



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

RELATÓRIO FINAL DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO

Maykko Antônio Bravo de Paula

**CAMPO GRANDE – MS
2024**

Maykko Antônio Bravo de Paula

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

RELATÓRIO FINAL DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO

Maykko Antônio Bravo de Paula

Orientador: Carlos Alberto do Nascimento Ramos

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
em Medicina Veterinária apresentado à
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul,
como requisito à obtenção do título de Bacharel
em Medicina Veterinária.

CAMPO GRANDE – MS
2024

Maykko Antônio Bravo de Paula

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em 19 de novembro
de 2024, e aprovado pela Banca Examinadora:



Prof. Carlos Alberto do Nascimento Ramos
Presidente



Prof. Cássia Rejane Brito Leal



Prof. Veronica Jorge Babo-Terra

Sumário

1. Introdução	6
2. Atividades desenvolvidas	7
2. 1 VetAnalisa	7
2. 1.1 Estrutura geral e localização	7
2. 1.2 Laboratório de microbiologia	7
2. 1.3 Laboratório de Sorologia	19
2. 1.4 Laboratório de parasitologia	24
2. 2 Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná.....	31
2.2.1 Estrutura, localização e funcionamento	31
2.2.2 Casuística.....	38
2. 3 LabmolVet.....	43
2.3.1 Estrutura geral e localização	43
2.3.2 PCR convencional	49
2.3.3 PCR em tempo real	55
2.3.4 Exames imunológicos.....	57
3. Projeto de pesquisa.....	60
3.1 Introdução	60
3.2 Material e métodos.....	64
3.3 Resultados e discussão	65
3.4 Conclusão	77
4. Considerações Finais.....	78
5. Referências	79

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha família, que me apoiou e me deu suporte para eu chegar até aqui. Em especial, agradeço a minha mãe, Clarice, mulher forte e guerreira, que criou sozinha duas crianças e hoje vê o seu segundo filho se formar. Mãe, obrigado por sempre acreditar em mim.

A família que construi durante esse percurso deixo aqui também a minha eterna gratidão, cada um de vocês tem um lugar especial em meu coração, nunca esquecerei o que fizeram por mim durante todo esse período de estágio e toda força que me deram ao longo do curso.

As minhas colegas de classe e amigas Mariana, Victoria, Luísa, Fernanda e Jhennifer deixo aqui o meu muito obrigado, vocês tornaram mais leve até os momentos mais difíceis da faculdade. A minha amiga Karolayne também preciso deixar aqui o meu agradecimento por estar junto comigo desde o ensino médio.

A equipe do VetAnalisa deixo aqui o meu agradecimento por terem me dado a oportunidade de estágio e possibilidade de conhecer mais sobre a área de medicina veterinária preventiva.

Aos residentes do Hospital Veterinário da UFPR obrigado pela paciência e pelos ensinamentos de clínica médica de pequenos animais.

A equipe do Labmol Vet o meu imenso obrigado pela oportunidade e pelo aprendizado. É sempre uma alegria aprender mais da minha área favorita da medicina veterinária preventiva: a biologia molecular.

Aos professores que me acompanharam nessa jornada eu sempre lembrarei de vocês. Deixo ainda um agradecimento especial a professora Veronica por ter me feito amar a Medicina Felina e ao professor Carlos por ter me dado oportunidade e apresentado a área de biologia molecular, levarei o senhor como um exemplo de profissional para a minha vida.

Agradeço ainda todas as outras pessoas que de alguma forma me ajudaram ou acreditaram em mim durante esse percurso.

Por fim, eu deixo minha gratidão a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, por ter me dado todas as condições para o aprendizado dessa ciência linda que é a Medicina Veterinária.

1.Introdução

O estágio obrigatório é uma disciplina da grade curricular do curso de medicina veterinária, o qual visa a prática do conhecimento adquirido ao longo da graduação. Ademais, a partir da seleção do acadêmico, espera-se o aprimoramento técnico na área escolhida, possibilitando também o desenvolvimento pessoal para assim complementar o processo de ensino e aprendizagem.

A escolha dos locais de estágio baseou-se na qualidade técnica dos setores e áreas de identificação do acadêmico. O primeiro local foi o laboratório VetAnalisa, no qual o estudante estagiou durante o período de 14 de junho de 2024 a 22 de julho de 2024, no setor de medicina veterinária preventiva, totalizando 190 horas e supervisionado pela Médica Veterinária Polliana Alves Franco. O segundo estágio foi realizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (UFPR) no período de 01 de agosto de 2024 a 31 de agosto de 2024, no departamento de clínica médica de pequenos animais, totalizando 176 horas e supervisionado pelo médico veterinário e professor Fabiano Montiani Ferreira. O último estágio foi feito no laboratório Labmol Vet no período de 03 de setembro de 2024 a 11 de outubro de 2024, no setor de biologia molecular e imunologia, totalizando 168 horas e supervisionado pelo Médico Veterinário Rodrigo Leite Soares. Diante do exposto, no total, o acadêmico realizou 528 horas totais de estágio.

Neste trabalho, inicialmente, é relatado a estrutura física dos locais de estágio e as atividades desenvolvidas. Por fim, apresenta-se o projeto de pesquisa desenvolvido durante a graduação que leva o seguinte título: Estudo retrospectivo sobre evidência sorológica e molecular de infecção por *Leishmania* sp. em felinos domésticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande.

2. Atividades desenvolvidas

2.1 VetAnalisa

2.1.1 Estrutura geral e localização

A VetAnalisa (VETANALISA LABORATÓRIO VETERINÁRIO LTDA), está localizada na Rua da Liberdade, n ° 434, Bairro Vila Glória, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. O setor onde foi desenvolvido o estágio curricular foi o de Medicina Veterinária Preventiva no período de 14 de junho de 2024 a 22 de julho de 2024, integral de segunda-feira a sábado (36 horas semanais), totalizando 190 horas e supervisionado pela Médica Veterinária Polliana Alves Franco.

O estagiário auxiliou no recebimento, separação e identificação de amostras. Ademais, o estagiário também foi responsável pela organização dos laboratórios, manuseio e separação de equipamentos. Por fim, com a supervisão da médica veterinária Mariana Green de Freitas e da auxiliar de laboratório Patrycia Barboza, o acadêmico ajudou na realização dos exames feitos no setor de medicina veterinária preventiva.

A estrutura é composta por uma área de recepção das amostras, um refeitório, uma sala administrativa, dois banheiros, um laboratório de patologia clínica e pelo setor de medicina veterinária preventiva, no qual está presente o laboratório de microbiologia, o laboratório de sorologia e o laboratório de parasitologia.

A recepção recebe as amostras derivadas principalmente de clínicas veterinárias parceiras do laboratório na cidade, registra os pedidos no sistema da empresa e encaminha para o setor responsável (patologia clínica ou medicina veterinária preventiva) de acordo com o exame pedido na requisição feita por um médico veterinário.

No setor de medicina veterinária preventiva, as amostras são separadas pelas recepcionistas, estagiário ou pelos profissionais do setor. As amostras de fezes ou urina são armazenadas em refrigeração, enquanto as demais (swabs de ouvido, de pele ou de lesões em meio *Stuart*, raspados de pele e outras) e as requisições ficam separadas em recipientes próprios em temperatura ambiente.

2.1.2 Laboratório de microbiologia

No laboratório de microbiologia é realizado os exames de cultura bacteriana aeróbica manual, urocultura, coprocultura, hemocultura, cultura bacteriana

anaeróbica manual, antibiograma, cultura fúngica manual, cultura de dermatófitos e os de microbiologia automatizada através da utilização da máquina *BD Phoenix M50*.

O espaço é composto por duas geladeiras, uma na qual se é armazenado kits de sorologia, antibióticos e reagentes, e outra que se põe os meios de cultura não semeados e os kits/meios para identificação bacteriana no exame de cultura manual. Ademais, o laboratório também possui duas estufas (uma para cultura bacteriana e outra para cultura fúngica), dois microscópicos, um computador, uma impressora, um agitador vórtex, uma capela, kits para coloração panótico, kits para coloração de Gram, um quadro, vidrarias, reagentes para produção de meios de cultura, alças descartáveis, pinças, maçarico, bico de Bunsen portátil, placas, lâminas, lamínulas, suportes, pipetas, ponteiras, equipamento e reagentes de microbiologia automatizada, além de outros materiais, recipientes e reagentes (Figuras 01 e 02).



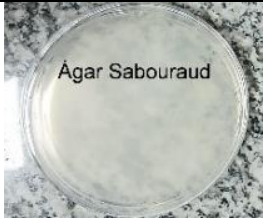
Figuras 01 e 02: Estrutura do laboratório de microbiologia da VetAnalisa do setor de medicina veterinária preventiva em ambas figuras (“A” e “B”).

As amostras que chegam ao laboratório são semeadas em meios conforme o tipo do material recebido (urina, swabs de pele, swabs otológicos, pelos, fezes e cultura fúngica). Quanto as amostras de swabs de pele e ouvido, semeia-se elas em meio ágar sangue/*MacConkey* em movimentos de zig zag até metade da placa (tipo de semeadura de estria sinuosa em ágar inclinado) finalizando com uma estrias mais curtas e espaçadas que separassem melhor as bactérias. Sobre as de urina, elas são semeadas em meio *Cled/MacConkey*, primeiro realizando uma estria reta no meio da placa e depois espalhando o material do início ao fim em zig zag. Ademais, para as culturas fúngicas, utiliza-se o meio seletivo de

Sabouraud e caso tenha-se a suspeita de *Cryptococcus sp.* a amostra também é semeada em Ágar Níger. Além disso, o laboratório possui o meio DermatoBac para cultura de dermatófitos (no caso de amostra de pelos). Por fim, quanto as fezes, essas são postas em caldo GN (enriquecedor para bactérias gram negativas, especialmente *Shigella* e *Salmonella*) e após 24 horas, com o material desse caldo, semeia-se o meio SS e também ágar sangue/*MacConkey*. O aspecto dos meios e a utilização/função de cada um é descrita no Quadro 01.

Quadro 01: Aspecto dos meios de cultura e suas funções gerais

Meio	Função e utilização	Figura
Ágar Sangue	Meio não seletivo que confere ótima condição para o crescimento da maioria dos microrganismos, especialmente das bactérias gram-positivas, e permite diferenciar bactérias produtoras da enzima hemolisina (enzima destruidora de eritrócitos) por meio dos padrões de hemólise vistos no meio após o crescimento bacteriano (hemólise alfa, beta ou gama, como pode ser visto na Figura 03).	
Ágar <i>MacConkey</i>	Inibe o crescimento de bactérias gram positivas devido a presença de cristal violeta e sais de bile, permitindo apenas o crescimento de bacilos gram negativos. Ademais, verifica a fermentação (meio e	

	colônias roseadas/roxas) ou não da lactose (meio amarelado com colônias transparentes/ brancas).	
Ágar Cled	Meio não seletivo e diferencial. Usado para isolamento e quantificação de microrganismos presentes em urina. Permite também diferenciar bactérias lactose positivas (colônias com coloração amarela) das bactérias lactose negativas (colônias com coloração azul)	
Sabouraud	Meio com nutrientes que favorecem o crescimento de diversos fungos (leveduras e bolores).	
Ágar SS	Meio seletivo e diferencial. Possui compostos que inibem o crescimento de bactérias gram positivas. Também é capaz de diferenciar bactérias lactose positivas das negativas. Por fim, o meio possui as substâncias tiosulfato de sódio e citrato férrico, que permitem a detecção de H ₂ S produzido por bactérias como <i>Salmonella</i> , sendo isso evidenciado por	

	formação de colônias de cor negra no centro da colônia, enquanto na <i>Shigella</i> observa-se a formação de colônias incolores. Meio muito empregado na realização de coprocultura.	
Ágar Níger	Meio seletivo e diferencial utilizado para isolamento de <i>Cryptococcus neoformans</i>. As colônias ficam com um aspecto “achocolatado” e “amarronzado” caso seja esse fungo.	
Ágar cromogênico	Possui o substrato cromogênico especial, que possibilita a formação de cores diferenciadas através de clivagem de enzimas específicas produzidas por diversos gêneros de microrganismos. Essa reação diferencia bactérias as bactérias com base na coloração das colônias.	
Ágar manitol	Meio seletivo e diferencial usado principalmente para identificar a presença de <i>Staphylococcus aureus</i>.	

Ágar Mueller-Hinton	Meio padronizado para a realização do exame de antibiograma	
---------------------	---	---



Figura 03: Padrão beta-hemólise no repique da esquerda e focos de alfa-hemólise gerados pela colônia do repique da direita.

Após essa etapa, a placa é posta na estufa para crescimento bacteriano ou na estufa para crescimento fúngico conforme o tipo de exame solicitado. Para cada amostra anota-se o número de identificação, nome do animal, tipo de exame e meio utilizado em uma folha separada, a qual é guardada em pastas específicas, como por exemplo a de “exames de cultura bacteriana em andamento”, para posterior preenchimento e registro dos resultados do exame.

Para que ocorra o crescimento bacteriano espera-se pelo menos 24 horas e no máximo 48 horas, enquanto os exames de culturas fúngicas possuem um prazo máximo de 14 dias para a avaliação dos meios. Caso não se tenha observado crescimento, após o período máximo de espera, a placa é descartada e o resultado é anotado e lançado no sistema. No entanto, caso observe-se a presença de colônias não contaminantes e tratando-se de culturas bacterianas é feito a descrição da colônia (cor, tamanho, brilho, presença ou não de hemólise e tipo de hemólise no ágar sangue, presença de mais um tipo de colônia, presença de véu, mudança de cor do meio, presença de precipitado de bile e outras

características).

A forma de apresentação da colônia já é um demonstrativo de qual bactéria pode estar presente no meio, visto que alguns grupos possuem características específicas de crescimento, como é o caso da colônia de *Pseudomonas aeruginosa* que possui a presença de pigmento com coloração esverdeada e têm odor doce. Outro exemplo claro é o da colônia de *Proteus sp.* que possui um odor putrífero e presença de “véu”. Ademais, uma colônia roseada e com aspecto múcoide costuma ser indicativo da presença de *Klebsiella sp.*, enquanto a colônia de *Escherichia coli* tende a ser roxa e mais seca. As Figuras (04, 05 e 06) abaixo demonstram a apresentação de diferentes colônias de bactérias.



Figuras 04 e 05: Colônia de *Pseudomonas sp.* em Ágar Sangue/ MacConkey (“A”) e em Mueller-Hinton (“B”).

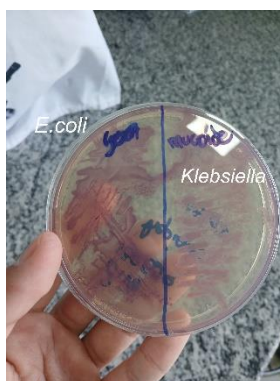
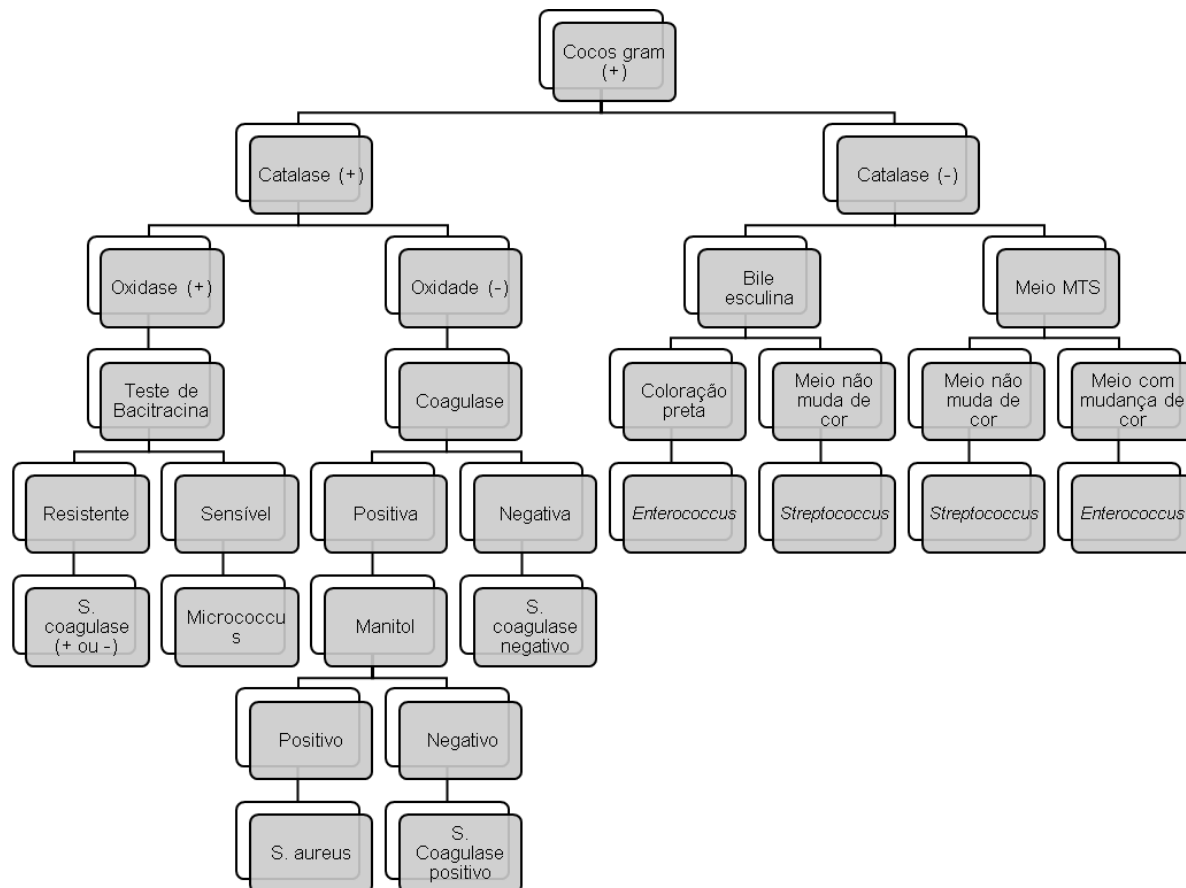


Figura 06: Colônias de *Klebsiella sp.* e *Escherichia coli* em meio cromogênico.

Após ser realizado a descrição, segue-se com o teste de catalase, o de oxidase e a coloração de gram dessas colônias em lâminas, visando realizar uma identificação inicial daquela bactéria. É anotado, então, o resultado desses testes na folha daquela amostra e caso o exame solicitado seja o de cultura manual a identificação segue de forma manual. O plano de ação visto no fluxograma 01 é

realizado quando identificado cocos gram positivos pela coloração de gram. A identificação de *S. aureus* pode ser vista nas figuras 07 e 08. Nas figuras 09, 10 e 11 observa-se os meios para diferenciação entre *Streptococcus sp.* e *Enterococcus sp.*



Fluxograma 01: Plano de ação para identificação de cocos gram (+).



Figuras 07 e 08: Teste de coagulase positivo ("A") e colônias com crescimento amarelado em manitol ("B") indicando a presença de *S. aureus*.



Figuras 09 e 10: Bile esculina em “A” e meio MTS em “B”, sem serem semeados.



Figura 11: MTS com alteração de cor e bile esculina com coloração preta indicando a presença de *Enterococcus sp.*

Quando é verificada a presença de bacilos gram negativos e o método de exame é manual semeia-se a colônia no meio rugai (Figuras 13 e 14), o qual contém uma série de provas bioquímicas para identificação de bactérias gram negativas. A interpretação do resultado é realizada conforme ilustrado pela Figura 12.

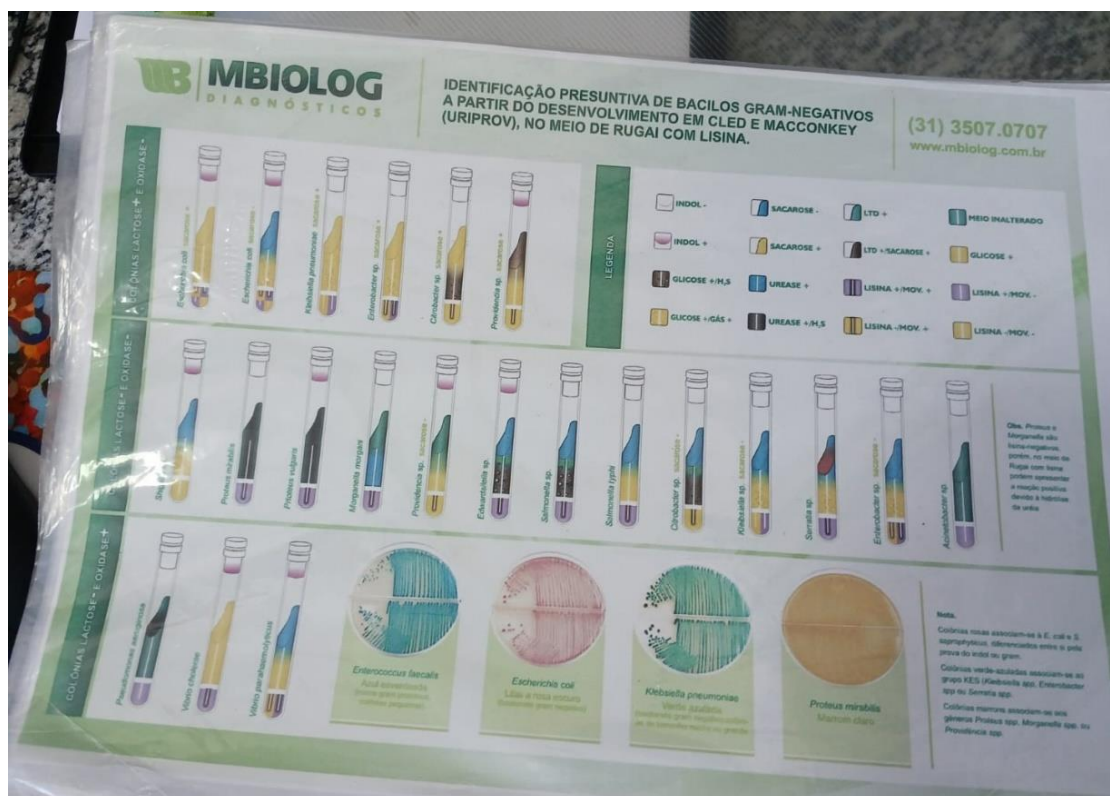
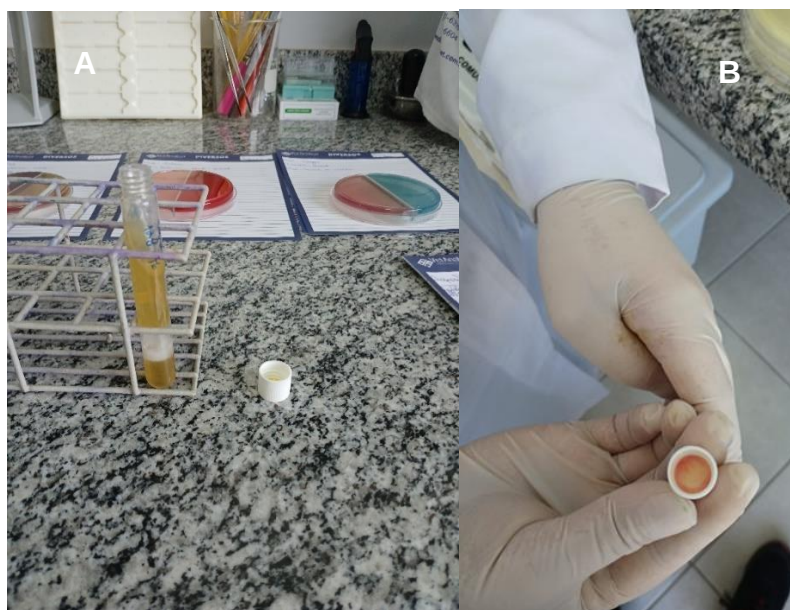


Figura 12: Esquema utilizado no laboratório para identificação de bacilos gram negativos.



Figuras 13 e 14: Prova em meio rugai ("A") com indol –, lisina –, sacarose +, glicose +, motilidade +, gás + identificando as bactérias do gênero *Enterobacter sp*; Em "B" é possível ver a reação de indol + após adição do reagente de Kovac.

Os cocos gram negativos também são identificados através do rugai e a classificação dos bacilos gram positivos é feita conforme a morfologia vista na coloração de gram. Esses dois últimos tipos de morfologias bacterianas não foram

vistos durante o período de estágio e costumam serem infrequentes.

Após a identificação da bactéria é realizado antibiograma específico para o gênero identificado. A colônia é semeada em ágar *Mueller-Hinton* com uma alça descartável e após isso é feito a adição dos discos de antibióticos ao redor da placa, prezando por uma certa distância entre cada um para que possa ser feita a leitura correta dos halos no dia seguinte. A adição dos discos é feita com uma pinça que deve ser esterilizada por meio do uso de um maçarico ou com o bico de Bunsen portátil.

Em alguns grupos de bactérias, durante a realização do antibiograma, testa-se determinados fatores de resistência, como o teste “D” para o gênero de bactérias *Staphylococcus*, no qual verifica a resistência induzível a clindamicina em caso de positividade. Outro exemplo de teste de resistência é o da beta-lactamase de Espectro Estendido (ESBL), o qual testa a resistência das enterobactérias aos beta-lactâmicos de amplo espectro, que no laboratório é realizado pelo método de disco-difusão, sendo utilizadas cefalosporinas de 1ª e 3ª gerações e um inibidor de beta-lactamase, amoxicilina + ácido clavulânico, cefepime, ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona. A amoxicilina é colocada centralmente no meio ágar *Mueller Hinton* e os outros discos são posicionados a uma distância curta. O teste é positivo quando ocorre a formação de um halo ao redor do disco de amoxicilina + ácido clavulânico.

As seleções dos antibióticos testados dependem do local que foi coletado amostra, pois alguns deles são apenas de uso tópico e outros apenas para uso sistêmico. O grupo de antibióticos e a leitura dos halos segue o preconizado pelo CLSI (2020) e pelo BRCast (2021). A placa de *Mueller-Hinton* é semeada e os resultados são lidos no dia seguinte a esse processo com uma régua própria para leitura de antibiograma (Figura 15). Na Figura 16 abaixo é demonstrado os discos de antibióticos de uso sistêmico que devem ser testados quando se identifica bactérias do gênero *Staphylococcus* e como deve ser feito a leitura dos halos do antibiograma, classificando então a bactéria como resistente, de resistência intermediária ou sensível para aquele antibiótico.

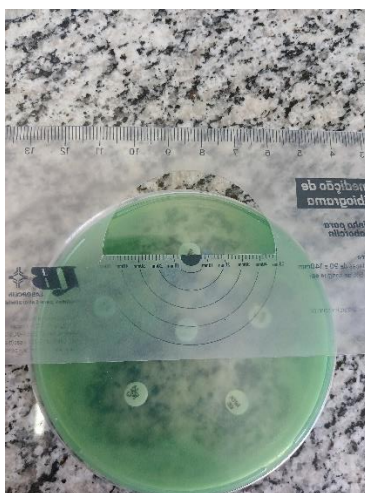


Figura 15: Leitura de antibiograma.

Staphylococcus sp.

ID PACIENTE: _____

Antibióticos sistêmicos

ISOLADO: _____

ANTIBIÓTICO	DISCO	RESISTENTE (s) mm	INTERMEDIÁRIO	SENSÍVEL (z) mm	CONSIDERAÇÕES	HALO	RESULTADO
Amoxicilina + Clav.	-	-	-	-	*Reportar resultado de oxacilina / Cefoxitina CLSI 2023		
Ampicilina	-	-	-	-	*Reportar resultado de oxacilina / cefoxitina CLSI 2023		
Benzilpenicilina	1 U	28		29	CLSI 2024		
Cefovecina	-	-	-	-	*Reportar resultado de oxacilina / cefoxitina CLSI 2023		
Cefoxitina	FOX 30	S. aureus 21 S. coagulase - 24	-	22 25	Staphylococcus aureus e S. sp. coagulase negativo. CLSI 2023		
Ciprofloxacino	CIP 5	15	16-20	21	CLSI VET2023		
Clindamicina	2	14	15-20	21	CLSIVET 2023		
Doxiciclina	TET 30	17	16-22	23	Usar disco de tetraciclina. CLSIVET 2023 Reporta suscetibilidade a Mino e Tetra		
Enrofloxacin	5	16	17-22	23	CLSIVET 2023		
Eritromicina	15	13	14-23	23	CLSIVET 2023		
Marbofloxacino	5	14	15-19	20	CLSI VET 2023		
Orbifloxacino	10	17	18-22	23	CLSI VET 2023		
Oxacilina	1	17	-	18	Staphylococcus sp. coagulase positiva, exceto S. aureus CLSI 2023		
Polimixina B					Qualquer tamanho De halo.		
Sulfa + Trimetoprim	23,75-1,25	10	11-15	16	CLSI VET 2023		
Nitrofurantoina	300	14	15-16	17	CLSIVET 2023 Somente em urina		

Figura 16: Tabela para leitura de antibiograma de *Staphylococcus sp.*

Quanto a microbiologia automatizada, após o crescimento bacteriano ou fúngico e a realização dos testes iniciais (catalase, oxidase e coloração de gram), separa-se os meios líquidos próprios do equipamento, sendo um para identificação e um para o antibiograma, e a placa, cujo tipo selecionado varia conforme o gram (+ ou -) encontrado, a qual contém de um lado uma coluna para os reagentes para os testes de identificação e do outro uma com os antibióticos para realização do antibiograma automatizado. A partir disso, em uma capela, é feito o repique da colônia nos meios líquidos, sendo a quantidade de bactérias medida em um calibrador espectrofotômetro para que não ultrapasse o valor

máximo ou o mínimo permitido pela máquina, e esses são adicionados na placa em suas respectivas colunas (Figuras 17 e 18).



Figuras 17 e 18: Preparação em capela em “A” e placa de microbiologia automatizada em “B”.

A placa, então, é levada e acoplada no equipamento de microbiologia automatizada *BD Phoenix M50* (Figura 19), o qual realiza a identificação do microrganismo por meio de testes bioquímicos e também o antibiograma se for bactéria. O resultado é emitido, impresso e lançado em cerca de 24 horas após todo o processo.



Figura 19: *BD Phoenix M50*.

2. 1.3 Laboratório de Sorologia

No laboratório de sorologia realiza-se os exames sorológicos para *Leishmania sp.* (ELISA IgG e reação de imunofluorescência indireta – RIFI) e para *Babesia sp.* (IgG e IgM).

O espaço é composto por um microscópio fluorescente, um equipamento

espectrofotômetro para ELISA, equipamento para lavagem, pipetas, ponteiras e suportes (Figura 20).



Figura 20: Estrutura do Laboratório de sorologia do setor de medicina veterinária preventiva da VetAnalisa

Para a realização de teste ELISA e de RIFI para *Leishmania* utiliza-se os kits comerciais da Biogene. No ELISA, inicialmente, em um eppendorf, diluí-se 1 μ l de cada amostra em 100 μ l de solução de diluição. Após isso, também era realizado o preparo das soluções controle, sendo diluído para cada controle 10 μ l em 90 μ l de solução de diluição. Posteriormente, a placa de ELISA é separada e no primeiro poço é adicionado 100 μ l de PBST, o branco para o leitor de ELISA, enquanto nos próximos três coloca-se os controles seguido por 100 μ l de cada amostra diluída nos poços posteriores. Em seguida, leva-se essa placa para ser incubada na estufa por 30 minutos em temperatura ambiente e, após isso, a placa é lavada 3 vezes com PBST para que depois possa ser adicionado 100 μ l por poço da solução do conjugado (preparado com 1 μ l do conjugado em 10ml de PBST). Na próxima etapa, a placa é levada para mais 30 minutos de incubação e, em seguida, lavada novamente 3 vezes dessa vez com PBS. Seguidamente, adiciona-se 100 μ l da solução de revelação, preparada conforme a quantidade de colunas de poços utilizados, em cada poço, e, ao final, leva-se a placa para incubação por 20 minutos em temperatura ambiente. Por fim, coloca-se duas gotas de solução de parada em cada poço (Figura 21) e a placa é posta no leitor de ELISA, o qual emitirá os valores de densidade óptica (D.O) de cada amostra.



Figura 21: Placa de ELISA após solução de parada.

Para que o teste de ELISA seja validado, os controles não reagentes precisam ter uma densidade óptica abaixo de 0,100 e o reagente deve ser acima de 0,300 (Figura 22). O ponto de corte, nesse teste, é encontrado obtendo-se a média aritmética de densidade óptica dos controles negativos e somando o valor R (0,170) a esse dado. Por fim, subtrai-se 0,03 do ponto de corte para a determinação da faixa de indeterminados. As amostras que possuírem densidade óptica acima do ponto de corte são classificadas como reagentes e as abaixo da zona de indeterminados lidas como não reagentes.

	1	2	3	4	5
A	001 0.082	009 0.159	017 0.122		
B	002 0.607	010 0.271	018 0.411		
C	003 0.199	011 0.185	019 0.163		
D	004 0.191	012 0.257	020 0.393		
E	005 0.467	013 0.221	021 0.315		
F	006 0.372	014 0.237	022 0.256		
G	007 0.225	015 0.492	023 0.329		
H	008 0.224	016 0.350	024 0.260		

Figura 22: resultado de um ELISA, estando leitura do controle negativo (A1 <0,100) e do controle positivo (B1 >0,300) dentro do esperado, validando o teste.

Quanto ao RIFI, primeiramente, realizava-se a diluição de 1:40 de cada amostra, adicionando 1ul de amostra em 39 ul de solução de diluição. Após isso, homogeneizava-se as amostras e 10 ul da solução era posto nos poços das lâminas comerciais, impregnadas com o antígeno, do kit Biogene, exceto no poço 6 e no 7, nos quais eram adicionados o controle negativo e o positivo respectivamente. Em seguida, incubava-se as lâminas por 30 minutos em câmara úmida na estufa e, após isso, realizava-se uma etapa de lavagem das lâminas por imersão com solução PBS durante 5 minutos. Posteriormente, adicionava-se 10 ul do conjugado diluído (preparado com 1ul da solução de conjugado e 500 ul de PBS) em cada poço, incubava-se novamente e o processo era finalizado com uma nova lavagem. Ao final, as lâminas eram levadas em microscópio de fluorescência e lidas de acordo com o brilho emitido resultante da reação antígeno-anticorpo expresso pela fluorescência ou não do antígeno impregnado nos poços da lâmina (Figura 23).

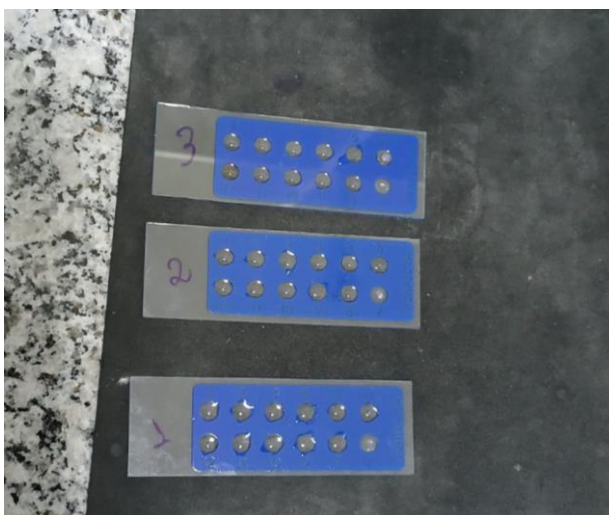


Figura 23: Lâminas de RIFI.

A presença de brilho indicava uma reação reagente e sua falta um resultado não reagente. As amostras com resultado positivo em 1:40 (Figura 24) passavam por uma diluição seriada e o teste era repetido até que fosse encontrado o seu título, caso o requisitante tenha pedido RIFI com diluição total.

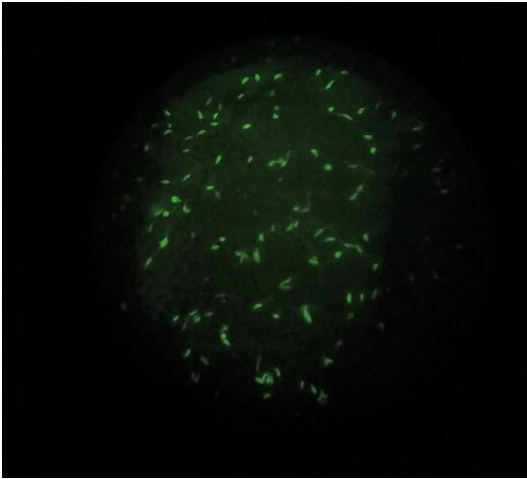


Figura 24: Resultado positivo em RIFI para *Leishmania* sp. na diluição de 1:40.

Para a realização do teste ELISA IgG e do teste de IgM de *Babesia* sp. utiliza-se no laboratório os kits comerciais da BioClin VetLis. O procedimento para a realização do teste seguia o disposto na Figura 25.

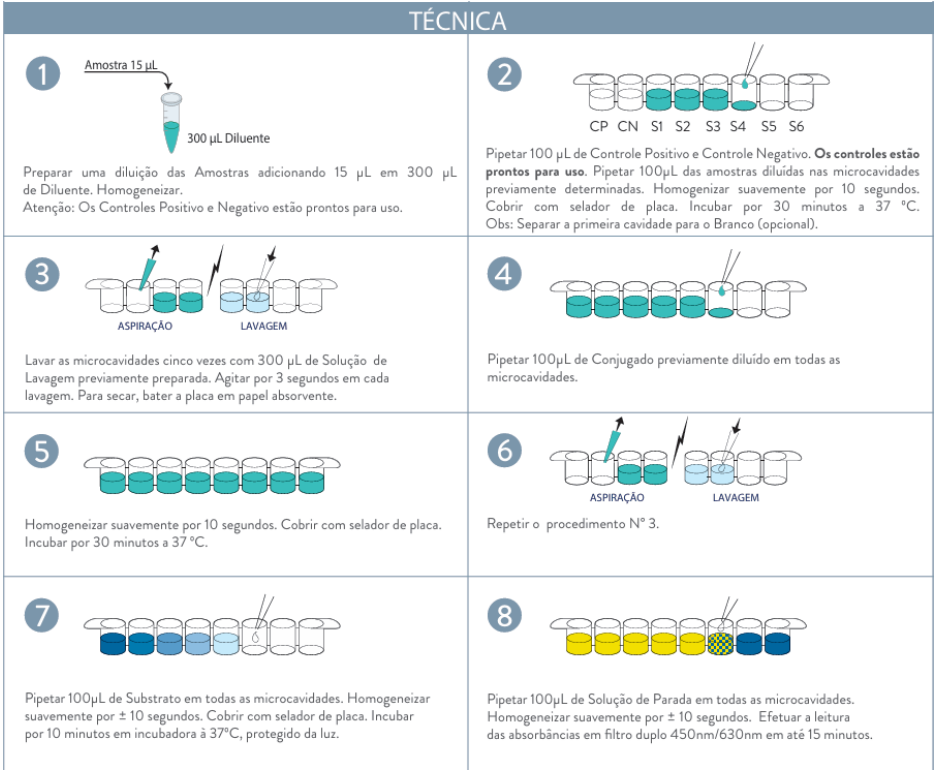


Figura 25: Procedimentos para a realização do teste ELISA comercial (BioClin) de *Babesia* sp. da VetLis (2024).

O teste IgM era validado se a densidade óptica do branco fosse abaixo de 0,100, a do controle negativo entre 0,100 e 0,300 e a do controle positivo acima de 1,000. O ponto de corte era encontrado fazendo a somatória da absorbância

média dos controles negativos mais o valor fixo de 0,450.

O kit de IgG diferenciava-se quanto a validação pelo branco cuja densidade deveria ser abaixo de 0,050 e a do controle positivo acima de 0,800. O ponto de corte era encontrado a partir da adição de 0,300 na absorbância média dos controles negativos. A interpretação de ambos os testes ocorriam da mesma forma para ambos os testes. As amostras acima de 1,1 eram consideradas positivas e as que possuíam um valor de D.O abaixo de 0,9 tidas como negativas, sendo os valores entre elas considerado como um resultado intermediário.

2. 1.4 Laboratório de parasitologia

No laboratório de parasitologia realiza-se os exames de citologia de pele, citologia otológica, raspado de pele, tricograma, OPG de grandes animais, técnica de Baerman e o parasitológico de fezes completo de pequenos animais (método direto, sedimentação, técnica de *Willis* e técnica de *Faust*).

O espaço é composto por um computador, uma estufa, uma centrífuga, um banho-maria, um aquecedor de vidrarias, impressora de fichas, dois microscópicos, uma geladeira para armazenamento de amostras antigas e reagentes, vidrarias, suportes, reagentes e outros materiais/equipamentos (Figura 26).



Figura 26: Estrutura do laboratório de parasitologia do setor de medicina veterinária preventiva da VetAnalisa.

Os testes de citologia de pele e a citologia otológica são realizados a partir da coloração das lâminas com panótico (Figura 27) e caso solicitado também era

realizado a coloração de gram (Figura 28). Nesse exame avaliava-se todos os parâmetros vistos na Figura 29 e, ao final, classificava-se o exame como sem alterações ou com alguma dermatopatia/otite e qual era sua origem (fúngica, bacteriana, parasitária ou outra causa). Nas Figuras 30 e 31 pode ser visto o exemplo de uma dermatopatia e de uma otite.



Figuras 27 e 28: Kits de coloração de lâminas - panótico em “A” e gram em “B”.

VetAnalisa BACTERIOSCOPIA
CITOLOGIA DE PELE

1. CELULAS EPITELIAIS SUPERFICIAIS
☐ ANUCLEADAS ☐ NUCLEADAS
☐ Ausentes ☐ (moderada) ☐ Ausentes ☐ (moderada)
☐ (discreta) ☐ (acentuada) ☐ (discreta) ☐ (acentuada)

2. BACTERIAS
 2.1. GRAM POSITIVAS
☐ Ausentes
☐ Cocos: ☐ Intracitoplasmáticos ☐ Extracitoplasmáticos
☐ Bacilos: ☐ Intracitoplasmáticos ☐ Extracitoplasmáticos
☐ Outro: ☐ Intracitoplasmáticos ☐ Extracitoplasmáticos
 * Quantidade Ausente, +(discreta), ++(moderada) e +++ (acentuada)

2.2. GRAM NEGATIVAS
☐ Ausentes
☐ Cocos: ☐ Intracitoplasmáticos ☐ Extracitoplasmáticos
☐ Bacilos: ☐ Intracitoplasmáticos ☐ Extracitoplasmáticos
☐ Outro: ☐ Intracitoplasmáticos ☐ Extracitoplasmáticos
 * Quantidade Ausente, +(discreta), ++(moderada) e +++ (acentuada)

3. ESTRUTURAS LEVEDURIFORMES
☐ Ausentes ☐ Presentes, eritotrix ☐ Presentes, ectotrix
☐ Aitrococários
☐ Cryptococcus spp.
☐ Gênero Malassezia sp., quantidade por campo/100x:
☐ Outro: _____

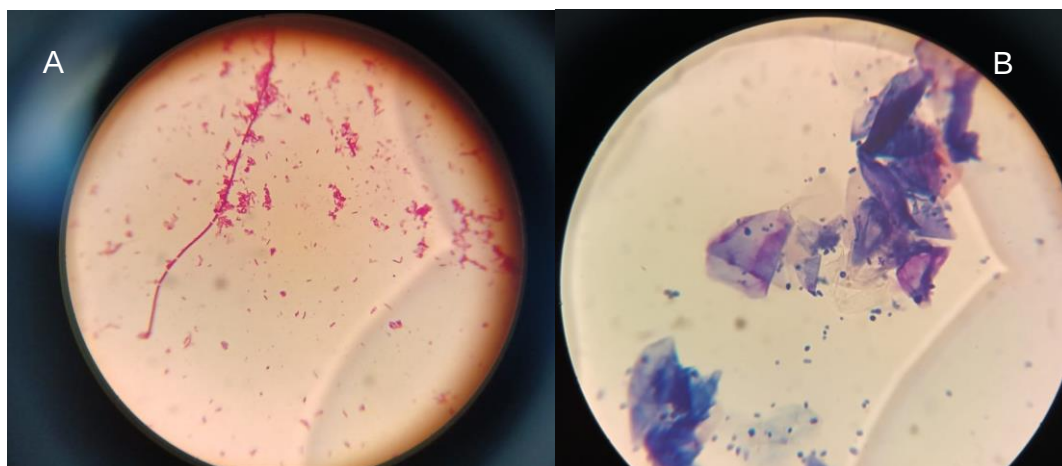
4. INFILTRADO INFLAMATORIO
☐ Ausentes ☐ Macrófagos
☐ Neutrófilos íntegros ☐ Linfócitos
☐ Neutrófilos degenerados ☐ Outro: _____
 * Quantidade Ausente, +(discreta), ++(moderada) e +++ (acentuada)

5. PARASITOS
☐ Ausentes ☐ Presentes: _____

6. CONCLUSÃO:
 Dermatopatia: ☐ Fúngica ☐ Bacteriana ☐ Parasitária
☐ Outra: _____

OBSERVAÇÕES: _____

Figura 29: Ficha para avaliação de lâminas de bacterioscopia.



Figuras 30 e 31: Aglomerado de bacilos gram negativos indicando dermatopatia bacteriana em “A” e presença acentuada de *Malassezia* sp. indicando dermatopatia fúngica (“B”).

O raspado de pele é realizado a partir da adição de KOH nas lâminas das amostras. Após isso, coloca-se uma lamínula em cima da amostra e ela é levada para análise no microscópico. Nesse exame avalia-se a presença de ectoparasitas na amostra, presença de células inflamatórias, presença de estruturas fúngicas (como hifas, artroconídeos endotrix, artroconídeos ectotrix e outros) indicadoras de dermatófitos e defeitos evidentes na estrutura do pelo. O exame de tricograma também é realizado da mesma forma, porém aqui, além do avaliado no primeiro exame, também se verifica a estrutura do pelo de forma mais detalhada (avaliação do bulbo, haste, ramificações, pigmentação, fase de crescimento e outros fatores).

As técnicas de OPG e a de *Baerman* são menos frequentemente realizadas no laboratório, por conta do laboratório receber mais amostras de pequenos animais e esses serem exames mais realizados em amostras de fezes de grandes animais.

A técnica de OPG busca identificar de forma quantitativa a presença de ovos nas fezes de grandes animais. Nessa técnica, uma pequena quantidade de fezes (2g) é colocada junta, em um recipiente, com 28mL de solução saturada de sal e homogeneizada. Em seguida, o conteúdo passa por uma filtração e com uma pipeta pega-se um pouco desse filtrado colocando-o em uma câmara *MacMaster* (Figura 32), a qual é levada ao microscópio para avaliação e contagem dos ovos dos nematoides estrongilídeos, enquanto a presença de helmintos de outro gênero é marcada separadamente. O número contado é multiplicado por um fator padrão, resultando-se assim no valor de OPG daquela amostra.

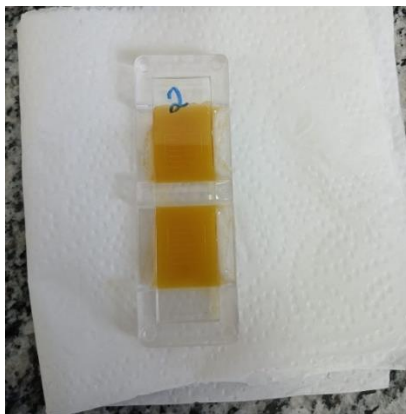


Figura 32: Câmara de MacMaster.

O exame de *Baermann* (Figura 33) tem por função atrair as larvas de nematóides (em particular as larvas de *Strongyloides stercoralis* ou Ancilostomídeos) pela água aquecida (termohidrotropismo positivo das larvas). Para realizar esse procedimento, primeiramente, aquecia-se água até cerca de 40-45°C e, enquanto isso, com cerca de 4 gazes se fazia uma rede com auxílio de alças cortadas e fita. A água quente era colocada dentro de um funil sem fundo e a amostra de fezes ficava dentro da rede. Em seguida, colocava-se a rede dentro do funil e ela ficava em repouso ali por cerca de algumas horas. O calor e a umidade estimulam a motilidade das larvas levando elas a se deslocar para a superfície da massa fecal. No entanto, como são incapazes de nadar contra a gravidade, tendem a sedimentar e a concentrar-se no fundo do funil. Dessa forma, ao final, o material sedimentado é coletado com uma pipeta, centrifugado e posto em uma lâmina para ser observado no microscópio.



Figura 33: Técnica de Baerman

No exame parasitológico completo de pequenos animais é realizado quatro técnicas (método direto, sedimentação, técnica de *Willis* e técnica de *Faust*) para a investigação completa de helmintos (ovos ou larvas) e protozoários (cistos ou occistos) nas fezes desses animais. O método direto é indicado principalmente para a pesquisa de trofozoítos e larvas de helmintos, pois permite observar a motilidade delas, porém é importante que sejam fezes frescas para que o exame fique mais sensível. A técnica de sedimentação é muito empregada para a pesquisa de ovos pesados e ovos operculados, como o de *Platynosomum sp.* O exame de *Willis* é um procedimento de flutuação espontânea específico para a pesquisa de ovos com densidade baixa, como os de ancilostomídeos. Por fim, a técnica de Faust é uma metodologia de flutuação de cistos de protozoários e ovos leves de helmintos.

O método direto é realizado adicionando um pouco da amostra de fezes em um recipiente junto com água. Posteriormente, a solução é homogeneizada com um palito de madeira e com esse mesmo material se retira um pouco dessa solução e coloca-se ela no centro de uma lâmina. Por fim, por cima disso, é colocado uma lamínula para a leitura em microscópico. Logo após, a técnica de sedimentação é efetuada e no mesmo recipiente adiciona-se um pouco mais de água. Seguidamente, essa solução é filtrada e transferida para outro recipiente, sendo o filtrado resultante posto em dois tubos de ensaio que são imediatamente levados até centrifugação por cerca de um minuto. Depois desse processo, descarta-se dos dois tubos quase que a totalidade do sobrenadante deixando apenas um pouco para que ele seja usado com o uso de uma pipeta na homogeneização do sedimento resultante da centrifugação. Em seguida, pinga-se uma gota desse sedimento homogeneizado em uma lâmina com o auxílio de uma pipeta e a técnica é finalizada colocando uma lamínula em cima disso para observação em microscópico. A Figura 34 mostra larvas de um helminto raro na espécie canina encontrado através do método direto e o de sedimentação.



Figuras 34: Caso raro de larva de *Strongyloides stercoralis* encontrado nas fezes de um cão pelo método direto e o de sedimentação.

A solução restante nos dois tubos é reaproveitada para a execução dos dois últimos testes: o teste de *Willis* e a técnica de *Faust*. Para a realização do primeiro, um dos tubos é preenchido até a borda com solução saturada de sal de forma até quase transbordar, e, depois, coloca-se uma lamínula em cima da solução, deixando ela lá por alguns minutos. No final, a lamínula é retirada do tubo e posta em uma lâmina para ser lida. Quando ao segundo teste, utiliza-se o tubo restante e nele é adicionado sulfato de zinco até completar o volume de 12mL. Em seguida, esse tubo é levado para centrifugação e após isso ele é tirado cuidadosamente da centrífuga e levado até uma estante. Por fim, com uma alça procura-se pegar aos poucos gotas da película que é formada na superfície da solução após a centrifugação, local que deve se concentrar os ovos e/ou cistos, colocando isso em uma lâmina para análise microscópica (Figuras 35, 36, 37, 38 e 39).



Figuras 35 e 36: Na letra “A” técnica de *Willis* e técnica de *Faust* em “B”.



Figuras 37 e 38: ovos de *Ancylostoma* sp. em “A” e occistos de *Cystoisospora* sp. em “B”. Ambos encontrados em fezes de cães pelas técnicas de *Faust* e de *Willis*.



Figura 39: cistos degenerados de *Giardia* sp. encontrados nas fezes de um cão pelo método de *Faust*

2. 2 Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná

2.2.1 Estrutura, localização e funcionamento

O Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná (UFPR) está localizado na Rua dos Funcionários, nº 1540, bairro Cabral, Curitiba, Paraná. A área em que foi desenvolvido o estágio curricular foi a de Clínica Médica de Pequenos Animais no período de 01 de agosto de 2024 a 31 de agosto de 2024, integral de segunda-feira a sexta-feira (40 horas semanais), totalizando 176 horas e supervisionado pelo médico veterinário e professor Fabiano Montiani Ferreira. Na Figura 40 abaixo pode ser visto a entrada do hospital.



Figura 40: Entrada do Hospital Veterinário da UFPR.

A parte de pequenos animais do Hospital Veterinário da UFPR é dividida em setores, atendendo pacientes nas mais variadas áreas (clínica médica, clínica cirúrgica, oftalmologia, oncologia e odontologia). Ademais, o hospital também conta com um setor de silvestres e um de grandes animais, que possui diferentes especialidades, além da parte de diagnóstico por imagem, de laboratórios clínicos e da farmácia.

No que tange a organização da parte de pequenos animais, o hospital possui uma recepção, com espaço para recebimento dos casos e pesagem dos pacientes, sete salas ambulatoriais (sendo duas para clínica médica, uma para o pronto atendimento, uma para a clínica cirúrgica, uma para odontologia, uma para oftalmologia e uma para a oncologia), um internamento cirúrgico, uma sala de internamento geral para cães, uma sala para internamento geral de gatos, uma sala de coleta, uma sala de isolamento para doenças infectocontagiosas e uma UTI. Além disso, quanto aos demais espaços, o local também apresenta um

refeitório, uma sala de residentes, duas salas de reunião, um almoxarifado, uma sala de nutrição, quatro banheiros e outros pontos. As Figuras 41, 42, 43, 44 e 45 mostram um pouco do interior do HV.



Figuras 41 e 42: Interior do HV da UFPR em ambas imagens (“A” e “B”).



Figuras 43 e 44: Entrada de funcionários em “A” e refeitório do HV em “B”.



Figura 45: Sala de coleta de exames complementares.

O setor de Clínica Médica é composto por quatro professores supervisores e seis médicos veterinários residentes. Os residentes ficam responsáveis pelo pronto atendimento (PA), pelas consultas agendadas do setor e pelo internamento geral, sendo essas funções divididas entre eles de modo a sempre ficar dois em cada local diariamente. A estrutura geral de cada um desses espaços pode ser visto pelas Figuras 46, 47, 48 e 49.

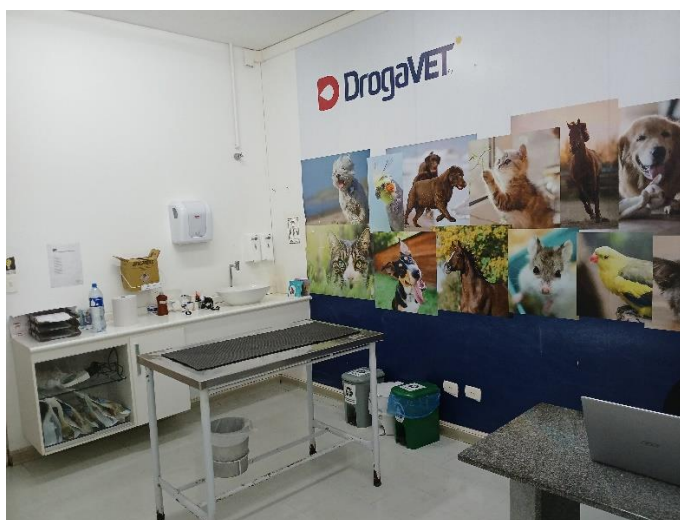


Figura 46: Consultório de clínica médica para consultas agendadas.



Figura 47: Consultório do pronto atendimento (PA).



Figura 48: Sala de internamento geral de cães.



Figura 49: Sala de internação geral de gatos (gatil)

Os tutores são orientados e encaminhados pela recepção do hospital para o setor de clínica médica. Em caso de urgência/emergência ou se o tutor quiser atendimento imediato é recomendado o comparecimento ao pronto atendimento (PA) que fica aberto das 7:30 até as 18h para consultas sem necessidade de horário marcado. Porém, caso não seja uma urgência, necessidade de consulta especializada ou se o tutor quiser esperar, o paciente é agendado para uma consulta marcada com um dos residentes. Em necessidade de internamento do paciente, durante os atendimentos no PA ou em consulta agendada, o tutor assina um termo de consentimento e o paciente é levado para a sala de internamento geral. Nesse espaço, abre-se uma ficha para ele, a qual é marcada com uma cor de acordo com o nível de complexidade do caso (vermelho, amarelo ou verde). O período de medicação e quantidade diária de avaliação dos parâmetros é definido conforme a cor da ficha do paciente como pode ser visto pela Figura 50, 51 e 52.

CLASSIFICAÇÃO DE COMPLEXIDADE			
INTERNAMENTOS			
DIÁRIA DE BAIXA COMPLEXIDADE	DIÁRIA DE MÉDIA COMPLEXIDADE	DIÁRIA DE ALTA COMPLEXIDADE	UTI
• 1 parâmetro diário • 1-3 medicações • Sem necessidade de fluidoterapia • Paciente estável com baixa probabilidade de piora • Máximo 5 pacientes	• Até 2 parâmetros diários • 3 - 6 medicações • Uso de cerênia e/ou butorfanol • Paciente estável com média probabilidade de piora da complexidade • Necessidade de fluidoterapia • Máximo 3 pacientes	• Mais de 2 parâmetros diários • Mais de 6 medicações • Uso de cerênia e/ou butorfanol • Paciente descompensado, com alta probabilidade de piora ou evolução para dbito • Necessidade de fluidoterapia • Alterações hemodinâmicas • Uso de sonda (nasogástrica, esofágica e uretral) • Uso de medicamentos em infusão contínua (exceto vasoativos) • Paciente em isolamento • Alterações gastrointestinais • Oxigenioterapia (mantendo saturação de O2) • Inclusão de fisioterapia se necessário • Máximo 2 pacientes	• Parâmetros a cada 1/2 horas • Uso de vasoativos • Lacteto aumentado • Nível de consciência reduzido (comatoso) • Hipóxia não responsiva a oxigenioterapia (necessidade de intubação ou ventilação mecânica) • Paciente descompensado • Alterações hemodinâmicas • Uso de infusão contínua • Inclusão de fisioterapia se necessário

Figura 50: Classificação de complexidade no internamento.

HOSPITAL VETERINÁRIO UFRP - FICHA DE INTERNAMENTO CLÍNICA MÉDICA DE PEQUENOS ANIMAIS

Paciente: [redacted] ID: [redacted] Data de Admissão: 30/07/24 Veterinário Responsável: [redacted]
 Espécie: Cavalo Raça: São Sexo: Macho Idade: 7 anos Peso: 240 kg Proprietário: [redacted]
 Diagnóstico/ Suspeita clínica: Colicada de início súbito, hipotensão, hipotermia aguda.
 Temperamento: Bom Alimentação: Alfafa, milho cozido Passado: Sem
 Observações:

MEDICAÇÃO	DOSE	VOLUME	VIA	DATA: 08/08/2022				DATA: 09/08/2022				DATA: 10/08/2022			
				9h	13h	17h	21h	1h	5h	9h	13h	17h	21h	1h	5h
<u>Clorpromazina (Klorazepam)</u>	<u>25</u>	<u>500</u>	<u>IV</u>	<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>		
<u>Clorpromazina (Klorazepam)</u>	<u>0,2</u>	<u>10</u>	<u>SC</u>	<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>		
<u>Clorpromazina (Klorazepam)</u>	<u>1</u>	<u>10</u>	<u>SC</u>	<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>		
<u>Clorpromazina (Klorazepam)</u>	<u>0,5</u>	<u>10</u>	<u>SC</u>	<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>		
<u>Clorpromazina (Klorazepam)</u>	<u>2</u>	<u>50</u>	<u>SC</u>	<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>		
<u>Clorpromazina (Klorazepam)</u>	<u>0,1</u>	<u>100</u>	<u>SC</u>	<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>		
<u>Clorpromazina (Klorazepam)</u>	<u>70</u>	<u>150</u>	<u>SC</u>	<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>			<u>OK</u>	<u>OK</u>		

FLUIDOTERAPIA
 Solução: _____ Taxa: _____
 Vol./24h: _____ Vel.: _____
 Equip.: _____ Cateter: _____
 Acesso Venoso (DATA): _____

ALIMENTAÇÃO
 Alimento Fornecido: _____
 Necessidade diária (Kcal): _____ Fornecido: _____
 Quantidade diária (g): _____ Ingerido: _____
 Quantidade/refeição (g): _____
 Obs: _____
 VIA: Espont. () SNG () SE () VIA: Espont. () SNG () SE () VIA: Espont. () SNG () SE ()
 Peso: 240 kg Peso: 240 kg Peso: 240 kg

*6. Alfafa
18.50 Alfafa
Cevado 500g
Se comer 200g
Linha 100 (Linha)*

*6.50 Alfafa
Alfafa
Linha 100
Linha 100*

*6.50 Alfafa
Alfafa
Linha 100
Linha 100*

Figura 51: Ficha de um paciente de cor vermelha com as medicações.

PARÂMETROS	OBSERVAÇÕES											
	DATA: 05/08/24				DATA: / /				DATA: / /			
	08 h	12 h	16 h	20 h	08 h	12 h	16 h	20 h	08 h	12 h	16 h	20 h
FC	92	92	92	92								
FR	40	40	40	40								
TR	38,4	38,2	38,2	38,2								
AUSCULTAÇÃO	OK	OK	OK	OK								
PAS/Maguito Nº	4	4	4	4								
MUCOSAS	NC	NC	NC	NC								
TPC	33'	33'	33'	33'								
PULSO	FIR	FIR	FIR	FIR								
GLICEMIA	560	560	560	560								
% DESIDRATAÇÃO	560	560	560	560								
EMESE	N	N	N	N								
DEFECOU	N	N	N	N								
URINOU	N	N	N	N								
NÍVEL DE CONSCIÊNCIA	Alerta	Alerta	Alerta	Alerta								
OBSERVAÇÕES GERAIS:	Horário				Horário				Horário			
☐ Realizar a glicemia apenas se não comer												

Figura 52: Ficha de um paciente de cor vermelha – parte dos parâmetros.

As consultas são realizadas com o auxílio do sistema Vetus, no qual é feita toda a anamnese do paciente, transcrição do exame físico, orçamentos, elaboração de receitas e demais registros (Figura 53).

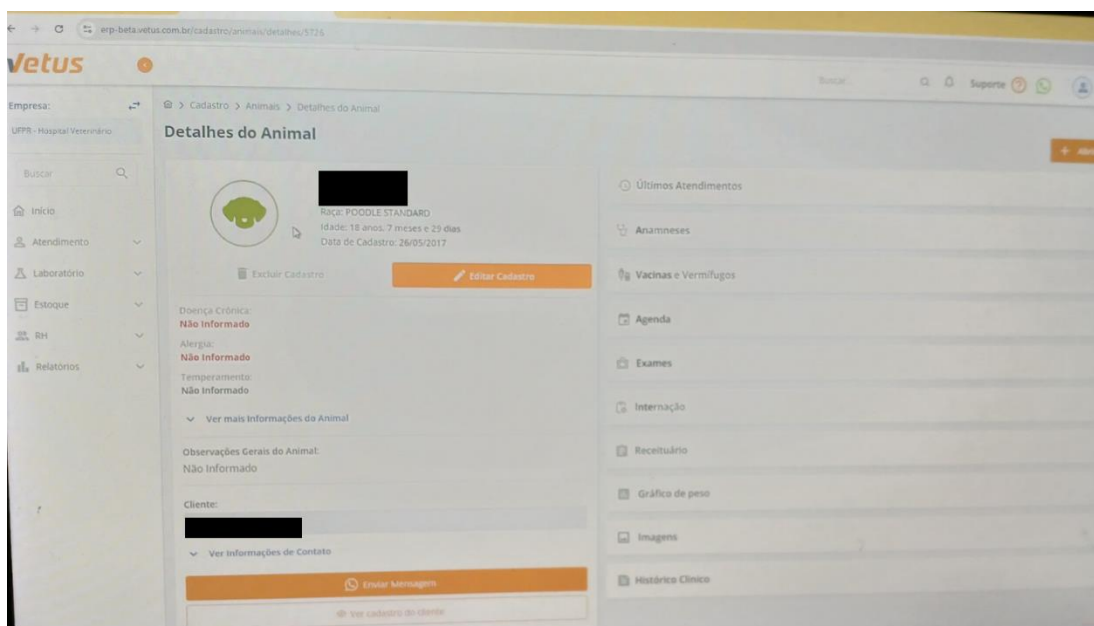


Figura 54: Organização do sistema Vetus.

O estagiário acompanhou e auxiliou os residentes na realização de suas atividades. No internamento geral ficava responsável pela aferição dos parâmetros (frequência cardíaca, frequência respiratória, auscultação, avaliação de mucosas, TPC, nível de hidratação, temperatura, glicemia, pressão, nível de consciência, linfonodos e outros) e pela aplicação de medicações nos horários marcados na ficha de cada paciente, além de auxiliar na contenção deles e na organização do local. Nas consultas agendadas e no PA, o acadêmico assistia as consultas e após a consulta ou durante a escrita da receita e dos orçamentos, que ocorria fora do consultório, discutia o caso com o residente responsável. Ademais, o aluno realizou procedimentos de enfermagem veterinária (coleta de sangue para exames complementares, acesso venoso, sondagem uretral, fluidoterapia subcutânea e outros), exame físico e a anamnese de alguns casos com a supervisão do residente. Além disso, o acadêmico acompanhou os residentes em algumas de suas aulas, nas quais teve a oportunidade de treinar técnicas de enfermagem veterinária em bonecos (Figura 55). Por fim, semanalmente, compareceu nas reuniões de discussão de casos com os professores e nas reuniões com empresas do ramo de veterinária (Figura 56), que possibilitam ao residente um conhecimento sobre as novidades relacionado ao mercado da veterinária, além de outros conhecimentos gerais de setor.



Figura 55: Treinamento de técnicas de enfermagem veterinária em bonecos

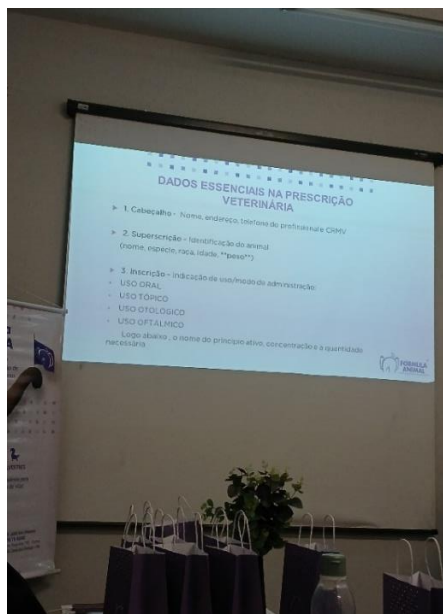


Figura 56: Apresentação realizada por uma empresa do ramo de farmácias veterinárias durante as reuniões semanais com empresas.

2.2.2 Casuística

O hospital conta com uma rotina de alto número de atendimentos ao longo do dia, porém devido a necessidade constante de estagiários no internamento geral nem sempre era possível acompanhar todas as consultas. Durante o período de estágio acompanhou-se 67 pacientes, sendo 51 cães e 16 gatos.

O Gráfico 01 abaixo mostra a frequência em cães do aparecimento de uma doença como suspeita principal ou diagnóstico diferencial nos casos

acompanhados pelo estagiário durante o estágio curricular no HV- UFPR, o que indica a casuística dos atendimentos realizados em cães no hospital veterinário durante esse período.

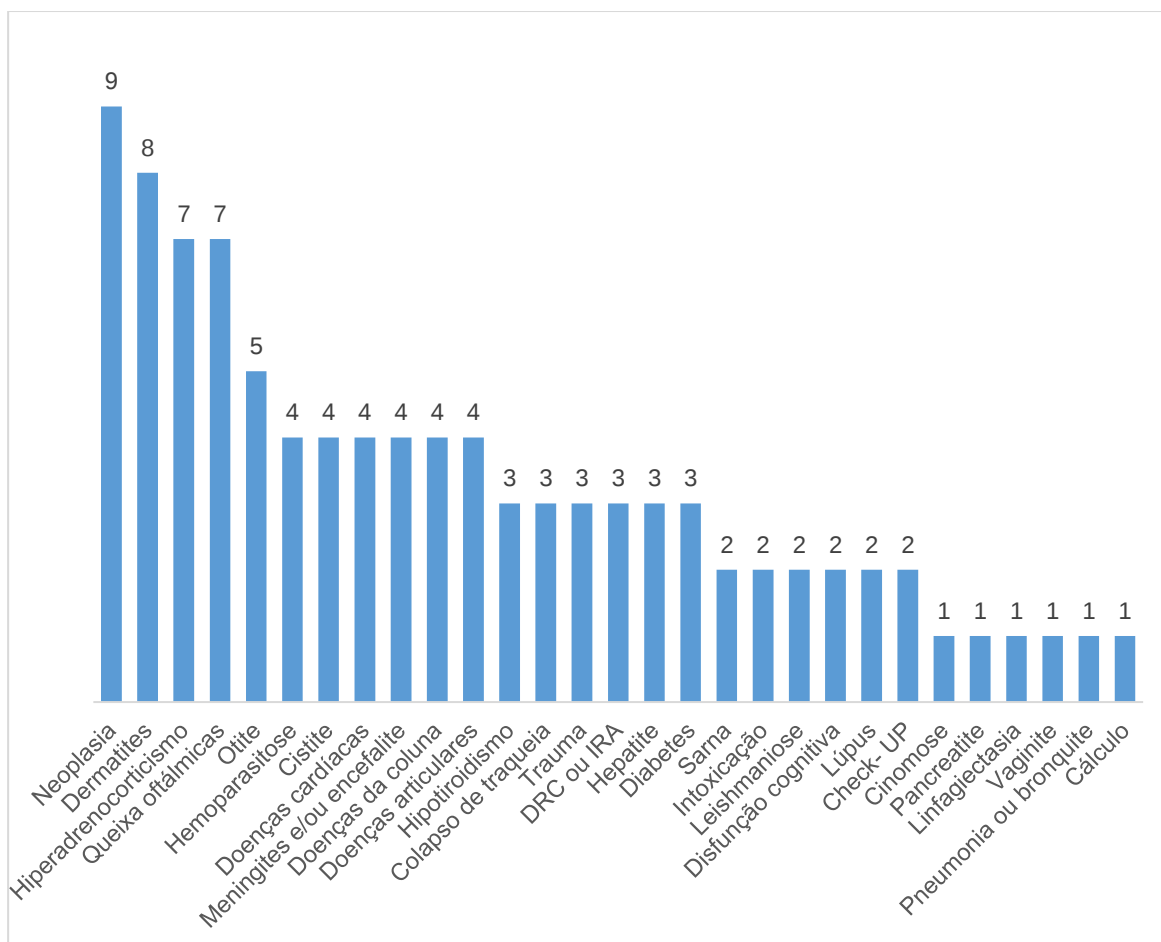


Gráfico 01: Frequência do aparecimento de uma doença como suspeita clínica ou diagnóstico diferencial em consultas de cães atendidos no HV-UFPR

As figuras 57, 58, 59, 60 e 61 mostram pacientes caninos que tiveram seus casos acompanhados durante o período de estágio no HV da UFPR.



Figura 57: paciente Alice - diagnóstico de pneumonia e anemia hemolítica imunomediada de origem desconhecida



Figura 58: paciente Clotilde- diagnóstico de trauma abdominal e cistite



Figura 59: paciente Ulises – diagnóstico de corpo estranho e gastrite



Figura 60: paciente White – suspeita de leptospirose



Figura 61: paciente Otavio – diagnóstico de cetoacidose diabética, hepatite, hipotireoidismo

O Gráfico 02 abaixo mostra a frequência em gatos do aparecimento de uma doença como suspeita principal ou diagnóstico diferencial nos casos acompanhados pelo estagiário durante o estágio curricular no HV- UFPR, o que indica a casuística dos atendimentos realizados em gatos no hospital veterinário durante esse período.

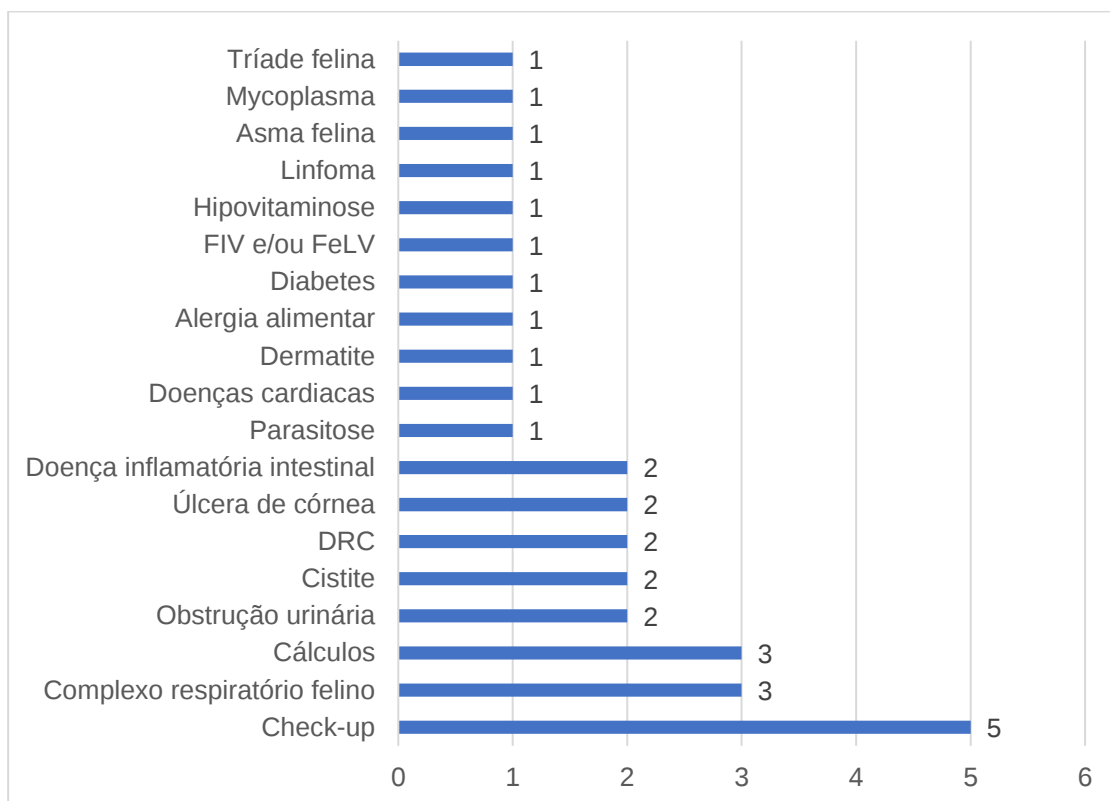


Gráfico 02: Frequência do aparecimento de uma doença como suspeita clínica ou diagnóstico diferencial em consultas de felinos domésticos atendidos no HV-UFPR.

As figuras 62, 63 e 64 mostram pacientes felinos que tiveram seus casos acompanhados durante o período de estágio no HV da UFPR.



Figura 62: paciente Mimus – sofria de diarreia crônica, sendo alergia alimentar, tríade felina, hipovitaminose, parasitose e linfoma as principais suspeitas



Figura 63: paciente Faísca – diagnóstico de úlcera de córnea grave



Figura 64: paciente Lua – diagnóstico de tromboembolismo com suspeita de cardiomiopatia hipertrófica e Mycoplasmoses

2.3 LabmolVet

2.3.1 Estrutura geral e localização

O LabmolVet (Figura 65) está localizado na Rua Pedro Celestino, nº 1717, Bairro Centro, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. O setor onde foi desenvolvido o estágio curricular foi o de Biologia Molecular e Imunologia no período de 03 de setembro de 2024 a 11 de outubro de 2024, integral de segunda-feira a sexta-feira (30 horas semanais), totalizando 168 horas e supervisionado pelo Médico

Veterinário Rodrigo Leite Soares.



Figura 65: Entrada do LabmolVet.

O estagiário auxiliou no recebimento, separação, aliquotagem e identificação de amostras. Ademais, o estagiário também foi responsável pela organização dos laboratórios, manuseio e separação de equipamentos. Por fim, com a supervisão do médico veterinário Rodrigo Leite Soares, o acadêmico ajudou na realização dos exames feitos no laboratório.

Ao entrar no laboratório, os clientes se deparam com uma área de recepção (Figura 66), a qual é responsável por recolher e identificar os exames, destinando as amostras a realização dos exames moleculares e/ou imunológicos. Ademais, fora da estrutura do laboratório para a realização dos exames, ele também possui um refeitório (Figura 67), uma sala administrativa e dois banheiros.



Figura 66: Recepção do LabmolVet



Figura 67: Refeitório do LabmolVet

Após a separação e identificação das amostras elas são armazenadas em refrigeração no interior do laboratório, na geladeira da sala de extração de amostras, até serem aliquotadas para a realização dos exames pedidos em requisição. O laboratório efetua uma série de exames moleculares e imunológicos, sendo a reação em cadeia da polimerase (PCR) principal exame realizado. A Figura 68 abaixo mostra a requisição do laboratório e os exames por ele ofertados.



LABMOL VET
Laboratório de Diagnóstico Molecular Veterinário

Av. Senador Filinto Muller 2443
Vila Ipiranga, Campo Grande-MS
CEP: 79070-900
67 9 8126-1994 / 67 9 8174-2669
e-mail: labmolvet@gmail.com
www.labmolvet.com.br

FORMULÁRIO DE SOLICITAÇÃO DE EXAMES

Nome do animal:		Espécie:	Idade:	Sexo:
Raça:		Telefone:	Data da coleta:	
Proprietário (a):		Assinatura e carimbo		
Laboratório/Clinica:				
Veterinário (a)/CRMV:				
E-mail:				
MATERIAIS COLETADOS				
☐ Sangue Edta	☐ Linfonodo	☐ Urina	☐ Swab ocular	
☐ Soro	☐ Medula óssea	☐ Fezes	☐ Swab Orofaringe	
☐ Lquor	☐ Líquido cavitário	☐ Bulbo capilar	☐ Swab cloaca	
☐ Tecidos:	☐ Secreção:	☐ Cultura	☐ Outros:	
EXAMES				
☐ <i>Anaplasma platys</i>	☐ <i>Giardia</i> spp.	☐ Teste rápido <i>Ehrlichia canis</i> Ac		
☐ <i>Anaplasma</i> spp.	☐ <i>Hepatozoon</i> spp.	☐ Teste rápido <i>Giardia lamblia</i> Ag		
☐ <i>A. marginale</i>	☐ <i>Herpesvirus felino</i>	☐ Teste rápido <i>L. infantum</i> Ac		
☐ <i>Babesia bovis</i>	☐ <i>Herpesvirus bovino I</i>	☐ Teste rápido Parvovirose Ag		
☐ <i>Babesia bigemina</i>	☐ <i>Herpesvirus bovino V</i>	☐ Teste rápido FIV (Ac) e FeLV (Ag)		
☐ <i>Babesia vogeli</i>	☐ <i>Leishmania amazonensis</i>	☐ SNAP 4DX plus		
☐ <i>Bartonella henselae</i>	☐ <i>Leishmania infantum</i>	☐ Pesquisa direta de hemoparasitas		
☐ <i>Borrelia burgdorferi</i>	☐ <i>L. infantum</i> ELISA + RIFI 1:40	☐ Pesquisa direta de <i>Leishmania</i>		
☐ <i>Brucella</i> sp.	☐ <i>L. infantum</i> ELISA + RIFI 1:80	☐ Teste de Knott - <i>Dirofilaria immitis</i>		
☐ <i>Calicivirus felino</i>	☐ <i>L. infantum</i> ELISA + RIFI tit. total	☐ Teste de Woo e Buffy coat		
☐ <i>Chlamydia felis</i>	☐ <i>Leptospira</i> spp.	COMBOS FACILITADORES		
☐ <i>Chlamydia psittaci</i>	☐ <i>Mycoplasma</i> spp.			
☐ <i>Cinomose</i> (CDV)	☐ <i>Neospora caninum</i>	☐ Combo 3 "Doença do carrapato" (cães): <i>A. platys</i> , <i>E. canis</i> e <i>B. vogeli</i>		
☐ <i>Clostridium chauvoei</i>	☐ <i>Parvovirus canino</i> (CPV)	☐ Combo 5 "Doença do carrapato" (cães): <i>A. platys</i> , <i>E. canis</i> , <i>B. vogeli</i> , <i>Mycoplasma</i> spp. e <i>Hepatozoon</i> spp.		
☐ <i>Clostridium perfringens</i>	☐ <i>Pasteurella multocida</i>	☐ Combo 5: Diferenciais doenças do SNC canina: <i>Cinomose</i> , <i>N. caninum</i> e <i>T. gondii</i>		
☐ <i>Coronavirus</i> (PanCov)	☐ <i>Piroplasmas</i>	☐ Combo 3- Triagem Viral felina: FIV, FeLV (RNA) e <i>Coronavirus</i>		
☐ <i>Cryptosporidium</i> spp.	☐ <i>Salmonella</i> spp.	☐ Combo 3- Doenças do trato respiratório superior felina: <i>Calicivirus</i> , <i>Herpesvirus felino</i> e <i>Mycoplasma</i> spp.		
☐ <i>Cryptococcus neoformans</i>	☐ Sexagem de aves	☐ Combo 4- Hemoparasitose felina: <i>A. platys</i> , <i>E. canis</i> , <i>Mycoplasma</i> spp. e <i>Piroplasmas</i>		
☐ <i>Diarreia viral bovina</i>	☐ <i>Staphylococcus aureus</i>	Outros: (Quais)?		
☐ <i>Ehrlichia canis</i>	☐ <i>Sporothrix schenckii</i>			
☐ FeLV (RNA)	☐ <i>Toxoplasma gondii</i>			
☐ FeLV (DNA proviral)	☐ <i>Trypanosoma</i> spp.			
☐ FIV (DNA proviral)	☐ Teste rápido <i>Cinomose</i> Ag			
☐ Filarídeos	☐ Teste rápido <i>Cinomose</i> Ac			

Figura 68: Folha de requisição do LabmolVet

O interior do laboratório é dividido em uma sala para a extração de amostras, uma sala dos termocicladores, uma sala de esterilização, uma sala para preparação do mix de PCR, uma sala para realização de eletroforese e para exames imunológicos. A organização do espaço pode ser vista na Figura 69, a qual também apresenta um mapa de riscos (biológicos, físicos, químicos e outros) existentes no laboratório.



Figura 69: Mapa de risco - LabmolVet.

A sala de extração (Figura 70) de DNA/RNA possui uma geladeira para armazenamento de amostras, duas capelas para manipulação de amostras e reagentes, três centrifugas (sendo uma com resfriamento para extração de RNA), duas incubadoras, um vórtex, um espectrofotômetro para quantificação do DNA/RNA extraído, um computador, suporte de amostras, armários para armazenamento de reagentes, vidrarias e espaço para lavagem de vidrarias.



Figura 70: Sala de extração de amostras.

A sala de esterilização dos equipamentos, vidrarias e ponteiros possui 3 autoclaves e um chuveiro de segurança. A estrutura do local pode ser vista pela Figura 71.



Figura 71: Sala de esterilização do LabmolVet.

Ao lado dessa sala se encontra a dos termocicladores (Figura 72), a qual possui 4 termocicladores para realização de PCR convencional e 2 para PCR em tempo real. Além disso, o espaço contém uma bancada para pipetagem e armários nos quais se guarda equipamentos de testes, suportes, ponteiros e vidrarias esterilizadas.



Figura 72: Sala dos termocicladores do LabmolVet.

Ademais, o laboratório ainda conta com duas salas adicionais, uma para a preparação de mix de PCR, outra para a realização de eletroforese e também para a realização de exames imunológicos, como RIFI e ELISA.

A sala para preparação de mix de PCR (Figura 73) apresenta um freezer, no qual é guardado os reagentes para construção do mix, uma capela de alto nível de biossegurança, uma balança, um micro-ondas e duas bancadas. Para entrar na sala de mix, o estagiário precisava separar um jaleco limpo cuja única utilização era para o preparo dos mixes, visando evitar que contaminações externas possam interferir no procedimento e, conseqüentemente, na reação de PCR.



Figura 73: Sala de preparação do mix para PCR.

A sala de eletroforese (Figura 74) possui uma geladeira, no qual é guardado os produtos da termociclagem, marcadores, amostras de soro, testes rápidos, kit Dot-ELISA de erliquiose e kits para diagnóstico sorológico de leishmaniose (ELISA e RIFI da marca Biogene). Além disso, o local possui três cubas, um microscópico com luz fluorescente, um transiluminador UV, dois microscópicos comuns, suportes, kit de coloração panótico e tambor para armazenamento de água destilada.



Figura 74: Sala de eletroforese.do LabmolVet

2.3.2 PCR convencional

O laboratório recebe uma nova leva de amostras sempre ao final de cada período do dia (final de manhã ou da tarde) e, a partir disso, as amostras são separadas e identificadas pela recepção. Em seguida, aquelas destinadas à realização da PCR são alíquotadas em eppendorfs de 2mL para serem submetidas a extração de DNA ou RNA dependendo do agente a ser pesquisado. Para as amostras de sangue é aliqotado 350microlitros no eppendorf, mas caso seja outro tipo de material muitas vezes é necessário a utilização de um swab para a coleta (como no caso de fezes), a centrifugação da amostra visando concentrar mais o DNA (quando a amostra for de urina e o agente a ser pesquisado for *leptospira* sp.) ou até mesmo a maceração e divisão da amostra (amostras de tecidos, como do sistema nervoso por exemplo).

A extração de DNA (Figura 75) é seguida adicionando 500microlitros de SDS 20%, responsável pela lise celular, no eppendorf com a amostra. Em caso de amostra diferente de sangue, quando se espera uma baixa concentração de

DNA extraído (como amostras de líquido por exemplo), é adicionado junto 10 microlitros de proteinase K (PK) e o eppendorf levado para incubação a 56°C por 18 horas antes de a extração ser continuada. Esse processo é realizado pois a PK auxilia na digestão de proteínas e remoção de contaminação, inclusive inativando nucleases. Seguidamente, a amostra é homogeneizada em vórtex e, após isso, coloca-se 400 microlitros de clorofórmio, separando os componentes moleculares por meio da dissolução de proteínas, lipídeos e alguns carboidratos. Posteriormente, homogeneiza-se novamente em vórtex, pipetando depois 300 microlitros de solução de precipitação proteica no eppendorf realizando novamente, ao final, a homogeneização. Essa última solução torna as proteínas da amostra em insolúveis novamente, permitindo que após o processo de centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm a solução seja separada em três fases (Figura 76): uma fase aquosa contendo os ácidos nucleicos, uma fase intermediária contendo as proteínas precipitadas e uma fase mais abaixo contendo os solventes orgânicos.

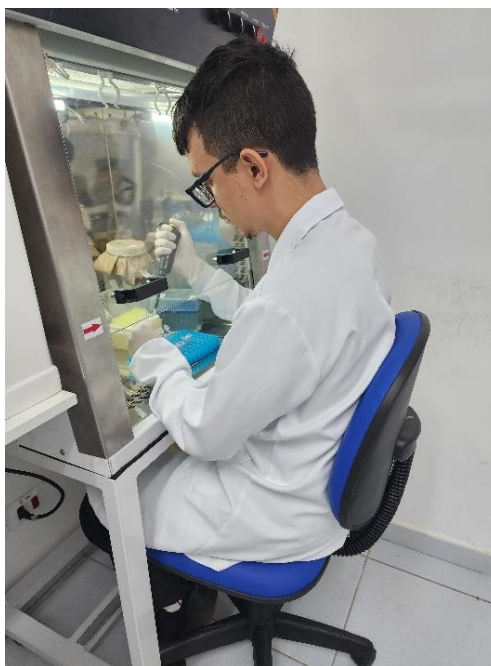


Figura 75: procedimento de extração de DNA na capela



Figura 76: três fases após separação na centrifugação.

Após a centrifugação, a parte aquosa é pipetada e transferida para um novo eppendorf, o qual é identificado de acordo com o número da amostra e nele adicionado 1mL de álcool 100%, o qual tem por função precipitar o DNA e remover possíveis impurezas restante. A solução é homogeneizada por inversão e o tubo levado para uma nova centrifugação por 5 minutos a 100000 rpm. Depois desse processo, é possível verificar a presença do “pallet”, no qual se está concentrado o DNA precipitado. O sobrenadante é descartado e realiza-se uma nova etapa de lavagem, porém dessa vez com 1mL de álcool 70%. Em seguida, o eppendorf é colocado para centrifugação por 2 minutos a 10000 rpm e o sobrenadante resultante descartado novamente. Posteriormente, retira-se possíveis resíduos de álcool colocando o eppendorf na incubação à 65°C por cerca de 5 minutos. Por fim, o DNA é solubilizado com a adição de água livre de nuclease e dessa forma fica pronto para ser quantificado pelo espectrômetro (Figura 77), aparelho que verifica se o processo foi bem sucedido através da análise da concentração do DNA e do fator de pureza. A concentração de DNA esperada gira em torno de 100 a 200 ng/ μ l, porém valores um pouco abaixo, desde que tendo um fator de pureza dentro do padrão (1,8 a 2), também são aceitados e não interferem significativamente no resultado final da reação PCR.



Figura 77: Espectrofotômetro para quantificação de DNA ou RNA extraído

Quanto a extração de RNA, o método empregado é o realizado com trizol. A principal diferença desse método em relação ao convencional de extração de DNA é a utilização do trizol, um agente desnaturante forte que efetuando a lise celular e a inativação das RNases, mantendo a integridade do RNA. Ademais, por conta do uso desse reagente, não é adicionado o SDS 20% no início e nem a solução de precipitação proteica, apenas o clorofórmio para separar a solução em fase aquosa. Além disso, todo o processo de centrifugação é realizado em refrigeração a 4°C visando garantir uma melhor extração do RNA.

A montagem de reação de PCR é feita na sala de preparação do mix e, para a maioria das reações, utiliza-se o master mix, que contém a Taq DNA polimerase (sintetiza o DNA), tampão (mantém o pH estável), dNTPs (substrato da reação) e $MgCl_2$ (cofator da enzima Taq polimerase). Além disso, adiciona-se também no eppendorf água e os primers (oligonucleotídeos iniciadores), que são específicos para cada reação. No caso da RT-PCR, além dos demais reagentes, a enzima transcriptase reversa, que é responsável pela transformação do RNA para DNA, é posta no mix. Após isso, com os reagentes devidamente homogeneizados, o volume é aliquotado em eppendorfs menores e esses levados até a sala dos termocicladores. Seguidamente, os tubos são separados e adiciona-se uma amostra sabidamente positiva no tubo que será o controle positivo, água no controle negativo e o DNA ou RNA extraído da amostra nos outros tubos. Por fim, identifica-se cada tubo e eles são levados ao termociclador

para a reação de PCR.

No termociclador é configurado o programa de termociclagem específico para o par de primers utilizado e a reação se inicia. A PCR consiste em uma técnica de amplificação *in vitro* de fragmentos específicos de DNA, sendo que para essa replicação se utiliza uma enzima termoestável, a Taq polimerase. A reação é dividida em três fases: desnaturação (aquecimento até 94 graus visando desnaturação da dupla fita de DNA e obtenção de fita simples), anelamento (resfriamento da reação e emparelhamento dos primers iniciadores com as suas sequências específicas de nucleotídeos, sendo específico a temperatura necessária para que ocorra essa fase conforme mostra a Figura 78 e 79) e extensão (elevação da temperatura até 72 e polimerização de nova fita de DNA por meio da ação da Taq). A Figura 80 mostra a reação de PCR no termociclador. Além disso, quando se trata da RT-PCR, existe ainda uma etapa anterior a da desnaturação que é a de transcrição, a qual ocorre em uma temperatura constante de 40-50°C e nela a enzima transcriptase reversa realiza a transformação do RNA para cDNA. Depois de todo esse processo, têm-se como resultado final um acúmulo exponencial específico dos fragmentos de DNA de interesse, ou seja, do patógeno procurado caso a reação seja positiva, o que pode ser visto através da realização da eletroforese.

Agente	Primer F	Primer R	Pares de bases	Temp. de anel.	Referências
Adenovirus canino tipo I e II	(HA1)	(HA2)	CAV-1 (791) e CAV-2 (1408)	58°C	Hu et al., 2001
Anaplasma marginale MSPS	(msp5-F)	(msp5-R)		714	Bacaneli et al., 2014
Anaplasma platys - Nested	(Apy5F)	(Apy5R)		212	Rufino et al., 2013
Anaplasma spp. convencional (16S)	(AptspF)	(AptspR)		800	Zobba et al., 2014
Anaplasma spp. tempo real	(gltA84F)	(gltA84R)		84	da Silva et al., 2016
Babesia bigemina	(CYB1)	(CBBR)		263	Buling et al., 2007
Babesia bovis	(CYB0)	(CBBR)		263	Buling et al., 2007
Babesia canis (subgêneros)	(18S-F)	(18S-R)		551	Almeida et al., 2012
Bartonella henselae	(P-bhenfa)	(P-bhenr)	186 (B. henselae) e 168 (B. clarridgeiae)	50°C	Rampersad et al., 2005
Bartonella henselae	(N-bhenfa)	(N-bhenr)	152 (B. henselae) e 134 (B. clarridgeiae)	50°C	Rampersad et al., 2005
Bordetella bronchiseptica	(Fla2)	(Fla4)		237	Horsthor et al., 1999
Borrelia spp.	(23S-F)	(23S-R)		500	Albuquerque, 2017
Brucella spp.	(IS711-F)	(IS711-R)		63	Henic et al., 2008
Calicivirus felino	(FCV24)	(FCV414)		391	Furtado et al., 2017
Cinomose canina CDV (com cepa vacinal)	(P1)	(P2)		286	Frisk et al., 1999
Cinomose RT-qPCR	(CDV4.1-F)	(CDV3-R)		116	Hallecker et al., 2021
Chlamydiaceae	(CHYF)	(CHYR)		230	Comdon & Chao, 2007
Chlamydia felis	(420)	(423)		277	Rampazzo et al., 2008
Chlamydia felis	(CpH55-F)	(CpH55-R)		151	Braz et al., 2014
Clostridium perfringens	(CCF516)	(CCR516)		516	Kojima et al., 2001
Clostridium perfringens	(cpA-F)	(cpA-R)		236	Ana, 2012
Coronavirus bovino HEMINESTED	(BCOV1)	(BCOV2)		463	Asano et al., 2009
Coronavirus bovino HEMINESTED	(BCOV1)	(BCOV3)		306	Asano et al., 2009
Coronavirus canino	(CcoV1)	(CcoV2)		409	Decaro et al., 2004
Coronavirus canino e felino	(S1)	(S2)		380	Han et al., 2014
Coronavirus felino	(qPCR-F)	(qPCR-R)		368	Guan et al., 2010
Diarrea Viral Bovina	(103)	(372)		290	Pitz et al., 2007
Dirofilaria immitis	(DIRO-F)	(DIRO-R)		203	Tranquero et al., 2020
Cryptosporidium parvum	(CN4)	(CN5)		136	Mitchell et al., 1994
Cryptosporidium spp.	(CRU185F)	(CRU185R)		300	Haddad et al., 2013
Ehrlichia spp. DSB	(Dsb-330)	(Dsb-728)		401	Doyle et al., 2003

Figura 78: parte um do quadro com a temperatura de anelamento dos primers de diferentes agentes possíveis de serem pesquisados no laboratório

Agente	Primer F	Primer R	Pares de bases	Temp. de anel.	Referências
Ehrlichia spp. 16S	(16SF)	(16SR)	125	60°C	Peleg et al., 2009
Ehrlichia canis Nested-PCR	(ECC)	(ECB)	500	58°C	Wien et al., 1997
Ehrlichia canis Nested-PCR	(HE)	(ECA)	389	60°C	Wien et al., 1997
Encephalitozoon spp.	(Ecun-F1)	(Ecun-R2)	111	59°C	Hester et al., 2002
FelV - Proviral (reação 2)	(FelV-G-F)	(FelV-G-R)	601	58°C	Furtado et al., 2017
FelV (Virus)	(FelV_U3-exo_r2)	(FelV_U3-exo_r2)	131	60°C	Tongtako et al., 2009
FIV - Proviral (Nested)	(FIV-P1F)	(FIV-P2F)	1022	58°C	Furtado et al., 2017
FIV - Proviral (Nested)	(FIV-P2F)	(FIV-PIR)	578	58°C	Furtado et al., 2017
Filarídeos	(Fila125F)	(Fila125R)	330	58°C	Otranto et al., 2011
Fungos (genérico)	(Fungus 1)	(Fungus 2)	429	50°C	Bialek et al., 2001
Giardia spp.	(GiarF)	(GiarR)	130	53°C	McGiade et al., 2013
Hepatozoon spp.	(HepF)	(HepR)	666	57°C	Inokuma et al., 2002
Herpesvirus Bovino tipo I (IBR)	(Bcon)	(B5)	354	58°C	Claus et al., 2007
Herpesvirus Bovino tipo V	(Bcon)	(B5)	159	58°C	Claus et al., 2007
Herpesvirus canino	(CaHV-1F)	(CaHV-1R)	450	49°C	Santos, 2014
Herpesvirus equino tipo I	(EHV-1F)	(EHV-1R)	135	55°C	Wagner et al., 1992
Herpesvirus equino tipo I	(EHV-4F)	(EHV-4R)	326	55°C	Wagner et al., 1992
Herpesvirus equino tipo IV	(HerpF)	(HerpR)	292	53°C	Nagafi et al., 2014
Herpesvirus felino	(Histo1)	(Histo2)	231	72°C	Bialek et al., 2001
Histoplasma capsulatum	(a1)	(a2)	62	63°C	Monari et al., 1998
Leishmania amazonensis	(RV1)	(RV2)	145	62°C	Lachaud et al., 2002
Leishmania spp.	(A)	(B)	331	58°C	Moran et al., 1992
Leptospira spp.	(MRBLV1)	(MRBLVR)	120	60°C	Rode-Lustig et al., 2013
Leucose Enzootica Bovina	(MorbF)	(MorbR)	122	54°C	Makhar et al., 2013
Morbilivírus felino	(rHF5)	(rHF6)	677	53°C	Chadler et al., 2004
Mycoplasma spp. (Hemotópico)	(MfelF)	(MfelR)	750	53°C	Marinho et al., 2011
Mycoplasma felis (Respiratório)	(NP6)	(NP7)	328	50°C	Lee et al., 2010
Neospora caninum	(M-F)	(M-R)	180	58°C	Hong et al., 2007
Parainfluenza canina	(CPV-2F)	(CPV-2R)	583	50°C	Canet et al., 1999
Parvovirus CPV-2	(PIRO A)	(PIRO B)	400	55°C	Canet et al., 1999
Piroplasmas	(B-Iso-F)	(B-Iso-R2)	150	60°C	Quarato et al., 2017
Piroplasmas (Babesia, Theileria e Cytauxzoon)					

Figura 79: parte dois do quadro com a temperatura de anelamento dos primers de diferentes agentes possíveis de serem pesquisados no laboratório

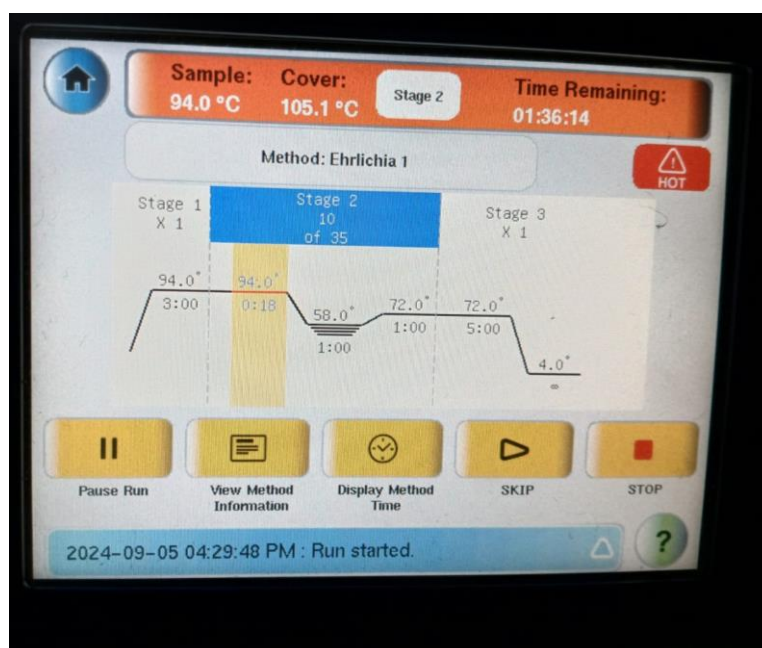


Figura 80: reação de PCR na etapa de desnaturação.

Na eletroforese cada amostra é misturada com uma solução tampão (gel red) e um corante fluorescente (brometo de etídeo) que se intercala entre as moléculas de DNA. Em seguida, as amostras são adicionadas em poços de um gel de ágar previamente preparado, o qual é colocado dentro de uma cuba que emite corrente elétrica. A voltagem permite a migração da amostra pelo gel de ágar do polo negativo para o polo positivo, separando no final o DNA em diversos

fragmentos por tamanho ao longo do gel. O fragmento de interesse se torna passível de ser visualizado devido a alta amplificação do fragmento obtida na reação de PCR quando o agente pesquisado está ali presente, sendo essa visualização vista por meio da formação de uma banda quando o gel é exposto a luz ultravioleta no transiluminador (Figura 81).

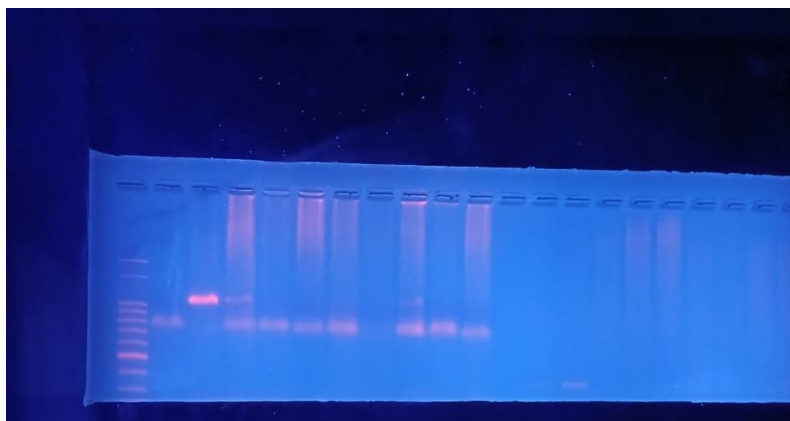


Figura 81: leitura da eletroforese: formação de banda nas amostras 2,3 e 8 indicando positividade delas.

2.3.3 PCR em tempo real

No laboratório emprega-se o método de qPCR que utiliza sondas de hidrólise. O preparo do mix para essa reação é feito conforme o disposto pelo Quadro 02 abaixo. Após finalizado a montagem, separa-se a placa de qPCR e em cada poço é adicionado 15 microlitros do mix seguido por 5 microlitros da amostra. Por fim, esse mesmo processo também é feito em poços separados com o controle positivo puro, que possui quantidades conhecidas de DNA servindo como um padrão, e com o controle positivo diluído, além do controle negativo.

Quadro 02: preparo do mix para uma reação de qPCR

Tampão de reação qPCR (mistura de qPCR)	10 µl
Primers e probes específicos (oligonucleotídeos e sondas fluorescentes)	2 µl
Enzima qPCR	1 µl
Água	2 µl
Controle positivo ou amostra	5 µl
Volume final de reação	20 µl

O método de sondas de hidrólise consiste em um sistema de detecção que utiliza três primers, sendo um deles a sonda que é marcada com um fluoróforo (repórter) e um inibidor (quencher) nas extremidades. No início da reação, no entanto, quando essas duas partes do primer se encontram fisicamente próximas o quencher absorve a fluorescência do repórter e o termociclador não detecta ela. Porém, a sonda tem a capacidade de se ligar no meio do fragmento gerado na etapa de anelamento, entre os outros dois primers, e daí conforme a DNA polimerase for quebrando a sonda, por ocasião da amplificação, o fluoróforo e o quencher acabam se separando e a luz não é mais captada pelo quencher e sim pelo termociclador. Com isso, conforme a reação progride e mais sondas são quebradas, a amplificação produz quantidades crescentes de DNA de dupla fita, que se liga ao corante, resultando em aumento da fluorescência. A intensidade de luminosidade é detectada pelo termociclador e convertida em números que permitem delimitar se uma amostra é positiva ou negativa.

A qPCR também é empregada para realizar uma quantificação do DNA-alvo. O software da qPCR utiliza os dados de fluorescência para determinar o número de ciclos necessários para que ela alcance um limiar pré-estabelecido, conhecido como ciclo limiar (Ct). O Ct está inversamente relacionado à quantidade inicial de DNA presente na amostra, ou seja, quanto menor o Ct, maior a quantidade inicial de DNA. A partir disso, a quantidade inicial de DNA alvo na amostra é então determinada comparando o Ct da amostra com os Ct de padrões de calibração conhecidos que contêm quantidades sabidas do DNA alvo. Isso permite a quantificação precisa do DNA presente na amostra original, sendo um Ct abaixo de 40 indicador da positividade da amostra conforme protocolo do teste. A Figura 82 abaixo mostra a análise de uma amostra considerada positiva com baixo Ct e alta quantidade de DNA do agente verificado através da fluorescência.

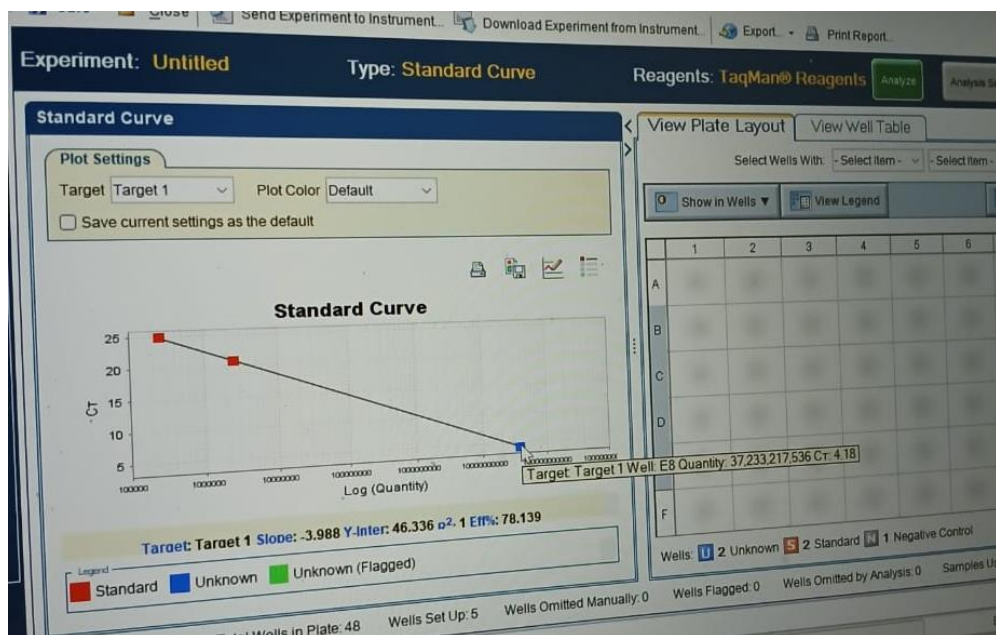


Figura 82: amostra positiva na qPCR com Ct de 4,18.

2.3.4 Exames imunológicos

O principal exame sorológico realizado no laboratório é o ELISA IgG, juntamente com a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em amostras de cães. Esses testes são feitos também com kits da marca Biogene e os protocolos se assimilam com o acompanhado anteriormente pelo estagiário.

O laboratório também executa o teste *Immunocomb* para detecção de anticorpos IgG anti-*Erlichia canis*, sendo esse exame uma modificação do ELISA tradicional, no qual ao invés do antígeno estar adsorvido no fundo do poço de uma placa ele está adsorvido em um ponto do dente de um cartão plástico. Os kits vêm com dois componentes principais: um pente de plástico com antígeno purificado e uma placa reveladora (Figura 83). Para a realização desse teste deve-se furar o primeiro poço da placa reveladora e adicionar 5 µl do soro da amostra nessa primeira solução. Após isso, a solução é homogeneizada e o pente é posto nesse primeiro poço, de forma que, caso no soro se tenha anticorpos IgG anti-*Erlichia canis* eles são ligados aos antígenos do pente. Em seguida, o pente é transferido para a segunda fileira e nela os anticorpos que não se ligaram anteriormente acabam sendo lavados. Seguidamente, na terceira fileira, o pente fica em contato com anticorpos anti-IgG canino marcados por uma enzima, sendo os anticorpos ligados ao cartão marcados com isso. Após isso, o pente passa por dois processos de lavagem nas duas fileiras posteriores e na última se encontra o substrato

(cromógeno), ocorrendo a reação enzimática que provoca uma mudança de cor, cuja intensidade indica a quantidade de anticorpos presentes na amostra. A avaliação é feita através da escala de tons cinza e a interpretação da intensidade do tom no ponto inferior (o da amostra) do pente deve ser feita comparando ele com o do controle positivo, localizado no ponto superior do pente. A leitura do teste é feita conforme indica as Figura 84 e 85.



Figura 83: realização do teste Immunocomb para detecção de anticorpos *anti-Erlichia canis*



Figura 84: leitura do pente, sendo a primeira amostra estando o ponto da amostra (o inferior) na escala 3 dos tons de cinza (reação média positiva)

Results		Remarks
≥S5	Reação forte positiva	Título 1:320-1280
S3-S4	Reação média positiva	Título 1:80-1:160
S1-2	Reação fraca positiva	Título 1:20-1:40
S0	Reação negativa	Negativo
	*Referência Positiva sem reação	Teste inválido
*	*Sombreamento interfere com a leitura	Teste inválido
≥S3	Sombreamento não interfere com a leitura S ≥ 3 reação positiva	Positivo

Figura 85: quadro para interpretação do resultado do teste *Immunocomb*.

Por fim, o laboratório também oferece testes rápidos imunocromatográficos, que se assemelham ao ELISA, porém tendo a diferença da reação imunológica ocorrer no papel cromatográfico por migração capilar. Os kits oferecidos para esse exame são da marca *Allere*, sendo realizado o teste rápido de cinomose (antígeno ou anticorpo), parvovirose (antígeno), FIV (anticorpo) e FeLV (antígeno).

3. Projeto de pesquisa

LEISHMANIOSE FELINA: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE FELINOS DOMÉSTICOS COM ANTICORPOS ANTI-*LEISHMANIA* SP. EM UMA ÁREA ENDÊMICA DO BRASIL

Maykko Antônio Bravo de PAULA¹, Bruno Silva de REZENDE², Carlos Alberto do Nascimento RAMOS³.

¹ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária da UFMS, voluntário de Iniciação Científica CNPq – PIVIC 2023/24.

² Aluno de doutorado da FAMEZ/UFMS.

³ Professor Adjunto de Genética Veterinária, Biologia Molecular e Imunodiagnóstico da FAMEZ/UFMS.

Resumo: O objetivo neste trabalho foi encontrar a soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* sp. em felinos domésticos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande - MS, por meio da técnica de imunocromatografia, tendo sido realizado também uma análise semiquantitativa através de diluição seriada das amostras e utilização desse teste, obtendo-se uma soroprevalência geral de 9,77% considerando um total de 215 amostras analisadas e títulos de até 1:8. Como método confirmatório utilizou-se a técnica de PCR, porém não foi observado a positividade de nenhuma das amostras reagentes no método anterior, apesar de se existir a possibilidade da ocorrência de falsos negativos devido às condições das amostras e material utilizado (sangue total). Ademais, buscou-se traçar um perfil clínico e laboratorial do grupo sororeagente para leishmaniose felina (LF), sendo realizado também uma diferenciação desse grupo de outro no qual também se verificava a positividade para retrovírus imunossupressoras (*FeLV* e/ou *FIV*), notando-se a presença de pelo menos 2 sinais sugestivos da LF em 14 animais (66%) e em 11 (52,38%) ao menos 3. Por fim, as seguintes alterações laboratoriais foram vistas: leucocitose, plaquetopenia hipoalbumemia, hiperglobulinemia, hiperproteinemia e uma relação albumina/globulina abaixo do valor de referência.

Palavras-chaves: leishmaniose felina; soroprevalência; caracterização clínica e laboratorial.

3.1 Introdução

A apresentação clínica das leishmanioses depende da relação hospedeiro-parasita e da espécie envolvida do protozoário, podendo ser do tipo mucocutânea, cutânea ou visceral (Pirajá, 2013). Dentre os causadores da leishmaniose visceral (LV) destacam-se os protozoários *L. donovani* e *L. infantum*, tendo a última maior importância como agente etiológico da doença no Brasil, sobretudo em cães

(Vieira, 2016). No entanto, outras espécies domésticas são suscetíveis a infecção, tais como os felinos e os equinos (Pirajá, 2013).

No Brasil, duas espécies de mosquitos, até o momento, estão relacionadas com a transmissão do protozoário, *Lutzomyia longipalpis* (Silva, 2007) e *Lutzomyia cruzi* (Vieira, 2016). Para conseguir realizar a maturação dos ovos, as fêmeas dos flebotomíneos necessitam de sangue, e ao picar um animal ela pode ingerir macrófagos infectados com a formas amastigotas do protozoário, os quais se transformam em promastigotas no tubo digestivo do vetor. A partir disso, com a inoculação da saliva dessas fêmeas em um hospedeiro saudável as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e neles a *Leishmania sp.*, utilizando-se de sistemas de evasão do sistema imune, realiza a mudança para a sua conformação amastigota e continua a sua replicação finalizando o ciclo (Figueiredo, 2014).

A leishmaniose visceral se torna cada vez mais um problema de saúde pública mundial, sendo no Brasil considerada endêmica em diversos estados, como em Mato Grosso do Sul. O cão nas áreas urbanas atua como o principal reservatório do protozoário, mas outros animais vêm ganhando destaque com o surgimento de novos estudos, como os felinos e os equídeos (Pirajá, 2013). Conforme Mancianti (2004), o aumento de casos relatados em felinos a partir de 1990 pode indicar que essa espécie também possui importante papel na epidemiologia da doença. O autor Vieira (2016) ressalta que não se pode considerar mais o felino doméstico apenas como um hospedeiro acidental e sim como um importante reservatório de *Leishmania sp.*, pois estudos da infecção nesta espécie começam a indicar aumento da soropositividade, mesmo que o animal não apresente sinais clínicos ligados a afecção como ressalta Oliveira (2019). Já Gallego (2020) considera o gato como um reservatório secundário. Ademais, conforme Machado (2020), para sustentar essa hipótese, o felino possui características comportamentais que favorecem a picada pelos flebotomíneos, como caça predatória noturna e vida livre que coincide com o período de repasto sanguíneo das fêmeas do vetor e pode favorecer a infecção e disseminação do protozoário. Além disso, Pirajá (2013) relata que a relação cada vez mais próxima do gato com o homem, e o fato do animal ser uma espécie suscetível à infecção por *Leishmania sp.* reforça a importância do felino doméstico na epidemiologia da

doença.

O estudo realizado por Batista et al (2020) elucidou mais sobre o papel do gato no ciclo epidemiológico da doença ao conseguir confirmar a transmissão de *L. infantum* de um gato doméstico para um cão doméstico através do seu vetor biológico *L. longipalpis* de forma experimental, indicando que esse processo possa estar ocorrendo em uma escala maior.

Os gatos infectados por *L. infantum* podem não apresentar sinais clínicos da doença por anos ou durante a vida toda (Oliveira et al, 2020). Quando os sinais clínicos se encontram presentes eles tendem a ser inespecíficos e comuns a outras enfermidades felinas, sendo isso mais uma das razões da provável subestimação da real ocorrência da doença nesses animais (VIEIRA, 2016). Os autores ressaltam que os gatos apresentam uma resposta imune majoritariamente celular, o que concede à esta espécie um certo grau de resistência a essa doença pela boa ação desse tipo resposta frente no combate ao protozoário, enquanto que no cão o tipo de resposta predominante é do tipo humoral, menos eficaz contra o parasita (Santos et al., 2018; Oliveira, 2019). O surgimento de sinais clínicos na espécie geralmente está atrelado a presença concomitante de outras doenças como a *FIV* (*Feline Immunodeficiency Virus*) e *FeLV* (*Feline Leukemia Virus*), infecção por *Toxoplasma gondii* e/ou outras doenças típicas dos felinos que podem comprometer a resposta imune celular e permitir a proliferação do parasita (Pirajá, 2013).

A maioria dos casos sintomáticos de leishmaniose felina apresentam sinais clínicos da forma cutânea da doença, como alopecia, lesões nodulares ou ulceradas na pele e mucosas, geralmente presentes na cabeça (pálpebras, nariz e lábios), ou nas partes distais dos membros. Outros sinais comuns incluem linfadenomegalia, emagrecimento, lesões oculares (principalmente uveíte), alterações renais e hepáticas (Oliveira et al., 2020). Um estudo realizado por Santos et al. (2018) também confirmou a associação da doença com o aparecimento do complexo gengivoestomatite crônica felina. Quanto aos achados laboratoriais, em alguns pacientes felinos com a enfermidade se verificou anemia arregenerativa ou não, leucopenia ou leucocitose com neutrofilia, eosinofilia, monocitose, linfócitos reacionais, trombocitopenia ou presença de macroplaquetas. Ademais, na bioquímica sérica, alterações como diminuição de

albumina, hiperproteinemia com aumento de globulinas e aumento de bilirrubina total, alanina aminotransferase (ALT), e aspartato aminotransferase (AST) foram constatados (Noé, 2008).

O diagnóstico de leishmaniose pode ser realizado por diferentes métodos, podendo ser através da pesquisa do parasita (citologia, histologia, PCR) e métodos sorológicos (testes de imunofluorescência, ELISA, aglutinação direta, *Western blot*) (Vieira, 2016). No entanto, não existe uma metodologia oficial ou padrão para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp. em felinos, sendo a junção de diferentes metodologias sorológicas e/ou moleculares o mais empregado (Oliveira et al, 2020). Conforme Júnior et al (2020) é importante que os estudos sorológicos levem em conta que o perfil de resposta humoral nos gatos difere dos cães em relação a leishmaniose, pois eles tendem a apresentar menor produção de anticorpos.

A prevalência de *L. infantum* em felinos domésticos é variável, estudos sorológicos e/ou moleculares indicam de 0% a mais de 60%, conforme Júnior et al. (2020). Um estudo realizado por esses mesmos autores obteve uma prevalência conjunta de 3,8% em gatos atendidos no Hospital Veterinário do município de Patos - PB para os testes de triagem DPP e o teste ELISA, tendo 6,6% das amostras consideradas como reagentes no primeiro teste dentro de 432 amostras analisadas. Ademais, em Campo Grande, para cães observa-se elevadas prevalências de até 25,3% (Furlan, 2010), e em gatos o estudo de Noé (2008) obteve 7,27% de amostras soropositivas para *Leishmania* sp. utilizando a reação de imunofluorescência indireta.

Considerando a importância da leishmaniose como um problema de saúde pública nacional, principalmente em regiões endêmicas como o município de Campo Grande, a proximidade cada vez mais evidente do homem com o gato, espécie suscetível a *Leishmania* sp. e potencial reservatório, é necessário mais conhecimento acerca da prevalência da infecção nos felinos domésticos da região. Assim, no presente trabalho foi realizado um estudo retrospectivo sobre as evidências sorológicas e moleculares de infecções por *Leishmania* sp. em felinos domésticos atendidos no HV da FAMEZ/UFMS. Por fim, também buscou-se correlacionar os resultados obtidos com dados de exames clínicos e de exames laboratoriais anteriormente realizados.

3.2 Material e métodos

Avaliação sorológica e molecular

Foram avaliadas 215 amostras de soro sanguíneo de gatos atendidos no Hospital Veterinário (HV) da UFMS, tendo sido uma parte retirada de um banco de amostras armazenadas a -20°C no ano de 2022, e outra parte retirada da rotina do HV durante o segundo semestre de 2023.

Todas as amostras, primeiramente, passaram por uma triagem e foram analisadas pelo teste imunocromatográfico TR-DPP (*Biomanguinhos*) para detecção qualitativa de anticorpos IgG contra *Leishmania sp.*, que emprega como antígeno duas proteínas recombinantes k26/k39. Os testes foram realizados conforme instruções do fabricante.

Após essa primeira etapa, as amostras que reagiram na etapa de triagem foram submetidas a uma diluição seriada com PBS (1:2, 1:4, 1:8). Essa análise foi realizada visando obter um dado semiquantitativo que indicasse a proporção de anticorpos presentes nas amostras reagentes na primeira etapa. Ademais, também buscou-se verificar a existência da relação entre título e sinais clínicos indicativos de leishmaniose nos felinos.

Os resultados obtidos foram separados em positivos ou negativos, assim como o título de cada amostra positiva. Em seguida, a soroprevalência geral e a soroprevalência considerando o título obtido em cada amostra foi estimado por estatística descritiva e representado por meio da utilização de gráficos.

Por fim, executou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), com primers e protocolo para replicação de DNA de *Leishmania infantum* estabelecidos por Cortes et al (2004), em todas as amostras positivas no teste de triagem ainda viáveis, usando o sangue total restante delas, visando o emprego de uma metodologia de diagnóstico direto, confirmatória e diferenciada.

Associação dos resultados obtidos com os dados clínicos e laboratoriais

Depois de realizadas as análises de todas as amostras de soro, executou-se um levantamento das fichas clínicas e dos exames laboratoriais realizados anteriormente nos gatos positivos, quando disponíveis. Os dados clínicos, hematológicos e bioquímicos de relevância foram registrados em planilhas e submetidos a análise estatística visando encontrar possíveis diferenças entre as

variáveis laboratoriais e clínicas analisadas, entre os grupos de animais positivos e negativos, que possam diferenciar os valores de referência de um gato saudável, utilizando-se os intervalos padronizados pelo laboratório de patologia clínica veterinária da FAMEZ/UFMS, daqueles reagentes para *Leishmania sp.*

Após isso, no banco de dados, comparou-se as amostras somente reagentes para *Leishmania sp.* com as positivas para essa doença e para FIV ou FeLV com a finalidade de descartar que possíveis alterações nos exames possam estarem sendo ocasionadas por um alto número de positivos para essas duas últimas enfermidades e não pela *Leishmania sp.*, além disso se buscou traçar uma diferenciação entre esses grupos.

3.3 Resultados e discussão

Soroprevalência e análise molecular

Das 215 amostras avaliadas pelo teste de imunocromatografia, um total de 21 foram reagentes, resultando em uma soroprevalência de 9,77% (Figura 86). Essa porcentagem é maior do que a observada no estudo de Júnior et al (2020) que também utilizou o Teste Rápido TR-DPP® (*Bio-Manguinhos*) como uma das metodologias de avaliação, tendo obtido 6,6% de amostras reagentes nesse teste. Outrossim, em um comparativo com um estudo realizado em Campo Grande, também se observou uma soroprevalência ligeiramente acima da obtida por Noé (2008), a qual encontrou 7,27% por meio de análises de imunofluorescência indireta.

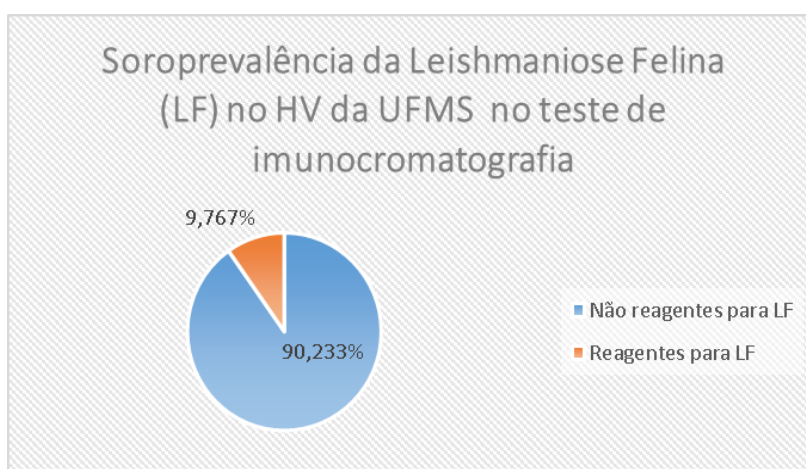


Figura 86. Soroprevalência aproximada de gatos reagentes no teste de imunocromatografia, oriundos do atendimento no Hospital Veterinário da FAMEZ/UFMS no ano de 2022 e no segundo semestre de 2023.

No que tange a titulação por meio de diluições seriadas, das 21 amostras reagentes no teste de triagem 6 obtiveram título de 1:2, 6 de 1:4 e o maior título encontrado foi 1:8 (4 amostras do total de 21). Sobre as demais amostras, não se verificou reação positiva em 5 após a primeira diluição e não foi possível a testagem de 1 devido a falta de material na amostra. A distribuição dos títulos seguiu o apresentado na Figura 87.

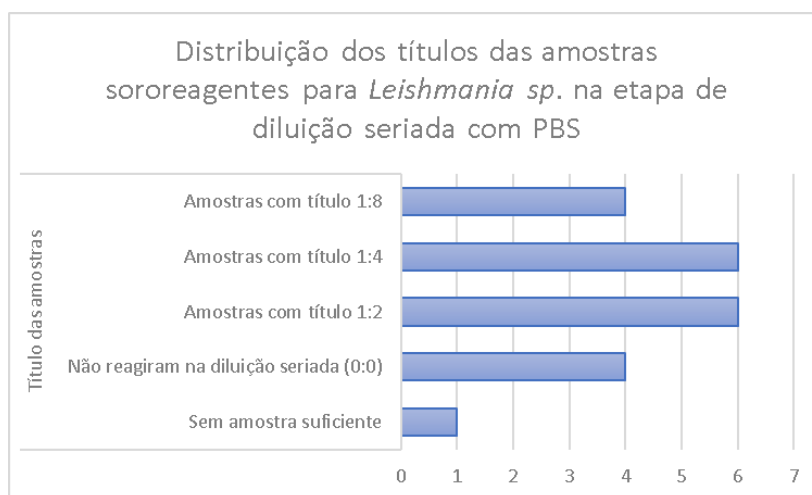


Figura 87. Distribuição dos títulos das amostras sororeagentes no teste de triagem

A baixa soroprevalência encontrada, quando comparada ao observado em cães na região (Furlan, 2010), associada ao baixo título anticorpos anti-*Leishmania sp.*, pode estar relacionada a uma resistência natural da espécie à infecção por *Leishmania sp.* (Santos et al., 2018). Ademais, a falta de padronização do teste, a sensibilidade desconhecida para a espécie e a resposta imunológica variável dessa espécie quanto a essa infecção pode contribuir para que metodologias de análise sorológica, como a imunocromatografia, não seja efetiva para detectar anticorpos na espécie. Solano-Galego et al (2007) observaram que a resposta imune dos felinos domésticos frente a essa infecção é predominantemente celular, ao invés de humoral, sendo essa uma possível explicação para baixa produção de anticorpos identificada nessa espécie.

Por conta dessa baixa produção de anticorpos, alguns pesquisadores afirmam que a sorologia pode não ser o melhor método de diagnóstico para leishmaniose felina (Maia, 2011; Berenguer, 2019). Reforçando essa tese, um estudo experimental de Simões-Mattos et al (2005) verificou que as técnicas sorológicas falharam em detectar anticorpos durante a fase de manifestações clínicas da infecção por *L. braziliensis* em gatos, o que poderia também estar

ocorrendo em testes para detecção sorológica de anticorpos anti- *L. infantum*. Por fim, também não é possível descartar a interferência de reações cruzadas nesses testes sorológicos (Pennisi, 2015).

Na técnica de PCR, não se observou amplificações positivas em nenhuma das amostras analisadas. No entanto, é importante ressaltar que muitas das amostras analisadas apresentavam pouco volume de material, e outras encontravam-se congeladas a muitos meses antes da análise por PCR, o que pode ter levado a degradação do DNA presente nas amostras. Por conta disso, os resultados obtidos podem se tratar de falsos negativos. Dessa forma, para as demais análises, serão considerados para classificação dos animais como reagentes ou não reagentes apenas os resultados sorológicos.

Análise de parâmetros laboratoriais

Na análise dos parâmetros hematológicos de todos os animais soropositivos para *Leishmania sp.*, apenas 5 animais apresentaram anemia (sendo 3 do tipo macrocítica normocrômica e 2 normocítica normocrômica) e não se constatou associação significativa entre infecção e anemia. No entanto, esse grupo apresentou leucocitose e plaquetopenia quando comparado com os valores de referência para a espécie (Figuras 88 e 89).

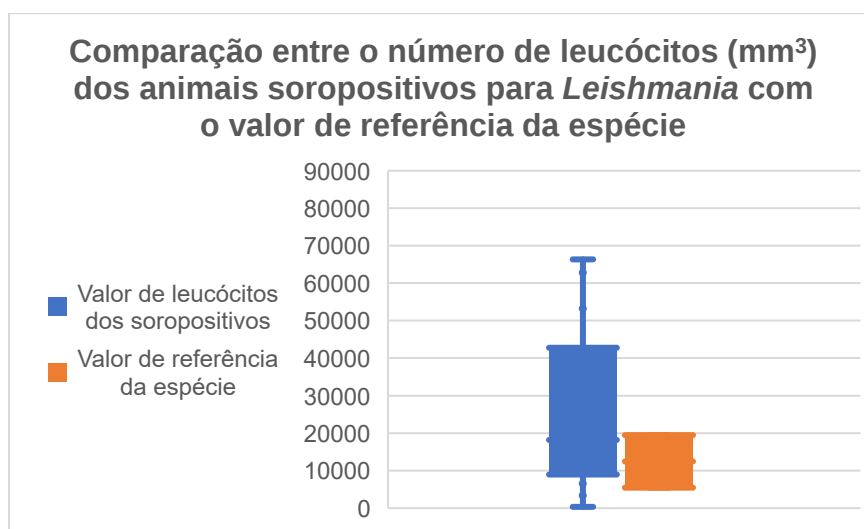


Figura 88. Comparação entre o número de leucócitos dos animais reagentes para LF com o valor de referência

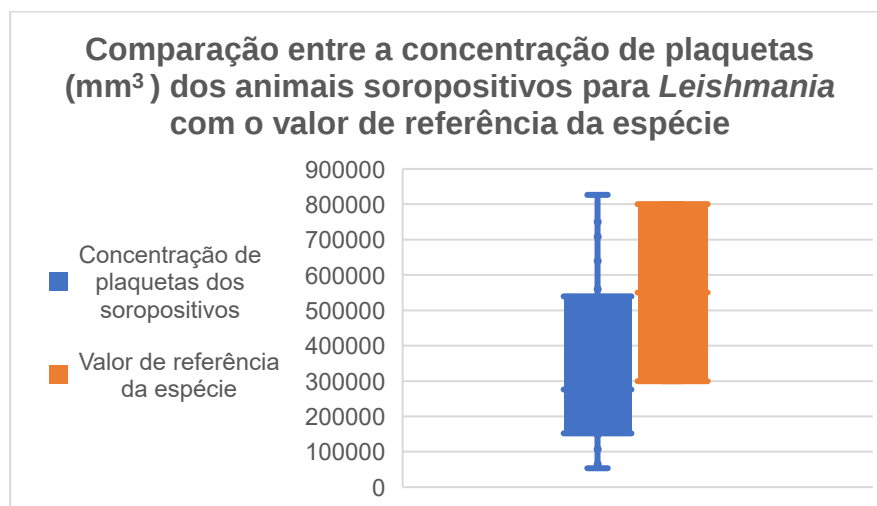


Figura 89. Comparação entre a concentração de plaquetas dos animais reagentes para LF com o valor de referência

Com relação aos parâmetros bioquímicos, o grupo reagente para *Leishmania sp.* apresentou hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, hiperproteinemia e uma relação albumina/globulina abaixo do valor de referência. Não houve diferença considerável na análise dos valores de ALT, creatinina e proteína total (Figuras 90-92).

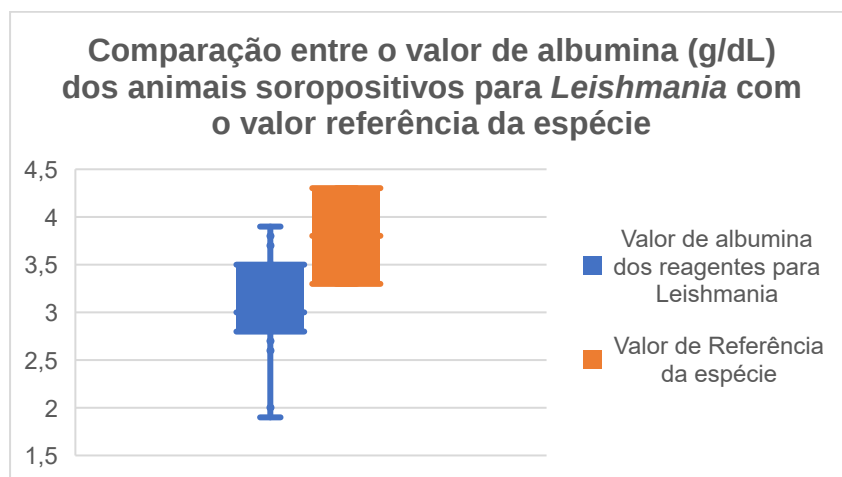


Figura 90. Comparação entre o valor de albumina dos animais reagentes para LF com o valor de referência

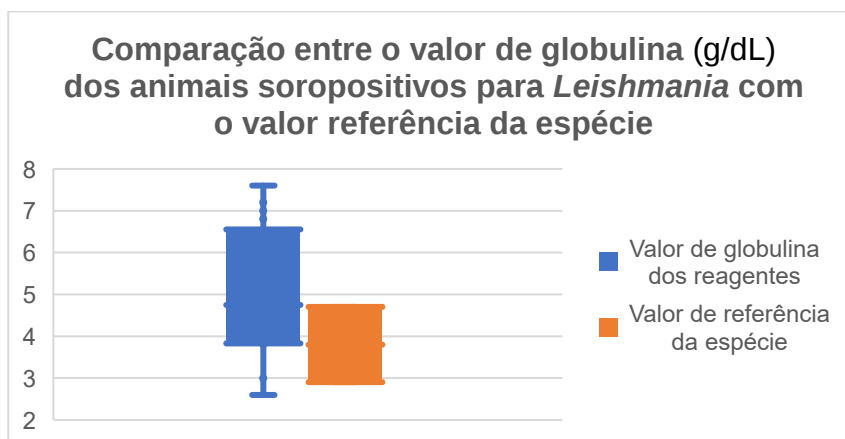


Figura 91. Comparação entre o valor de globulina dos animais reagentes para LF com o valor de referência

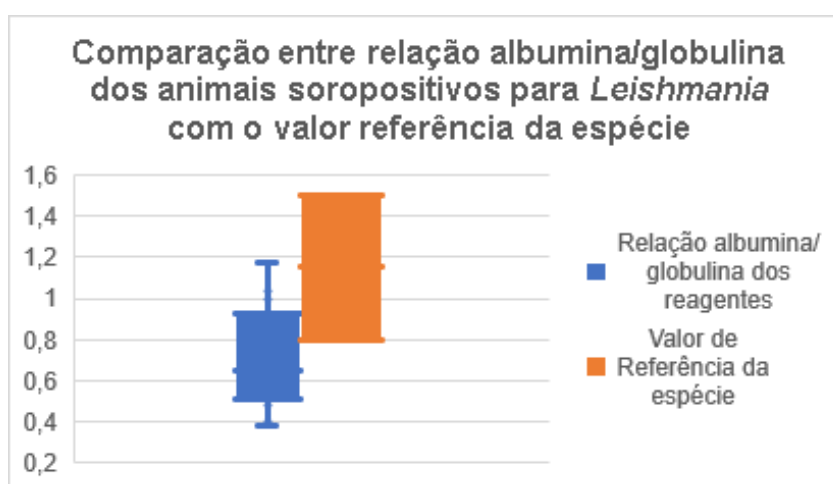


Figura 92. Comparação entre a relação albumina/globulina dos animais reagentes para LF com o valor de referência

Os parâmetros laboratoriais, hematológicos e bioquímicos, observados nesses animais são semelhantes aos vistos na literatura para leishmaniose felina e também descritos pelo estudo de Noé (2008) na cidade de Campo Grande, com exceção da série leucocitária que no estudo do autor se constatou a presença de leucopenia ao invés da leucocitose identificada no presente trabalho. Apesar disso, segundo Vieira (2016), a leucocitose com neutrofilia é um achado bem comum nesses animais e a creatinina, ALT, e FA podem apresentar valores normais. Apesar dos parâmetros encontrados serem compatíveis, esse perfil laboratorial ainda pode estar presente em diversas doenças infecciosas e, por isso, de maneira isolada, não é conclusivo para o diagnóstico da leishmaniose felina.

Análise das fichas clínicas

As fichas clínicas de todos os animais reagentes foram avaliadas em busca de informações epidemiológicas que pudessem ser associadas a maior exposição ou susceptibilidade dos animais à infecção.

Dos 21 animais, apenas 6 gatos não tinham acesso a rua (28,5%) e os outros 15 possuíam livre acesso ou viviam em condições semi-domiciliadas (71,4%). Em relação a presença de animais contactantes, 16 (76,19%) felinos conviviam com algum outro animal e apenas 5 (23,8%) viviam sozinhos. Ademais, 20 animais tinham dados sobre vacinação, porém apenas 4 (20%) do total eram vacinados com vacinas múltiplas (V4 ou V5), sendo esse número aumentado para 7 (35%) quando considerado os animais vacinados apenas para raiva.

Sobre a utilização de repelentes ou ectoparasiticidas foi possível obter dados apenas de 16 animais e dentre esses apenas 3 (18,75%) realizavam o uso desses medicamentos.

Ademais, a respeito da mudança de rotina ou não, encontrou-se essas informações sobre 14 animais, tendo sido observado em 6 (42,85%) animais. Por fim, acerca da presença de enfermidades crônicas nesses felinos, havia informações de apenas 13 animais sobre testes para *FIV* e *FeLV*. Foi realizado teste de imunocromatografia de mais 6 animais, dos quais ainda havia material disponível, totalizando 19 animais testados ou com dados obtidos por meio de análise de ficha clínica. Desses, 9 apresentavam resultado positivo para *FIV* e/ou *FeLV* (47%), sendo 5 apenas para *FeLV* (26%), 3 apenas para *FIV* (15,7%), e 1 (5%) animal com co-infecção (*FIV/FeLV*).

O acesso livre à rua (semidomiciliado) é uma característica que apresenta associação com o diagnóstico de leishmaniose em diversos estudos. Ademais, também se observou a falta de profilaxia inseticida, o que, quando unido a presença de outros animais próximos, resulta em um cenário que favorece o repasto sanguíneo pelo vetor e, consequentemente, à infecção e continuidade do ciclo da doença (Amorá, 2006; Cardoso, 2010; Gonçalves, 2014).

A partir dos dados obtidos com as fichas clínicas também foi possível elencar os principais sinais clínicos observados nos pacientes reagentes para LF. Foram observadas apatia, hiporexia/anorexia, emagrecimento, gengivite, linfadenomegalia, êmese, alopecia, nódulos, lesões de pele, distensão

abdominal, secreção ocular e/ou secreção nasal. As frequências são apresentadas na Figura 93.

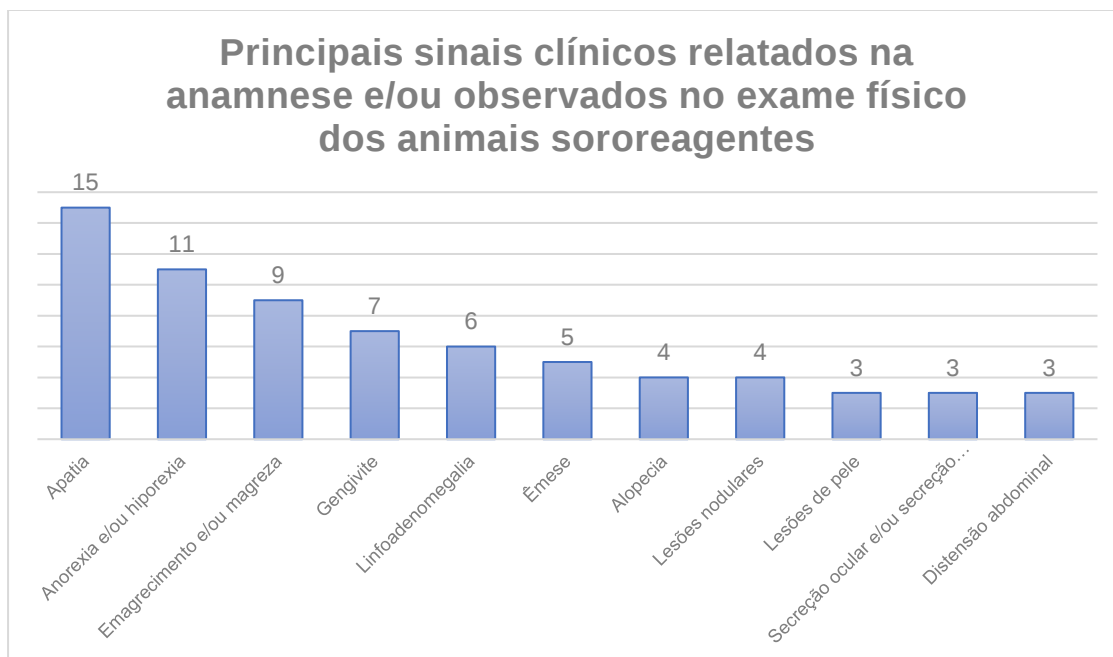


Figura 93. Frequência de sinais clínicos em felinos soropositivos para LF, atendidos no Hospital Veterinário da FAMEZ/UFMS no ano de 2022 e no segundo semestre de 2023.

Em um comparativo com a literatura, notou-se a presença de pelo menos 2 sinais sugestivos da LF em 14 animais (66%) e em 11 (52,38%) ao menos 3, o que demonstra que os sinais clínicos observados nesse grupo foram semelhantes ao encontrado por outros autores para a Leishmaniose em felinos (Pirajá, 2013; Santos et al, 2018; Oliveira et al., 2020).

Quando analisado os animais reagentes para *Leishmania sp.* e também para FeLV verificou-se um padrão clínico semelhante, mas foi observado um aumento na frequência de emagrecimento, apatia, linfadenomegalia, hiporexia, gengivite, alopecia, lesões de pele e lesões nodulares. O aumento de sinais clínicos mais sugestivos da Leishmaniose Felina (LF) nos animais também positivos para FeLV pode ter relação com o comprometimento da resposta imune celular desses animais, permitindo a proliferação do parasita (Pirajá, 2013). Porém, a possibilidade de outras enfermidades, além da FeLV, estarem envolvidas nos quadros apresentados, juntamente ou não com a *Leishmania sp.*, não pode ser descartada.

Comparação dos dados laboratoriais com *FeLV* e/ou *FIV*

Quando realizado uma comparação entre o grupo apenas reagente para leishmaniose felina (LF) com o grupo reagente para essa doença e para *FeLV*, o segundo grupo apresentou valores de eritrócitos, hemoglobina e volume globular (VG) inferiores aos encontrados no primeiro grupo e abaixo do valor de referência (Figuras 94 e 95). Ademais, o mesmo se repetiu com a série de plaquetas e a concentração de hemoglobina corpuscular média (C.H.C.M) se manteve dentro da normalidade.

Para a série de leucócitos (Figura 96) e os valores de volume corpuscular médio (V.C.M), no entanto, notou-se padrões acima dos dois outros grupos. Além do mais, quando incluído na análise os animais reagentes para *FIV* junto com o segundo grupo, obteve-se um padrão semelhante (anemia macrocítica normocômica e plaquetopenia), com exceção do número de leucócitos que apresentou valores parecidos com o grupo de animais apenas reagentes para *Leishmania* sp., apesar de ainda acima do valor de referência para a espécie (Figuras 97, 98 e 99).

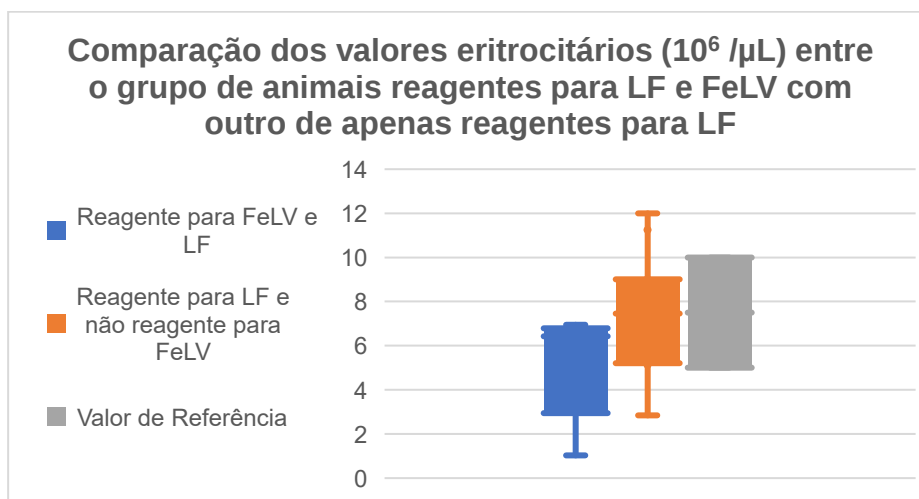


Figura 94. comparação dos valores eritrocitários do grupo de animais reagentes para LF e *FeLV* com outro de apenas reagentes para LF

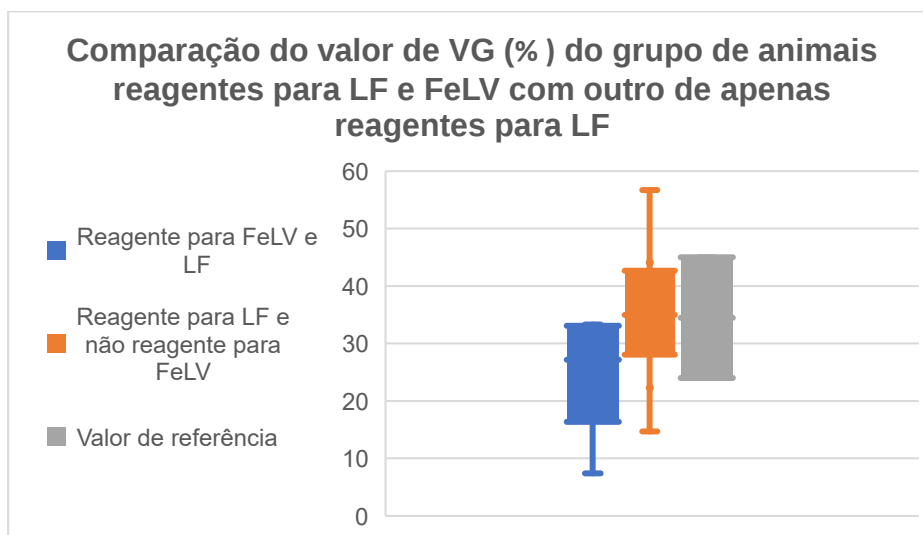


Figura 95. comparação do VG de animais reagentes para LF e *FeLV* com outro de apenas reagentes para LF.

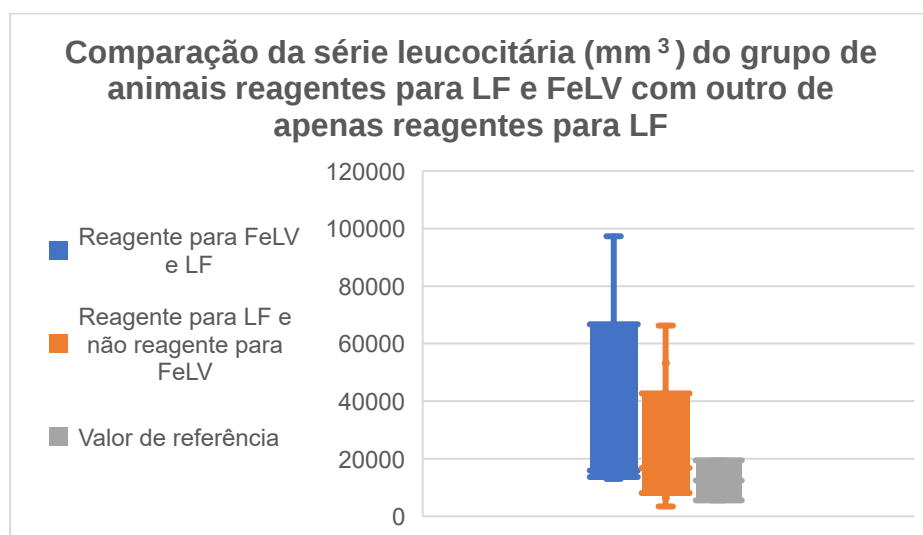


Figura 96. Comparação da série leucocitária do grupo de animais reagentes para LF e *FeLV* com outro de apenas reagentes para LF

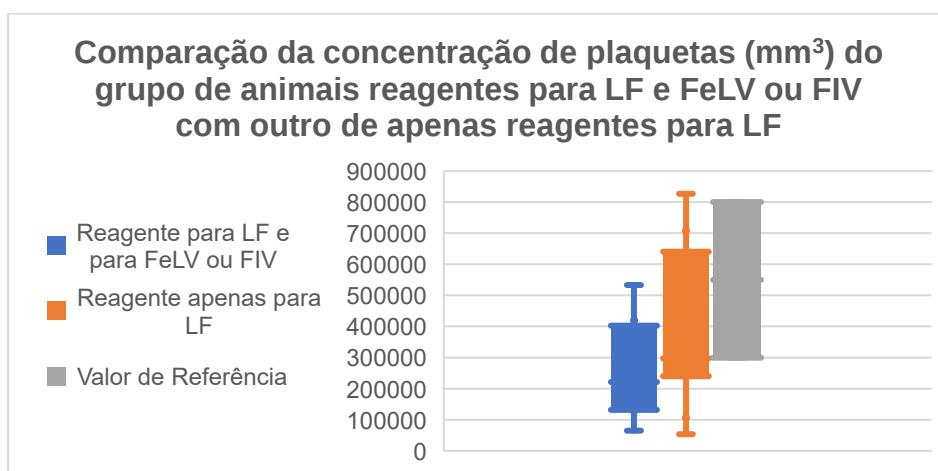


Figura 97. Comparação da concentração de plaquetas do grupo de animais reagentes para LF e *FeLV* ou *FIV* com outro de apenas reagentes para LF

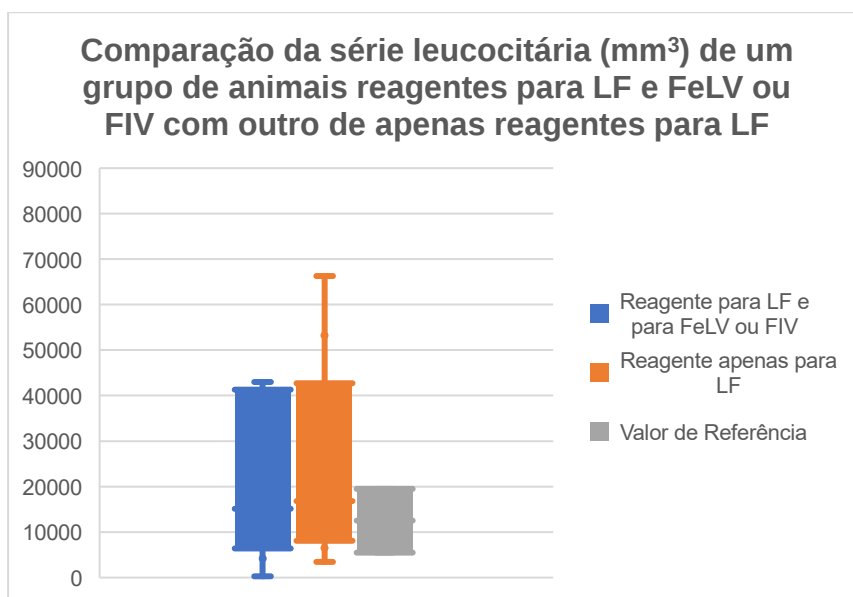


Figura 98. Comparação da série leucocitária do grupo de animais reagentes para LF e *FeLV* ou *FIV* com outro de apenas reagentes para LF.

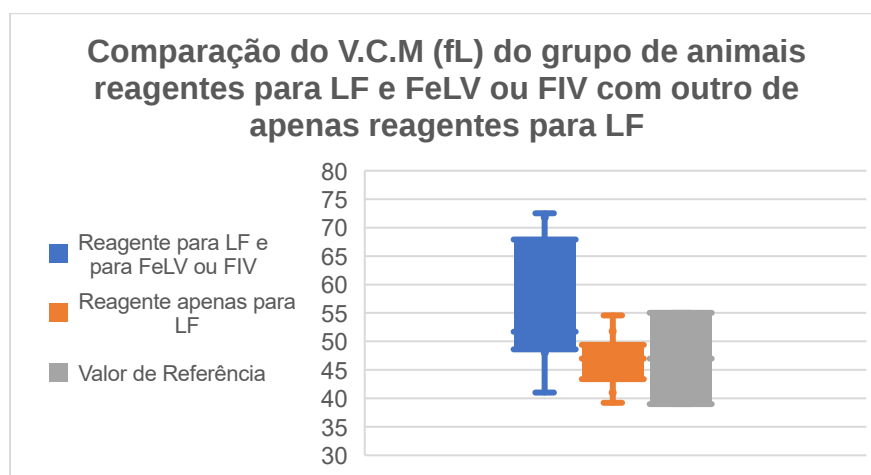


Figura 99. Comparação do V.C.M do grupo de animais reagentes para LF e *FeLV* ou *FIV* com outro de apenas reagentes para LF

No caso dos parâmetros bioquímicos, as mesmas análises foram feitas (nos reagentes para *FeLV* e LF) e constatou-se valores de albumina e uma relação albumina/globulina inferior ou parecida ao encontrado no primeiro grupo e abaixo do valor de referência (Figura 100). A respeito dos dados sobre globulina, proteína total e ALT, encontrou-se valores acima ou parecidos com os outros dois outros grupos (Figuras 101, 102 e 103). Com relação aos dados de creatinina, o grupo de animais apenas reagentes para *Leishmania sp.* teve valores mais elevados que as outras duas categorias (Figura 104). Por fim, também se realizou comparações com os dados dos reagentes para *FeLV* ou *FIV* observando-se padrões

semelhantes aos da análise anterior.

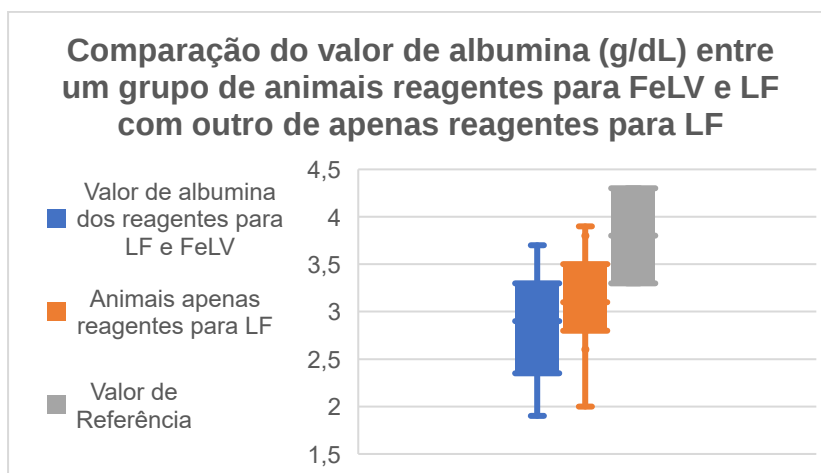


Figura 100. Comparação do valor de albumina do grupo de animais reagentes para LF e FeLV com outro de apenas reagentes para LF

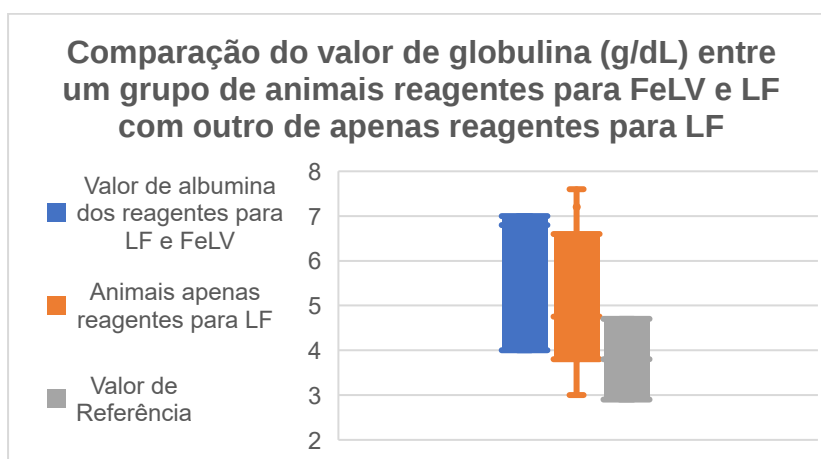


Figura 101. Comparação do valor de globulina do grupo de animais reagentes para LF e FeLV com outro de apenas reagentes para LF

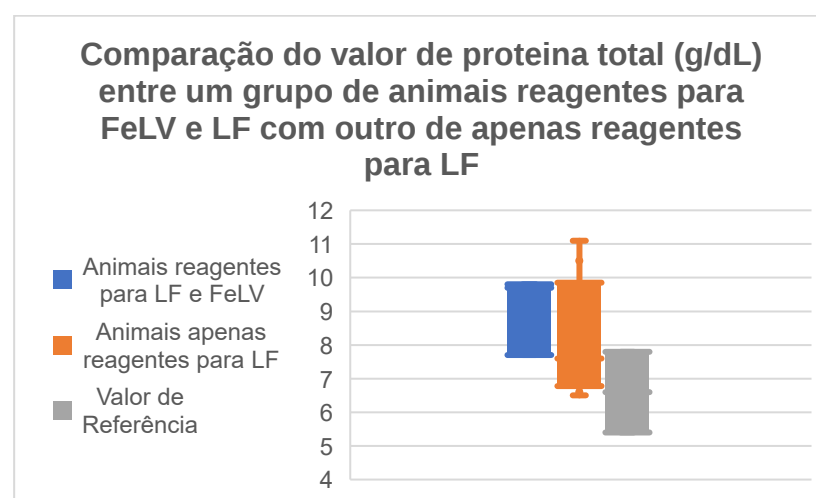


Figura 102. Comparação do valor de proteína total do grupo de animais reagentes para LF e FeLV com outro de apenas reagentes para LF

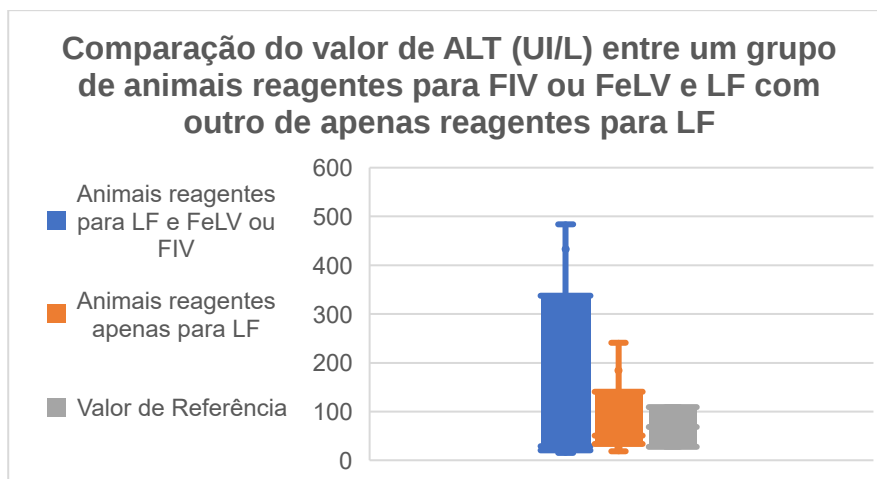


Figura 103. Comparação do valor de ALT do grupo de animais reagentes para LF e *FeLV* ou *FIV* com outro de apenas reagentes para LF

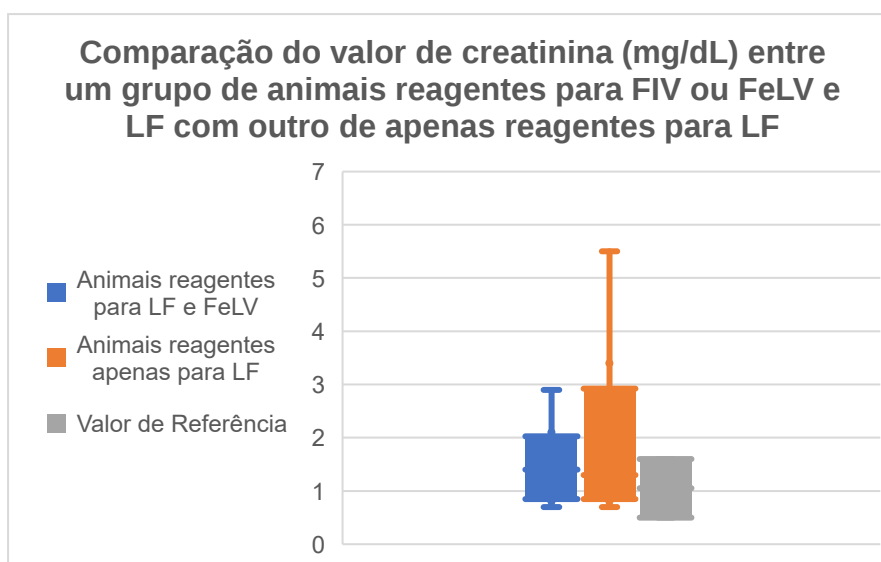


Figura 104, Comparação do valor de creatinina do grupo de animais reagentes para LF e *FeLV* ou *FIV* com outro de apenas reagentes para LF

As alterações laboratoriais observadas nos animais positivos para *FeLV* e/ou *FIV* são semelhantes às observadas na literatura para essas doenças, especialmente para *FeLV*. A presença maior de leucopenia muitas vezes é mais relatada, no entanto, a suspeita de tumores da série linfóide em alguns dos pacientes é provavelmente a razão da leucocitose observada (De Souza, 2017; Perroti, 2009).

Os resultados obtidos demonstram que essas duas enfermidades devem estar contribuindo para o perfil laboratorial observado nos animais reagentes para LF, o que pode significar uma interferência delas na análise e um resultado que não expressa o real perfil dos animais infectados por *Leishmania sp.* No entanto,

observa-se que para alguns casos (leucócitos, plaquetas, albumina, globulina, relação albumina/globulina, proteína total e creatinina) os valores do grupo composto apenas por reagentes para LF, excluindo os animais *FeLV* e/ou *FIV* positivo, continuam em uma tendência abaixo ou acima do valor de referência. No entanto, não é possível concluir sobre a real contribuição da infecção por *Leishmania sp.* sobre esses parâmetros, devido ao baixo número de animais reagentes analisados.

3.4 Conclusão

O estudo reforçou a tese de resistência natural do gato à infecção por *Leishmania sp.*, com esses animais tendo uma baixa produção de anticorpos contra esse agente, principalmente evidenciado pelo baixo título máximo encontrado na diluição seriada. Ademais, nos animais positivos, encontrou-se um perfil clínico e laboratorial compatível com o apresentado na literatura para leishmaniose felina, apesar de ainda não ser possível descartar a interferência de outras doenças e fatores nas análises e resultados obtidos. Por fim, para tentar minimizar possíveis interferências nas análises realizadas, realizou-se uma comparação com os animais positivos para *Leishmania sp.* e também para *FIV* ou *FeLV*, verificando-se que essas duas enfermidades podem estar contribuindo em determinados pontos do perfil laboratorial e clínico observado nos animais reagentes para LF, o que pode significar uma interferência delas na análise e um resultado que não expressa o real perfil dos animais sororeagentes para leishmaniose.

4. Considerações Finais

O estágio obrigatório da medicina veterinária na área medicina veterinária preventiva foi enriquecedor. No laboratório VetAnalisa aprendi sobre áreas da preventiva que tive pouco contato durante a graduação, conseguindo assim entender sobre a execução e indicação de uma série de exames de microbiologia, sorologia e parasitologia. Ademais, no LabmolVet desenvolvi ainda mais o meu conhecimento na área de biologia molecular, podendo realizar exames como a qPCR por exemplo.

O estágio de clínica médica de pequenos animais ofereceu a oportunidade de acompanhar outros profissionais da área e vivenciar a rotina de um hospital veterinário, sendo de extrema importância para reforçar os conhecimentos práticos e teóricos de clínica que aprendi ao longo da graduação.

O projeto de pesquisa me possibilitou desenvolver o raciocínio crítico e teórico de um pesquisador. O estudo foi de essencial importância para o meu crescimento profissional e espero que ele seja útil para o desenvolvimento de novas pesquisas na área.

5. Referências

1. ALVES, Maria Luana. **Ocorrência da leishmaniose visceral em cães e gatos em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP**. 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2016.
2. AMÓRA, S. S. A.; SANTOS, M. J. P.; ALVES, N. D.; COSTA, S. C. G. da; CALABRESE, K. da S.; MONTEIRO, A. J.; et al. **Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil**. *Ciência Rural*, v. 36, p. 320-325, 2006.
3. BATISTA, J. F. et al. **Transmission of Leishmania infantum from cats to dogs**. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 29, 2020.
4. BERENGUER, L. K. A. R. **Identificação e caracterização molecular de Leishmania spp. em felinos domésticos em áreas endêmicas do estado de Pernambuco**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. **TR DPP Leishmaniose Visceral Canina**. Fundação Oswaldo Cruz: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. 2024.
6. CARDOSO, L.; LOPES, A. P.; SHERRY, K.; SCHALLIG, H. **Low seroprevalence of Leishmania infantum infection in cats from northern Portugal based on DAT and ELISA**. *Veterinary Parasitology*, v. 174, n. 1-2, p. 37–42, 2010.
7. CHATZIS, M.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F. **Feline leishmaniosis due to Leishmania infantum (syn. L. chagasi)**. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, v. 61, n. 4, p. 359-367, 2010.
8. COSTA, T.; MARCONDES, M.; LAURENTI, M. D.; BRESCIANI, K. D. S.; LUCAS, S. R. R. **Utilização de técnica de ELISA utilizando proteína A e anti-IgG para o diagnóstico da Leishmaniose visceral em gatos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2008.
9. DE SOUZA, Emile Stefanine Borges. **Leucemia Viral Felina: Revisão de Literatura**. 2017. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2017.
10. FIGUEIREDO, F. B.; BONNA, Isabel Cristina Fábregas; NASCIMENTO, L. D.;

- COSTA, Tatiana da; BAPTISTA, Cibele; SCHUBACH, Tânia Maria Pacheco; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis; MADEIRA, Maria de Fátima. **Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-Leishmania em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, p. 141-145, 2009.
11. FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F. **Os Parasitos e a Questão da Infecção em Animais Domésticos e Domiciliados**. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R., organizadores. Leishmanioses do continente americano. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014. p. 259-273. ISBN 978-85-7541-568-9. Disponível em: <https://doi.org/10.7476/9788575415689.0016>.
 12. FURLAN, Mara Beatriz Grotta. **Epidemia de leishmaniose visceral no Município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006**. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília, v. 19, n. 1, p. 16-25, mar. 2010.
 13. GONÇALVES, M. B. **Prevalência, distribuição e identificação de prováveis fatores de risco para Leishmaniose Visceral canina em Camaçari - BA**. 2014. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.
 14. JÚNIOR, Damião; MELO, Marcia. **Leishmaniose Visceral em Felinos Domésticos, Naturalmente Infectados, Atendidos no Hospital Veterinário/UFCG, Patos -PB**. Apresentado no XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE, 2015.
 15. MACHADO, M. C. M.; SIEBRA, C. C.; SILVA, L. F.; ANDRE, W. P. P. **O Gato como Potencial Reservatório de Leishmania spp.: Uma Questão de Saúde Única**. Apresentado no II Congresso Iberoamericano de Saúde Pública Veterinária, 2020.
 16. MAIA, C.; CAMPINO, L. **Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis?** Trends in Parasitology, v. 27, n. 8, p. 341-344, 2011.
 17. MANCIANTI, F. **Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat?** Parasitologia, v. 46, n. 1-2, p. 203–206, jun. 2004.
 18. MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOS-PÉREZ, M.; PESSON, B.;

- MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. **Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain**. Veterinary Parasitology, v. 30, n. 145, p. 267-273, 2007.
19. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. 5. reimpressão. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
 20. NOÉ, Perla. **Infecção por *Leishmania spp.* em gatos (*Felis domesticus*) na cidade de Campo Grande, MS, Brasil**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2008.
 21. OLIVEIRA, I. N. de. **Estudo soroepidemiológico e parasitológico da leishmaniose felina atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba**. 2019. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2019.
 22. OLIVEIRA, Trícia Maria Ferreira de Sousa; LEONEL, João Augusto Franco; SILVA, Diogo Tiago da; ALVES, Maria Luana; VIOTI, Geovanna; SOARES, Rodrigo Martins; STARKE-BUZETTI, Wilma Aparecida. **Leishmaniose Felina no Brasil**. In: Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Veterinária. 1. ed. Stricto Sensu Editora, 2020. p. 126-144.
 23. PASSOS, Stephanie Karoline. **Investigação da Infecção por *Leishmania sp* em Gatos de Área Endêmica para as Leishmanioses**. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.
 24. PENNISI, M. G.; CARDOSO, L.; BOURDEAU, P.; KOUTINAS, A. **LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis**. Parasites & Vectors, v. 8, p. 197-204, 2015.
 25. PERROTTI, Isabella Belletti Mutt. **Retrovírus em felinos domésticos**. 2009. 1 CD-ROM. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado – Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2009.
 26. PIRAJÁ, G. V.; SILVA, D. T.; PERUCA, L. C. B.; ALVES, M. F.; PAIXÃO, M. S.; LUCHEIS, S. B.; DOS SANTOS, W. J.; GUIRALDI, L. M. **Leishmaniose Felina: Revisão de Literatura**. Revista Veterinária e Zootecnia, v. 20, p. 203-216, 2013.
 27. SANTOS, C. M.; TONIAL, A. L.; DUARTE, V. R.; FAVACHO, A. R. M.; FERREIRA, E. C. **Análise citológica para diagnóstico de leishmaniose em um gato oligossintomático em área endêmica, Campo Grande, MS, Brasil**.

- Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, v. 1, p. 59-71, 2018.
28. SILVA, Elaine Araujo; ANDREOTTI, R.; HONNER, M. R. **Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 40, p. 1-6, 2007.
29. SIMÕES-MATTOS, L. **O gato doméstico (*Felis catus*) como potencial hospedeiro reservatório de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** 2005. 231 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.
30. SOARES, C. S. A.; DUARTE, S. C.; SOUSA, S. R. **What do we know about feline leishmaniosis?** Journal of Feline Medicine and Surgery, v. 17, n. 6, p. 475-485, 2015.
31. SOLANO-GALLEGO, L.; RODRÍGUEZ-CORTÉZ, A.; INIESTA, L.; et al. **Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 76, n. 4, p. 676-680, 2007.
32. VIEIRA, J. M. **Leishmaniose Felina: Por que devemos nos preocupar?** 2016. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Clínica Médica de Felinos Domésticos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.