

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

TEREZA EMMANUELLE DE FARIAS ROTONDANO

2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO

Estágio Realizado na Área de Biologia Molecular no Laboratório de Biologia Molecular da
Universidade Federal de Campina Grande

TEREZA EMMANUELLE DE FARIAS ROTONDANO
Graduanda

Prof. Dra. MÁRCIA ALMEIDA DE MELO
Orientadora

Patos-PB
2007

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CAMPUS DE PATOS - UFCG

R848u

2007

Rotondano, Tereza Emmanuelle de Farias.

Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório – ESO III /
Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano - Patos - PB: CSTR, UFCG,
2007.

12f.: il. + anexos.

Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório – ESO III (Graduação
em Medicina Veterinária) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural,
Universidade Federal de Campina Grande.

1 – Biologia Molecular - Relatório. I – Título.

CDU: 577.2: 636.3 (047)



Biblioteca Setorial do CDSA. Maio de 2022.

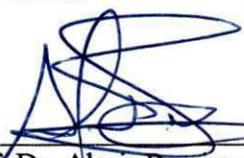
Sumé - PB

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

TEREZA EMMANUELLE DE FARIAS ROTONDANO
Graduanda

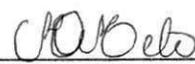
Relatório de Estágio Supervisionado submetido ao Curso de Medicina Veterinária
como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário

EXAMINADORES:



Prof. Dr. Almir Pereira de Souza

NOTA: 10,0



Prof. Dra. Márcia Almeida de Melo

NOTA: 10,0

A Deus por ter me dado forças para nunca desistir dos meus sonhos;
Aos meus pais Cleide e Éder pela dedicação e amor incondicionais;
À minha irmã Anna Rafaella pelo carinho e compreensão
imprescindíveis ;
Aos meu professores que acreditaram no meu potencial e construíram
a profissional que sou;
A todos os meus amigos que diretamente e indiretamente contribuíram
para a conclusão do meu curso;
Aos animais... fonte de inspiração para minha opção profissional.

DEDICO...

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. DESENVOLVIMENTO.....	8
2.1 Estrutura Física.....	8
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	8
3.1 Descrição das Técnicas Utilizadas.....	10
3.1.1 ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	10
3.1.2 Extração de DNA.....	10
4. CONCLUSÃO.....	11
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
ANEXOS	

LISTA DE TABELAS

página

Tabela 1: Número de amostras processadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Campina Grande no período de 13/08/07 a 12/10/07

9

1. INTRODUÇÃO

O Estágio Supervisionado Obrigatório – ESO - integra a grade curricular do décimo período do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG - com uma carga horária mínima de 240 horas. O mesmo representa pael fundamental para o aperfeiçoamento do acadêmico no âmbito profissional e pessoal.

O presente relatório visa descrever as atividades desenvolvidas pela discente Tereza Emmanuelle de Farias Rotondano na área de Biologia Molecular no Laboratório de Biologia Molecular da UFCG, no período de 13/08/07 a 12/10/07 totalizando uma carga horária de 320 horas.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 ESTRUTURA FÍSICA

O Hospital Veterinário (HV) da UFCG conta com os setores de Patologia Clínica, Patologia Animal, Clínica Médica de Pequenos Animais, Clínica Médica de Grandes Animais, Cirurgia de Grandes e Pequenos Animais, Radiologia, Biologia Molecular e Reprodução Animal.

O setor de Biologia Molecular está sob coordenação da Prof Dra. Márcia Almeida de Melo, o mesmo representa uma das mais recentes admissões da UFCG desenvolvendo técnicas de diagnóstico como ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) as quais representam uma inovação na rotina médica do HV.

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades desenvolvidas durante o ESO dizem respeito a utilização das técnicas de diagnóstico ELISA e PCR, visando o diagnóstico de leishmaniose, além de cultivo de microrganismos, principalmente *Leishmania sp.* Durante o estágio também foi possível a participação em um curso de biologia molecular, ministrado pelo Prof Dr. Paulo Paes de Andrade com duração total de 100 horas.

As técnicas de diagnósticos foram acompanhadas desde a simples chegada e acondicionamento das amostras até o resultado final. As amostras processadas eram oriundas da própria rotina da clínica médica do HV bem como de outros municípios como Pombal, Campina Grande, Recife além de amostras enviadas pelo laboratório Fort Dodge do Mato Grosso, as mesmas eram enviadas acompanhadas de uma ficha de solicitação com a suspeita clínica, que no caso referia-se a Leishmaniose canina, e, após o exame, um laudo técnico era emitido com o resultado final.

Após o diagnóstico sorológico por ELISA os animais positivos eram isolados em um canil localizado nas dependências do HV para posterior eutanásia, durante esse procedimento eram efetuadas a coleta de sangue, punção de medula óssea na crista ilíaca, e obtenção de fragmentos referente ao baço, fígado e ponta da orelha.

As amostras obtidas durante a eutanásia eram acondicionadas em tubos de ensaio contendo meios de cultura MEM (fase líquida) e meio NNN (fase sólida) e também eram utilizadas na confecção de imprints para posterior análise microscópica.

A PCR contou apenas com a etapa de extração e acondicionamento de DNA efetuada a partir das amostras obtidas dos cães positivos para Leishmaniose, por meio da técnica ELISA, utilizando-se o Dneasy Blood and Tissue Kit¹. Após a obtenção das amostras as mesmas permaneciam em temperatura ambiente e as extrações eram efetuadas em três etapas com intervalo de 8 dias, visando a avaliação da qualidade do DNA após períodos diferentes de armazenamento das alíquotas.

A tabela 1 apresenta o número de amostras processadas durante o ESO no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Campina Grande no período de 13/08/07 a 12/10/07 .

Tabela 1: Número de amostras processadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Campina Grande no período de 13/08/07 a 12/10/07 .

Atividades Desenvolvidas	Número
Soros analisados por ELISA	500
Amostras utilizadas na extração de DNA	39
Amostras utilizadas para imprint e esfregaço sanguíneo	9
Total	548

¹ Qiagen

3.1 DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS UTILIZADAS

3.1.1 ELISA

A reação de ELISA é baseada no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados em um suporte plástico (ELISA indireto). Este reconhecimento é revelado através de uma proteína conjugada a uma enzima (Peroxidase) permitindo a visualização da reação. O **ELISA/S7** ^{®2}, kit utilizado durante o ESO para o diagnóstico do Calazar canino, tem como base um peptídeo recombinante produzido por engenharia genética, que permite a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção. O emprego desse antígeno no kit confere alta especificidade e sensibilidade ao teste visto que animais previamente vacinados ou aqueles que foram previamente infectados por outros tipos de tripanossomatídeos e, não pelo agente do calazar canino, não respondem positivamente à técnica.

3.1.2 Extração de DNA

O kit Dneasy Blood and Tissue utilizado durante o ESO representa um método rápido e eficaz para extração de DNA em amostras de sangue e medula óssea bem como de outros tecidos. A técnica consiste na exposição do material genético inserido no interior das células, pela ação de uma enzima denominada proteinase K, com posterior lavagem, seqüestro, precipitação e separação do DNA por meio de Etanol e dos tampões AL, AW1/AW2 e AE respectivamente. Todas as centrifugações eram realizadas entre 15-25 °C numa velocidade de 8000 rpm durante 1 minuto, com exceção da centrifugação efetuada após a adição do tampão AW2 a qual foi de 14000 rpm durante 3 minutos.

Após a realização da extração as mostras eram estocadas a -20°C até a realização da PCR.

² BIOGENE Indústria e Comércio Ltda ME

4. CONCLUSÃO

O Estágio Supervisionado Obrigatório é de grande valia no tocante ao aperfeiçoamento do acadêmico, pois possibilita que o mesmo firme-se na sua opção profissional além de ampliar significativamente as possibilidades de atuação dentro do curso de Medicina Veterinária.

Durante o desenvolvimento das atividades descritas um fator importante foi o estudo mais apurado sobre a Leishmaniose visceral canina, principalmente no município de Patos, a qual acreditava-se não representar riscos para os animais dessa região. A partir desse estudo foi possível identificar o valor da interdisciplinaridade dentro da rotina médica, unindo um bom exame clínico a técnicas laboratoriais eficazes foi possível alcançar diagnósticos conclusivos o que contribuiu satisfatoriamente para o meu aprendizado.

O período destinado ao ESO foi de suma importância para adquirir experiência, confiança e confirmar mais uma vez que optei pela profissão certa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. 6 ed. ROCA: São Paulo, 2002.

Anexos



Cultura de *Leishmanis sp.*



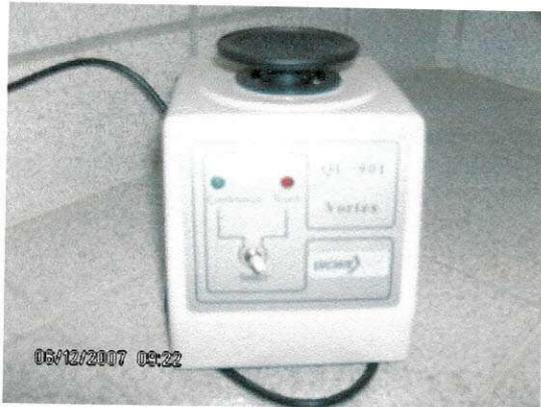
Phmêtro e aquecedor elétrico



Kit de extração de DNA



Leitor de ELISA



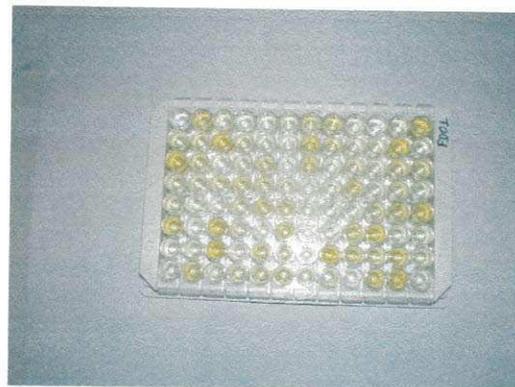
Vortex



Termociclador



Microcentrifuga para eppendorf



Placa utilizada na realização do teste ELISA



Animal eutanasiado após resultado positivo para Leishmaniose



Animal eutanasiado após resultado positivo para Leishmaniose



Punção de medula óssea e coleta de material para cultivo e extração de DNA



Coleta de amostra hepática para cultivo e extração de DNA



Biogene

Kit para Diagnóstico do Calazar Canino ELISA/S7®

Para Uso Veterinário

Descrição

A reação de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é baseada no reconhecimento de anticorpos específicos por antígenos fixados em um suporte plástico. Este reconhecimento é revelado através de uma proteína conjugada a uma enzima (Peroxidase) permitindo a visualização da reação.

O ELISA/S7® tem como base um peptídeo recombinante, produzido por engenharia genética, que permite a detecção de anticorpos na fase mais precoce da infecção. O emprego desse antígeno no kit para o diagnóstico do calazar canino - ELISA/S7® confere alta especificidade e sensibilidade ao teste, sendo único no mercado.

Apresentação

O kit é composto de uma placa de ELISA e de todos os reagentes necessários a realização de 96 reações.

Produto	Volume	Conservação
Solução de coleta	25 ml	- 20°C
Solução S7	10 ml	- 20°C
Soro controle reagente	10 µl	- 20°C
Soro controle não reagente	10 µl	- 20°C
Solução Citrato	10 ml	4°C
Conjugado (Ptn - A PO)	3 µl	4°C
Revelador (TMB)	100 µl	4°C
Água Oxigenada (H ₂ O ₂)	50 µl	4°C
Solução de lavagem (PBS 10x)	50 ml	4°C
Tween 20	200 µl	4°C
Solução de parada (H ₂ SO ₄ , 2N)	10 ml	T.A

A estabilidade de todos os reagentes é de seis meses

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL COORDENAÇÃO DE MEDICINA VETERINÁRIA CAMPUS DE PATOS - PB	FICHA DE AVALIAÇÃO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL COORDENAÇÃO DO CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA CAMPUS DE PATOS - PB
---	--

Nome do(a) Aluno(a) TEREZA EMANUELLE DE FARIAS ROTONDANO	Carga Horária
Local do Estágio: LAB BIOL MOLECULAR	Período: 2007-2
Área do Estágio: MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA	

CRITÉRIOS	Nota
GRUPO I: ASPECTOS PROFISSIONAIS	10
1. Qualidade do trabalho	10
2. Capacidade de sugerir e inovar	10
3. Conhecimentos	10
4. Volume e padrão das atividades	10
5. Capacidade de inquirir, aprender	10
6. Capacidade de tomar iniciativas	10
SUB-TOTAL I (soma/6)	
GRUPO II: ASPECTOS HUMANOS	
7. Assiduidade e Pontualidade	10
8. Capacidade de seguir normas e regulamentos internos	10
9. Relacionamento com colegas e ambientes	10
10. Capacidade de cooperar (disponibilidade)	10
11. Responsabilidade	10
SUB-TOTAL II (soma/5)	
MEDIA FINAL (sub-total I+sub-total II/2)	10

LIMITES PARA CONCEITUAÇÃO Ate 2,0 - Muito fraco 2,1 a 4,0 - Fraco 4,1 - 6,0 - Regular 6,1 - 8,0 - Bom 8,1 - 10,0 - Excelente	CONCEITUAÇÃO: (MEDIA FINAL) 10,0
--	---

OBSERVAÇÕES: Preenchimento manuscrito no verso	data: PATOS, 17 / 11 / 2007
--	---------------------------------------

Responsável pelo preenchimento: MARCIA ALMEIDA DE MELO NOME (Letra de forma)	Professora Cargo	Melo Assinatura e Carimbo
---	----------------------------	-------------------------------------

Profª Márcia Almeida de Melo
Unid. Acad. de Med. Veterinária
CSTR/UFPA
CRMV - PB: 0533