenciaram a presença de grupos específicos de espécies bacterianas Gram-negativas, não esporuladas, com maior predominância de grupos de bactérias pigmentadas de preto e marrom, sacarolíticos e não sacarolíticos, bem como não pigmentados e fermentativos e de *Fusobacterium nucleatum*.

Socransky et al. (1998) avaliaram os grupos microbianos específicos da placa dental de humanos e dentre os três constituintes do complexo vermelho identificados, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* são considerados os principais periodontopatógenos envolvidos na etiologia das periodontites. Borsanelli et al. (2015) identificaram pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por método de cultivo independente a presença de espécies do gênero *Porphyromonas* e *Prevotella* na bolsa periodontal de bovinos com lesões de profundidade superior a 5mm e em animais periodontalmente saudáveis. Os resultados apontaram que 80% dos bovinos com periodontite albergavam *Porphyromonas endodontalis*, 73% *Prevotella melaninogenica* e 61% *Prevotella intermedia*, o que evidencia a importância da presença dessas bactérias pigmentadas de preto na etiologia da doença periodontal em bovinos.

Bactérias do gênero *Treponema* também foram encontradas em bovinos com periodontite, principalmente *Treponema amylovorum*, *T. denticola* e *T. maltophilum* (BORSANELLI et al., 2015). *Fusobacterium* spp. e outras bactérias anaeróbias facultativas também são amplamente encontradas em lesões de bovinos com periodontite (DÖBEREINER et al., 2000; DUTRA et al., 2000). A enfermidade não ocorre se estes micro-organismos (que são na maioria das vezes normais da

microbiota oral de bovinos), não estiverem presentes (DUTRA & DÖBEREINER, 2001).

Conclusão

A “cara inchada” dos bovinos é uma enfermidade multifatorial que não ocorre sem a presença de micro-organismos residentes na microbiota oral dos animais. A recuperação clínica dos animais doentes quando são transferidos para áreas indenes ou quando deixam de ingerir o fator determinante está intimamente relacionada à diminuição dos micro-organismos associados à lesão. A importância do biofilme na doença periodontal em bovinos e em outras espécies é evidente por se tratar de um verdadeiro complexo comunitário de inúmeros micro-organismos com capacidade de interações e trocas de nutrientes que abriga e oferece condições para a permanência de bactérias com potencial periodontopatogênico. Inicialmente, a formação da placa bacteriana envolve basicamente cocos e bactérias Gram-positivas com subsequente adesão de bactérias anaeróbias estritas Gram-negativas que são as maiores responsáveis pelo desencadeamento da doença. Neste contexto, a caracterização e o conhecimento sobre a microbiota oral de bovinos torna-se indispensável por parte dos médicos veterinários durante a abordagem clínica dos animais. A possibilidade de diagnosticar a doença, reconhecer o papel dos micro-organismos, prescrever o melhor tratamento e adotar medidas de controle e prevenção, podem reduzir os prejuízos econômicos e promover a saúde e o bem estar animal.

Referências

- ADRIAENS, P.A.; DE BOEVER, J.A.; LOESHE, W.J.; Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans: A reservoir of periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontology*, v.59, p. 222-230, 1988.
- BORSANELLI, A.C.; GAETTI-JARDIM, JR.E.; SCHWEITZER, C.M.; DÖBEREINER, J.; DUTRA, I.S.; Presence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the oral microflora of cattle with periodontitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35, n.10, p. 829-834, 2015.
- BORSANELLI, A.C.; GAETTI-JARDIM, JR.E.; DÖBEREINER, J.; DUTRA, I.S.; *Treponema denticola* in microflora of bovine periodontitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35, n.3, p.237-240, 2015.

BOTTEON, R.M.; DUTRA I.S.; DÖBEREINER, J.; BLOBEL, H.; Caracterização de bactérias anaeróbias isoladas de lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.13, n.3/4, p. 51-55, 1993.

BREX, M.; THEILADE, J.; ATTSTRÖM, R.; Influence of optimal and excluded oral hygiene on early formation of dental plaque on plastic films: A quantitative and descriptive light and electron microscopy. *Journal of Clinical Periodontology*, v.7, p. 361-373, 1980.

BREX, M.; THEILADE, J.; ATTSTRÖM, R.; Ultrastructural estimation of the effect of sucrose and glucose rinses on dental plaque formed on plastic films. *Scandinavian Journal of Dental Research*, v.89, p. 157-164, 1981.

DÖBEREINER, J.; DUTRA, I.S.; ROSA, I.V.; The etiology of “cara inchada”, a bovine epizootic periodontitis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.24, n.1, p. 50-56, 2004.

DÖBEREINER, J.; DUTRA, I.S.; ROSA, I.V.; BLOBEL, H.; Cara inchada of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependant periodontitis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.20, n.2, p. 47-64, 2000.

DUTRA, I.S.; BOTTEON, R.C.M.; DÖBEREINER, J.; Modificação da microbiota associada às lesões peridentárias da “cara inchada” em bezerros transferidos para área indene. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.20, n.2, p. 71-74, 2000.

DUTRA, I.S.; DÖBEREINER, J. Cara inchada dos bovinos. In: RIET-CORREA, F. et al. *Doenças de Ruminantes e Equídeos*, 2ªed. Varela: São Paulo, v.1, p. 397-401, 2001.

DUTRA, I.S.; KANOE, M.; BLOBEL, H.; Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da “cara inchada” dos bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.6, n.2, p. 59-63, 1986.

DUTRA, I.S.; MATSUMOTO, T.; DÖBEREINER, J.; Surtos de periodontite em bezerros (“cara inchada”) associados ao manejo do solo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.13, n.1/2, p. 1-4, 1993.

FRISKOPP, J.; HAMMARSTRÖM, L.; A comparative scanning electron microscopic study of supragingival and subgingival calculus. *Journal of Periodontology*, v.51, p. 553-562, 1980.

GRISTINA, A.G.; Biomaterial-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration. *Science*, v.237, p. 1588-1595, 1992.

HARVEY , C.E.; Periodontal diseases in dogs. Canine Dentistry, v.28, p .1111-1128, 1998.

HAJISHENGALIS, G.; Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nature, v.15, p. 30-44, 2015.

HILLAM, D.G.; HULL, P.S.; The influence of experimental gingivitis on plaque formation. Journal of Clinical Periodontology, v.4, p. 56-61, 1977.

KINANE, D.F.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Patogênese da Periodontite, In: LINDHE, J.; LANG, N.P.; KARRING, T. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010. p. 271-291.

LANG, N.P.; MOMBELLI, A.; ATTSTRÖM, R. Biofilmes e Cálculos Orais, In: LINDHE, J.; LANG, N.P.; KARRING, T. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010. p. 173-196.

LISTGARTEN, M.A.; Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man: A light and electron microscopic study. Journal of Periodontology, v.47, p. 1-18, 1976.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, B.; Experimental gingivitis in man. Journal of Periodontology, v.36, p. 177-187, 1965.

LOESCHE, W.J.; Bacterial mediator in periodontal diseases. Clinical Infectious Diseases, v.16 (supp4), p.cS203-S210, 1993.

MARSHAL, K.C.; Biofilms: An overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. American Society of Microbiology News, v.58, p. 202-207, 1992.

MATSSON, L.; ATTSTRÖM, R.; Histologic characteristics of experimental gingivitis in the juvenile and adult beagle dog. Journal of Clinical Periodontology, v.6, p. 334-350, 1979.

MERGENHAGEN, S.E.; ROSAN, B.; Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion. American Society of Microbiology, Washington, p. 7-13, 1985.

MIKKELSEN, D.; MILINOVICH, G.J.; BURRELL, P.C.; HUYNH, S.C.; PETTETT, L.M.; BLACKALL, L.L.; TROTT, D.J.; BIRD, P.S.; Phylogenetic analysis of *Porphyromonas* species isolated from the oral cavity of Australian marsupials. Environmental Microbiology 2008, v.10, n.9, p.2425-2432, 2008.

SAXTON, C.A.; Scanning electron microscope study of the formation of dental plaque. Caries Research, v.10, p. 102-119, 1973.

SCHOROEDER, H.E.; ATTSTRÖM, R.; Effects of mechanical plaque control on development of subgingival plaque and initial gingivitis in neutropenic dogs. *Scandinavian Journal of Dental Research*, v.87, p. 279-287, 1979.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Infecções periodontais, In: LINDHE, J.; LANG, N.P.; KARRING, T. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 5 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010. p. 197-254.

SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; SMITH, C.; KENT JR, R.L.; Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, v.25, n.2, p. 134-44, 1998.

SPENCE, J. A.; AITCHISON, G. U.; SYKES, A. R.; Broken Mouth (premature incisor loss) in sheep: the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Comparative Pathology*, v. 90, p. 275- 292, 1980.

TEN NAPEL, J.; THEILADE, J.; MATSSON, L.; ATTSTRÖM, R.; Ultrastructures of developing subgingival plaque in beagle dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, v.12, p. 507-524, 1983.

THEILAD, E.; WRIGHT, W.H.; JENSEN, B.S.; LÖE, H.; Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *Journal of Periodontology*, v.1, p. 1-13, 1966.

WILDERER, P.A.; CHARAKLIS, W.G.; Structure and Function of Biofilm. In CHARAKLIS, W.G.; WILDERER, P.A.; Eds. *Structure and Function of Biofilms*. Chichester, UK: John Wiley, p.5-17, 1989.

ZANDER, H.A.; HAZEN, S.P.; SCOTT, D.B.; Mineralization of dental calculus. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, v.103, p. 257-260, 1960.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO

Araçatuba 2016

Relatório de Estágio Supervisionado

Relatório de Estágio Supervisionado, como parte do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Araçatuba, para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Aluna: Júlia Rebecca Saraiva

Supervisor: Prof. Tit. Iveraldo S. Dutra

Araçatuba

2016

INTRODUÇÃO

A escolha pela área de Medicina Veterinária Preventiva foi se consolidando durante a graduação após o contato com as disciplinas de Epidemiologia Veterinária e Saúde Pública, Enfermidades Parasitárias dos Animais, Tecnologia em Produtos de Origem Animal, Higiene e inspeção de Alimentos, Defesa Sanitária e mais especificamente Enfermidades Infecciosas dos Animais. A partir de então realizei treinamento técnico na disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais sob orientação do Professor Titular Iveraldo dos Santos Dutra, e juntamente com seus orientados e equipe pude acompanhar e participar das atividades desenvolvidas na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA).

O estágio curricular me permitiu visualizar a extrema importância que o médico veterinário que opta por essa área desempenha na sociedade e a responsabilidade que exerce no contexto público e educação em saúde no que se refere à proteção e bem estar da população humana e animal.

Os locais escolhidos foram recomendados por pós-graduandos e pelo orientador Iveraldo dos Santos Dutra uma vez que já os conheciam.

Segue abaixo a descrição dos locais de estágio e as atividades desenvolvidas.

1. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP JABOTICABAL (FCAV). Laboratório de Análise de Alimentos de Origem Animal e Água.

O estágio foi realizado no período de 01 de julho ao dia 31 de agosto de 2016, sob supervisão do Prof.º Adjunto Luiz Augusto do Amaral. O laboratório está localizado no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (Figura 1). O departamento possui dois blocos, sendo um deles responsável pela área de enfermidades parasitárias dos animais, e o outro pelos laboratórios de Doenças Infecciosas, Saúde Pública, Laboratório de Análises de Alimentos e Água e mais recentemente o Laboratório de Biologia Molecular. As salas dos docentes ficam agregadas aos laboratórios de cada especialidade.

A equipe do Laboratório de Análise de Alimentos de Origem Animal e Água é composta por um único técnico, Waldemar Dibelli Junior, que é responsável por realizar as atividades de análises e leitura das amostras que são enviadas pelos usuários. Atualmente, o Prof. Adj. Luiz Augusto do Amaral é o único responsável pelo laboratório.

Além dos docentes e técnicos do laboratório, também pude conviver,

acompanhar e auxiliar os pós-graduandos Rafael Akira Sato e Paula Maria Pilotto Branco nos projetos “Características microbiológicas de sushis adquiridos em estabelecimentos que comercializem comida japonesa” e “Biodigestão e co-digestão de dejetos de bovinos leiteiros com vistas a promoção da saúde ambiental e saúde pública”, respectivamente.



Figura 1: Vista frontal do Departamento FCAV

a) ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA ÁGUA

A técnica realizada neste laboratório para análise de água objetiva principalmente pesquisar a presença ou ausência dos principais indicadores bacterianos de contaminação hídrica. O processo é dividido em duas fases: Teste Presuntivo e Teste Confirmatório. A coleta da água deve ser realizada em frasco de vidro estéril e não deve completar totalmente o volume do frasco para que seja possível homogeneizar a amostra. As amostras devem ser mantidas refrigeradas e o tempo de coleta e realização do exame não deve exceder 24 horas.

O teste presuntivo busca primariamente a presença de coliformes totais, grupo composto por bacilos Gram-negativos não esporulados, aeróbios facultativos, oxidase negativa, fermentadores de lactose à temperatura de 35 – 37 °C produzindo ácidos, aldeídos e gás (BETTEGA, 2006). O meio recomendado para a detecção de coliformes em água, é o Caldo Lauril Sulfato Tryptose ou caldo lactosado concentração dupla, com tubos de Durham.

Nestas determinações são utilizados dez tubos contendo 10 mL do caldo Lauril nos quais são inoculados 10 mL da amostra de água em cada um dos tubos que serão incubados a 35 – 37 °C por 24 horas. A leitura é feita após a incubação e a prova presuntiva será considerada positiva quando houver a presença de gás nos tubos de Durham. Quando isso ocorre, os materiais positivos são separados e realizam-se os testes confirmatórios para coliformes totais e termotolerantes.

O grupo de coliformes termotolerantes ou fecais é composto por bactérias que são capazes de fermentar lactose quando submetidas a temperatura de 44,5 °C pelo

período de 24 horas. A *Escherichia coli* é a principal espécie representante deste grupo (BETTEGA, 2006).

Após a realização do teste presuntivo, os tubos positivos (contendo gás) são separados e uma alíquota da cultura (Lauril) é transferida com auxílio de alça bacteriológica para tubos contendo meio de caldo lactose bile 2% verde brilhante com tubos de Durham, sendo incubados a 35 °C por até 48 horas. A presença de gás nos tubos de Durham indica prova confirmatória positiva para coliformes totais. A leitura dos resultados é feita com o auxílio de uma tabela NMP onde se obtém o número mais provável de coliformes totais em 100 mL de amostra.

A determinação de coliformes termotolerantes (fecais) é feita a partir da transferência de uma alíquota dos tubos positivos na prova presuntiva (Lauril) também com o uso de alça bacteriológica para tubos com caldo EC Broth contendo tubos de Durham. A incubação é feita em banho-maria à temperatura de aproximadamente 44,5 °C durante 24 horas. A presença de gás nos tubos de Durham indica prova confirmatória positiva para coliformes fecais em 100 mL de amostra. Os resultados são obtidos a partir de tabela de NMP.

A contagem de micro-organismos mesófilos é feita transferindo-se 1 mL da amostra sem diluir e 1 mL da amostra diluída para placas de Petri esterilizadas. A diluição pode ser realizada com água peptonada 0,1% esterilizada (proporção de 1 mL da amostra para 9 mL do diluente). Após a transferência para placa de Petri, adiciona-se aproximadamente 15 mL de ágar padrão para contagem fundido e resfriado (aproximadamente 40 graus Celsius). Depois da homogeneização e da solidificação as placas são incubadas em estufa a 37 °C, invertidas, por 48 horas. Em seguida realiza-se a contagem das colônias nas placas.

Relato de Caso: Propriedade rural Jumay (análise de água)

Mediante autorização do professor responsável pelo laboratório, pude realizar análise bacteriológica da água da propriedade rural da minha família. A propriedade pertence ao município de Cosmorama (SP) e a fonte de água que abastece o local é proveniente de poço profundo (aproximadamente 80 metros de profundidade). Em um determinado ponto da casa há um filtro onde a água coletada é destinada ao consumo humano. Foram coletadas amostras de dois pontos da casa: Do local onde há o filtro e de uma torneira com água vinda diretamente da caixa d'água da casa.

Os frascos para coleta foram cedidos pelo laboratório e identificados em "C" para água da caixa e "F" para água do filtro. Em seguida, foram acondicionadas em recipiente térmico com gelo durante a viagem e mantidos refrigerados até o dia seguinte para realização da análise (Figura 2).

O teste presuntivo foi realizado transferindo-se 10 mL de cada amostra para 10 tubos contendo caldo Lauril sulfato triptose com tubos de Durham, totalizando 20 tubos. A incubação foi feita em estufa a 37 °C por até 48 horas. Os resultados do primeiro teste demonstraram produção de gás em 3 tubos da amostra filtrada e em todos os 10 tubos da amostra da caixa d'água (Figura 3).

A partir dos tubos considerados positivos na prova presuntiva realizou-se o segundo teste (confirmatório). Separaram-se os tubos com produção de gás, transferiu-se uma alíquota para tubos contendo caldo lactose bile 2% verde brilhante e uma alíquota para tubos contendo caldo EC Broth ambos com tubos de Durham. A partir de então foram incubados em estufa a 37 °C e em banho-maria a 44,5 °C, respectivamente (Figura 4). A leitura foi feita após 48 horas (tubos com caldo lactose bile 2% verde brilhante) e 24 horas (tubos com caldo EC).

Em nenhum tubo com caldo EC houve presença de gás, o que indica que as amostras não estavam contaminadas por coliformes fecais. Entretanto, os 10 tubos positivos na prova presuntiva com amostra de água da caixa se apresentaram positivos no teste confirmatório com caldo lactose bile 2% verde brilhante bem como 1 tubo das 3 tubos da amostra filtrada, indicando portanto a presença de coliformes totais em ambas amostras (Figura 5). Os resultados obtidos pela tabela de NMP estão demonstrados na Figura 6.

A contagem de micro-organismos mesófilos foi feita a partir da transferência de 1 mL de cada amostra para placa de Petri esterilizada seguida de adição de ágar-padrão, homogeneização e após solidificação foram incubadas a 37 °C por 48 horas. A contagem demonstrou 275 UFC/mL (unidades formadoras de colônias) para água filtrada e 500 UFC/mL para água da caixa.



Figura 2: Frascos esterilizados para coleta.



Figura 3: Presença de gás nos tubos de Durham (prova presuntiva)



Figura 4: caldo EC (primeira fileira) e bile verde brilhante (segunda fileira), antes do banho-maria e da incubação.



Figura 5: Presença de gás em amostras positivas para coliformes totais (água da caixa).

TUBOS POSITIVOS	NMP	LIMITES -95% CONFIANÇA	
		INFERIOR	SUPERIOR
0	< 1,1	0,0	3,0
1	1,1	0,03	5,9
2	2,2	0,26	8,1
3	3,6	0,69	10,6
4	5,1	1,30	13,4
5	6,9	2,10	16,8
6	9,2	3,10	21,1
7	12,0	4,30	27,1
8	16,1	5,90	36,8
9	23,0	8,10	59,5
10	> 23,0	13,5	INFINITO

Figura 6: Resultados evidenciando a presença de CT.

Os resultados demonstraram alta contaminação água por coliformes totais (CT) na água que não é filtrada, indicando portanto necessidade de limpeza e desinfecção da caixa d'água do poço e a realização de uma nova coleta. Além da higienização indica-se também a cloração da água. As bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais não necessariamente apresentam ação patogênica ao homem, entretanto a amostra testada provém de fonte não tratada o que justifica a necessidade de higienização do local contaminado.

b) Análise microbiológica do leite pasteurizado

Na análise do leite pasteurizado considera-se como rotina a pesquisa de coliformes totais, coliformes fecais e de micro-organismos mesófilos. Antes de abrir a embalagem, deve-se homogeneizar a amostra e realizar uma desinfecção da tesoura e da área que será cortada utilizando-se algodão embebido em álcool 70 °GL, sempre próximo ao bico de Bunsen. A lavagem das mãos e limpeza da bancada antes de realizar qualquer procedimento de análise microbiológica de alimentos também é imprescindível.

Para determinação do número mais provável de coliformes totais utiliza-se

como meio de cultura o caldo lactose bile 2% verde brilhante, sendo dividido em 3 baterias de 3 tubos, todos contendo o meio e tubos de fermentação de Durham.

As amostras são diluídas em água peptonada a 0,1% na proporção de 1 mL de leite para 9 mL do diluente correspondendo a diluição 10^{-1} . Em seguida, transfere-se mais 1 mL da diluição 10^{-1} para outro tubo contendo 9 mL do diluente correspondendo a diluição 10^{-2} .

Na primeira bateria de três tubos adiciona-se 1 mL de leite diretamente da embalagem, na segunda bateria, 1 mL da amostra diluída 10^{-1} e na terceira bateria 1 mL da amostra diluída 10^{-2} . A seguir, as amostras são incubadas a 35-37 °C por 24-48 horas. A leitura é feita a partir da observação da formação de gás nos tubos de fermentação de Durham e com auxílio de tabela NMP determina-se o número mais provável de coliformes totais da amostra.

A partir dos tubos considerados positivos para presença de coliformes totais, determina-se o número mais provável de coliformes a 45 °C (fecais). Com o auxílio de uma alça bacteriológica transfere-se uma alíquota dos tubos positivos para tubo contendo caldo EC com tubos de fermentação de Durham. Estes são mantidos em banho-maria a 44,5 °C por 24 horas e a leitura dos resultados será feita utilizando-se tabela NMP para determinar o número mais provável de coliformes a 45 °C por mL de leite. É extremamente importante atentar-se para que não haja variação da temperatura do banho-maria, pois temperatura abaixo de 44,5 °C pode levar a resultados falso-positivos.

Para a determinação da contagem de micro-organismos mesófilos, ou contagem bacteriana total (CBT) em placa, utilizam-se as diluições 10^{-2} e 10^{-3} transferindo-se 1 mL para placa de Petri esterilizadas e em seguida adicionando cerca de 15 mL de ágar PCA (ágar padrão para contagem) aquecido a aproximadamente 40°C. Após a solidificação, as placas são incubadas invertidas por 48 horas sob temperatura de 35 °C. Após o período de incubação é feita a leitura e contagem das placas e o resultado é multiplicado pelo fator de diluição e expresso em UFC/mL.

c) Análise microbiológica de alimentos sólidos ou pastosos

No caso de alimentos sólidos ou pastosos o que os diferencia dos demais é a forma como é feita a primeira diluição. Inicialmente, pesam-se 25 gramas da amostra e adicionam-se em 225 mL de diluente (água peptonada a 0,1%) e esta passa a ser a diluição 10^{-1} (Figura 7). Antes de realizar as outras diluições a mistura deverá ser homogeneizada. A partir desta serão feitas as outras diluições adicionando-se 1 mL da diluição inicial em 9 mL de diluente.

Os procedimentos para determinação microbiológica destes alimentos são idênticos aos do leite com exceção da fase presuntiva dos coliformes totais e fecais a qual 1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e assim sucessivamente, são inoculados em caldo lauril sulfato. Nesta fase utiliza-se uma bateria de 3 tubos contendo o caldo e tubos de Durham e a diluição depende do produto em análise, ou seja, quanto mais contaminado, mais diluições são realizadas. A presença de coliformes fecais e a contagem padrão de micro-organismos mesófilos na placa já foram descritos anteriormente para o leite. Os resultados são obtidos utilizando-se tabela de NMP.



Figura 7: Diluição 10^{-1} (vidros maiores), tubos com caldo Lauril sulfato e placas de Petri para amostra de frango (cortes e coxas)

d) Atividades complementares

Além das atividades de análises microbiológicas dos alimentos e água, tive a oportunidade de acompanhar e desenvolver outras atividades. Permaneci por cerca de 15 dias no laboratório de leptospirose e brucelose, onde acompanhei a técnica realizada para diagnóstico dessas duas enfermidades sendo a soroaglutinação microscópica o principal método realizado para diagnóstico de leptospirose e o teste antígeno acidificado tamponado (AAT) e fixação de complemento utilizados para diagnóstico de brucelose (triagem e confirmatório, respectivamente). Ainda acompanhei a residente Natália Crispim no exame clínico de bezerros com pneumonia. Participei do projeto com biodigestores anteriormente citado e de análise microbiológica de sushis dos alunos do programa de pós graduação do setor de medicina veterinária preventiva. Inclui também a participação em uma aula ministrada pelo Professor Luiz Augusto do Amaral para os alunos de graduação do curso de Ciências Biológicas sobre “Cadeia Epidemiológica”, além de discussões sobre diversos assuntos com o professor orientador do estágio curricular.

2. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA – UEL. Laboratório de Leptospirose e Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública

a) Laboratório de Leptospirose

O estágio foi realizado durante o período de 01 a 30 de setembro de 2016, sob supervisão da Professora Lucienne Garcia Pretto Giordano. O laboratório pertence ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sendo parte integrante do hospital veterinário do local. A principal atividade desenvolvida no laboratório de leptospirose é o diagnóstico da doença por meio de soroaglutinação em microscopia de campo escuro e exame direto da urina para detecção de leptospiros permitindo a confirmação do diagnóstico. Além da rotina, o laboratório também se envolve em pesquisas e possui convênios com empresas para análise de vacinas com intensa rotina de atividades e casuística.

Atualmente o laboratório encontra-se sob supervisão da técnica Cristiane da Silva que é responsável por receber as amostras, identificá-las, realizar os diagnósticos e emitir os relatórios. O departamento também conta com um programa de residência em moléstias infecciosas, sendo que durante este período a residente Suelen Aparecida Suphoronski esteve presente juntamente comigo e com a técnica neste laboratório.

Os sorovares de leptospiros para o preparo de antígenos empregados na rotina de diagnóstico são mantidos em meio base EMJH e em estufa B.O.D. sob temperatura de 28°C. O repique é feito semanalmente, utilizando-se material estéril próximo ao fogo em capela de fluxo laminar para evitar possíveis contaminações externas. O laboratório dispõe de 3 baterias de tubos (avó, mãe e descarte), sendo a mãe utilizada na rotina e a avó utilizada para os repiques (de avó para mãe). A bateria de descarte é eliminada toda semana alternando-se sempre as baterias a serem utilizadas.

Para o diagnóstico sorológico da leptospirose (rotina e pesquisa) são testados 19 sorovares: Australis, Bratislava, Autumnalis, Butembo, Castellonis, Bataviae, Canicola, Cynopteri, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Panama, Pomona, Pyrogenes, Hardjo, Wolffi, Shermani e Tarassovi.

A soroaglutinação microscópica (SAM) é a técnica recomendada pela Organização Mundial da Saúde para o diagnóstico da leptospirose. Apesar dos anticorpos formados pelo animal serem dirigidos a determinado sorovar específico, a ocorrência de reações cruzadas entre sorovares podem ocorrer, sendo assim, um mesmo animal pode ser reagente a vários sorovares simultaneamente (WOHL,

1996).

Inicialmente, dilui-se o soro do animal em placa alta (Figura 8) em proporção 1:50, ou seja, 25 μ L de soro mais 1225 μ L de solução PBS (tampão fosfato salino), colocando no agitador por 20 minutos. Posteriormente, transfere-se 25 μ L da placa alta para placa baixa de poliestireno (fundo em “U”) utilizando-se micropipeta multicanal (Figura 9) e adiciona-se 25 μ L dos respectivos sorovares. Após agitar por mais 20 minutos, a placa está pronta para leitura.

A leitura é realizada em microscopia de campo escuro, empregando-se objetiva de 20 vezes em lâminas delimitadas. Utilizando-se alça previamente flambada, transfere-se uma alíquota de cada pocinho para lâmina delimitada e então realiza-se a leitura. As amostras são consideradas reagentes quando há pelo menos 50% de aglutinação associado à diminuição de leptospiros “livres” no campo (Figura 10). Amostras reagentes são então separadas para titulação.



Figura 8: Soros separados (esquerda) e placa alta (direita).

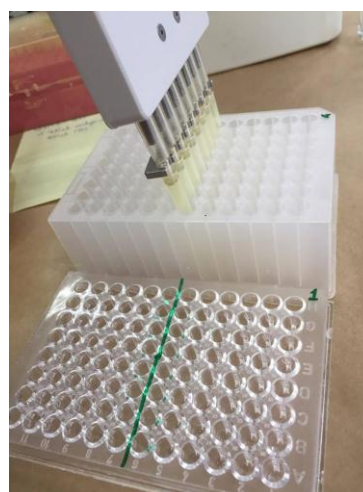


Figura 9: Transferência da placa alta para placa baixa.

A titulação é feita a partir das amostras reagentes na primeira triagem. A diluição é feita na proporção de 1:100 onde coloca-se 25 μ L de PBS em até 5 pocinhos da placa baixa e 25 μ L das amostras marcadas como reagentes da placa alta, sendo portanto o primeiro pocinho correspondente a diluição 1:200. Sucessivamente, 1:400, 1:800, 1:1600. Colocam-se os sorovares marcados (25 μ L), agita-se a placa por 20 minutos e realiza-se a leitura. O valor da titulação baseia-se no último poço com aglutinação de até 50% associado à diminuição de leptospiros livres em campo.

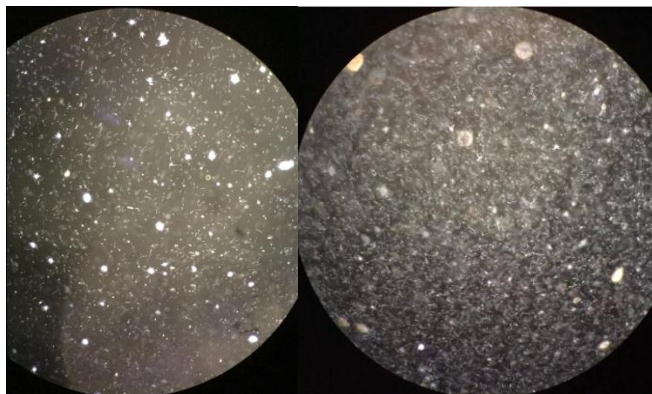


Figura 10: Amostra reagente (à esquerda) e não reagente (à direita). Observar o aumento de leptospiras “livres” e diminuição de aglutinações no campo à direita.

O laboratório também realiza exame direto da urina, principalmente de cães que são encaminhados ao hospital veterinário da universidade quando há suspeita da doença. O melhor método de coleta é a cistocentese, pois há menos contaminação e a leitura deve ser realizada em no máximo 20 minutos após a coleta. A leitura consiste em encontrar leptospiras na amostra, sendo que neste caso independente de quantidade, a presença de uma única leptospira é indicativa da doença. É importante ressaltar o caráter intermitente das leptospiras, e que, portanto, é necessário mais de uma coleta quando a amostra é negativa em exame direto da urina em campo escuro.

b) Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública

O estágio foi realizado no período de 03 de outubro a 27 de outubro de 2016, sob supervisão da professora Roberta Lemos Freire (responsável pelo laboratório), também pertencendo ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Durante este mês acompanhei principalmente a residente Andressa Rorato Nascimento de Matos e alunos do programa de pós-graduação nas atividades realizadas no local, bem como tive a oportunidade de auxiliar a residente em plantões com os animais destinados ao setor de moléstias infecciosas, sendo cinomose e parvovirose doenças de alta casuística na região de Londrina.

As principais atividades das quais participei no laboratório foram o diagnóstico de toxoplasmose, neosporose e leishmaniose por meio de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e acompanhamento da manutenção de cepas Rh de toxoplasmose em camundongos (bioensaio). O laboratório trabalha não somente com amostras de animais domésticos, mas também com amostras humanas principalmente no diagnóstico de toxoplasmose em gestantes, crianças e portadores de doenças imunossupressoras.

A RIFI busca a ocorrência ou não de anticorpos na amostra e apresenta alta especificidade. A técnica para toxoplasmose, neosporose e leishmaniose é basicamente a mesma, exceto em alguns pontos como tempo de incubação, lavagem, utilização de tampão e diluição.

I) RIFI Toxoplasmose:

Primeiramente são separados os soros que serão testados inclusive os controles positivo e negativo. Em uma placa baixa de poliestireno são marcados os pocinhos dos controles e das amostras e adiciona-se 150 µL de solução tampão (PBS) em todos os pocinhos. Em seguida são transferidos 10µL da amostra e realiza-se a diluição com 50 µL de um pocinho para o outro, sem descartar o conteúdo do último pocinho.

Após a diluição, 10µL de cada pocinho são colocados em lâmina delimitada e pré-sensibilizada com antígeno, transferindo-se sempre da diluição menos concentrada para mais concentrada. Incuba-se a 37°C por 30 minutos e realizam-se 3 lavagens de 10 minutos cada com PBS (pH 7,2) para retirar as partículas não ligantes.

A segunda parte da técnica remete a colocar o conjugado, um marcador que visa identificar o que está sendo procurado (neste caso taquizoítos de toxoplasma). O conjugado é espécie-específico (exemplo: cão= 1:1200, ou seja, 1 parte do conjugado para 1200 µL de PBS + 12 µL de Azul de Evans, retira-se 13 µL do PBS para não ultrapassar a proporção correta). Novamente incuba-se a lâmina à 37°C por 30 min e realizam-se mais 3 lavagens com PBS. Neste momento as lâminas estão prontas para leitura e devem ser protegidas da luz com papel alumínio.

A leitura é realizada em microscopia de fluorescência (que deve ser aquecido 10 minutos antes de iniciar a leitura), e somente é válida se os controles estiverem adequados, isto é, controle positivo com taquizoítos fluorescentes e controle negativo sem taquizoítos fluorescentes. Amostras reagentes são aquelas em que em pelo menos 5 campos do microscópio é possível visualizar taquizoítos com contornos fluorescentes compatíveis com o que é visto no controle positivo. A titulação é na proporção de 1:4, ou seja, primeiro poço da lâmina 1:16; depois 1:64, 1:256, 1:1024 e assim sucessivamente. São considerados reagentes amostras com titulação a partir de 1:16.

As cepas (do tipo RH) são mantidas em camundongos e repicadas de segunda, quarta e sexta-feira. Após eutanásia é realizado o lavado intraperitoneal com 0,2 mL de solução salina e depois de analisar a viabilidade em microscópio (Figura 11), reinocula-se em outro camundongo. Geralmente são utilizadas fêmeas com peso de até 30g.

II) RIFI Neosporose e RIFI Leishmaniose

Basicamente o procedimento realizado é o mesmo diferenciando quanto a tempo de incubação, quantidade de lavagens e proporção para diluição. No caso da leishmaniose, deve-se diluir os controles positivos e negativos segundo preconiza a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), sendo utilizadas as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

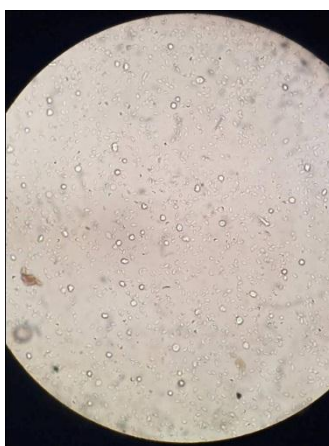


Figura 11: Taquizoítos de toxo plasma (lavado intraperitoneal de camundongos).

III) Outras atividades desenvolvidas

Além das atividades em laboratório, durante o período estagiado na UEL tive a oportunidade de acompanhar as atividades do laboratório de virologia, que inclui principalmente diagnóstico por soroneutralização para Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR) e Diarréia Viral Bovina (BVD). Também pude participar do “I Congresso de Pesquisa em Saúde Animal e Humana (COPESAH)” ocasião na qual apresentei um resumo da minha Iniciação Científica intitulado “Microbiota anaeróbia identificada no sulco gengival de bovinos”. Por fim, tive contato com outras técnicas de diagnóstico para toxoplasmose no laboratório de Zoonoses e Saúde Pública (ELISA e Western Blot), além de coloração de Ziehl Neelsen para identificação de *Criptosporidium spp.*, e método de detecção de coliformes totais e fecais em água pelo substrato cromogênico definido (Colilert).

A tabela abaixo demonstra a quantidade de diagnósticos para toxoplasmose, leishmaniose e neosporose realizados no período do mês de outubro, computando apenas a rotina laboratorial.

Tabela 1. Exames realizados no período de estágio para o diagnóstico de toxoplasmose, neosporose e leishmaniose, no Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública no período de 03 a 27 de outubro de 2016.

Doença	Material enviado	Técnica de diagnóstico	Resultado		Total de análises
			Positivo	Negativo	
Toxoplasmose	Soro	RIFI	9	12	21
Neosporose	Soro	RIFI	3	20	23
Leishmaniose	Soro	RIFI	0	6	6

RECOMENDAÇÃO E CONCLUSÃO

O estágio curricular foi proveitoso em todos os aspectos, desde o profissional até o pessoal. Durante este período tive oportunidade de reforçar à área a qual pretendo direcionar minha carreira profissional e perceber o quanto preciso investir em conhecimento e buscar aprender sempre mais para me tornar uma profissional qualificada.

Ambos os locais escolhidos eu indicaria para futuros estagiários, pois além de me possibilitarem o aprendizado e a realização das atividades, tive contato com profissionais excelentes com disposição para explicar e transmitir seus conhecimentos a nós estagiários.

Em Jaboticabal apesar de a rotina ter sido um pouco baixa durante o período em que estive estagiando, sempre encontrava outras atividades para desempenhar além daquelas desenvolvidas apenas no laboratório. Em Londrina, o laboratório de leptospirose possui uma rotina muito grande permitindo que eu acompanhasse e realizasse todas atividades desenvolvidas no local. No laboratório de zoonoses e saúde pública me deparei com uma equipe multidisciplinar composta não apenas por médicos veterinários, mas também por farmacêuticos e biomédicos trabalhando juntos em prol de uma saúde única.

O estágio curricular obrigatório ampliou minha visão sobre a medicina veterinária preventiva despertando o meu interesse em permanecer, trabalhar e melhorar as condições de saúde para os animais, o meio ambiente e para as pessoas. Agradeço imensamente às duas instituições que me acolheram e me possibilitaram essa experiência de vida.

REFERÊNCIAS

BETTEGA, J., Ramos, M.P., et al., **Metodos analiticos no controle microbiologico de agua para consumo humano**. Cienc. agrotec. [online]. 2006, vol.30, n.5, pp.950-954. ISSN 1413-7054.

WOHL, J. S. **Canine Leptospirosis**. Compendium in Continuing Education for the Practicing Veterinarian. v. 18, n. 11, p. 1215-1225, 1996.