



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS**  
**FILHO**



**IDENTIFICAÇÃO DE ESTRATÉGIAS PARA INATIVAÇÃO DA  
CARGA PARASITÁRIA EM CARÇAÇAS DE CAMUNDONGOS  
INFECTADAS COM *Toxoplasma gondii* ou *Trypanosoma cruzi*.**

VERONICA DOS SANTOS

RIO DE JANEIRO

2018

VERONICA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE ESTRATÉGIAS PARA INATIVAÇÃO DA CARGA  
PARASITÁRIA EM CARCAÇAS DE CAMUNDONGOS INFECTADAS COM  
*Toxoplasma gondii* ou *Trypanosoma cruzi*.**

Dissertação de Mestrado Profissional apresentada ao Programa de Pós-Graduação Formação para a Pesquisa Biomédica. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Como requisito necessário a obtenção do título de Mestre.

RIO DE JANEIRO

2018

Santos, Veronica dos.

Identificação de estratégias para inativação da carga parasitária em carcaças de camundongos infectadas com *Toxoplasma gondii* ou *Trypanosoma cruzi*.

Rio de Janeiro, 2018.

Dissertação (Mestrado profissional em formação para a pesquisa Biomédica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2018.

Orientadores: Rossiane Claudia Vommaro

Érica dos Santos Martins Duarte

1- Inativação química de carga parasitária. 2- *Toxoplasma gondii* 3. *Trypanosoma cruzi*. 4- Carcaças de camundongos infectados

Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Este trabalho foi realizado sob orientação das professoras Dr<sup>a</sup> Rossiane Claudia Vommaro e Dr<sup>a</sup> Érica dos Santos Martins Duarte, no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-UFRJ.

## AGRADECIMENTOS

Tão importante quanto concluir este trabalho foi o aprendizado diário nestes últimos anos com o grupo de pessoas que integram o Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer.

À Prof<sup>a</sup>. Dr. Rossiane Claudia Vommaro, pela oportunidade de desenvolver um projeto desafiador, pelo incentivo nos momentos de dificuldades, pela oportunidade do crescimento profissional que adquiri neste convívio de muitos aprendizados.

À Prof<sup>a</sup>. Dr. Érica Martins Duarte, pela objetividade na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Wanderley de Sousa, pela confiança e incentivo ao crescimento profissional ao corpo técnico do laboratório.

À Prof<sup>a</sup>. Dr. Narcisa Cunha e Silva, FADA MADRINHA obrigada por tudo.

À Prof<sup>a</sup>. Susana Frases, por todas as orientações e solidariedade principalmente nesta reta final.

À Emile Barrias, pelos excelentes exemplos de objetividade profissional, por sempre compartilhar experiências pessoais e profissionais e por ter um abraço amigo nas horas difíceis.

À Prof<sup>a</sup>. Cristina Henriques pelos ensinamentos sobre Biologia Molecular, pelos exemplos valorosos e compartilhamento de conhecimentos.

À Noêmia Rodrigues, querida companheira de trabalho pelo apoio incondicional, pelas muitas caronas construtivas, pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório.

À Juliana Vidal, pelos empréstimos de material de estudo e incentivo nessa fase tão desafiadora.

À Carol Alcântara, pela cooperação pelos ensinamentos e doçura no dia a dia.

À Sara Teixeira de Macedo, pelo apoio nas horas mais corridas de trabalho.

À Camila Wendt, pela amizade, serenidade e delicadeza.

À Lissa Catherine, pelo ensinamento de como manter a cultura mais linda de *Trypanosoma cruzi*. À Aline Abreu, pela rica contribuição na organização dos experimentos do grupo de experimentação *in vivo*.

À Juliana Portes, pelas ótimas ideias, pelo carinho e amizade.

À Paula Terra Bandeira, pelas inúmeras orientações sobre a tão complexa técnica de PCR.

À Aline Alves, Jean Oliveira, Marcos Rodrigues, Vinicius Alves, Alexia Aquiles, Azul Barrinhas por fazer dos meus dias os mais divertidos.

Aos meus colegas de trabalho, Tatiana, Otavio, Jean Pierre com quem divido as tarefas, aflições e alegrias.

## Dedicatória

Dedico esta jornada a minha família que tanto me apoia em meus projetos.

Aos meus pais Délcio e Lucy, meus primeiros exemplos de perseverança, responsabilidade, bondade, honestidade, lealdade e amor incondicional.

Às minhas tias mães Léia e Vivi, por sempre estarem presentes em minha vida.

Às minhas irmãs, Monica, Valeria e Andrea, por contribuírem cada um com uma forma particular em me ensinar a ser quem sou.

Em Memória do meu irmão Marcus Aurélio dos Santos que partiu a poucos dias do fim desta jornada, me mostrou que esta vida é breve e devemos sempre cumprir nossas metas com coragem, dignidade e muito amor a tudo que nos propormos.

Aos meus sobrinhos, alegrias da minha vida.

Ao meu amigo namorando, agradeço a paciência com meus destemperos, angustias e ansiedades.

Ao meu amigo, José Luiz Roberto por ser sempre presentes em todos os meus momentos sejam eles quais forem.

À Eliane Lourenço minha amiga-irmã agradeço pelo carinho pela paciência e os melhores conselhos na vida.

## RESUMO

Santos, Veronica dos. Identificação de estratégias para inativação da carga parasitária em carcaças infectadas com protozoários, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*, patogênicos ao homem e a outros animais. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2018.

Diversos avanços na pesquisa científica tem sido alcançados através de testes *in vivo*, em contrapartida o resíduo gerado ao final das experimentações pode representar um risco ao meio ambiente, no que se refere ao descarte de carcaças infectadas com protozoários patogênicos. A finalidade deste trabalho é apresentar uma alternativa viável para inativação química dos protozoários parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii* em carcaças de camundongos usados em pesquisa científica. Este projeto foi desenvolvido sob princípios considerados ideais para a não-geração de resíduos baseados na Redução, Reutilização e Reciclagem amplamente conhecido como o princípio dos 3 R's, reduzindo o número total de animais envolvidos no estudo. Foram reutilizadas 40 carcaças infectadas com o protozoário *Toxoplasma gondii* cepa RH, 4 carcaças infectadas com a cepa Me49, 12 carcaças infectadas com *Trypanosoma cruzi* cepa Y e 4 camundongos de obtenção de macrófagos para extração de amostras. Na primeira etapa as carcaças infectadas pelo *Toxoplasma gondii* com crânio ou cavidade peritoneal aberto ou fechado foram submetidas à imersão em Lysoform® bruto por 6 ou 24 horas para comparar o grau de impregnação do desinfetante. Em seguida foram congeladas ou não a -20° C por 48 horas. Amostras extraídas das carcaças tratadas ou não com Lysoform® bruto foram usadas como substrato para o bioensaio, que consistiu no inoculo do macerado de órgãos extraídos de carcaças infectadas em camundongos suíços saudáveis. No caso do *Trypanosoma cruzi* as carcaças infectadas foram utilizadas fechadas e nas mesmas condições descritas acima, porém as amostras extraídas foram inoculadas em camundongos Balb-c saudáveis. Os animais de todos os bioensaios foram observados em período de 5 a 30 dias após inoculo (DPI). Amostras de sangue e tecidos extraídos dos animais provenientes dos bioensaios foram analisadas através de Reação da Cadeia Polimerase (PCR) e microscopia óptica (MO). Comparando amplificações dos controles positivos de todas as cepas dos protozoários

em estudo com as amostras dos bioensaios foi possível observar que não houve ampliações nas carcaças tratadas com Lysoform® bruto por 24 horas e congeladas - 20°C por 48 horas, demonstrando que o desinfetante foi capaz de inativar ambos parasitos. Através dos dados obtidos foi possível elaborar Protocolo Operacional Padrão (POP) para inativação química de carcaças infectadas com protozoários patogênicos ao homem e a outros animais dando uma alternativa no procedimento de resíduos biológicos.

## ABSTRACT

Santos, Veronica dos. Identificação de estratégias para inativação da carga parasitária em carcaças infectadas com protozoários patogênicos ao homem e a outros animais. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2017.

Several advances in scientific research have been achieved using in vivo tests. In contrast the residue generated at the end of the experiments may represent a risk to the environment, regarding the disposal of carcasses infected with pathogenic protozoa. The objective of this work is to present a viable alternative for chemical inactivation for *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* infecting carcasses of mice, produced in scientific research. This project was developed under principles considered ideal for non-generation of waste based on Reduction, Reuse and Recycling, widely known as the 3 R's principle reducing the total number of animals involved in the study. 40 carcasses infected with the protozoan *Toxoplasma gondii* RH strain, 4 carcasses infected with the Me49 strain, 12 carcasses infected with *Trypanosoma cruzi* strain Y, and 4 originated from macrophage obtaintion. First of all, the carcasses infected with *Toxoplasma gondii*, with opened or closed brain or peritoneal cavity were immersed in crude Lysoform ® for 6 or 24 hours to compare the degree of impregnation of the disinfectant. They were then frozen at -20 ° C for 48 hours. Samples extracted from carcasses treated with or without crude Lysoform ® were used as substrate for the bioassay, which consisted of inoculating the macerate of organs extracted from infected carcasses in healthy Swiss mice. In the case of *Trypanosoma cruzi* the infected carcasses were used closed and under the same conditions described above, but the extracted samples were inoculated in healthy Balb-c mice. The animals of all bioassays were observed at 5 to 30 days pos inoculation (IPD). Samples of blood and tissues extracted from the bioassays were analyzed through Polymerase Chain Reaction (PCR) and optical microscopy (OM). Comparing amplifications of the positive controls of all the protozoa strains studied with the bioassay samples, it was possible to observe that there were no amplifications in the carcasses treated with crude Lysoform ® for 24 hours and frozen - 20°C for 48 hours, demonstrating that the disinfectant was able to

inactivate both parasites. Through the data obtained it was possible to elaborate a Standard Operational Protocol (POP) for chemical inactivation of carcasses infected with pathogenic protozoa to man and other animals, providing an alternative to the biological waste procedure.

	<b>Lista de Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1	Correlação de fórmulas químicas.	<b>32</b>
Figura 2	Vias de transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i> .	<b>37</b>
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> :	<b>41</b>
Figura 4	Alternância de temperaturas em cada ciclo utilizando o iniciador B1: Desnaturação: 94°C= separação da fita dupla de DNA molde em duas fitas simples; Anelamento: 65°C = iniciadores se ligam aos sítios específicos na fita simples; Extensão: 72°C: DNA polimerase acrescenta os dNTPs à fita, de acordo com o pareamento de bases.	<b>55</b>
Figura 5	Alternância de temperaturas em cada ciclo utilizando par iniciadores: TCZ 1 e TCZ 2. Desnaturação: 94°C= separação da 1 dupla de DNA molde em duas fitas simples; Anelamento: 55°C iniciadores se ligam aos sítios específicos na fita simples; Extens 72°C: DNA polimerase acrescenta os dNTPs à fita, de acordo com pareamento de bases.	<b>56</b>
Figura 6	A: Camundongo Suíço sadio antes do inoculo; B camundongo infectado com protozoário <i>Toxoplasma gondii</i> cepa RH com 48 horas de inoculo via intraperitoneal; C, D - animais dispostos lado a lado para comparativo característico dos pelos eriçados causados pela debilitação causada pela infecção, dificultando manter os hábitos de higiene, assim como a visível infecção na região ocular.	<b>57</b>
Figura 7	A: Camundongos Balb-C sadio antes do inoculo; B: Camundongo Balb-C infectado após sete dias depois do inoculo via intraperitoneal.	<b>58</b>
Figura 8	Cisto Me49 (seta) em macerado de cérebro de camundongo suíço com três meses de infecção.	<b>59</b>
Figura 9	Taquizoítas da cepa RH dispersos em lavado intraperitoneal utilizados para manutenção de cepa.	<b>60</b>

- Figura 10 Alíquota contendo tripomastigotas (seta) obtidos de punção intracardíaca realizada em camundongo infectado com *T. cruzi* cepa Y. 61
- Figura 11 Imagens de microscopia óptica de contraste de fases. A- taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH em lavado intraperitoneal de camundongos suíços infectados com macerado de fígado extraído de carcaça após 6h da eutanásia sem tratamento térmico ou químico. 62
- Figura 12 Imagens de microscopia óptica de contraste de fase mostrando a presença de *T. cruzi* na forma de tripomastigota sanguíneo (setas em A e B) obtidos através de punção cardíaca e observado pelo método de *Pizzi-Brenner* em camundongos inoculados com macerado de fígado extraído de carcaça após 6h da eutanásia sem tratamento térmico ou químico. 63
- Figura 13 Microscopia óptica de contraste de fases mostrando a presença de taquizoítas no lavado peritoneal de camundongos que foram inoculados com macerado de fígado proveniente de carcaças com o couro da região abdominal aberta, imersos por 6h sem congelamento referentes ao grupo 1 (M & M, Tab. 2). 64
- Figura 14 Microscopia óptica de contraste de fases mostrando a presença de taquizoítas no lavado peritoneal de camundongos que foram inoculados com macerado de fígado proveniente de carcaças com o couro da região abdominal fechada, imersos por 6h sem congelamento referentes ao grupo 2 (M & M, Tab. 2). 65
- Figura 15 Microscopia óptica de campo claro de lavado intraperitoneal de bioensaio do Grupo 3 (M & M, Tab. 2), contendo taquizoítas de *T. gondii* cepa RH em interação com células LLC-MK2 após 12h de interação (A) e após 24h de interação (B). 66
- Figura 16 Gel de agarose 1,5%, contendo produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores para o gene B1 de *T. gondii*. **Coluna 1.** 67

Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2.** DNA extraído de Taquizoítas isolados de lavado peritoneal 193 pb. **3.** DNA extraído de amostra do baço. **4.** DNA extraído de amostra do fígado

- Figura 17 Gel de agarose 1,5% representativo de reações de PCR com iniciadores para gene B1 com oito amostras de DNA extraídas de animais dos bioensaios. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2.** Controle positivo (DNA extraído de amostra de fígado de carcaças infectadas com *T.gondii* 193 pb), **3-9.** DNA extraído do fígado dos bioensaios inoculados com macerado de fígado extraído de carcaças tratadas neste grupo. **Colunas 4-5 e 7-9** apresentaram ampliações correspondentes ao controle positivo. . **68**
- Figura 18 Gel de agarose 1,5%, contendo nove produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores para o gene B1 de *Toxoplasma gondii*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2-3** Controles positivos (DNA extraído de amostra de carcaças infectadas com *T.gondii* 193 pb), **4.** Controle positivo (DNA extraído de taquizoíta isolado do lavado peritoneal 193 pb), **5-10** DNA extraído do fígado dos bioensaios inoculados com macerado de fígado extraído de carcaças tratadas neste grupo. Seta vermelha sinaliza formações inespecíficas formadas durante o processo de amplificação de DNA. **69**
- Figura 19 Gel de agarose 1,5%, contendo nove produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores para o gene B1 *Toxoplasma gondii*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2.** Controle positivo (DNA extraído de amostra dos protozoários em suspensão no lavado peritoneal 193 pb); **Coluna 3.** Controle negativo (DNA extraído de animal não infectado); **Coluna 4-9** DNA extraído do fígado dos bioensaios inoculados com macerado de fígado extraído de carcaças tratadas do grupo 6. **70**
- Figura 20 Gel de agarose 1,5% contendo reações de PCR com iniciadores para gene B1 com seis amostras de DNA extraídas de bioensaios. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2-** Controle positivo **71**

(DNA extraído de amostra de carcaças infectadas com *T.gondii* 193 pb), **3-7** DNA extraído do fígado dos bioensaios inoculados com macerado de fígado extraído de carcaças tratadas neste grupo. Seta vermelha sinaliza formações inespecíficas formadas durante o processo de amplificação de DNA.

- Figura 21 Figura 21 – Gel de agarose 1,5%, contendo sete produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores para o gene B1 *Toxoplasma gondii*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2.** Controle positivo (DNA extraído de amostra de carcaças infectadas com *T.gondii* 193 pb), **3 - 8** DNA extraído do fígado dos bioensaios inoculados com macerado de fígado extraídos de carcaças tratadas. Seta vermelha sinaliza formações inespecíficas formadas durante o processo de amplificação de DNA. **72**
- Figura 22 Micrografia de cisto cerebral de *T.gondii* cepa Me49. Grupo 1 (A) obtido de carcaças com o couro do crânio integra e o grupo 2 (B) obtido de carcaças com o couro do crânio aberto tratado com Lysoform® por 24 horas, seguido por congelamento a -20° C por 48 horas Contornos irregulares observados em várias partes da parede celular. **73**
- Figura 23 Gel de agarose 2%, representativos de reações de PCR com iniciador um par de iniciadores para o gene B1 *T.gondii*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100 -1000 pb, **Coluna 2.** Controle positivo (DNA extraído de amostra dos protozoários em cistos cerebrais). **Coluna 3.** Controle positivo DNA extraído de bradizoítas em suspensão com ampliações correspondentes ao 193 pb referentes ao gene B1, descritos por Wright e colaboradores (1990). **74**
- Figura 24 Gel de agarose 1,5%, contendo nove amostras de produtos de PCR amplificados a partir do par de iniciadores do gene B1 específico para *T. gondii*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **Colunas 2.3** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado de carcaças infectadas) **4.** (Amostra extraída de bradizoítas em suspensão **75**

193pb). **Colunas 5-10** Amostras extraídas de bioensaios com inóculo obtidos de carcaças fechadas (DNA extraído de amostra do fígado). Seta vermelha sinaliza formações inespecíficas formadas durante o processo de amplificação de DNA.

Figura 25 – Gel de agarose 1,5%, contendo nove amostras de produtos de PCR amplificados a partir do par de iniciadores B1 específico para *T.gondii*. 76

**Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **Colunas 2 e 3,** controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado e cérebro de carcaças infectadas) **4.** Amostra extraída de bradizoítas em suspensão 193 pb. **Colunas 5-10** Amostras extraídas do fígado de bioensaios com inóculo obtido de amostras de cérebro carcaças com o couro da região craniana aberta. Seta vermelha sinaliza formações inespecíficas formadas durante o processo de amplificação de DNA.

Figura 26 Gel de agarose 1,5%, contendo produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores K-DNA e TCZ específicos para *T. cruzi*. 77

**Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do coração) **3** Controle positivo (DNA extraído de amostra do baço) **4.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado) amplificados com par de iniciadores K-DNA R, K-DNA F; **5.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do coração) **6.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do baço) **7.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado) amplificados com par de iniciadores TCZ-1, TCZ-2 na faixa esperada de 188 pb como descritos por Moser e colaboradores (1989). \* coluna vazia.

Figura 27 Gel de agarose 1,5%, contendo sete amostras de produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores TCZ 1, TCZ 2 específicos para *T.cruzi*. 78

**Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2.3** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado) 188 pb. **Colunas 4, 5, 6, 7 e 8** amostras extraídas de bioensaios inoculados com amostras de carcaças fechadas, submetidas a 24 horas de imersão em Lysoform® sem congelamento, (DNA extraído de amostra do fígado). A amostra na coluna 8 apresentou traços

correspondentes à amplificação do DNA.

- Figura 28 Gel de agarose 1,5%, contendo sete amostras de produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores TCZ 1, TCZ 2 específicos para *T. cruzi*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2** Controle negativo **3.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado) 188 pb. **Colunas 4, 5, 6 e 7** amostras extraídas de bioensaios inoculados com macerado de carcaças tratadas 6 horas de imersão em Lysoform® com congelamento, (DNA extraído de amostra do fígado). . Seta vermelha sinaliza formações inespecíficas formadas durante o processo de amplificação de DNA. **79**
- Figura 29 Gel de agarose 1,5%, contendo sete amostras de produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores TCZ 1, TCZ 2 específicos para *T. cruzi*. **Coluna 1.** Marcador de peso molecular 100-1000 pb, **2.** Controle negativo **3.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado) 188 pb. **Colunas, 4, 5, 6, 7 e 8** amostras extraídas de bioensaios tratados 24 horas de imersão em Lysoform® com congelamento. Seta vermelha sinaliza formações inespecíficas formadas durante o processo de amplificação de DNA. **80**

**Lista de Tabelas**

Tabela 1	Níveis de inativação microbiana	<b>27</b>
Tabela 2	Iniciadores utilizados para amplificação do DNA de amostras infectadas por <i>Toxoplasma gondii</i>	<b>56</b>
Tabela 3	Iniciadores utilizados para amplificação do DNA de amostras infectadas por <i>Trypanosoma cruzi</i> .	<b>57</b>
Tabela 4	Organização dos grupos de estudo <i>Toxoplasma gondii</i> Cepa RH	<b>61</b>
Tabela 5	Organização dos grupos de estudo <i>Toxoplasma gondii</i> Cepa Me49.	<b>72</b>
Tabela 6	Organização dos grupos de estudo <i>Trypanosoma cruzi</i> Cepa Y.	<b>76</b>

**Lista de Abreviações**

µl	Microlitro
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ART	Artigo
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DNTP'S	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EPA	Environment Protection Agency
EPI	Equipamento de Proteção Individual
EUA	Estados Unidos da America
FCF-IQ	Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Instituto de Química - USP
FISPQ	Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos
G	Calibre da agulha
IGA	Imunoglobulina A
IGG	Imunoglobulinas G
IGM	Imunoglobulinas M
NB	Nível de Biossegurança
NG	Nanograma
NR	Norma Regulamentadora
P/V	Peso por Volume

QCA	Composto Quaternário de Amônio
QSP	Quantidade Suficiente Para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RSS	Resíduos de Serviços de Saúde
RSU	Resíduos Sólidos Urbanos
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
USP	Universidade de São Paulo
V/V	Volume por Volume

## Sumário

	<b>Pág.</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>24</b>
<b>1.1 Geradores de Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) no Brasil.....</b>	<b>24</b>
1.1.1 Responsabilidade pelos resíduos do serviço de saúde – RSS.....	25
1.1.2 Classificação dos grupos de resíduos do serviços de saúde – RSS. ....	25
<b>1.2 Carcaças infectadas e o potencial de risco de disseminação.....</b>	<b>26</b>
<b>1.3 Manejo de Resíduo Sólidos do Serviço de Saúde. RSS.....</b>	<b>28</b>
<b>1.3.1 Métodos recomendados para inativação de resíduos patogênicos no Brasil.....</b>	<b>29</b>
1.3.2 Tratamento de Resíduos.....	29
1.3.2.1 Tratamento Térmico de Resíduos.....	29
1.3.2.2. Tratamento químico de resíduos.....	30
<b>1.4 Métodos recomendados para inativação de resíduos patogênicos em instituições de pesquisa.....</b>	<b>32</b>
<b>1.5 Metodologias tradicionais de tratamento aplicadas no Centro de Ciências de Saúde – UFRJ para inativação parasitaria.....</b>	<b>33</b>
1.5.1 Principais fatores de risco nas etapas do manejo.....	34
<b>1.6 Protozoários patogênicos ao homem e a outros animais.....</b>	<b>34</b>
<i>1.6.1 Toxoplasma gondii.....</i>	<i>34</i>
1.6.1.1 Formas de diagnóstico para Toxoplasmose.....	38
1.6.2 Tripanossomíase americana.....	39
1.6.2.1 Incidência de infecção oral causada pelo protozoário <i>T. Cruzi</i> .....	41
1.6.2.2 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas.....	41

1.6.2.3 Fase e forma clínica da doença.....	42
1.8.2.4 Diagnóstico da doença de Chagas.....	42
Justificativa.....	44
<b>2 objetivo.....</b>	<b>45</b>
2.1 objetivo geral.....	44
2.1 objetivo específico.....	44
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>46</b>
3.1. Animais.....	46
<b>3.2. Protocolos de manutenção dos animais infectados e obtenção protozoários utilizados neste estudo.</b>	<b>46</b>
<b>3.2.1 Protocolo de manutenção para cepa RH de <i>T.gondii</i>.</b>	<b>46</b>
<b>3.2.2 Protocolo de manutenção para cepa ME49 de <i>T.gondii</i>.</b>	<b>47</b>
<b>3.2.3 Protocolo de manutenção para cepa Y de <i>T.cruzi</i></b>	<b>47</b>
<b>3.4 Reaproveitamento das carcaças e extração de órgãos e tecidos.....</b>	<b>48</b>
3.4.1 Análise de órgãos por PCR e identificação de sítios de infecção.....	49
<b>3.5 bioensaio .....</b>	<b>49</b>
3.5.1 Observações de viabilidade parasitária através da microscopia óptica.....	50
3.5.2 Investigação da presença parasitária nos órgãos do bioensaio por meio de PCR.	55
<b>3.6. Protocolos aplicados para amplificação de DNA para <i>T. Gondii</i>.....</b>	<b>55</b>
3.6.1 Protocolos aplicados para amplificação de DNA para <i>T. Cruzi</i> .	56
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Caracterizações do estado geral dos animais envolvidos no estudo.....</b>	<b>57</b>
<b>4.2 Confirmação da infecção e viabilidade de <i>T. Gondii</i> cepa RH e ME49 e <i>T.cruzi</i> cepa Y em carcaças de camundongos previamente</b>	

<b>infectados.....</b>	<b>59</b>
4.2.1 Infecção parasitaria em carcaças de animais previamente infectadas <i>T. Gondii</i> cepas RH e Me49.	59
4.2.2 Confirmação da infecção pelo protozoário <i>T. Cruzi</i> em animais por bioensaio e por microscopia óptica.	60
<b>4.3 Desenvolvimento de métodos de inativação química e física de carcaças infectadas com <i>T. Gondii</i> e <i>T. Cruzi</i>. .....</b>	<b>61</b>
<b>4.3.1 Análise da inativação parasitária nas carcaças de camundongos. ....</b>	<b>62</b>
4.3.1.1 Bioensaio com carcaças de camundongos infectadas com a cepa RH de <i>T. Gondii</i> .	63
<b>4.3.1.2 Observação de cistos viáveis em camundongos infectados com a cepa Me49 submetidos ao tratamento de imersão e congelamento.....</b>	<b>71</b>
<b>4.3.2 Verificação da presença de <i>Toxoplasma gondii</i> Cepa Me49 em amostras do bioensaio.....</b>	<b>74</b>
<b>4.4 - Verificação da presença parasitaria de <i>Trypanosoma cruzi</i> em cepa Y....</b>	<b>76</b>
4.4.1 Verificação da presença de <i>T. Cruzi</i> em controle positivo por PCR e escolha do iniciador.....	77
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>7 PERSPECTIVA.....</b>	<b>88</b>
<b>8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>89</b>
<b>9 ANEXOS</b>	

## 1- INTRODUÇÃO

Nas linhas de pesquisa existentes no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) têm como objetos de estudo protozoários causadores de graves doenças parasitárias para o homem e outros animais. (adaptado de <http://www.biof.ufrj.br/>; último acesso 21/05/2018). Os protozoários parasitos, *Leishmania Spp*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi* têm sido utilizados como modelos de escolha para diferentes estudos tanto por sua importância médica e veterinária já que causam morbidade ou mortalidade ao homem e outros animais de importância econômica e social (Dias e Schofileld, 1999), por serem bons modelos para o estudo da biologia celular de eucarionte (adaptado de <http://www.biof.ufrj.br/pt-br/node/4> último acesso 21/05/2018).

Em muitas destas linhas de pesquisas o uso de mamíferos que mimetizam os sistemas biológicos de humanos é imprescindível para o entendimento da interação patógeno-hospedeiro, da patogênese da doença e também para as fases iniciais dos testes de quimioterapia antiparasitária (Abrão *et al.*, 1994). Como modelo animal, o camundongo (*Mus musculus*) é amplamente utilizado devido às vantagens na reprodução, manipulação, fácil acomodação e principalmente devido à susceptibilidade à infecção por patógenos (Rader, 2004; Birke *et al.*, 2007). A utilização de animais para experimentação no Brasil passou a ser regulamentada em 2008 através da Lei 11.794 (de outubro de 2008), conhecida como "Lei Arouca". Esta lei segue as discussões internacionais a respeito de diretrizes e da legislação sobre animais de experimentação. Um dos maiores desafios para os formuladores de políticas públicas é a harmonização das disposições legais, sem prejudicar a pesquisa biomédica (FILYPECKI *et al.*, 2011). Baseado nesta lei, a formulação de normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica, bem como o estabelecimento de procedimentos para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal é função do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Ao CONCEA também é dada a responsabilidade pelo credenciamento das instituições que desenvolvem atividades nesta área, além de administrar o cadastro de protocolos experimentais ou pedagógicos aplicáveis aos procedimentos de ensino e projetos de pesquisa científica realizados ou em andamento

no país. Já nas instituições brasileiras que criam e/ou utilizam animais com a finalidade de ensino e pesquisa científica há a necessidade da criação e registro de uma Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (<http://ciuca.mct.gov.br>). Desta forma, tais CEUAs passam a ser registradas no CONCEA. Sem o cadastramento, as instituições não podem pedir seu credenciamento sem o qual não poderão fazer o uso de animais de acordo com a Lei Arouca. Cada instituição (com a sua CEUA) é responsável por sua experimentação e ética na utilização dos animais e, se houver alguma irregularidade, as CEUAs devem denunciá-las ao CONCEA. O descumprimento da Lei Arouca pode acarretar multas elevadas às instituições infratoras, as quais podem ser interditadas temporária ou definitivamente, além de estarem sujeitas a perda de financiamentos públicos.

Também cabe a CEUA prover o treinamento de seus membros e de pesquisadores da Instituição em áreas afins ao bem-estar animal, além de temas relacionados ao assunto como criação e manutenção, ética e eutanásia (<http://ciuca.mct.gov.br>). Após utilização para atividades experimentais e eutanásia é essencial o descarte do animal e de seus dejetos. Este descarte é regulamentado pela Lei de descarte de resíduos sólidos e deve seguir as normas previstas na legislação em vigor no país (CONCEA, 2013). É a Lei 12.305/2010 (Lei ordinária) de 02/08/2010 que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos - RSS, dispondo sobre seus princípios, objetivos e instrumentos, bem como sobre as diretrizes relativas à gestão integrada e ao gerenciamento de resíduos sólidos, incluindo os perigosos, às responsabilidades dos geradores e do poder público e aos instrumentos econômicos aplicáveis.

## **1.2 Geradores de Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) no Brasil.**

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nº 306/04 (anexo I cap. II) e a Resolução Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 358/2005 art. 1(anexo II).

“São definidos como geradores de Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) todos os serviços relacionados com o atendimento à saúde humana ou animal, inclusive os serviços de assistência domiciliar e de trabalhos de

campo; laboratórios analíticos de produtos para a saúde; necrotérios, funerárias e serviços onde se realizem atividades de embalsamamento, serviços de medicina legal, drogarias e farmácias, inclusive as de manipulação; **estabelecimentos de ensino e pesquisa na área da saúde**, centros de controle de zoonoses; distribuidores de produtos farmacêuticos, importadores, distribuidores e produtores de materiais e controles para diagnóstico *in vitro*, unidades móveis de atendimento à saúde; serviços de acupuntura, serviços de tatuagem, dentre outros similares”.

### 1.2.1 Responsabilidade pelos resíduos do serviço de saúde – RSS.

Os estabelecimentos de serviços de saúde são os responsáveis pelo correto gerenciamento de todos os RSS por eles gerados, cabendo aos órgãos públicos, dentro de suas competências, a gestão, regulamentação e fiscalização (Brasil 2006). Embora a responsabilidade direta pelos RSS seja dos estabelecimentos de serviços de saúde, por serem os geradores, pelo princípio da responsabilidade compartilhada, se estendendo ao poder público e às empresas de coleta, tratamento e disposição final (Brasil 2006).

### 1.1.2. Classificação dos grupos de resíduos do serviço de saúde – RSS.

De acordo com a RDC ANVISA no 306/04 e Resolução CONAMA no 358/05, (anexo III), os RSS são classificados em cinco grupos:

Grupo A: Resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características de maior virulência ou concentração podem apresentar risco de infecção. Incluem carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais não submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos, bem como suas forrações.

Grupo B: Resíduos contendo substâncias químicas que podem apresentar risco à saúde pública ou ao meio ambiente, dependendo de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade.

Grupo C: Quaisquer materiais resultantes de atividades humanas que contenham radionuclídeos em quantidades superiores aos limites de eliminação especificados nas normas da Comissão Nacional de Energia Nuclear-CNEN e para os quais a reutilização é imprópria ou não prevista.

Grupo D: Resíduos que não apresentem risco biológico, químico ou radiológico à saúde ou ao meio ambiente, podendo ser equiparados aos resíduos domiciliares. Nesse grupo estão incluídos restos de alimentos e de podas e jardins.

Grupo E: Materiais perfuro cortantes ou escarificantes, tais como: lâminas de barbear, agulhas, escalpes, ampolas de vidro, brocas, limas endodontias, pontas diamantadas, lâminas de bisturi, lancetas, tubos capilares, micropipetas, lâminas e lamínulas, espátulas, e todos os utensílios de vidro quebrados no laboratório (pipetas, tubos de coleta sanguínea e placas de Petri) e outros similares.

## **1.2 Carcaças infectadas e o potencial risco de contaminação.**

De acordo com a classificação de resíduos com a possível presença de agentes biológicos descritos pela RDC ANVISA nº 306/04 (anexo III),

“Carcaças de animais utilizados na pesquisa são consideradas como resíduos biológicos do grupo A2 pelo alto risco de contaminação para os operadores de recolhimento de lixo biológico e para o meio ambiente”.

O Art. 16 da RDC CONAMA nº 358 (anexo IV), orienta de forma geral que após a realização dos procedimentos a que se destinam.

“As carcaças devem ser submetidas a processo de tratamento com redução de carga microbiana compatível com nível III de inativação microbiana” descritos na tabela 1.

### Tabela I - NÍVEIS DE INATIVAÇÃO MICROBIANA

#### NÍVEIS DE INATIVAÇÃO MICROBIANA

Nível I	Inativação de bactérias vegetativas, fungos e vírus lipofílicos com redução igual ou maior que 6Log10.
Nível II	Inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias com redução igual ou maior que 6Log10
Nível III	<b>Inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias com redução igual ou maior que 6Log10, e inativação de esporos do B. stearothermophilus ou de esporos do B. subtilis com redução igual ou maior que 4Log10.</b>
Nível IV	Inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias, e inativação de esporos do B. stearothermophilus com redução igual ou maior que 4Log10.

Fonte: Technical Assistance Manual: *State Regulatory Oversight of Medical Waste Treatment Technologies - State and Territorial Association on Alternate Treatment Technologies.*

A inativação das carcaças infectadas visa prevenir o risco de contaminação do ambiente e disseminação de doenças ao homem e a outros animais. Como exemplo: para que as carcaças dos camundongos hipoteticamente contendo 1 milhão de protozoários, após o processo de tratamento a carcaça deverá apresentar 1 ou menos protozoários viáveis. Desta forma, entende-se que todo processo físico ou químico que

atinja a redução da carga parasitária em 6 log10 ou inativação completa de parasitos pode ser considerado seguro. A partir da comprovação da inativação descrita na RDC ANVISA nº 306 / 04 (anexo VIII - 6.1.3), “processos que vierem a ser validados para a obtenção de redução ou eliminação da carga microbiana, em equipamento compatível com Nível III de Inativação Microbiana“ as carcaças poderão ser conduzidas ao seu destino final sem que ofereçam risco de contaminação ao operador e ao meio ambiente.

### **1.3 Manejo dos Resíduos Sólidos do Serviço de Saúde – RSSS.**

No Brasil, a Diretoria Colegiada da ANVISA define a etapa do manejo que trata os resíduos gerados no serviço de saúde.

“Tratamento consiste na aplicação de método, técnica ou processo que modifique as características dos riscos inerentes aos resíduos, reduzindo ou eliminando o risco de contaminação, de acidentes ocupacionais ou de danos ao meio ambiente”.

No capítulo III RDC ANVISA nº 306 / 04 (anexo VII), informa que o tratamento pode ser aplicado no próprio estabelecimento gerador ou em outro estabelecimento, observado nestes casos, as condições de segurança para o transporte entre o estabelecimento gerador e o local do tratamento e além disso acrescenta que o gerenciamento dos RSS é formado por um conjunto de procedimentos de gestão aplicando embasamentos técnicos, científicos e legais, voltados para redução dos resíduos produzidos e segurança nos processos de manejo de resíduos gerados, visando à proteção dos operadores e do meio ambiente.

“Todo gerador deve elaborar um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde – PGRSS”.

#### **1.3.1 Métodos recomendados para inativação de resíduos patogênicos no Brasil.**

Para o tratamento adequado de cada classe de resíduos produzidos, devemos conhecer sua origem e seguir normas técnicas descritas pelo CONCEA 2013 e RDC nº 306/2004 ANVISA (anexo VIII) que norteiam de forma segura e correta todas as fases deste manejo. Neste trabalho, o tratamento dos resíduos de serviços de saúde é o principal tópico explorado, destacando as metodologias aplicadas atualmente para inativar resíduos patogênicos gerados nas instituições de ensino no Brasil e em outros países, avaliando novas alternativas que ofereçam praticidade e segurança ao operador, redução de novos resíduos gerados pela descontaminação em comparação as metodologias tradicionais utilizadas.

#### **1.3.1.1 Tratamento de Resíduos.**

O tratamento consiste na aplicação de método, técnica ou processo que modifique as características dos riscos inerentes aos resíduos, reduzindo ou eliminando o risco de contaminação, de acidentes ocupacionais ou de danos ao meio ambiente. Para a inativação de carcaças de animais, a ANVISA, com a normativa 03/2005, baseada na Resolução da Diretoria Colegiada nº 306/2004, cap. VI- 6.1 (anexo VIII) recomenda:

“Carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos, bem como suas forrações, e os cadáveres de animais suspeitos de serem portadores de microrganismos de relevância epidemiológica e com risco de disseminação, que foram submetidos ou não a estudo anatomopatológico ou confirmação diagnóstica devem ser submetidos a tratamento antes da disposição final”.

#### **1.3.1.2. Tratamento térmico de resíduos.**

Tratamentos térmicos são os métodos que utilizam do aumento da temperatura para destruição ou inativação de microrganismos patogênicos. (Brasil 2006). O método da incineração queima os resíduos a temperaturas superiores a 1.000° C, por período,

sendo que após esse estágio, os gases oriundos dessa queima também são elevados a altas temperaturas para que haja a desintegração das moléculas de dioxinas e furanos. Os remanescentes da queima são, geralmente, constituídos de gases, como o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>); dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>); Nitrogênio (N<sub>2</sub>); oxigênio (O<sub>2</sub>) proveniente do ar em excesso que não é queimado completamente; água (H<sub>2</sub>O); cinzas e escórias, constituídas de metais ferrosos e materiais inertes, como por exemplo, vidros etc. (Brasil 2006).

A autoclavação é um tratamento térmico que consiste em manter os RSS a uma temperatura elevada e em contato com o vapor de água por um período de tempo suficiente para destruir os microrganismos patogênicos presentes no material contaminado ou ainda, reduzi-los a um número que não represente risco à saúde. (Brasil 2006). De acordo com a RDC ANVISA nº 316/02 (anexo XI).

“Os sistemas de tratamentos térmicos de resíduos são fontes potenciais de risco ambiental e de emissão de poluentes perigosos, podendo constituir agressão à saúde e ao meio ambiente se não forem corretamente instalados, operados e mantidos”.

#### 1.3.1.3. Tratamento químico de resíduos.

Para o tratamento químico e sanificação um grande numero de compostos a base de Cloro, Iodo, Quaternários de Amônio, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, clorexidina, Estes agentes químicos se caracterizam por apresentarem níveis de eficiência variáveis em face das diferentes formulações e valores de pH (Germano e Germano, 2001). O ácido hipocloroso predomina entre os valores de pH 4,0 e 7,0, enquanto o íon hipoclorito predomina na faixa de pH 9,0 ( Mc Donnel e Russell, 1999).

#### Compostos clorados.

Para Jimenez (2001), agentes clorados tem sua ação diminuída na presença de matéria orgânica, sendo corrosivo para algumas estruturas metálicas, porém apresentam amplo espectro de ação contra microrganismos, tendo ação bactericida, fungicida,

viricida e esporicida. Segundo Martins e Kuayne (1996), os compostos clorados estão disponíveis na forma de cloro líquido, hipocloritos, cloraminas orgânicas e inorgânicas e dióxido de cloro.

#### Compostos Quaternários de Amônio - CQA's.

Já os CQA's podem ser correlacionados ao hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), no qual os átomos de hidrogênio (H) são substituídos por radicais alquí (R) e a hidroxila (OH), por um halogênio, conforme apresentado na Figura 1. O quaternário de amônio é ativo contra as formas vegetativas de bactérias gram-positivas, gram-negativas, vírus não lipídicos e fungos. Os compostos quaternários de amônio são indicados para desinfecção de baixo nível, e em relação aos demais sanificantes é considerado menos corrosivo e apresentar baixa toxicidade. (adaptado de Andrade *et al.*, 1996).

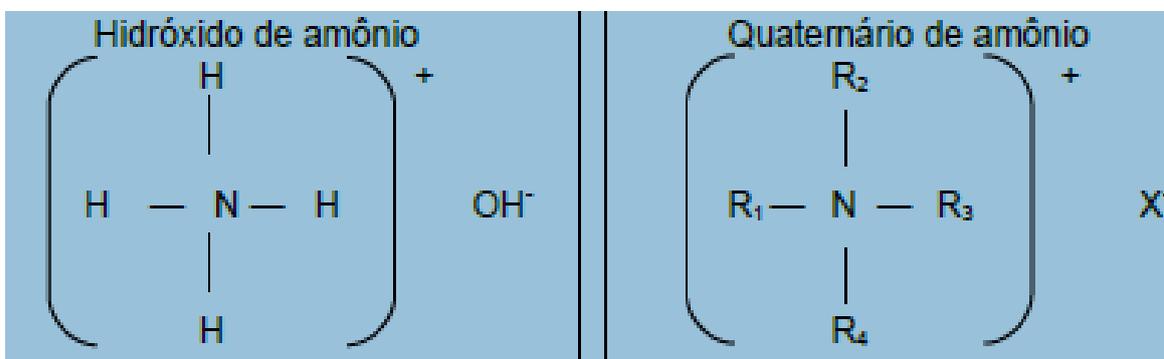


Figura 1: correlação de fórmulas químicas: formula estrutural do sal quaternários de amônio, correlacionados ao hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), átomos de hidrogênio (H), radicais alquí (R), hidroxila (OH) Fonte: Scielo.br.

O desinfetante LYSOFORM® (Bombril - S.A.) apresenta concentração <0,2% do componente ativo Hidróxido de Amônio, de acordo com a Ficha de Informações de Segurança de produtos Químicos – FISPQ (anexo X). Este produto é destinado ao uso doméstico, em condições normais de uso pode oferecer baixo risco ao operador, não é classificado no grupo de produtos perigosos. Esse desinfetante oferece baixo risco de

manipulação por ter em sua composição 90% de água. Segundo a RDC ANVISA nº 306/04 (anexo IX), resíduos químicos que não apresentam risco à saúde ou ao meio ambiente não necessitam de tratamento, podendo ser submetidos a processo de reutilização, recuperação ou reciclagem. Quando não submetidos a estes processos, os resíduos sólidos podem ter disposição final em aterro sanitário licenciado e os resíduos líquidos podem ser lançados em corpo receptor ou na rede pública de esgoto, desde que atendam às diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes. O uso de equipamento de proteção individual como luvas, máscara e óculos de proteção podem ser suficientes durante a manipulação do produto, não necessitando de mais aparatos para utilização do descarte, que pode ser feito diretamente na rede de esgoto doméstico.

#### **1.4 Métodos recomendados para inativação de resíduos patogênicos nas instituições de pesquisa.**

Nas instituições americanas os resíduos biológicos infeccioso-patogênicos são recolhidos dos laboratórios e inativados nas próprias dependências do biotério central, quando equipado com autoclaves apropriadas para acondicionamento animal, ou são removidos por empresas especializadas no tratamento de resíduos. O Guia *Minnesota Pollution Control Agency, infectious waste: management guidance for storage and decontamination facilities* descreve minuciosamente o processo de inativação executado por pessoal autorizado (anexo XIII).

Na Universidade de Boston, Estados Unidos, o tratamento de carcaças de animais é feito pela esterilização por autoclave em sacos plásticos bem fechados e uso de recipientes adequados, ao tipo de resíduo, volume e grau de periculosidade. A inativação dos resíduos é supervisionada por um funcionário do *Environmental Health and Safety (EHS)* (Departamento de Segurança e Saúde Ambiental), que é designado para servir como um ponto de contato primário para todos os assuntos relacionados à segurança e saúde ambiental dos laboratórios da instituição (adaptado do manual do *Environmental Health and Safety, Boston University*) (anexo XIV).

No Brasil, várias instituições de pesquisa, como no Centro de Ciências de Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde este trabalho foi desenvolvido,

não realizam a todos os processos inativação no estabelecimento gerador, transportando o resíduo gerado na pesquisa para os processos de tratamento e destinação final fora de suas dependências, porém carcaças de camundongos experimentalmente infectadas por patógenos, que não passem pelo processo de tratamento térmico ou químico, em caso de exposição indevida ou incidente pontual, podem infectar o operador, responsável pelo manejo deste resíduo.

Na Universidade de São Paulo – USP, Brasil, o tratamento das carcaças de animais utilizados na pesquisa é feito por empresas responsáveis pelo transporte e dependendo do processo a destinação final dos RSS. Os procedimentos para segregação e acondicionamento são descritos em Procedimento Operacional Padrão - POP's disponíveis em <http://biot.fm.usp.br/pdf/GuiadosPOPsResiduos.pdf>.

Na Fundação Oswaldo Cruz o biotério de experimentação de Farmanguinhos é responsável pela manutenção dos animais utilizados nas pesquisas científicas desenvolvidas no Laboratório de Farmacologia aplicada de Farmanguinhos, as instalações e atividades operacionais do biotério foram modernizadas para garantia da qualidade dos animais envolvidos nos experimentos (SALES, 2013). Ao realizar o levantamento de não conformidades ações corretivas foram implantadas para melhoria de processos que envolvem animais de experimentação. A implantação de autoclaves destinadas a descontaminação de carcaças na unidade geradora, evitando a contaminação do ambiente externo. (<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/11633/1/10.pdf>).

### **1.5 Metodologias tradicionais de tratamento aplicadas no Centro de Ciências de Saúde – UFRJ para inativação parasitária.**

Para inativação de carcaças infectadas utiliza-se um procedimento de inativação diferente da utilizada em culturas dos patógenos *in vitro*. Para o descarte seguro de células de qualquer linhagem é adotada a inativação por autoclavação, onde os frascos de cultivo contendo o material infectado são submetidos à temperatura de 121° C por 30 minutos. Desta forma a total inviabilização do parasito é garantida, assim como a segurança do resíduo descartado. Já a inativação das carcaças de animais no CCS da

UFRJ segue as recomendações da Comissão de Biossegurança descritas na página da instituição no tópico – Resíduo de Serviço de Saúde - RSS – disponibilizado em (<http://www.ccs.ufrj.br/pt/sobre-o-ccs/coordenacoes/biosseguranca#rss>) consultado em 23/11/2017 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do CCS, UFRJ (CEUA). As normas da Comissão de Biossegurança e do CEUA do CCS indicam que a inativação dos patógenos de Nível de Biossegurança 2 (NBa2) e 3 (NBa3) (anexo XVI), em carcaças de animais usados em pesquisa, deve ser realizada antes da saída desse material dos laboratórios responsáveis. As recomendações básicas preconizam que as carcaças estejam devidamente acondicionadas em saco plástico branco leitoso com contornos e desenhos pretos como indica ABNT 9191:2008 (anexo XVII). As carcaças recolhidas são encaminhadas ao tratamento realizado por empresas especializadas no manejo de resíduos e o processo de inativação executado por pessoal autorizado assim como em outras instituições.

#### **1.5.1 Principais fatores de risco nas etapas do manejo.**

Segundo Chieffi e colaboradores (2000), os fatores de risco passam por desconhecimento, desatenção, falta ou mal-uso de equipamentos de proteção individual, instalações e equipamentos inadequados, iluminação deficiente, falta de capacitação ou participação de outros motivos facilitadores. Considerando o potencial de disseminação por via oral das doenças causadas pelos protozoários *T.cruzi* e *T.gondii*. Em casos de acidentes ou possíveis descartes inapropriados de carcaças infectadas, é de suma importância destacar a preocupação dos pesquisadores com o manejo adequado aos resíduos produzidos em experimentações e a forma como será descartado. Por exemplo, o congelamento de carcaças em temperaturas que não atinjam  $-20^{\circ}\text{C}$  e permaneçam por períodos menores de 24 horas não é recomendado para a inativação do protozoário *T. gondii*, que é capaz de manter-se viável e preservado no tecido por até 14 dias. Resultados de ensaios comprovaram que amostras de carne embaladas a vácuo mantinham formas ativas de *T. gondii*, após seis semanas mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$  (Neumayerová *et al.*, 2014). Lewinsohn, e colaboradores (2005), sugere que o caldo de cana-de-açúcar não é a única bebida capaz de transmitir a Doença de Chagas, o suco de açaí foi associado a casos de infecção por *T. cruzi* por via digestiva em um surto no Estado do Pará, Brasil. Diante destes fatos é imprescindível que estudos direcionados às

etapas de inativação e descarte de carcaças sejam realizados, de forma a proporcionar novas alternativas simples e seguras para resíduos biológicos desta natureza.

## **1.6 Protozoários patogênicos ao homem e a outros animais.**

### *1.6.1 Toxoplasma gondii.*

*Toxoplasma gondii* é um patógeno intracelular obrigatório com ampla distribuição mundial, estando um terço da população global possivelmente infectada. (Tenter *et al*, 2000). Causador da Toxoplasmose este protozoário é capaz de infectar seres humanos animais domésticos e selvagens de sangue quente. Em todos os países grande parte da população humana e animal (mais de 300 espécies de animais entre mamíferos e aves - domésticos ou silvestres) apresentam parasitismo pelo *T. gondii*. Em algumas regiões, 40 a 70 % dos adultos aparentemente saudáveis apresentam-se positivos para o *T.gondii* em testes sorológicos (Neves, *et al* 2005). O parasito apresenta três estágios infecciosos: taquizoíto- a forma de replicação rápida do parasita e presente durante a fase aguda da doença; bradizoíto - a forma de replicação lenta presente nos cistos teciduais durante a fase crônica da infecção e esporozoíto - que é o resultado da replicação sexuada no hospedeiro definitivo e está presente em oocistos esporulados (Dubey *et al.*, 1998). Embora a toxoplasmose seja assintomática na maioria dos indivíduos, casos na clínica médica são bastante comuns, podendo ocasionar cegueira e retardo mental em crianças infectadas congenitamente além de ser causa de grande morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos (Montoya e Liesenfeld, 2004). Em pacientes imunocomprometidos, a doença deve-se principalmente a reativação de cistos latentes, mas também pode ocorrer na infecção primária (Martino, *et al.*, 2005). Os seres humanos podem ser infectados com *T. gondii* através de diferentes rotas (como descrito na Figura 2): consumo de carne crua ou pouco cozida de animais cronicamente infectados, ingerindo oocistos esporulados presentes na água, no solo ou em vegetais e pela transmissão vertical através da placenta (Hide *et al* 2016). A vasta gama de hospedeiros, a alta prevalência e a distinta diversidade clínica de genótipos parasitários representam um risco significativo para a saúde pública. Apesar de *T. gondii* exibir marcantes sintomas neurotrópicos este parasito também pode

infectar órgãos viscerais como fígado, baço, pâncreas, além do coração e linfonodos. A estrutura clonal das cepas dominantes é composta por um baixo nível de diferenças genéticas, sendo essa diferença de 1 a 2% na sequência de DNA (Robert-Gangneux e Dardé, 2012). A patogenia dessas cepas foi determinada em camundongos sendo as cepas do tipo I (RH, CAST, VEL) consideradas de alta virulência por causar infecções letais nestes animais, as cepas do tipo II (ME49, PDS e PLK) são consideradas de virulência moderada enquanto as cepas do tipo III (CEP e VEG) são ditas de baixa virulência, já que a infecção causada pelo tipo clonal pode ser controlada pelo sistema imunológico dos camundongos e a infecção tende a cronificar (Boothroyd e Grigg, 2002).

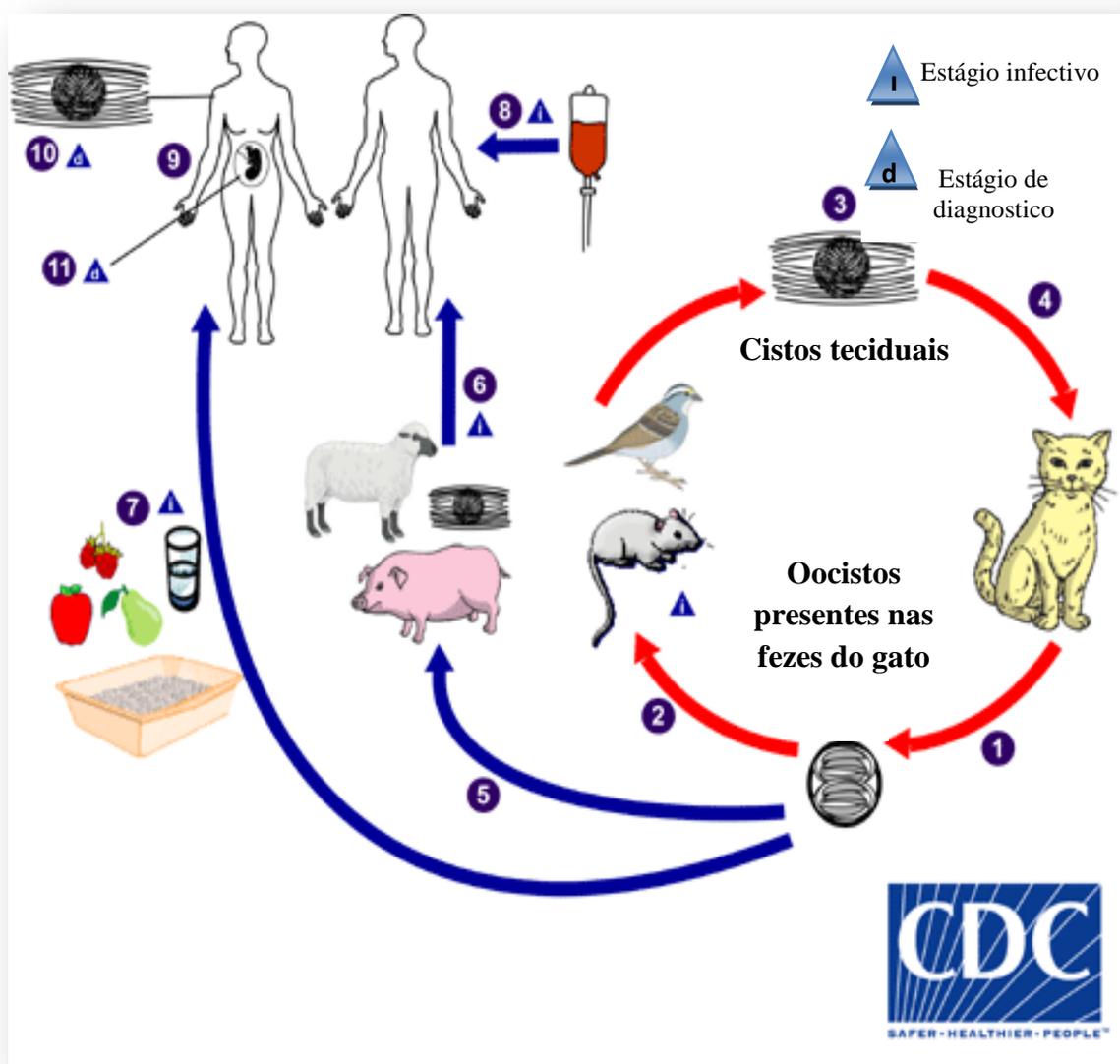


Figura 2: Ciclo de vida e via de transmissão do *Toxoplasma gondii*.

Fonte: CDC - Centers for Disease Control and Prevention.

O ciclo de vida do *T.gondii* é complexo e envolve um hospedeiro definitivo e intermediário. Os hospedeiros definitivos do *T.gondii* são membros da família Felidae (os gatos domésticos e seus parentes). Conforme representado na Figura 2, oocistos esporulados são eliminados nas fezes do gato.

#### Detalhamento da Figura 2

Embora oocistos sejam liberados por 1-2 semanas, aparecem nas fezes em grande número. Oocistos levam 1-5 dias para esporular no ambiente e se tornarem infectivos. Hospedeiros intermediários incluem pássaros e roedores e outros animais de sangue quente. Estes se infectam após a ingestão de solo, água ou material vegetal contaminado com oocistos. **2-** Nos oocistos encontram-se as formas esporozoítas que são convertidas em taquizoítos logo após serem ingeridos pelos hospedeiros. Estes taquizoítos se replicam em diversos tecidos como o neural e muscular e podem se converter em bradizoítas, capazes de formar cistos. **3-** Gatos são infectados após a ingestão de tecidos infectados de hospedeiros intermediários que abrigam cistos teciduais. **4-** Os gatos também podem ser infectados diretamente por ingestão de oocistos esporulados. Animais criados para consumo humano e da caça selvagem podem também ser infectados com cistos teciduais após a ingestão de oocistos esporulados no ambiente. **5-** Os seres humanos podem ser infectados por ingestão de carne crua ou mal cozida de animais que abrigam cistos teciduais ou consumo de alimentos ou água contaminados com fezes de gato ou por amostras ambientais contaminados (tais como o solo fecal-contaminados ou manipulação da caixa de areia de um gato de estimação). No hospedeiro humano, os parasitas formam cistos nos tecidos, mais frequentemente no músculo esquelético, miocárdio, cérebro, e os olhos; esses cistos podem permanecer durante toda a vida do hospedeiro. **6-** Os humanos podem se infectar por qualquer uma das várias rotas: ao comer carne pouco cozida de animais que abrigam cistos de tecido. **7-** Consumindo alimentos ou água contaminada com fezes de gato ou por amostras ambientais contaminadas (como solo contaminado com fezes ou mudança da caixa de lixo de um gato de estimação). **8-** Transfusão de sangue ou transplante de órgãos. **9-** Via transplacentária da mãe para o feto. **10-** No hospedeiro humano, os parasitas formam cistos de tecido, mais comumente no músculo esquelético, miocárdio, cérebro e olhos;

esses cistos podem permanecer durante toda a vida do hospedeiro. O diagnóstico é geralmente alcançado por sorologia, embora os cistos de tecido possam ser observados em espécimes de biópsia corados. **11-** O diagnóstico de infecções congênitas pode ser conseguido através da detecção de DNA de *T. gondii* em líquido amniótico, utilizando métodos moleculares como a PCR. Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html> e Kompalic-Cristo *et al.* (2005).

#### 1.6.1.1 Formas de diagnóstico para Toxoplasmose.

##### Diagnóstico sorológico

Segundo Amendoeira e colaboradores (2010), no diagnóstico sorológico, os anticorpos IgM específicos são geralmente os primeiros a serem detectados. Os anticorpos IgG aparecem mais tarde, elevam-se bastante durante a fase aguda e, depois, diminuem gradualmente até títulos baixos, que persistem na maioria dos casos, ao longo da vida do indivíduo. Os anticorpos IgM desaparecem após a fase aguda, entretanto, métodos sensíveis podem detectar IgM por longos períodos após a infecção (de meses até anos). A demonstração do aumento dos títulos de IgG entre duas amostras pode ajudar no diagnóstico da fase aguda da infecção por *T. gondii*, quando a IgM específica for negativa e na impossibilidade de se observar a soro conversão. Entretanto, a ocorrência de um único título elevado, com qualquer método, não confirma infecção aguda, pois o título de IgG específica pode permanecer elevado por muitos anos. Deste modo, preferencialmente, para caracterizar a fase aguda da toxoplasmose, espera-se que seja demonstrado o aumento dos títulos de anticorpos em amostras de soro obtidas pelo menos com três semanas de intervalo, seriadas e testadas de forma pareada (Wong SY *et al.*, 2008). Tem sido relatado o valor da detecção de anticorpos IgA *T. gondii*-específicos para o diagnóstico de toxoplasmose aguda recente, os quais desaparecem antes dos anticorpos IgM. A detecção simultânea de IgM e IgA apontam para a fase aguda da toxoplasmose, favorecendo um diagnóstico mais preciso da toxoplasmose aguda adquirida, principalmente em gestantes. (Camargo, *et al* 1995).

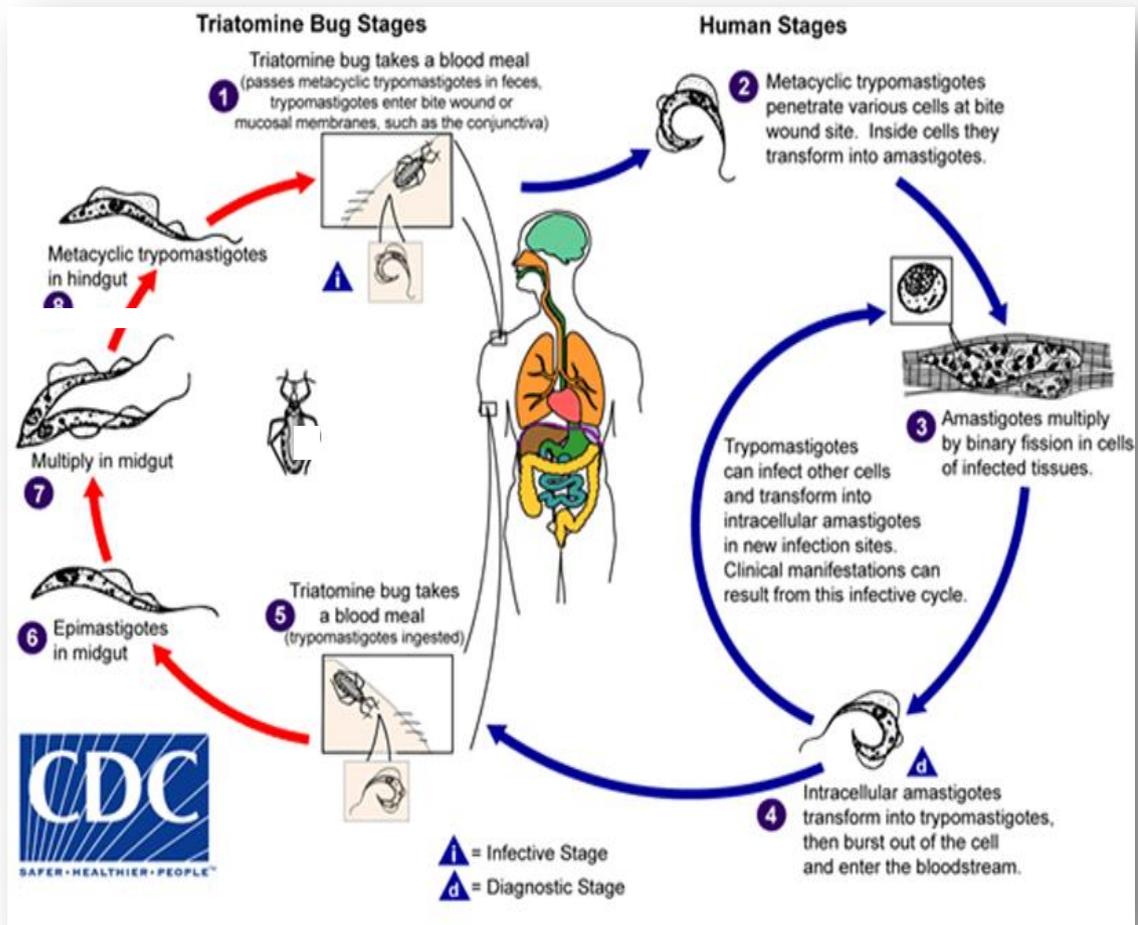
##### Diagnóstico molecular para *Toxoplasma gondii*.

Segundo Liu e colaboradores (2012) métodos moleculares são utilizados em adição aos métodos sorológicos convencionais para o diagnóstico de toxoplasmose. Métodos convencionais geralmente não são enganosos, mas são limitados em casos pré-natais ou em pacientes imunocomprometidos. Por exemplo, uma infecção recente pode ser diagnosticada em uma gestante através de sorologia. Neste caso potencialmente em risco de infecção congênita, mas os resultados da sorologia não podem confirmar se o parasito foi transferido para o bebê. No entanto técnicas de diagnóstico molecular podem fazê-lo. O primeiro método de PCR para detecção de *T. gondii*, visando o gene B1 foi estabelecido por Burg e colaboradores em 1989. O gene B1 tem sido utilizado como um marcador genético no diagnóstico de *T. gondii* em amostras de tecidos possui um tamanho de 2,2Kb e 35 cópias no genoma. O uso deste gene como marcador possui uma altíssima eficiência pela técnica de PCR, possibilita a detecção do DNA correspondente a apenas um parasito presente em um lisado celular junto a 100 mil células humanas. (Burg, *et al* 1989). Os resultados mostraram ainda que este gene possuía uma região altamente conservada em todas as cepas testadas. Em estudos realizados por Wong e colaboradores (1993), foi mostrado que a sensibilidade e a especificidade da PCR amplificando o gene B1 de parasitos presentes no líquido amniótico foram ambas de 100%, em contraste com a inoculação de sangue fetal ou líquido amniótico em camundongos e culturas. A possibilidade de realizar a PCR para detectar *T. gondii* em sangue humano, como teste diagnóstico revolucionou o diagnóstico pré-natal de toxoplasmose congênita, uma vez que diminui o uso de métodos invasivos ao feto (Kompalic-Cristo, *et al.*, 2005).

#### 1.6.2 Tripanossomíase americana

A tripanossomíase americana é popularmente conhecida como doença de Chagas e é causada pelo *T.cruzi*, protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Ferreira *et al* 2014). No sangue dos vertebrados, o *T.cruzi* se apresenta sob a forma de tripomastigota e, amastigotas. Nos triatomíneos reduvídeos (insetos vetores), ocorre a transformação dos tripomastigotas em epimastigotas, a forma multiplicativa se diferencia em tripomastigota metacíclico, que são as formas infectantes acumuladas nas fezes do inseto. A Tripanossomíase destaca-se entre as doenças parasitárias pelas graves consequências que causam ao homem, como a cardiopatia chagásica, caracterizando a fase crônica da doença. A doença é considerada endêmica em países das Américas do Norte e Sul provocando morbidade e mortalidade

em alguns casos (Marcelo *et al.* , 2009). Atualmente, a Tripanossomíase afeta aproximadamente de 8-10 milhões de pessoas, sendo ainda uma ameaça constante para cerca de 28 milhões de pessoas no Cone Sul (OMS, 2007; revisto por Rassi *et al.*,2012).



Fonte: CDC - Centers for Disease Control and Prevention

Figura 3- Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*:

O ciclo inclui dois tipos de hospedeiros; primeiro é um inseto hemíptero e hematófago, popularmente conhecido como barbeiro (triatomíneo) e, o segundo, um mamífero reservatório que podem pertencer a diversas classes como marsupiais e outros roedores (Deane *et al.*, 1984). Triatomíneo infectado ao fazer o repasto sanguíneo, libera tripomastigotas metacíclicos nas fezes, próximo ao local da picada. Tripomastigotas entram no hospedeiro através da ferida ou através das mucosas, tal como a conjuntiva. 2- Dentro do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas invadem as

células perto do local da inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. **3-** e **4-** Os amastigotas se multiplicam por divisão binária e se diferenciam em tripomastigotas. Em seguida, são liberados na circulação como tripomastigotas. Tripomastigotas infectam as células de diferentes tecidos e transformam em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção. **5-** Tripomastigotas são ingeridos pelo triatomíneo durante o repasto sanguíneo. **6-** Nos triatomíneos, os tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no intestino médio do vetor. **7-** Os parasitos se multiplicam e se diferenciam no intestino médio em formas intermediárias e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infecciosos no intestino grosso. (Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>).

#### 1.6.2.1 Incidência de infecção oral causada pelo protozoário *T. cruzi*

Na região Norte do Brasil, a via oral tem assumido importância maior, principalmente em razão de sua associação com microepidemias (Calvo-Mendez *et al* 1994). Na transmissão oral, a ingestão de formas tripomastigotas metacíclicos de *T.cruzi* presentes em diferentes alimentos é fonte da contaminação (Camandaroba *et al.*, 2002). A partir de 2007, na região Norte, microepidemias de doença de Chagas aguda têm sido associadas à veiculação do *T. cruzi* pela polpa de açaí. Nesses surtos, as principais hipóteses foram a contaminação dos frutos ou da polpa por dejetos de animais reservatórios ou triatomíneos infectados, (Barbosa, *et al.*, 2012). Passos, *et al.* (2012) mostrou que a transmissão oral de tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi* ocorreu através da ingestão da poupa de açaí experimentalmente contaminada. Mesmo após submissão a variações de temperatura o protozoário mantém capacidade de causar danos à saúde do consumidor deste produto. Na Amazônia brasileira, a presença de Tc I e Tc IV tem sido relatada em humanos com doença de Chagas adquirida oralmente (Marcili *et al.*, 2009). O *T.cruzi* também pode ser transmitido através de transfusões de sangue, transplante de órgãos, via transplacentária, e em acidentes de laboratório (Chieffi, Amato Neto, 2000).

#### 1.6.2.2 Aspectos epidemiológicos da doença de Chagas.

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, causa no homem quadros clínicos com características e consequências muito variadas, destacam-se por sua gravidade na fase crônica sintomática, a cardiopatia chagásica e dilatações no esôfago e cólon. Esta tripanossomíase é endêmica nos países da América Latina, estendendo-se desde o norte do México até o sul da Argentina e é a causa de muitos casos de morbidade e mortalidade nestes países. Atualmente, a doença de Chagas afeta aproximadamente de 8-10 milhões de pessoas, sendo ainda uma ameaça constante para cerca de 28 milhões de pessoas no Cone Sul (OMS, 2007; revisto por Rassi Jr *et al.*, 2012).

### 1.6.2.3 Fase e forma clínica da doença.

A transmissão da doença de Chagas ocorre principalmente pelo vetor, devido à coabitação entre o vetor infectado e seres humanos (principalmente em áreas rurais endêmicas), por transfusão sanguínea e transplantes de órgãos, transmissão congênita (áreas rurais endêmicas e urbanas não endêmicas), por transmissão oral e através de acidentes de laboratório (casos mais raros) (Nickerson *et al.*, 1989), Em 2008, Yoshida descreveu, através de estudos de infecção experimental por *T. cruzi* pela via oral, a rota das formas tripomastigotas metacíclicas inoculadas oralmente, que escapam da ação do suco gástrico protegendo-se na camada de mucina e atravessando a mucosa gástrica.

### 1.6.2.4. Diagnóstico da doença de Chagas.

São muitos os tipos de diagnósticos que podem auxiliar na identificação da presença parasitária, desde os mais comuns como o diagnóstico sorológico, o xenodiagnóstico, hemocultura até os mais sensíveis como diagnóstico molecular que oferece maior exatidão ao resultado obtido.

#### Diagnóstico sorológico.

O diagnóstico laboratorial por métodos sorológicos é ainda o mais eficiente, rápido e econômico na prática diária; todavia, existem outros métodos para estabelecer o diagnóstico de etiologia chagásica indicados na fase aguda, na transmissão transfusional ou na congênita. Nestas circunstâncias, o exame parasitológico é mais importante. (DIAS e COURA,.,1997).

#### Diagnóstico molecular da doença.

O par de iniciadores TCZ-1 e TCZ-2, utilizados na técnica de PCR para a detecção de DNA específico de *T. cruzi*, são capazes de detectar todas as linhagens de *T. cruzi* (Carriazo, C. S. et al., 1998). TCZ-1 e TCZ-2 amplifica um conjunto contíguo de segmento de 188 pb de sequências de DNA repetitivas em série, isto é, no mesmo cromossomo (Gilber *et al.*, 2013). Testes de sensibilidade anteriores demonstraram que a sequência TCZ é capaz de detectar frações (aproximadamente 2 fg) de um único parasita (cerca de 200 fg). Schijman, *et al.*,.(2011) descreve que ensaios de PCR, em tempo real ou convencional geralmente têm como alvo a cinetoplastia DNA (mitocondrial) (KDNA, também conhecido como o minicírculo) ou DNA nuclear (nDNA, também conhecido como região TCZ minissatélite), que estão presentes em cópias (repetidas 100.000 vezes em cada parasita). A presença de múltiplos alvos aumentam significativamente a sensibilidade do teste.

## JUSTIFICATIVA

Projetos científicos utilizam camundongos em ensaios com diferentes patógenos, gerando carcaças de animais infectadas e com potencial risco de disseminação de microrganismos para seres vivos e ao meio ambiente. Nesta perspectiva, fica claro a necessidade de identificar métodos eficazes e acessíveis para inativação destes microrganismos na fonte geradora de resíduos.

Tendo em vista os obstáculos que tornam a inativação de carga parasitária um desafio crescente e o número alto de animais envolvidos em experimentos, há grande necessidade de se desenvolver um estudo voltado à inativação e ou redução da carga parasitária, em carcaças de camundongos e sem geração de novos resíduos. Para tal, este trabalho visa comprovar se há eficácia na aplicação do desinfetante de uso comercial Lysoform® bruto (BOMBRIL S.A) associado ao congelamento a -20°C por 48 horas e se, esta metodologia serviria como alternativa à incineração ou autoclavação das carcaças. Este procedimento vem sendo utilizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer como forma de redução da carga parasitaria dos patógenos utilizados pelos grupos desta unidade.

## 2. Objetivos

### Objetivo Geral:

Verificar a eficiência de métodos alternativos para inativação de patógenos de Nível de Biossegurança A2. *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi* em carcaças de camundongos infectados

### 2.1 Objetivos específicos:

A- Analisar a presença ou viabilidade de parasitos em camundongos suíços Webster e Balb-C saudáveis, inoculados com amostras oriundas de carcaças nas seguintes condições: imersas ou não em Lysoform® por 6 ou 24h; congeladas a - 20°C, a partir de material obtido de:

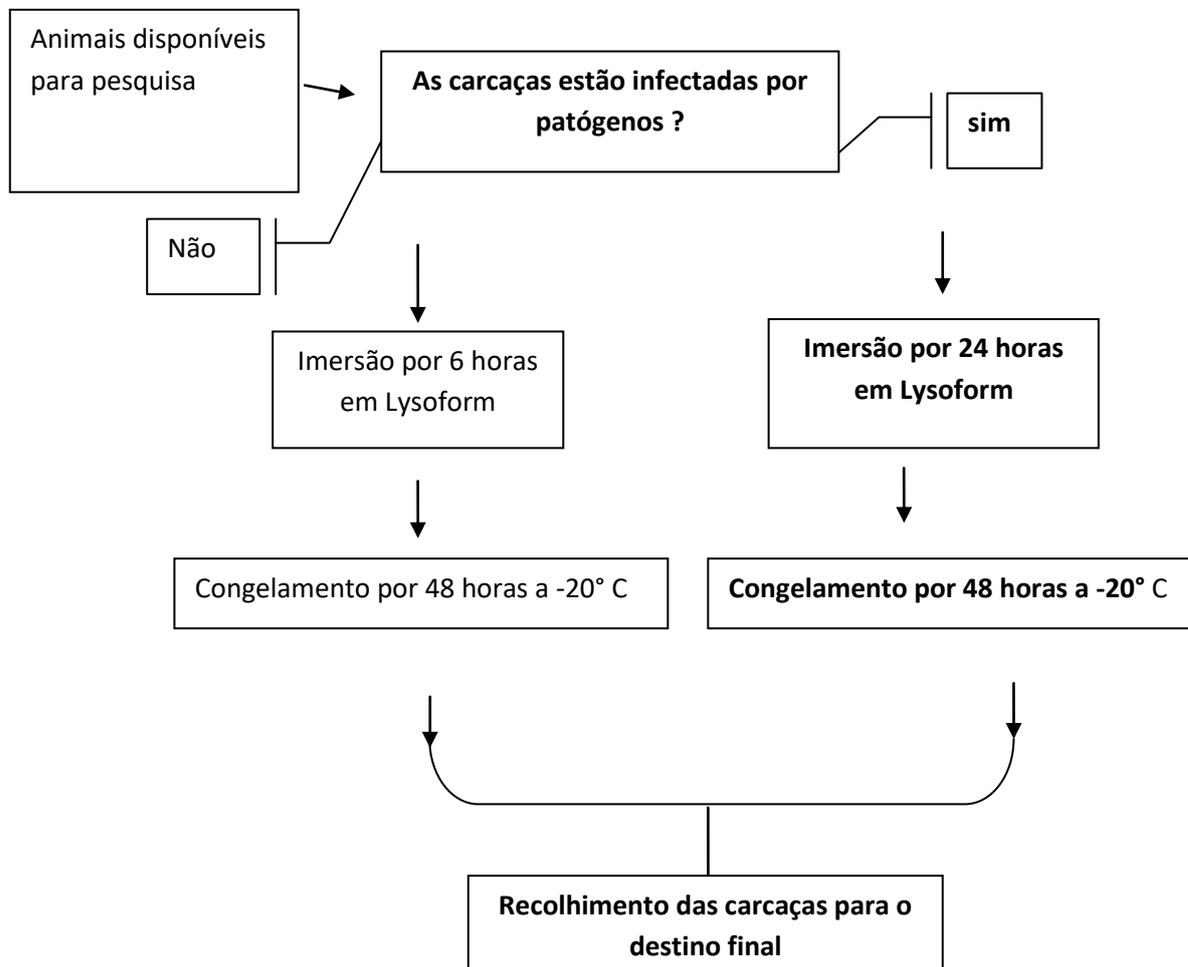
Macerado de baço e fígado de animais previamente infectados com *T.gondii*;

Macerado de coração, baço e fígado de animais previamente infectados com *T.cruzi*, verificando a proliferação parasitária no sangue, no lavado da cavidade peritoneal e em órgãos como cérebro, pulmão, baço, fígado e coração, através da microscopia óptica e análise de DNA.

B- Estabelecer Protocolo Operacional Padrão para o descarte de carcaça infectada com protozoários patogênicos, sem gerar resíduo químico nocivo ao meio ambiente.

### 3- MATERIAL E MÉTODOS

#### FLUXOGRAMA 1 – Separação e tratamento para carcaças usadas na pesquisa



### 3.1. Animais

Camundongos das linhagens Suíços Webster e Balb-C foram mantidos em estantes ventiladas AL 20 INTELIGENT CONTROL (ALESCO), sob condições controladas de filtração ar, luminosidade (ciclo 12/12h) e temperatura, recebendo ração e água *ad libitum* (CONCEA, 2013). Todos os procedimentos realizados com animais oriundos de experimentos desenvolvidos no LUCHM do IBCCF foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde - CEUA – UFRJ. (IBCCF 208 - 09/16- *Toxoplasma gondii*; IBCCF 106-08/16- *Trypanosoma cruzi*). Este estudo recebeu aprovação do CEUA--UFRJ Licença nº 044/16.

### 3.2. Protocolos de manutenção dos animais infectados e obtenção protozoários utilizados neste estudo.

#### 3.2.1 Protocolo de manutenção para cepa RH de *Toxoplasma gondii*.

Forma taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*, utilizados em experimentos de fase aguda da infecção, foram mantidos em camundongos Suíços Webster com 25 a 30 dias de idade através de inoculação via intraperitoneal, de  $1 \times 10^5$  taquizoítas diluídos em 200 µl de solução de Hanks. (Thermo). Após 48 horas de inoculação em camundongos suíços, seguindo as orientações das diretrizes da prática de eutanásia descritas pelo CONCEA (2013), os camundongos foram eutanasiados e realizado o lavado intraperitoneal com a injeção de 3 mL de solução de Hank's® (Gibco) no peritônio e posterior recolhimento do lavado para confirmação da presença parasitária por microscopia óptica.

As carcaças foram submetidas ao tratamento químico e físico como forma de verificar se o método alternativo à autoclavação se mostra eficaz para a inativação de protozoários em carcaças de camundongos infectados com *T. gondii* e *T. cruzi*. Foi avaliada a capacidade de inativação química do desinfetante comercial de uso geral Lysoform® associado ao congelamento a -20° C por 48 horas, para tal o desinfetante foi aplicado nas carcaças no momento do descarte em condições de integridade da pele sendo abertas representando animais que passam por procedimentos invasivos e

carcaças com a pele fechada representando animais que passam por procedimentos menos invasivos e tempos diferentes de imersão, seguidos ou não de congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 48 horas como descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Esquema da organização dos grupos de estudo *T.gondii* cepa RH

<b>Grupo (N=Número de animais)</b>	<b>Integridade da pele da carcaça<sup>1</sup></b>	<b>Tempo de imersão em Lysoform® (horas)<sup>2</sup></b>	<b>Tempo de congelamento <math>-20^{\circ}\text{C}</math> (horas)<sup>3</sup></b>	<b>Dias de observação<sup>4</sup></b>
<b>1 N=6</b>	pele aberta	6	0	5-7
<b>2 N=6</b>	pele fechada	6	0	5-7
<b>3 N=6</b>	pele aberta	24	0	5-7
<b>4 *N=12</b>	pele fechada	24	0	20
<b>5 *N=12</b>	pele fechada	6	48	20
<b>6 *N=12</b>	pele aberta	6	48	20
<b>7 *N=12</b>	pele fechada	24	48	20
<b>8 *N=12</b>	pele aberta	24	48	20

Na tabela acima é mostrada a organização de cada grupo de estudo, “n” indica o número de animais utilizados no estudo; a variável <sup>1</sup>“ Integridade das carcaças” mostra a condição aberta ou fechada da carcaça submetida ao tratamento; a variável <sup>2</sup>“ Tempo de imersão” se refere ao tempo de tratamento por 6 horas ou 24 horas; a variável <sup>3</sup>“ Tempo de congelamento” se refere ao tempo mínimo de congelamento recomendado; a variável <sup>4</sup>“ Dias de observação” informa a sobrevivência dos bioensaios dentro das condições ideais recomendadas pela CEUA - UFRJ. \*= Ensaios em duplicata.

### 3.2.2 Protocolo de manutenção para cepa ME49 de *T.gondii*.

A forma cística da cepa Me49 de *T. gondii*, utilizada em experimentos na fase crônica, foi mantida em camundongos Suíços Webster com 30 a 180 dias de idade, os animais foram eutanasiados seguindo as orientações das diretrizes da prática de eutanásia descritos pelo CONCEA (2013), os animais foram fixados em placa de cortiça destinada para este procedimento, com par de pinças adequadas, foi aberto o couro da região do crânio em seguida inserida tesoura na região da base do crânio e aberta de forma suficiente para remoção do cérebro, que depois de retirado foi depositado em tubo de centrifuga 5 ml (eppendorf), contendo solução tampão fosfato salino PBS pH 7,2 sendo lavado por 3X, o cérebro sem resíduos de outros fluidos foi passado sequencialmente em agulhas (BD de 18, 20, 22, 25 e 27 G.), uma alíquota de 10µl do macerado do cérebro, foi colocada na interface entre lâmina (26 X 76 mm) e lamínula (18 X 18mm) e observada em microscópio óptico (objetiva 40X), após a confirmação da presença cística a amostra foi quantificada e reservada para novos inóculos através de passagens por gavagem em volume de cistos e quantidade de animais estabelecidos no estudo (tabela 3) ou para futuras manutenções de cepas cistogênicas como a cepa Me49.

Tabela 3 – Esquema da organização dos grupos de estudo *T.gondii* cepa Me49.

<b>Grupo (N=Numero de animais)</b>	<b>Integridade da carcaça</b>	<b>Tempo de imersão em Lysoform®</b>	<b>Tempo de congelamento em -20°C</b>	<b>Dias de observação</b>
1 N=12	Carcaça fechada.	24H	48H	20
2 N=12	Carcaça aberta	24H	48H	20

Na tabela acima é mostrada a organização de cada grupo de estudo, “n” indica o numero de animais utilizados no estudo em duplicata; a variável “Integridade das carcaças” mostra a condição aberta ou fechada da carcaça submetida ao tratamento; a variável “Tempo de imersão” se refere ao tempo de

tratamento por 24 horas; a variável “Tempo de congelamento” se refere ao tempo mínimo de congelamento recomendado de 48 horas; a variável “Dias de observação” informa a sobrevivência dos bioensaios dentro das condições ideais recomendadas pela CEUA-UFRJ.

### 3.2.3 Protocolo de manutenção para cepa Y de *T.cruzi*

A cepa Y de *T. cruzi* foi mantida em camundongos Balb-C com idade de 25 a 40 dias. Camundongos da linhagem Balb-C foram inoculados pela via intraperitoneal com alíquotas contendo  $1 \times 10^5$  tripomastigotas de *T.cruzi* (cepa Y). A infecção foi monitorada pelo método *Pizzi-Brenner*, que consiste em observar a presença parasitária, colocando o camundongo infectado em caixa de contenção, com a cauda para fora, massageando a cauda no sentido da base para a ponta, com um corte de 1 mm na ponta da cauda deixando o sangue escorrer formando uma gota sobre a placa de Petri, foi colocada a primeira gota, que normalmente é desprezada (ou utilizada para fazer uma lâmina de esfregaço sanguíneo), e colocada à segunda gota. Foram coletados 10  $\mu$ l da segunda gota entre lâmina (26 X 76 mm) e lamínula (18 X 18 mm) e observado em microscopia óptica (objetiva 40 X), o número de parasitas móveis em cinquenta campos aleatoriamente observados, cobrindo toda a área da lamínula foram quantificados e reservados para o procedimento. Os animais foram eutanasiados seguindo as orientações das diretrizes da prática de eutanásia descritos pelo CONCEA (2013), os animais foram afixados em placa de cortiça destinada para este procedimento, com a região torácica para cima, a agulha 21 G (BD) conectada a seringa 1 ml (BD) foi introduzida na região do tórax e aplicada punção intracardíaca, o sangue foi aspirado lentamente para obtenção de maior volume sanguíneo reservado para novos inóculos e outros procedimentos descritos na tabela 4. As carcaças foram submetidas às condições de imersão por 6 ou 24 horas seguidas de 48 horas com ou sem congelamento a  $-20^\circ \text{C}$ , com couro fechado na região abdominal mimetizando os procedimentos aplicados em manutenção de cepas de *T.cruzi*.

Tabela 4. Esquema da organização dos grupos de estudo *T. cruzi* cepa Y.

Grupo (N=Numero de animais)	Integridade da carcaça	Tempo de imersão em Lysoform®	Tempo de congelamento em -20° C	Dias de observação
1 N=12	Carcaça fechada.	6	0	20
2 N=12	Carcaça aberta	24	48	20
3 N=12	Carcaça aberta	6	0	20
4 N=12	Carcaça fechada	24	48	20

Na tabela acima é mostrada a organização de cada grupo de estudo, “n” indica o numero de animais utilizados no estudo em duplicata; a variável “Integridade das carcaças” mostra a condição aberta ou fechada da carcaça submetida ao tratamento; a variável “Tempo de imersão” se refere ao tempo de tratamento por 6 horas ou 24 horas; a variável “Tempo de congelamento” se refere ao tempo mínimo de congelamento recomendado; a variável “Dias de observação” informa a sobrevivência dos bioensaios dentro das condições ideais recomendadas pela CEUA-UFRJ.

### **3.3 - Reaproveitamento das carcaças de camundongos infectados com *T.gondii* e *T.cruzi* e extração de órgãos e tecidos.**

Após o tratamento com Lysoform® como descrito 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3 as carcaças infectadas distribuídas nos grupos descritos nas tabelas 2, 3 e 4 quando necessário foram descongeladas em temperatura ambiente, e abertas para extração de órgãos considerados sítios de infecção como o baço, fígado e cérebro. Estes órgãos, foram colocados individualmente em tubos cônicos estéreis (Eppendorf) e adicionado contendo 3 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a e lavadas 4 vezes. Este procedimento foi realizado para remover o Lysoform Bruto® dos tecidos, minimizando os possíveis efeitos tóxicos do desinfetante Lysoform ® nos animais que receberam o inóculo.

### 3.4. Bioensaio

Os tecidos extraídos de carcaças infectadas experimentalmente, foram macerados através de passagens sucessivas por agulhas hipodérmicas de calibres 18G, 20 G e 22 G (BD). O macerado obtido foi então inoculado pela via intraperitoneal em animais sadios entre 4 e 6 semanas com peso aproximado de 18 a 20 gramas. Este procedimento foi realizado para as amostras provenientes das carcaças infectadas com *T. gondii* e *T. cruzi*. Os animais inoculados foram devidamente separados em grupos referentes ao órgão e protozoários do estudo e permaneceram em estante ventilada AL 20 (ALESCO), sob condições controladas de filtração ar, luminosidade (ciclo 12/12h), temperatura e recebendo ração e água *ad libitum*, em um total de 4 animais por gaiola por até 20 dias de observação. Durante o período de observação os bioensaios inoculados foram observados diariamente em busca de aspectos característicos de infecção parasitária aguda, como pelo eriçado, tremor e perda de peso. Os animais que apresentavam sinais de infecção aguda foram então eutanasiados em câmaras de indução priorizando o bem-estar animal nas devidas proporções de concentração de CO<sub>2</sub>. Os grupos de animais que não apresentaram sinais de infecção aguda foram observados por um período de até 20 dias após o inóculo. Ao término do tempo de observação, os animais inoculados foram eutanasiados e o fígado removido, 25mg do órgão foi submetido à extração de DNA genômico utilizando o kit “*Tissue and blood DNA extraction*” (Qiagen®). A extração ocorreu conforme o protocolo do fabricante. O DNA obtido foi quantificado em pequenos volumes através de espectrofotometria realizada no aparelho NANO VUE *Plus New* (General Eletronics®) e o restante da amostra estocada à -20° C até o uso.

#### 3.4.1 Observações de viabilidade parasitária através da microscopia óptica.

Nas etapas iniciais de cada ensaio a confirmação da infecção dos protozoários em estudo foram fundamentais para o reaproveitamento das carcaças infectadas por *T.gondii* cepas RH e Me49 e *T.cruzi* cepa Y, grupos de animais infectados que serviram de hospedeiros para os protozoários em manutenção de cepas foram selecionados para

posterior utilização dos órgãos servindo como amostras de controle positivo e posterior tratamento nas condições propostas neste estudo. Antes de submeter ao tratamento por métodos químicos foram confirmadas por microscopia óptica a presença dos protozoários de *T. gondii*, a forma cística da cepa Me49 extraída do cérebro e a forma taquizoíta da cepa RH dispersa no lavado intraperitoneal de carcaças infectadas. Ao confirmar a presença dos protozoários as carcaças foram submetidas a condições de tratamento propostas nas tabelas 2 e 3 e posteriormente inoculadas em bioensaios. Para os ensaios iniciais com a cepa Y de *T. cruzi* foram obtidos tripomastigotas sanguíneos através de punção cardíaca (descrita no item 3.2.3) em volume médio de 800 µl, centrifugados e inativados em SFB (GIBCO), os protozoários obtidos foram inoculados por via intraperitoneal em novos camundongos Balb-C, as mesmas carcaças infectadas foram reservadas sem imersão em Lysoform® em temperatura ambiente por 24 h. Amostras do fígado extraído das carcaças infectadas foram inoculado em bioensaios como descrito no item 3.2.3, os animais foram observados segundo critério descrito na tabela 4.

### **3.5. Investigação da presença parasitária nos órgãos extraídos dos animais do bioensaio por meio da Reação da Cadeia Polimerase - PCR.**

3.5.1 Extração de DNA de órgãos e tecidos para identificação dos melhores sítios de infecção.

Após definição do protocolo de tratamento para carcaças infectadas descritos nas tabelas 2, 3 e 4 foi realizado teste para eleger qual sítio de infecção atenderia melhor o estudo, possibilitando realizar análises com os órgãos baço, cérebro e fígado e realizada a extração de DNA com o kit DNeasy® Blood & Tissue (QUIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. o DNA obtido da extração, no espectrofotômetro NANO VUE plus new (General Eletronics®) e o restante da amostra estocada à -20° C até o uso.

3.5.2 Investigação da presença parasitária nos órgãos do bioensaio por meio de PCR.

A PCR é um procedimento que possibilita a amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA específicos, partindo-se de uma quantidade mínima de DNA alvo ou de RNA previamente convertido em cDNA ((AUSUBEL, et al., 2003; WEAVER,2001).). Para a

aplicação da técnica, são necessários três segmentos de ácidos nucleicos: a dupla fita de DNA para servir de molde e a construção de dois oligonucleotídeos (*primers*) específicos de fita simples e complementares as duas fitas molde de DNA -, desenhados de modo a flanquear a sequência a ser amplificada. Além disso, são necessários DNA polimerase, dNTPs, tampão e sais. (AUSUBEL, et al., 2003; WEAVER, 2001). A técnica de PCR foi utilizada para a verificação da presença dos parasitas, através da detecção de seu DNA utilizando iniciadores específicos para cada respectivo parasita, a partir da extração de DNA dos tecidos de todos os animais do bioensaio descrito acima. O objetivo da aplicação da técnica de Reação da Cadeia Polimerase neste estudo foi produzir amplificação em quantidade detectável do DNA específico dos protozoários *T. cruzi* e *T.gondii* de modo que essas amostras comprovem a presença ou ausência dos protozoários em amostras de tecido dos animais do bioensaio.

### 3.6 Protocolos aplicados para amplificação de DNA para *T. gondii*.

Para amostras de *T.gondii* foi utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores para o gene B1 conservado em diferentes cepas do parasito presente em 35 copias do genoma segundo Burg e colaboradores (1989). Para amplificação das amostras obtidas de carcaças infectadas com *T.gondii* foram utilizados dois iniciadores gene B1. O gene B1 foi isolado como descrito por Boothroyd, e colaboradores (1989). O par de iniciadores utilizados neste estudo esta descrito na tabela abaixo.

Tabela 5- Iniciadores utilizados para amplificação do DNA de amostras infectadas por *T. gondii*

<i>Toxoplasma gondii</i>			
Iniciador	Sequência	Origem DNA	Pares de base
B1 F	GGAAGTGCATCCGTTTCATGAG	Genômico	193
B1 R	TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC	Genômico	193

Origem: B1=genômico; tamanho aproximado dos *amplicons*.

As amostras foram amplificadas em 25 µl de mistura de reação contendo 100 ng de DNA de cada amostra de bioensaio, 1 µl cada iniciador, H<sub>2</sub>O qsp para 12,5 µl, e 12,5 µl Go Taq® Green Master Mix (Promega). Com adaptações do protocolo descrito por

Pujol-Riqué et al. (1999), Foi programado para realização da PCR uma desnaturação inicial (95 ° C durante 3 min.) seguido de 30 ciclos de desnaturação (94 ° C, 30 seg.), alongamento (65 ° C, 30 seg.) e extensão (72 ° C, 1 min.) (Fig. 4), além de uma extensão final executada a 72 ° C por 10 min. Produzindo bandas de 193 pares de base previstos por Jones, e colaboradores (2000).

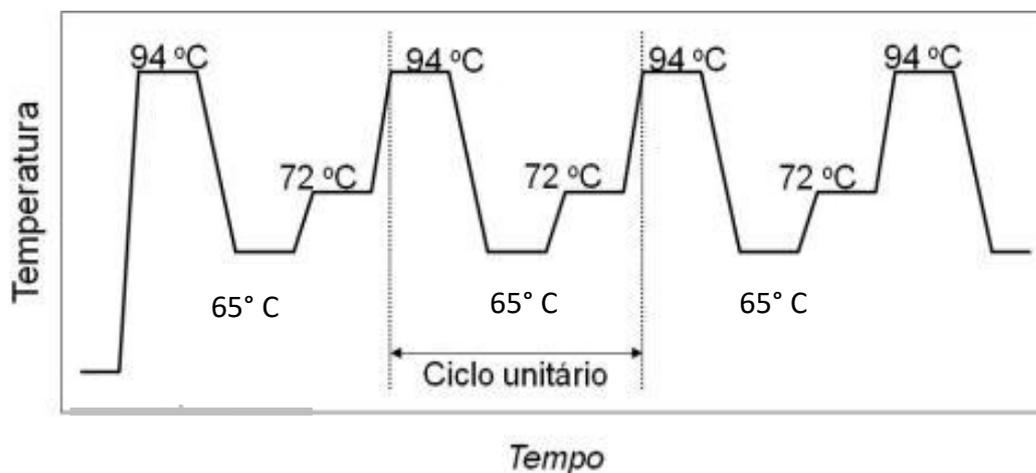


Figura 4: Alternância de temperaturas em cada ciclo utilizando o iniciador B1:

- Desnaturação a 94°C = separação da fita dupla de DNA molde em duas fitas simples;
- Anelamento a 65°C = iniciadores se ligam aos sítios específicos na fita simples;
- Extensão a 72°C: DNA polimerase acrescenta dNTPs à fita, de acordo com o pareamento de bases. Adaptado de J.M. Butler (2005).

Após amplificação, 20 µl de cada produto da reação de PCR foram aplicados em poços de um gel de agarose a 1,5% (p/v), em tampão TAE 1X (Tris 0,48% (p/v); EDTA dissódico 0,5 M a 0,2% (v/v) e ácido acético a 0,11% (v/v)) em água bidestilada e submetidos à eletroforese a 100 V. A eletroforese do produto de PCR foi realizada em um gel de 1,5% de agarose visualizada com intercalante para DNA Brometo de Etídio - EtBr, através de Ultra- Violeta. (NASCIMENTO *et al.* 1999; SOUZA, 2003).

### 3.6.1 Protocolos aplicados para amplificação de DNA para *T. cruzi*.

Para amostras de *Trypanosoma cruzi* foi utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores para o TCZ 1 e TCZ 2. Para amplificação das amostras obtidas de carcaças infectadas com *T.cruzi* foram utilizados dois iniciadores TCZ 1 e TCZ 2 de origem

nuclear como descrito Moser e colaboradores (1989). O par de iniciadores em utilizados neste estudo estão descritos na tabela 3.

Tabela 3- Iniciadores utilizados para amplificação do DNA de amostras infectadas por *T. cruzi*.

*Trypanosoma cruzi*

<i>Iniciador</i>	Sequencia	Origem DNA	Pares de base
<i>TCZ 1</i>	CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT	Nuclear	188
<i>TCZ 2</i>	CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG	Nuclear	188

Origem: N= nuclear; - tamanho aproximado dos *amplicons*.

As amostras foram amplificadas em 25 µl de mistura de reação contendo 300 ng de DNA de cada amostra de bioensaio, 1µl cada iniciador TCZ 1 e TCZ 2, H<sub>2</sub>O qsp. para 12,5 µl, e 12,5 µl Go Taq® Green Master Mix (Promega). Com adaptações do protocolo descrito por Moser e colaboradores (1989), Foi programado para realização da PCR uma desnaturação inicial (94° C durante 10 minutos) seguido de 30 ciclos de desnaturação (94° C, 30 segundos), alongamento (55° C, 30 segundos) e extensão (72° C, 30 segundos), além de uma extensão final executada a 72° C por 10 minutos (Fig. 5). Produzindo bandas de 188 pares de base previstos por Moser e colaboradores (1989).

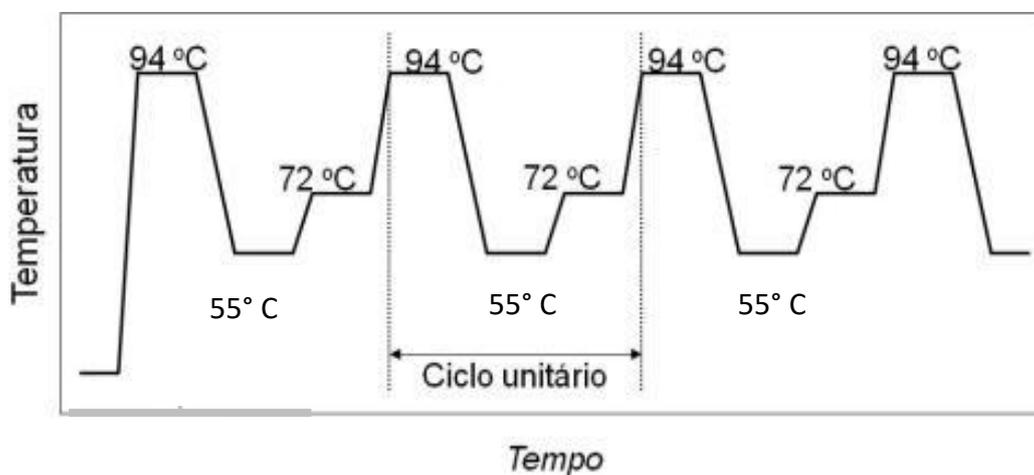


Figura 5: Alternância de temperaturas em cada ciclo utilizando par de iniciadores: TCZ 1 e TCZ 2. Desnaturação: 94° C = separação da fita dupla de DNA molde em duas fitas simples; Anelamento: 55° C = iniciadores se ligam aos sítios específicos na fita simples; Extensão: 72°C: DNA polimerase acrescenta os dNTPs à fita, de acordo com o pareamento de bases. Adaptado de J.M. Butler (2005).

Após amplificação, 20 µl de cada produto da reação de PCR foram aplicados em poços de um gel de agarose a 1,5% (p/v), em tampão TAE 1X (Tris 0,48% (p/v); EDTA dissódico 0,5 M a 0,2% (v/v) e ácido acético a 0,11% (v/v)) em água bidestilada e submetidos à eletroforese a 100 V. A eletroforese do produto de PCR foi realizada em um gel de 1,5% de agarose visualizada com intercalante para DNA Brometo de Etídio (EtBr) através de Ultra- Violeta. (NASCIMENTO *et al.* 1999; SOUZA, 2003).

## RESULTADOS

### 4.1 Caracterizações do estado geral dos animais envolvidos no estudo.

O aspecto geral dos animais saudáveis e infectados foi avaliado no início do estudo. Na figura 10 é possível observar diferenças entre o pelo do animal sadio (Fig. 10 A) e dos animais infectados de forma aguda com *T. gondii* (Fig. 10 B). Nos animais infectados se observa claramente o pelo eriçado (Fig. 10 B-D). Estes animais também apresentam olhos mais fechados quando comparados aos saudáveis (Fig. 10 D).

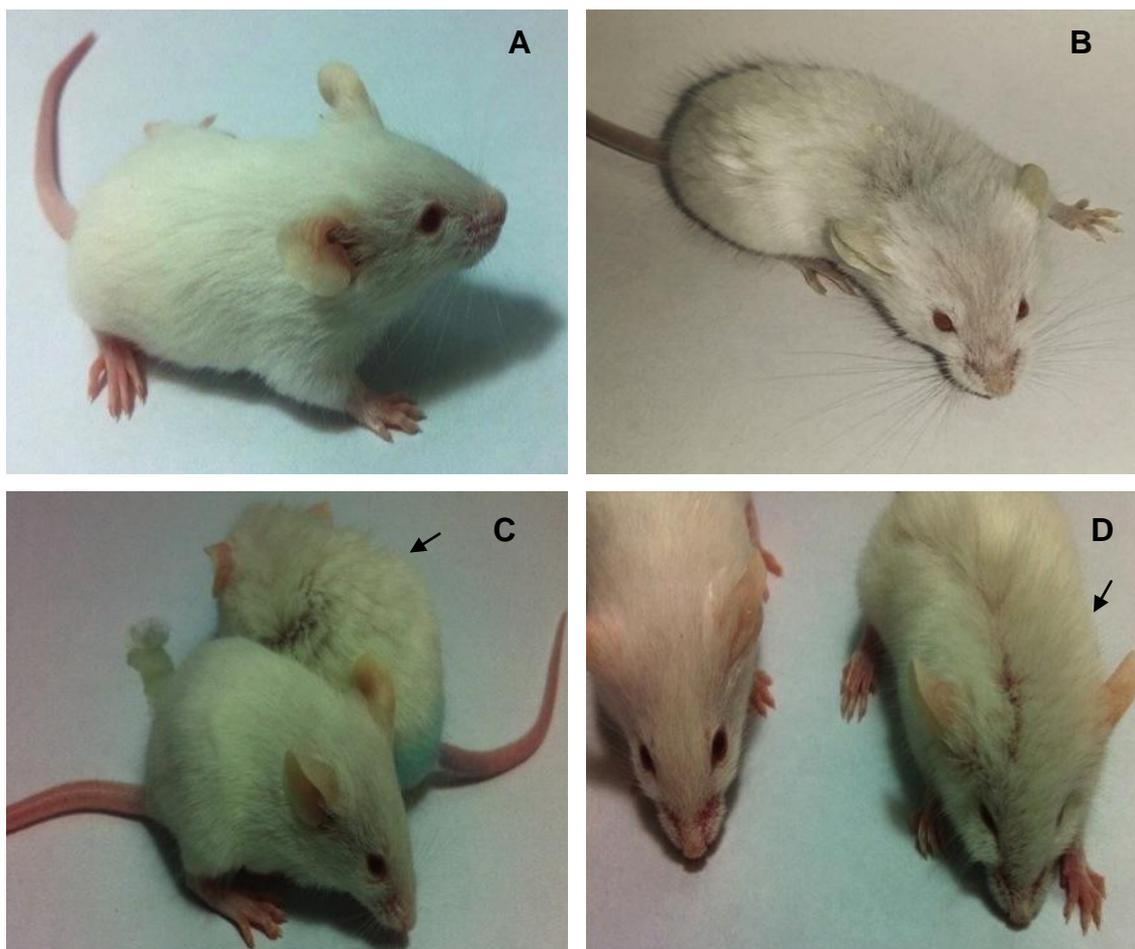


Figura 10 – A: Camundongo Suíço sadio antes do inoculo; B camundongo infectado com *T. gondii* cepa RH após 48 horas do inoculo via intraperitoneal; C, D - animais saudáveis e infectados (seta) dispostos lado a lado para comparação de características como pelos eriçados e diminuição da abertura dos olhos.

No caso dos animais infectados pelo *T. cruzi* o progresso da infecção também foi acompanhado pela visualização dos sintomas da infecção na pelagem ou comportamento (Figura 11). Neste caso os animais foram eutanasiados em sete dias pós-infecção. Assim, a presença de infecção foi avaliada mediante análise da parasitemia em camundongos Balb-C infectados.

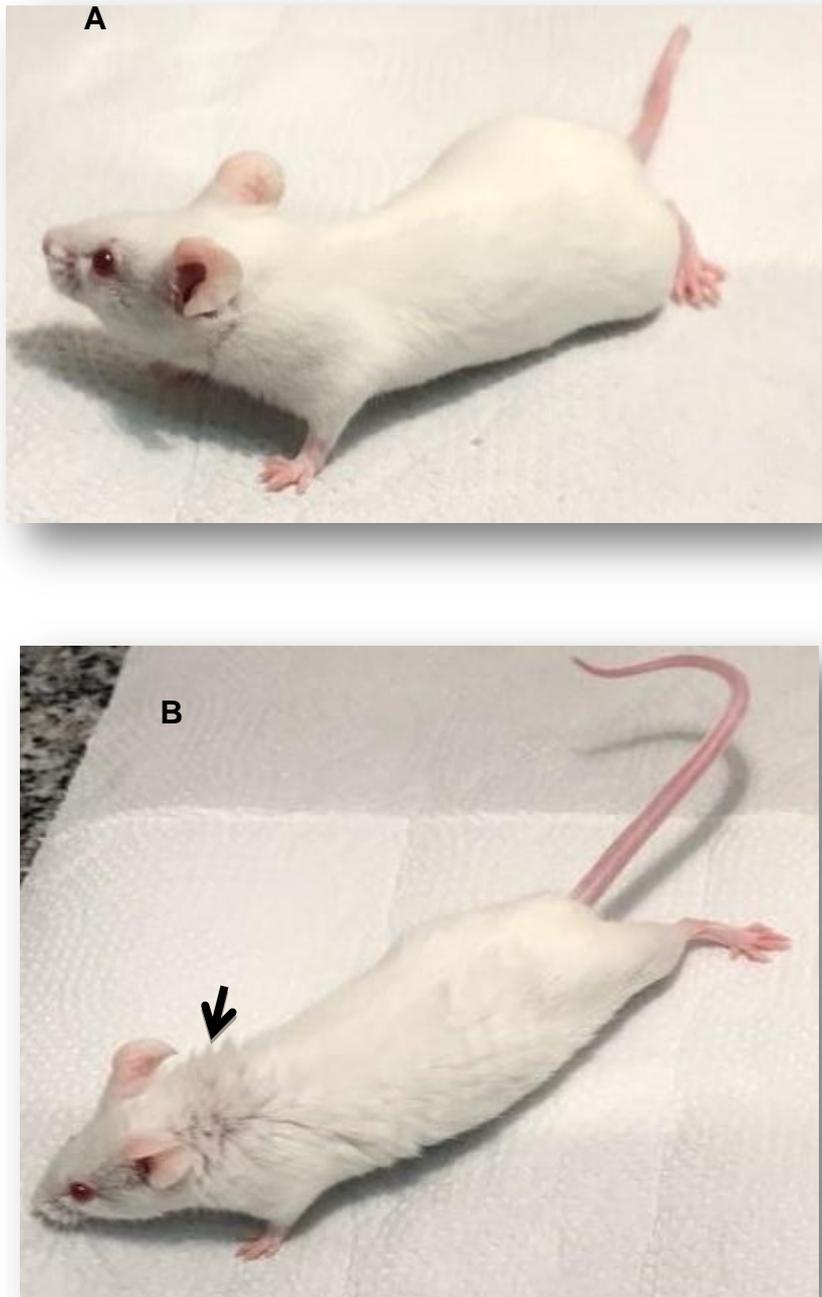


Figura 11- A Camundongos Balb-C sadios antes do inóculo; B camundongo Balb-C infectado via intraperitoneal após 5 dias do inóculo.

#### **4.2 - Confirmação da infecção e viabilidade de *T. gondii* cepa RH e Me49 e *T. cruzi* cepa Y em carcaças de camundongos previamente infectados.**

4.2.1 Infecção parasitaria em carcaças de animais previamente infectadas *T. gondii* cepas RH e Me49.

Para comprovar se os parasitos presentes nas carcaças frescas e sem qualquer tratamento são realmente viáveis e infecciosos, camundongos saudáveis foram infectados com macerado de fígado de carcaças de animais previamente infectados com *T. gondii* por 48 h (Bioensaio) conforme descrito em materiais e métodos. A infecção parasitária nos bioensaios foi então confirmada a partir da presença de taquizoítas no lavado intraperitoneal obtido do 5º ao 7º dias após inóculo (Figura 12 A). Já em relação aos animais infectados com a cepa Me49 de *T. gondii* foi observada a presença de cistos cerebrais nos animais infectados. Diferente da cepa RH, que é virulenta em camundongos, a cepa Me49 possui virulência intermediária e não causa uma infecção aguda com mortalidade rápida nos animais, mas sim uma infecção crônica que persiste por vários meses. Assim, para assegurar que os animais envolvidos neste experimento estavam positivos em relação à presença de cistos de *T. gondii*, um macerado de cérebro de camundongos infectados previamente com a cepa Me49, por dois meses, foi realizado e analisado por microscopia óptica, confirmando então a infecção por meio da presença de cistos cerebrais (Figura 12 B).

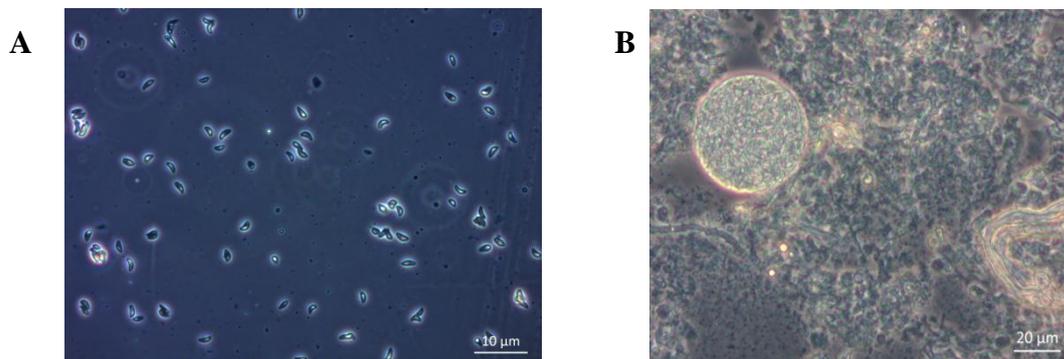


Figura 12 – Imagens de microscopia óptica de contraste de fases. A- taquizoítas de *T. gondii* da cepa RH em lavado intraperitoneal de camundongos suíços infectados com macerado de fígado extraído de carcaça de 6h, imagem B- cisto cerebral de *T. gondii* cepa Me49.

#### 4.2.2 - Confirmação da infecção pelo protozoário *T. cruzi* em animais por bioensaio e por microscopia óptica.

Neste experimento foi observada a presença de formas viáveis de *T. cruzi* em carcaças previamente infectadas com formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.

Como forma de atestar a presença de parasitos viáveis camundongos sadios foram inoculados com o macerado do fígado obtido das carcaças e a progressão da infecção foi acompanhada a partir da análise da parasitemia em alíquotas obtidas do sangue dos animais inoculados por um período de sete dias. O método *Pizzi-Brenner* (Descrição em materiais e métodos) foi aplicado para quantificação dos protozoários no sangue total e confirmou a presença de parasitos viáveis nos animais inoculados com o macerado de fígado (Fig. 13 A - B).

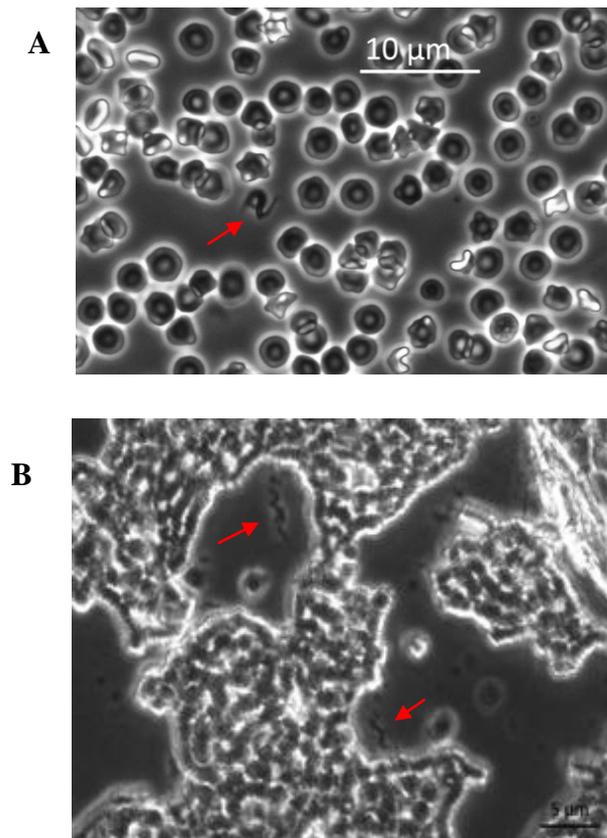


Figura 13 - Imagens de microscopia óptica de contraste de fase mostrando a presença de *T. cruzi* na forma de tripomastigota sanguíneo (setas em A e B) obtidos através de punção cardíaca e observado pelo método de *Pizzi-Brenner* em camundongos inoculados com macerado de fígado extraído de carcaça de 6h previamente infectada.

#### 4.3. Análise da inativação parasitária nas carcaças

A inativação dos protozoários parasitos nas carcaças infectadas submetidas às diferentes condições de tratamento através da imersão em Lysoform foi analisada realizando inicialmente bioensaio em animais sadios, os camundongos foram inoculados com diferentes macerados de fígado e cérebro infectados previamente pelos protozoários citados no estudo, estes órgãos são reconhecidos pela literatura como sítios de infecção

seguido da observação da presença de infecção aguda, crônica ou análise da presença do parasito a partir da amplificação do DNA por PCR. O par de iniciadores B1 aplicado para possíveis amplificações a partir de amostras obtidas de carcaças infectadas por *T. gondii* apresenta a sensibilidade de amplificar até 1 protozoário em um volume de cem mil células humanas (BURG *et al.* 1989), com alto grau de especificidade para uma região altamente conservada no DNA de diversas cepas de *T.gondii* (Wong e Remington 1993).

#### 4.3.1.1 Bioensaio com carcaças infectadas com a cepa RH de *T. gondii*

Camundongos saudáveis foram inoculados, com macerado de fígado provenientes das carcaças abertas e das carcaças fechadas, imersas em Lysoform® por 6 horas (**Grupos 1 e 2**, respectivamente), sem posterior congelamento, os animais do bioensaio apresentaram os primeiros sinais de infecção aguda a partir do 5º dia após o inoculo. A visualização de taquizoítas do *T.gondii* no lavado peritoneal do bioensaio do grupo 1 confirmou a presença de infecção aguda pelo *T. gondii* (Figura 14).

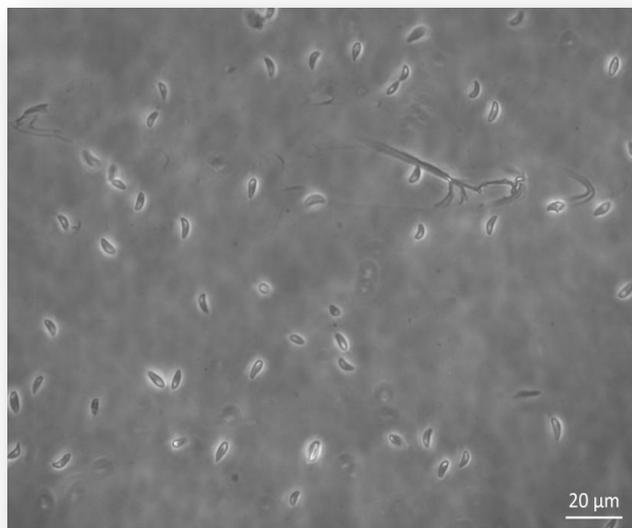


Figura 14 Microscopia óptica de contraste de fases mostrando a presença de taquizoítas no lavado peritoneal de camundongos que foram inoculados com macerado de fígado

proveniente de carcaças com o couro da região abdominal aberta, imersos por 6h, sem congelamento, referentes ao grupo 1 (M & M, Tab. 2).

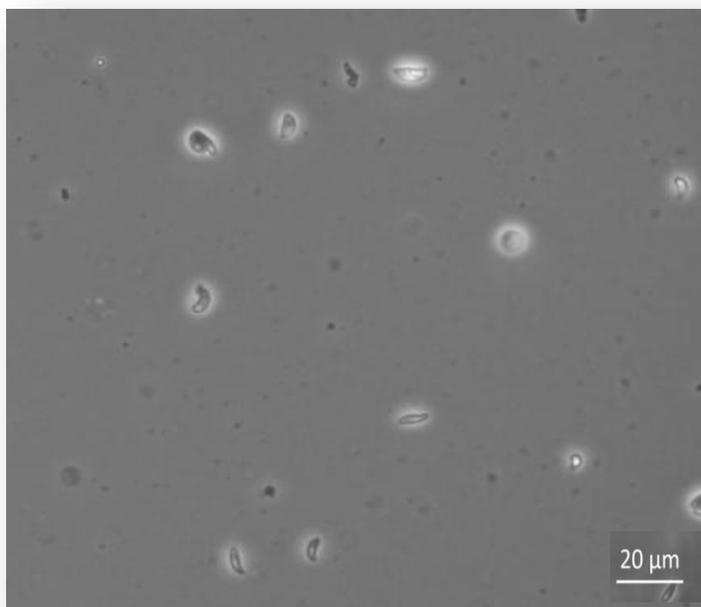


Figura 15 – Imagens de microscopia óptica de contraste de fase do lavado peritoneal de bioensaio do grupo 2 inoculado a partir de amostras extraídas da carcaça fechada.

Para o **Grupo 3** os bioensaios inoculados a partir de material extraído de carcaças abertas que foram tratadas com Lysoform® por 24 horas sem congelamento apresentaram baixa presença parasitária, porém os parasitos do lavado peritoneal foram infecciosos quando colocados para interagir com células epiteliais LLC-MK<sub>2</sub> por até 24h (Figura 16). Na figura 16 A e B observamos vários taquizoítas intracelulares (setas), mostrando a viabilidade destes parasitos.

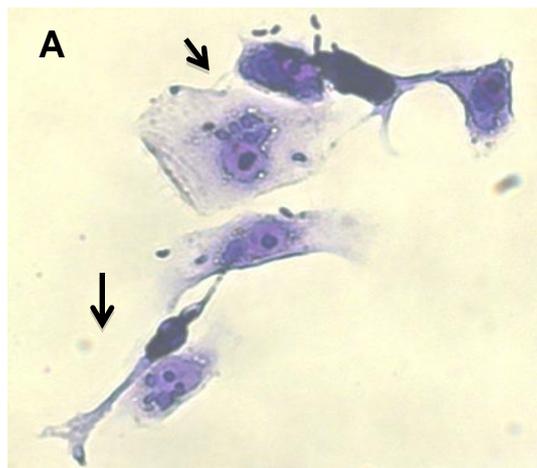


Figura 16 A - Interação após 12 horas

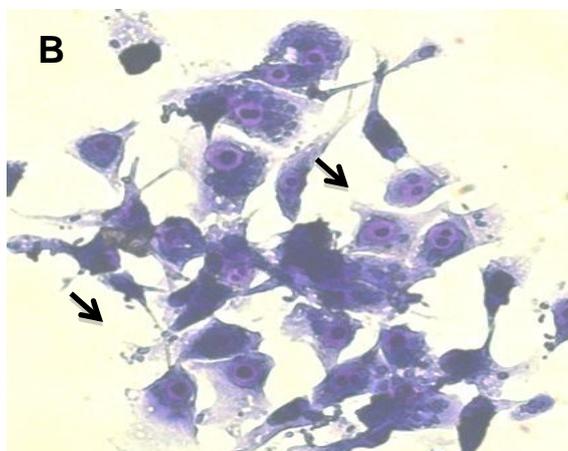


Figura 16 B: - Interação por 24horas.

Figura 16 – Imagens obtidas por microscopia de campo claro de células LLC-MK<sub>2</sub> coradas pelo “kit Panótico Rápido” em interação com taquizoítas de *T. gondii* obtidos de animais do bioensaio para observar a capacidade infectiva e proliferativa do parasito.

Em relação aos grupos 4 ao 8 os camundongos inoculados com macerado de fígado permaneceram vivos por 20 dias e não apresentaram sintomas de infecção aguda. Assim, a presença da infecção nestes animais foi verificada utilizando a metodologia da PCR utilizando os Iniciadores descritos em M&M. Como controles positivos foram utilizados amostras de fígado e baço de animais previamente infectados com a cepa RH de *T. gondii* sem qualquer tratamento com Lysoform® ou congelamento, e também taquizoítas isolados de peritônio. A amplificação do DNA extraído das amostras de fígado (Lane 4 na Figura 9) e baço (Lane 3 na Figura 9) por PCR originaram bandas em gel de agarose com o tamanho esperado (193pb), tal qual o DNA extraído de taquizoítas (Lane 2 na Figura 17).

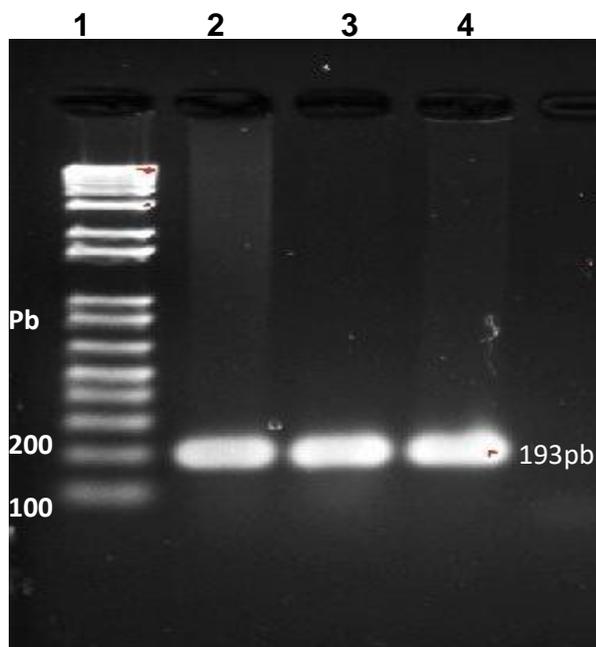


Figura 17 – Gel de agarose 1,5%, contendo produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores para o gene B1 de *T. gondii*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2.** DNA extraído de taquizoítas isolados de lavado peritoneal 193 pb. **3.** DNA extraído de amostra do baço. **4.** DNA extraído de amostra do fígado.

Como amostra de tecido para verificar a presença de parasitos viáveis nos bioensaios dos **Grupos 4-8** foi utilizado o fígado na análise da infecção da fase aguda da toxoplasmose, como descrito em M&M. Assim, o fígado extraído dos bioensaios inoculados a partir do **Grupo 4** (carcaças fechadas imersas por 24 horas em Lysoform® sem congelamento) o DNA extraído e posteriormente analisados por PCR. Enquanto amostras provenientes de 2 bioensaios não apresentaram amplificações (colunas 3 e 6 na Figura 18), amostras de 5 animais (colunas 4-5 e 7-9 na Figura 18) apresentaram amplificações correspondentes ao fragmento de 193pb característico do perfil de amplificação do gene B1 de *T.gondii*.

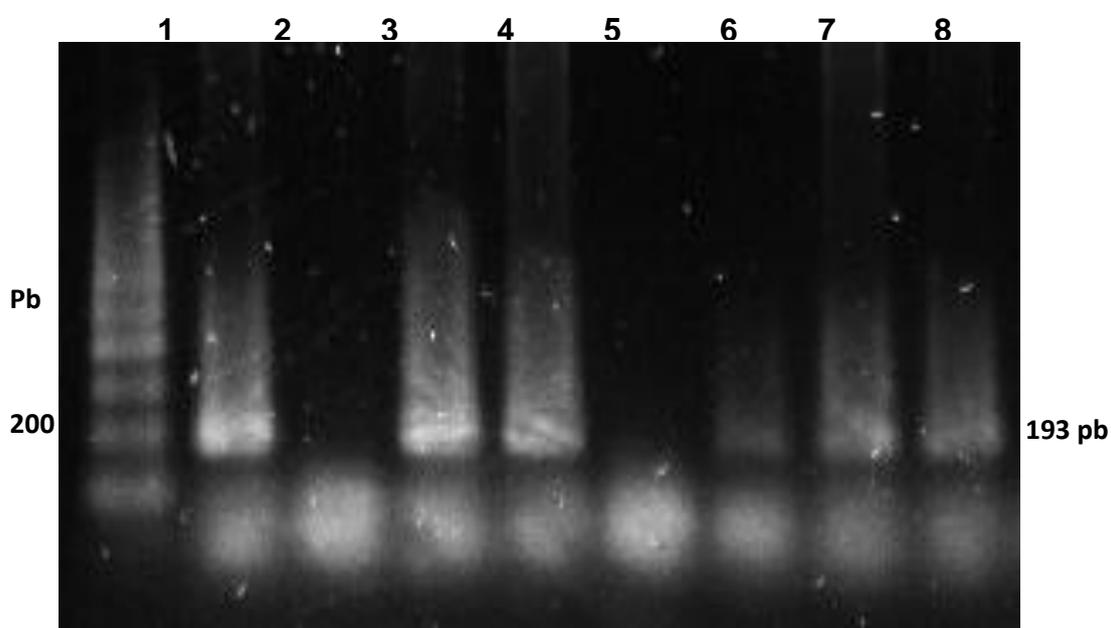


Figura 18- Gel de agarose 1,5% representativo de reações de PCR com iniciadores para gene B1 com oito amostras de DNA extraídas de animais dos bioensaios. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2.** Controle positivo (DNA extraído de amostra de fígado de carcaças infectadas com *T.gondii* 193 pb), **3-9.** DNA extraído do fígado dos bioensaios inoculados com macerado de fígado extraído de carcaças tratadas neste grupo. **Colunas 4-5 e 7-9** apresentaram amplificações correspondentes ao controle positivo.

Para reproduzir o descarte de carcaças infectadas sem manipulação, como é o caso de animais infectados submetidos procedimentos menos invasivos, nos **Grupo 5 e 7** a integridade do couro foi mantida. No **Grupo 5** o período de imersão em Lysoform® foi de 6 horas seguido de congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 48 h. As amostras do fígado de 4 animais inoculados com macerado de fígado provenientes de 2 carcaças com couro fechado mostraram amplificação positiva para *T. gondii* por PCR (colunas 7-10 da Figura 19). Enquanto amostras do fígado de 2 animais inoculados não apresentaram amplificação nas colunas 5 e 6.

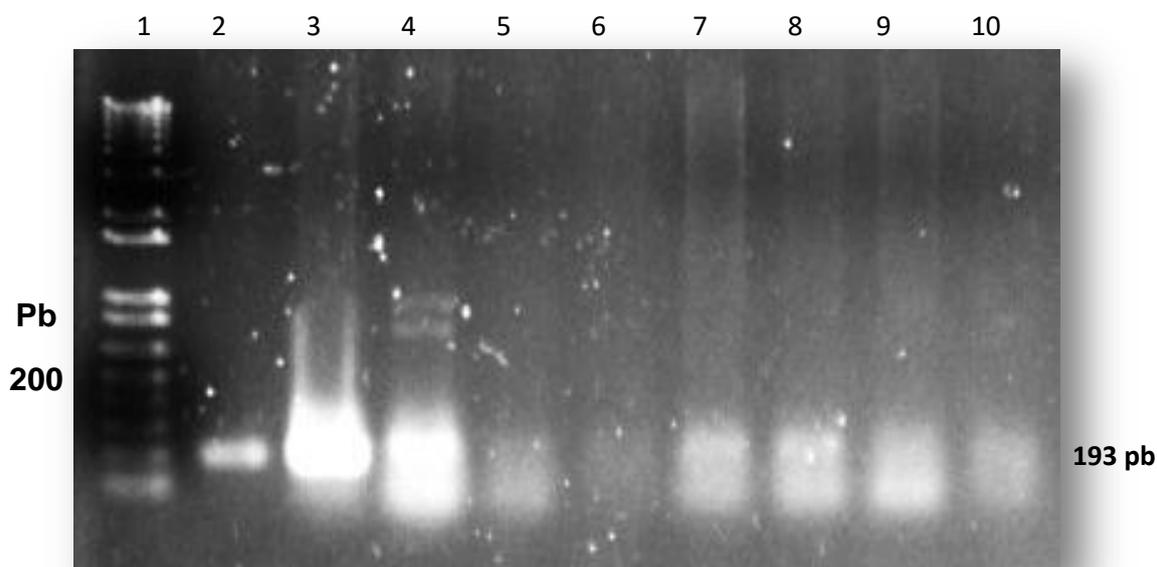


Figura 19 – Gel de agarose 1,5%, contendo nove produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores para o gene B1 de *Toxoplasma gondii*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2-3** Controles positivos (DNA extraído de amostra de carcaças infectadas com *T.gondii* 193 pb), **4.** Controle positivo (DNA extraído de taquizoíta isolado do lavado peritoneal 193 pb), **5-10** DNA extraído do fígado dos bioensaios inoculados com macerado de fígado extraído de carcaças tratadas neste grupo.

Para o **Grupo 6**, realizamos ensaios submetendo carcaças infectadas com couro aberto para mimetizar o protocolo de descarte de animais submetidos a procedimentos invasivos como cirurgias, obtenção de órgãos e tecidos ou lavado peritoneal. As carcaças abertas foram imersas em Lysoform® por 6h seguida de congelamento a -20° C por 48 horas (Fig. 20). Pelas observações no gel às amostras nas colunas 1-3 referentes ao peso molecular e controle positivo e negativo respectivamente, nas colunas 4-9 provenientes de bioensaios, nas colunas 4-6 não apresentaram amplificação enquanto as amostras de outros bioensaios (coluna 7-9 na figura 12) apresentaram traços de ampliações correspondentes ao fragmento de 193 pb característico do perfil de amplificação do gene B1 de *T.gondii*.

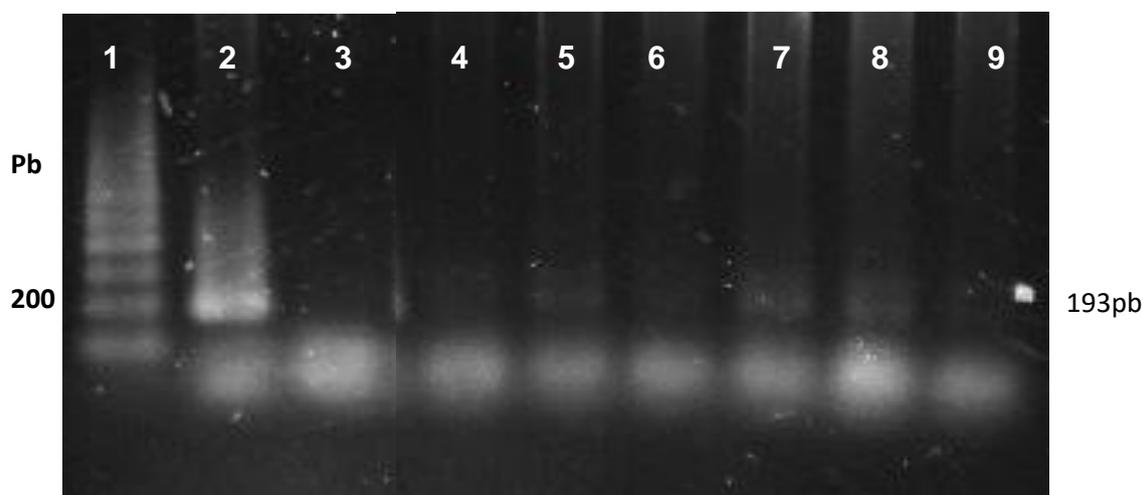


Figura 20 – Gel de agarose 1,5%, contendo nove produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores para o gene B1 *T. gondii*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2.** Controle positivo (DNA extraído de amostra dos protozoários em suspensão no lavado peritoneal 193 pb); **Coluna 3.** Controle negativo (DNA extraído de animal não infectado); **Coluna 4-9** DNA extraído do fígado dos bioensaios inoculados com macerado de fígado extraído de carcaças tratadas do grupo 6.

Para as carcaças do **Grupo 7** também foram mantidas a integridade do couro reproduzindo o descarte de carcaças infectadas descartadas sem manipulação. As carcaças submetidas a outros procedimentos menos invasivos como exemplo das curvas parasitêmicas foram submetidas ao tratamento por imersão 24 horas em Lysoform® e congelamento a -20° C por 48 horas (Fig. 21). Pelas observações no gel às amostras nas colunas 1-2 referentes ao peso molecular e controle positivo respectivamente, nas colunas 3-7 provenientes de bioensaios, não apresentaram amplificação ou traços de ampliações correspondentes ao fragmento de 193 pb característico do perfil de amplificação do gene B1 de *T.gondii*.

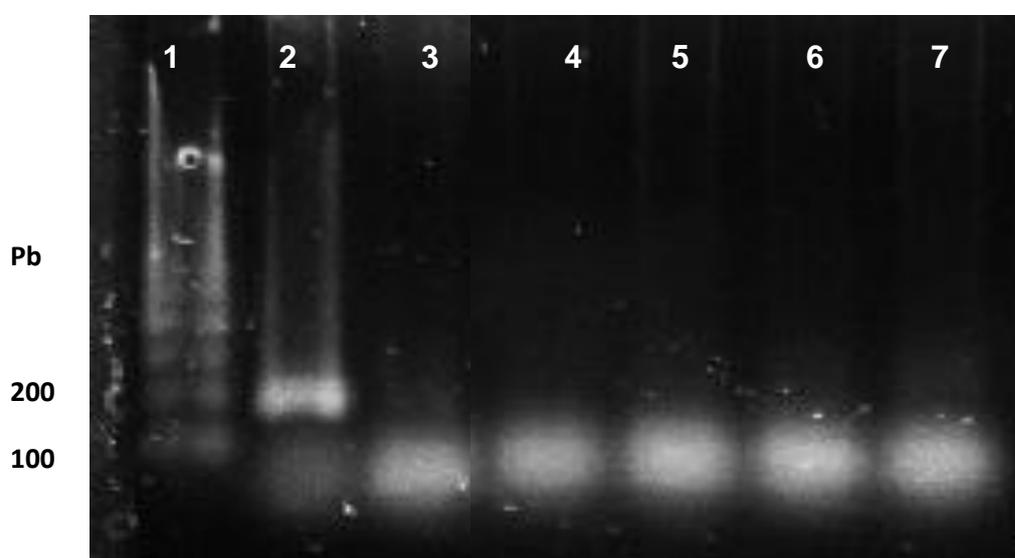


Figura 21 - Gel de agarose 1,5% contendo reações de PCR com iniciadores para gene B1 com seis amostras de DNA extraídas de bioensaios. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000pb, **2-** Controle positivo (DNA extraído de amostra de carcaças infectadas com *T.gondii* 193 pb), **3-7** DNA extraído do fígado dos bioensaios inoculados com macerado de fígado extraído de carcaças tratadas neste grupo.

Para o **Grupo 8** carcaças previamente infectadas e com a cavidade peritoneal aberta foram imersas por 24 horas em Lysoform® a fim de ampliar o período de impregnação no desinfetante. Essas carcaças também foram congeladas -20°C por 48 horas. O fígado foi extraído e o macerado foi inoculado em seis animais, os bioensaios foram acompanhados por 15 dias. Após este período todos os animais foram eutanasiados e o fígado extraído para obtenção das amostras que foram processados para a PCR. Amostras de 6 animais não apresentaram amplificação (Figura 22), As amostras na colunas 1-2 referentes ao peso molecular e controle positivo respectivamente, nas colunas 3-8 provenientes de bioensaios, não apresentaram correspondentes ao fragmento de 193pb característico do perfil de amplificação do gene B1 de *T.gondii*.

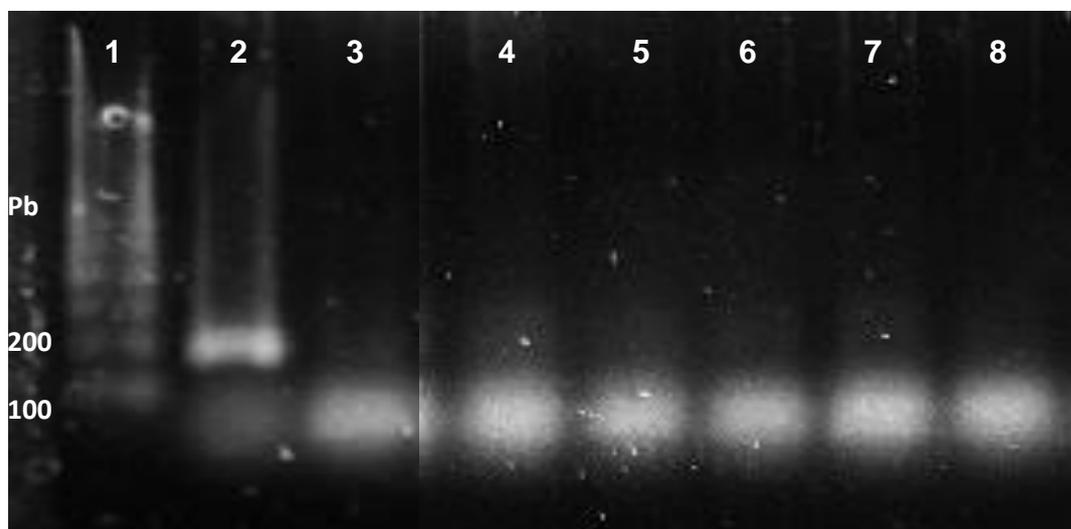


Figura 22 – Gel de agarose 1,5%, contendo sete produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores para o gene B1 *Toxoplasma gondii*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2.** Controle positivo (DNA extraído de amostra de carcaças infectadas com *T.gondii* 193 pb), **3 - 8** DNA extraído do fígado dos bioensaios inoculados com macerado de fígado extraídos de carcaças tratadas.

#### 4.3.1.2 - Observação de cistos viáveis em animais infectados com a cepa Me49 submetidos ao tratamento de imersão e congelamento.

As carcaças infectadas com a cepa cistogênica Me49 foram imersas em Lysoform® por 24 horas e congelados por 48 horas -20°C. Em todas as carcaças foi possível observar cistos característicos deste parasito (Fig. 23). Porém em amostras de duas carcaças investigadas, observamos irregularidades nos contornos da parede cística possivelmente provocada pelo tratamento a que foram submetidos.

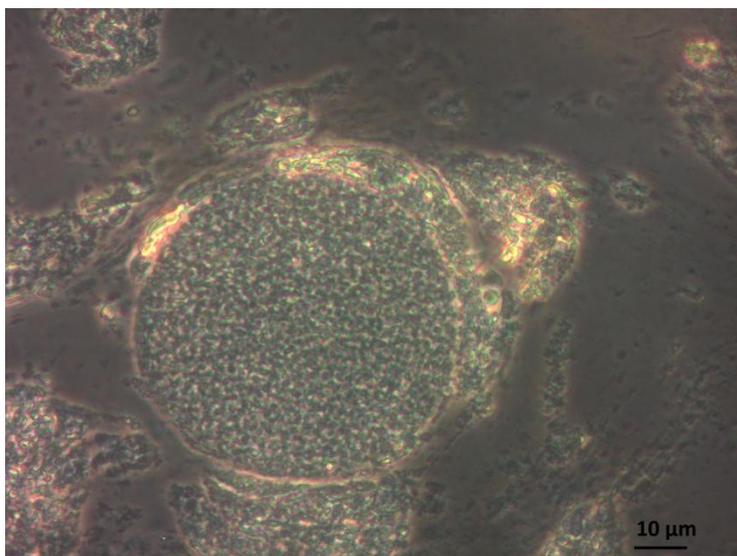


Figura 23— Micrografia de cisto cerebral de *T.gondii* cepa Me49 tratado com Lysoform® por 24 horas, seguido por congelamento a -20°C por 48 horas. Contornos irregulares observados em várias partes da parede mostram extravasamento de bradizoítas para o meio extracelular possivelmente causado pela ação do tratamento. Neste ensaio foram repetidas apenas as condições de imersão por 24 horas seguidas de 48 horas de congelamento, com variação de couro aberto ou fechado na região do crânio com objetivo de avaliar impregnação do Lysoform® no tecido cerebral.

Carcaças de camundongos da linhagem Swiss Webster previamente infectadas por *T. gondii* cepa Me49 foram avaliadas quanto à presença de cistos característicos da infecção. Inicialmente os cistos foram visualizados no macerado de cérebro por microscopia óptica (fig.15), após confirmação da presença cística animais do mesmo grupo foram preparados para o ensaio, às carcaças foi tratadas de acordo com a tabela 4, o macerado foi inoculado em bioensaios e as avaliações de amostras obtidas dos respectivos bioensaios foram testadas seguindo protocolo aplicado para cepa RH por meio de PCR utilizando o iniciador B1 conservado em diferentes cepas do parasito presente em 25-50 copias do genoma segundo Burg et al (1989). Os grupos 1 e 2 inoculados com macerado de cérebro permaneceram vivos por 20 dias a presença da infecção nestes animais foi verificada utilizando a metodologia da PCR utilizando os Iniciadores descritos em M&M. Como controles positivos foram utilizados amostras de cérebro de animais previamente infectados com a cepa Me49 de *T. gondii* sem qualquer tratamento com Lysoform® ou congelamento, e também bradizoítas isolados de cistos. A amplificação do DNA extraído das amostras por PCR originaram bandas em gel de agarose com o tamanho esperado 193 pb.

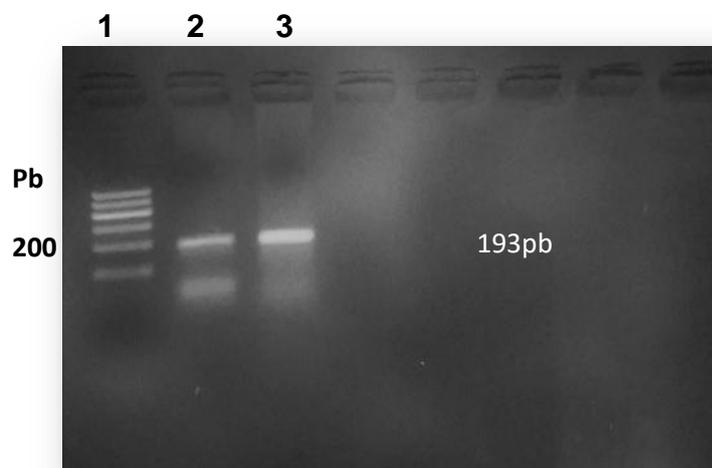


Figura 24- gel de agarose 2%, representativos de reações de PCR com iniciador um par de iniciadores para o gene B1 *T.gondii*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100 - 1000 pb, **Coluna 2.** Controle positivo (DNA extraído de amostra dos protozoários em cistos cerebrais 193 pb) **Coluna 3** Controle positivo (DNA extraído de bradizoítas em suspensão 193 pb).

#### 4.3.2 Verificação da presença de *T. gondii* Cepa Me49 em amostras do bioensaio.

Para ensaios com a cepa Me49 foram realizados PCR para observar se há amplificação após tratamento com Lysoform® bruto. Os ensaios foram separados em dois grupos, no grupo 1 o ensaio de 24 horas de imersão em Lysoform® com o couro do crânio fechado e mantido por 48 horas a -20° C As amostras nas colunas 1-4 referentes ao peso molecular e controles positivos respectivamente, nas colunas 5-10 provenientes de bioensaios, não apresentaram amplificações correspondentes ao fragmento de 193 pb característico do perfil de amplificação do gene B1 de *T.gondii*.

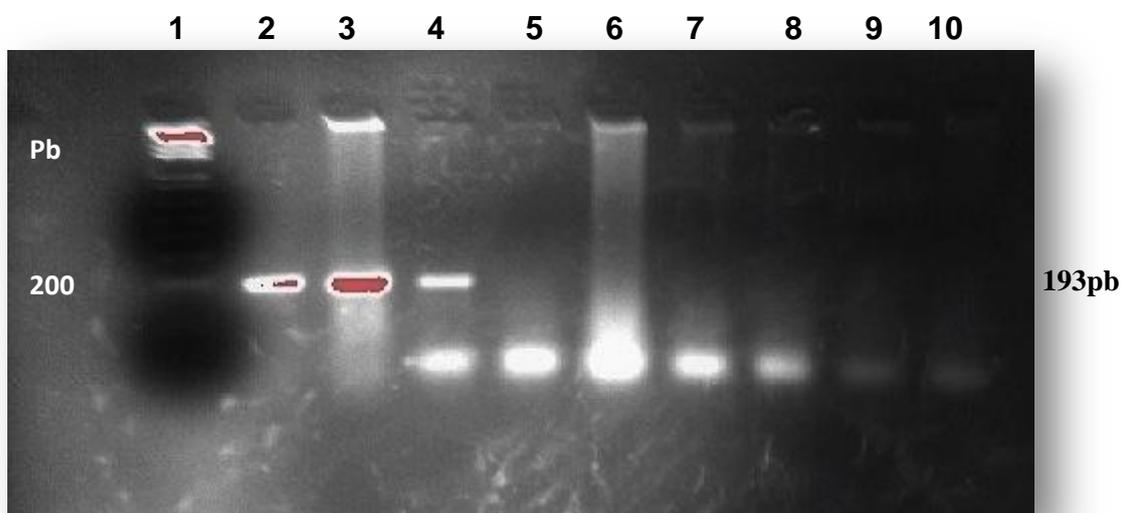


Figura 25 – Gel de agarose 1,5%, contendo nove amostras de produtos de PCR amplificados a partir do par de iniciadores do gene B1 específico para *T.gondii*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **Colunas 2.3** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado de carcaças infectadas) **4.** (Amostra extraída de bradizoítas em suspensão 193 pb). **Colunas 5-10** Amostras extraídas de bioensaios com inoculo obtidos de carcaças fechadas (DNA extraído de amostra do fígado). Seta vermelha sinaliza formações inespecíficas formadas durante o processo de amplificação de DNA.

Analisando os ensaios realizados com a cepa Me49 grupo 2, foram realizados ensaios com a cepa Me49 24 horas de imersão em Lysoform com o couro do crânio aberto e mantido por 48 horas a  $-20^{\circ}$  C. As amostras nas colunas 1 - 4 são referentes ao peso molecular e controle positivo extraídos de DNA proveniente dos bradizoítas em suspensão, de amostras de fígado e cérebro respectivamente, nas colunas 5-10 provenientes de bioensaios, não apresentaram correspondentes ao fragmento de 193 pb característico do perfil de amplificação do gene B1 de *T.gondii*.

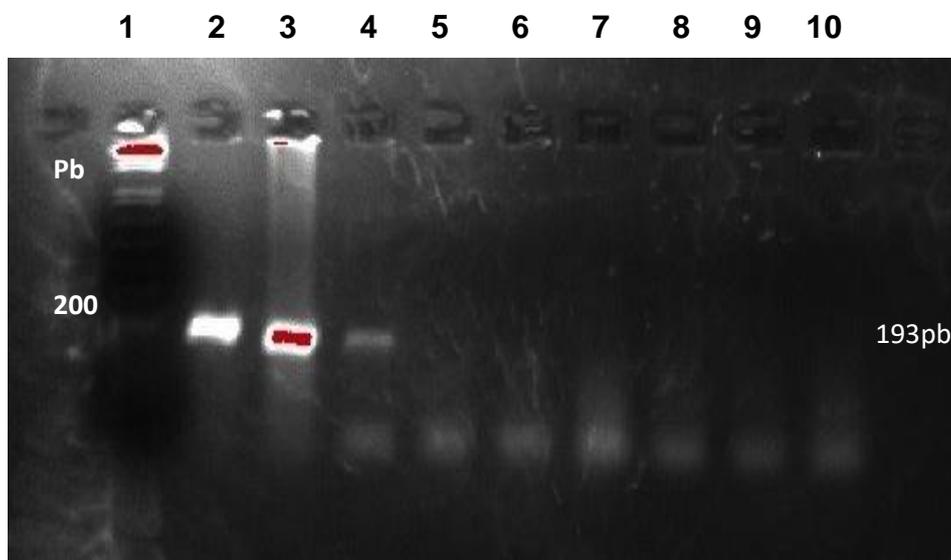


Figura 26– Gel de agarose 1,5%, contendo nove amostras de produtos de PCR amplificados a partir do par de iniciadores B1 específico para *T.gondii*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **Colunas 2 e 3,** controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado e cérebro de carcaças infectadas) **4.** Amostra extraída de bradizoítas em suspensão 193 pb. **Colunas 5-10** Amostras extraídas do fígado de bioensaios com inoculo obtido de amostras de cérebro carcaças com o couro da região craniana aberta.

#### 4.4 - Verificação da presença parasitaria de *T. cruzi* em cepa Y.

Neste ensaio as carcaças foram submetidas às condições de imersão por 6 ou 24 horas seguidas de 48 horas com ou sem congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , com couro fechado na região abdominal mimetizando os procedimentos aplicados em manutenção de cepas de *T. cruzi* descritas em M&M à técnica da PCR foi aplicada em amostras extraídas do bioensaio nas condições descritas na tabela 5 para observar possíveis ampliações iniciadas pelos oligonucleotídeos TCZ-1 e TCZ-2 nas faixas esperadas de 188 pb como descritos por Moser, e col., (1989).

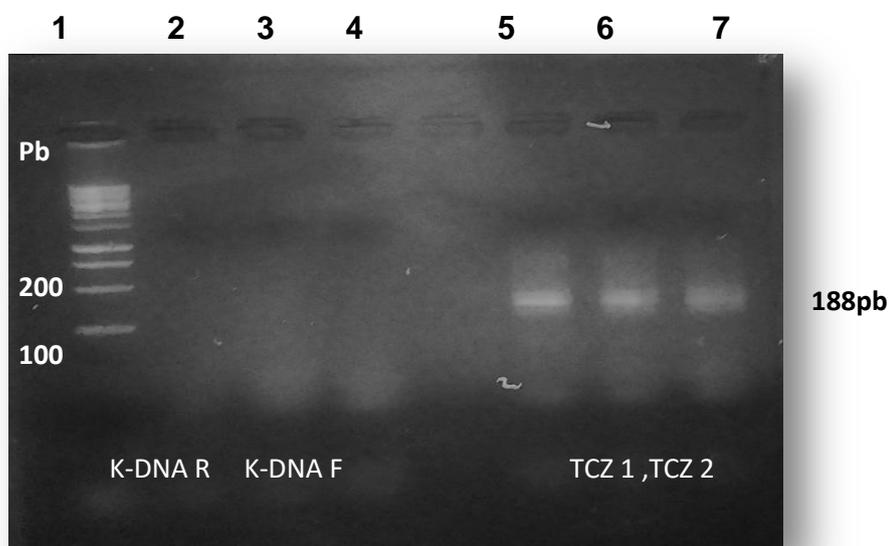


Figura 27 – Gel de agarose 1,5%, contendo produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores K-DNA e TCZ específicos para *T. cruzi*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do coração) **3** Controle positivo (DNA extraído de amostra do baço) **4.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado) amplificados com par de iniciadores K-DNA R, K-DNA F; **5.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do coração) **6.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do baço) **7.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado) amplificados com par de iniciadores TCZ-1, TCZ-2.

Ensaio realizados com carcaças do **Grupo 1** representadas por carcaças fechadas foram imersas por 6 horas em Lysoform® sem congelamento, e o macerado do fígado foi inoculado em animais saudios. A PCR foi realizada a partir de amostra de fígado dos bioensaios após os dias de observação indicados na tabela 5. As amostras nas colunas 1-3 referentes ao peso molecular e controle positivo respectivamente, nas colunas 4-8 amostras provenientes de bioensaios, não apresentaram correspondentes ao fragmento de 188 pb característico do perfil de amplificação do par de iniciadores TCZ 1 e 2.

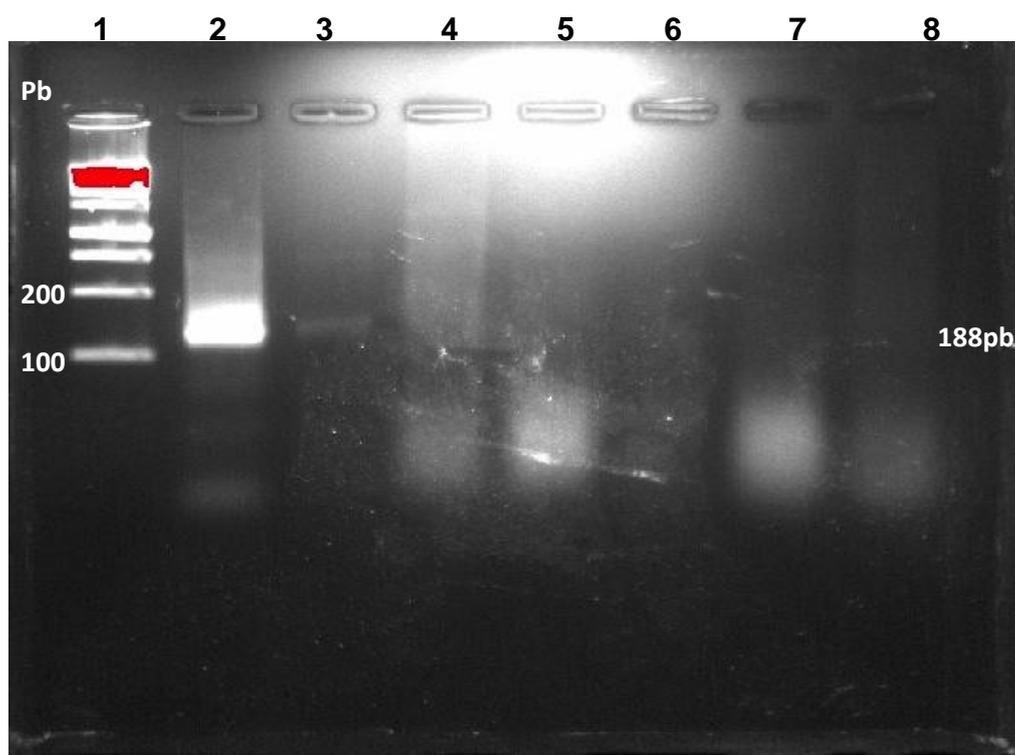


Figura 28 – Gel de agarose 1,5%, contendo sete amostras de produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores TCZ 1, TCZ 2 específicos para *T. cruzi*. **Coluna 1.** Marcador de peso molecular 100-1000 pb, **2.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado) 188 pb. **Colunas 3, 4, 5, 6, 7 e 8** amostras extraídas de bioensaios inoculados com macerado de carcaças fechadas que passaram por 6 horas de imersão em Lysoform® sem congelamento, (DNA extraído de amostra do fígado) amplificados com par de iniciadores TCZ-1, TCZ-2.

Ensaio realizados com carcaças do **Grupo 2** que representam carcaças fechadas, deixadas por 24 horas em Lysoform® e sem congelamento foram inoculadas em animais sadios. A PCR foi realizada a partir de amostras de fígado dos bioensaios. As amostras nas colunas 1 - 3 referentes ao peso molecular e controles positivos respectivamente, nas colunas 4-8 amostras provenientes de bioensaios, apenas a amostra na coluna 8 apresentou traços correspondentes ao fragmento de 188 pb característico do perfil de amplificação do par de iniciadores TCZ.

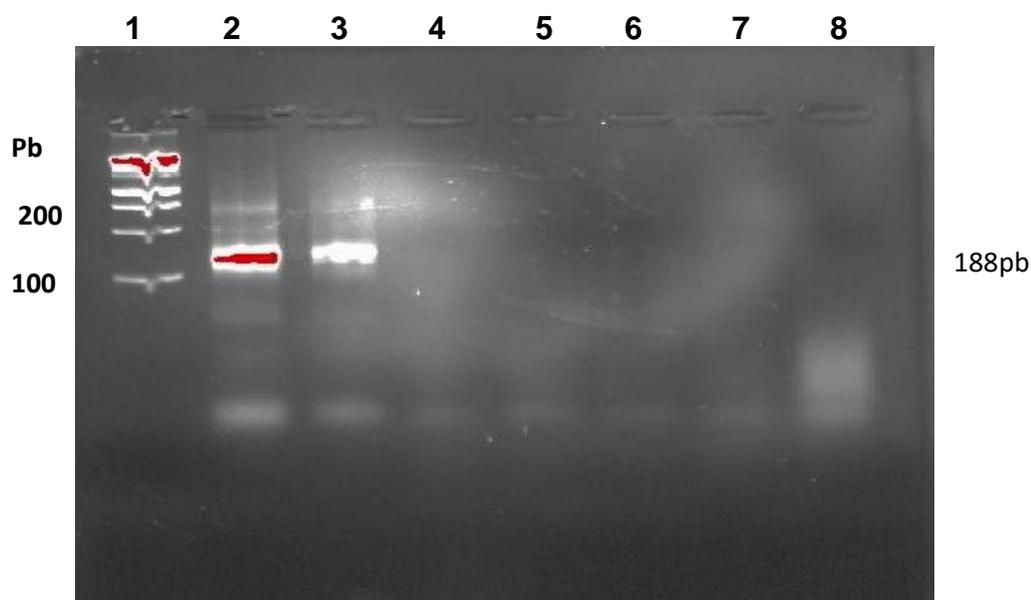


Figura 29 – Gel de agarose 1,5%, contendo sete amostras de produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores TCZ 1, TCZ 2 específicos para *T.cruzi*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2.3** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado) 188 pb. **Colunas 4, 5, 6, 7 e 8** amostras extraídas de bioensaios inoculados com amostras de carcaças fechadas, submetidas a 24 horas de imersão em Lysoform® sem congelamento, (DNA extraído de amostra do fígado). A amostra na coluna 8 apresentou traços correspondentes à amplificação do DNA.

Ensaios realizados com carcaças do **Grupo 3** que representou carcaças fechadas e passaram por 6 horas de imersão em Lysoform® com congelamento, foram inoculada em animais sadios e realizada PCR de DNA obtido do fígado dos bioensaios. As amostras nas colunas 1-3 referentes ao peso molecular e controles negativos e positivos respectivamente, nas colunas 4-7 amostras provenientes de bioensaios, nenhuma amostra apresentou fragmentos de 188 pb característico do perfil de amplificação do par de iniciadores TCZ.

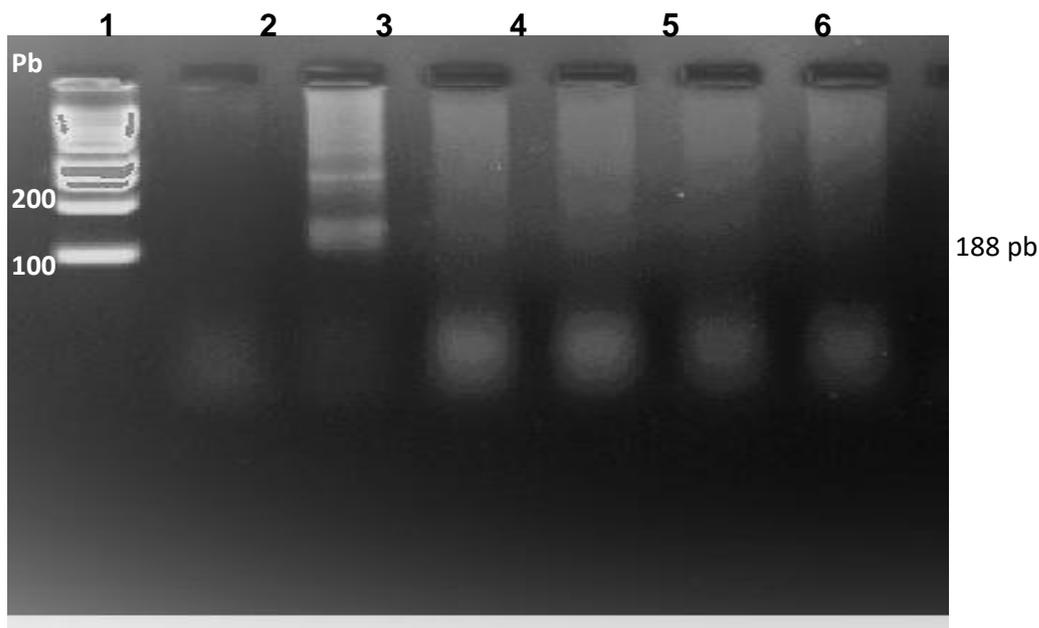


Figura 30 – Gel de agarose 1,5%, contendo sete amostras de produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores TCZ 1, TCZ 2 específicos para *T. cruzi*. **Coluna 1.** Marcadores de peso molecular 100-1000 pb, **2** Controle negativo **3.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado) 188 pb. **Colunas 4, 5, 6 e 7** amostras extraídas de bioensaios inoculados com macerado de carcaças tratadas 6 horas de imersão em Lysoform® com congelamento, (DNA extraído de amostra do fígado).

Ensaio realizados com carcaças do grupo 4 que representou carcaças fechadas e passaram por 24 horas de imersão em Lysoform® com congelamento, foram inoculadas em animais sadios e realizada PCR de DNA obtido de amostras do fígado dos bioensaios. As amostras nas colunas 1-3 referentes ao peso molecular e controles negativos e positivos respectivamente, nas colunas 4-8 amostras provenientes de bioensaios, nenhuma amostra apresentou fragmentos de 188 pb característico do perfil de amplificação do par de iniciadores TCZ.

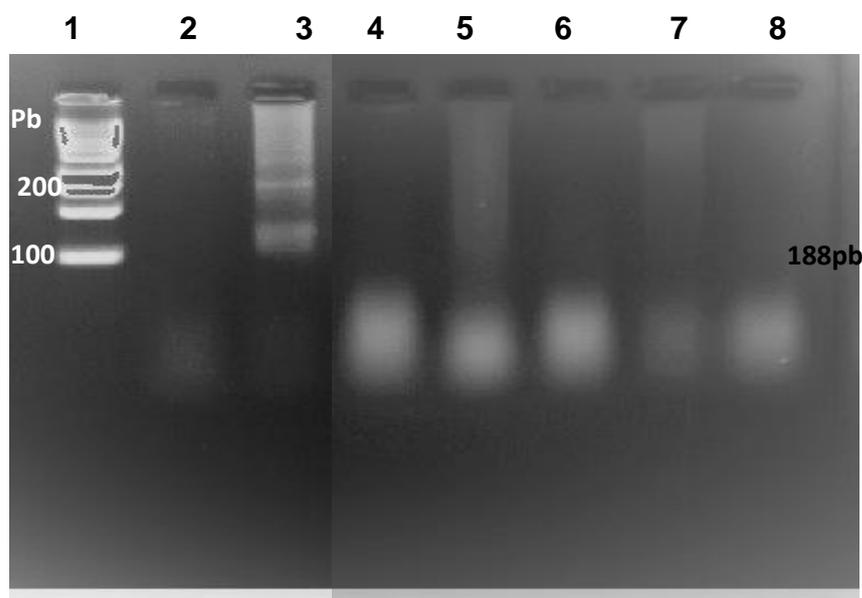


Figura 31 – Gel de agarose 1,5%, contendo sete amostras de produtos de PCR amplificados a partir dos pares de iniciadores TCZ 1, TCZ 2 específicos para *T. cruzi*. **Coluna 1.** Marcador de peso molecular 100-1000 pb, **2.** Controle negativo **3.** Controle positivo (DNA extraído de amostra do fígado) 188 pb. **Colunas, 4, 5, 6, 7 e 8** amostras extraídas de bioensaios tratados 24 horas de imersão em Lysoform® com congelamento.

LUCHM	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	01
<b>TITULO: Descarte de carcaças infectadas por protozoários patogênicos</b> <i>Toxoplasma gondii e Trypanosoma cruzi</i>		

### 1- OBJETIVO.

Tratamento alternativo em carcaças infectadas com protozoários patogênicos para redução da carga parasitária

### 2- CAMPO DE APLICAÇÃO.

Reduzir a carga parasitaria de carcaças infectadas no local de geração proporcionando maior segurança ao manejo de Resíduos Serviço de Saúde (RSS) infectados com protozoários patogênico, diminuindo possíveis riscos de contaminação aos operadores.

#### **Material Utilizado.**

- Lysoform Bruto (Bombril)
- Recipiente coletor
- Saco plástico branco leitoso

#### **Procedimento.**

- Após os procedimentos de pesquisa aplicados aos camundongos infectados descartar no recipiente coletor previamente preparado.
- Adicionar o desinfetante Lysoform Bruto até submergir a carcaça.
- Após 24 horas escoar o excesso do desinfetante na rede de esgoto.
- Recolher a carcaça devidamente identificada, e levar ao freezer por 48 horas.
- Aguardar a coleta.

#### **Recomendações**

- Contar o período de 24 horas a partir da ultima carcaça imersa.
- Manter a identificação para garantir as 48 horas de congelamento.

**3- RESPONSABILIDADE:****Corpo técnico, pesquisador, aluno.**

## 5 - DISCUSSÃO

O presente trabalho visa acrescentar alternativa prática segura e eficaz aos métodos de tratamento para descarte de carcaças infectadas experimentalmente por patógenos nas instituições de ensino e pesquisa no país. O baixo número de estudos científicos citando formas de tratamento de carcaças de animais infectados experimentalmente por patógenos pressupõe que as instituições de pesquisa científica estejam estruturadas e em condições de realizar a descontaminação dos resíduos dos serviços de saúde na fonte geradora.

A desinfecção química é amplamente utilizada como alternativa para descontaminação de ambientes, equipamentos e superfícies de diversas naturezas, tendo como ponto em comum à eficácia na inativação de microrganismos que possam estar presentes em materiais com resíduos biológicos, equipamentos utilizados na pesquisa e ensino e na produção de alimentos (Martins e Kuyae; 1996). A natureza do composto químico, associada ao tempo de exposição e a concentração dos sanificantes são de grande importância no processo de inativação de fungos bactérias e protozoários (Rulata 1995).

Atualmente o centro de ciências da saúde (CCS) não dispõe de local apropriado, destinado para as etapas cruciais do manejo de resíduos do serviço de saúde. A alternativa de terceirizar etapas de tratamento e disposição final traz a necessidade de assegurar que não haja risco de contaminação aos operadores, envolvidos nos processos iniciais do manejo e de qualquer eventual incidente. Durante o processo de descarte há o risco de sacos plásticos que embalam as carcaças rasgarem, expondo e derramando o seu conteúdo no freezer onde são armazenados antes do recolhimento pela empresa que executa os processos de transporte e armazenamento até o destino final deste material. Além disso, deve-se considerar o risco de desvio acidental das carcaças durante o transporte até o destino final. Tudo isso nos leva a reforçar a importância de identificar meios adequados e funcionais de inativação de patógenos, prevenindo a exposição de funcionários que manuseiam tal material e também diminuindo o risco de contaminação do ambiente.

Instituições como FIOCRUZ-RJ adequaram as instalações do biotério central com condições apropriadas para executar a descontaminação de carcaças e outros resíduos

com potencial de contaminação. Desta forma foram instaladas autoclaves em salas com acesso controlado (Sales, 2013).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana – *Environmental Protection Agency* (EPA), 1988, “Minimização de Resíduos” significa redução na geração de resíduos perigosos, antes das fases de tratamento, armazenamento ou disposição, incluindo qualquer redução de resíduos na fonte geradora, e inclui a diminuição do volume total e a redução da toxicidade do resíduo.

A Resolução CONAMA 05/1993 (anexo XIII) já assinala a importância da segregação correta dos resíduos biológicos em embalagens bem sinalizadas, ou seja, na falta de uma sinalização correta entre os materiais que têm contaminação biológica e que oferecem riscos biológicos daqueles com resíduos inertes, leva a um aumento do volume do material a ser inativado. Desta forma os resíduos comuns (grupo D anexo XI) que poderiam ser tratados como resíduos domiciliares são contaminados pelos resíduos infectantes (grupo A anexo XI), merecendo o mesmo gerenciamento destes resíduos.

Segundo Naime e colaboradores (2004) o objetivo de tratar resíduos infecciosos é reduzir os riscos associados à presença de agentes patogênicos. As técnicas aplicadas na descontaminação seguem as recomendações para cada tipo específico de resíduos. São conhecidos como opções para tratamento dos resíduos, a descontaminação por luz ultravioleta, tratamento por incineração, tratamento por calor úmido (autoclavação) e tratamentos químicos com diversos agentes.

Daugshies e colaboradores (2013), afirmam que, para identificar produtos químicos adequados são necessários dados confiáveis sobre a eficácia antiparasitária dos desinfetantes.

O presente trabalho avaliou a capacidade de inativação de patógenos com o *T.gondii* e *T.cruzi* aplicando um processo físico químico utilizando desinfetante de uso doméstico e congelamento. Os sanificantes mais comercializados são os compostos à base de cloro, iodo, quaternários de amônio, ácido peracético, peróxido de hidrogênio, clorexidina, entre outros (Andrade *et al.*, 1996).

Como agente químico foi utilizado o desinfetante Lysoform Bruto®, que é um composto quaternário de amônio. Diversos mecanismos de ação parecem estar relacionados com a atividade germicida dos compostos quaternários de Amônio (CQA), dentre estas a inibição enzimática (Andrade e Macedo, 1996), desnaturação de proteínas celulares essenciais e ruptura da membrana celular provocando vazamento de constituintes celulares (Dashner, 1997). Segundo Contreras e colaboradores (2003) os CQAs interferem na membrana celular alterando a permeabilidade estimulando a produção de glicose causando esgotamento celular.

Uma vantagem importante na inativação por meio de desinfetante de uso doméstico é não gerar resíduos que necessitem de tratamento posterior, ou seja, sem causar o aumento dos resíduos químicos que é outro desafio a ser estudado. Outras vantagens são a fácil manipulação, o baixo custo do produto em relação ao resultado alcançado e o baixo risco de exposição ao operador. Além disso, este tratamento químico possui baixo custo, pode ser empregada em qualquer laboratório pela simplicidade do procedimento, não necessitam de equipamentos, aparatos ou espaços reservados além do usual e requer apenas equipamentos de proteção individual. O tratamento com o Lysoform bruto foi realizado no momento do descarte das carcaças infectadas com *T.gondii* e *T.cruzi*. Durante os estudos foram empregadas para ambas as carcaças condições semelhantes de tratamento, possibilitando padronizar o processo de tratamento. A partir dos resultados obtidos pode-se observar que a imersão com Lysoform® por 6 ou 24h sem congelamento é ineficiente em inativar a infecção pelo *T. gondii* em carcaças abertas e fechadas (Tabela 3).

Já com o *T.cruzi* a imersão com desinfetante por 24h sem congelamento mostrou ser mais eficaz. Análises pela técnica da PCR dos animais do bioensaio não detectou o DNA do *T. cruzi*. A técnica de PCR é atualmente a ferramenta mais utilizada para identificar a presença de protozoários em amostras de tecidos ou fluidos suspeitos de contaminação, elevando a segurança do resultado a até 98% de certeza (Kompalic-Cristo, A. *et al* 2005).

O par de iniciadores de PCR TCZ1 e TCZ2 foi o escolhido para este trabalho, por ser específico para cepas de *T.cruzi* e não amplificar DNA de outros tripanossomatídeos, incluindo as espécies de *Leishmania sp* (Diaz *et al.*, 1992; Moser *et al.*, 1989; Virreira *et al.*, 2003).

O fígado foi órgão escolhido para o exame da presença de possíveis parasitos viáveis em camundongos de bioensaio, pela grande variedade de macrófagos específicos neste órgão. O fígado apresenta grande concentração de macrófagos infectados com *T. cruzi* (Sizirensen *et al.*, 1994). Embora os macrófagos sejam as células efetoras inatas mais importantes na defesa contra *T. cruzi*, também podem ser explorados pelo parasita como seu nicho primário de infecção, permitindo a evasão a imunidade mediada por estas células (Desjardins and Descoteaux, 1997; Paulnock and Collier, 2001; Stempin *et al.*, 2002; Martinez and Gordon, 2014).

Em relação ao *T. gondii* a introdução do congelamento após a imersão em Lysoform® mostrou ser crucial para a inativação deste protozoário nas carcaças. A associação da imersão no desinfetante por 24 horas com 48 horas de congelamento se mostrou ideal para a inativação do *T. gondii*. Camundongos de bioensaio inoculados com carcaças após este tratamento mantiveram-se viáveis por 30 dias e não foi possível detectar o DNA do *T. gondii* por PCR em amostras de fígado destes animais.

Cistos de *T. gondii* perde a sua infectividade aquecido a aproximadamente + 65 ° C é por isso que é improvável que sobreviva a procedimentos convencionais de cozimento (Jacobs *et al.*, 1960). O congelamento a -20 ° C e o descongelamento subsequente também mostraram destruir cistos teciduais de *T.gondii* (Jacobs *et al.*, 1960; Work, 1968; Dubey, 1974), mas tem sido relatado que cistos em carne permaneceram viáveis após o congelamento (GroBklaus e Baumgarten, 1967; Dubey e Frenkel, 1973).

Segundo He e colaboradores (2016) a toxoplasmose hepática existe, porque a infecção se espalha para o fígado durante a fase aguda da infecção, porém isso pode passar despercebido. De fato, várias patologias hepáticas, como hepatomegalia, hepatite, granuloma hepático, necrose, icterícia colestática e cirrose, têm sido associadas à infecção por *T. gondii*.

Como marcador genético foi utilizado o gene B1, que possui 35 cópias no genoma do protozoário é conhecido como marcador genético mais utilizado no diagnóstico de *T. gondii* por PCR (Burg *et al.*, 1989).

Assim, de acordo com os resultados obtidos e considerando um procedimento ideal para a inativação de *T. cruzi* e *T. gondii* em carcaças infectadas seria a imersão com Lysoform® por 24h seguida de congelamento por 48h.

## 6 - CONCLUSÃO

As condições de tratamento de carcaças de camundongos com imersão em desinfetante por 6h sem congelamento não foram eficientes na inativação de *T.gondii*, levando bioensaios a óbito em até sete dias, estas carcaças podem ser consideradas de alto risco ao operador e a outros animais predadores, assim como carcaças não tratadas e apenas congeladas para posterior descarte.

O *T.cruzi* se mostrou mais sensível à presença do Lysoform® em carcaças de camundongos fechadas quando imersas por 6 horas sendo ou não congeladas. O protocolo geral mais eficiente de inativação de patógenos como *T.gondii* e *T.cruzi* foi à imersão de carcaças fechadas ou abertas de camundongos por 24h, seguida de congelamento por 48h à -20° C.

A simplicidade do método de inativação identificado neste estudo e o baixo custo - financeiro tornam o desinfetante de uso domestico associado ao congelamento como uma alternativa viável e segura para bioensaios com protozoários como *T.gondii*, *T.cruzi*.

## **7 - PERSPECTIVA**

- A) Aprovar junto à comissão de biossegurança e a comissão de ética este procedimento operacional padrão, para que outros laboratórios tenham acesso as informações e instruções essenciais a inativação.
- B) Até que haja local destinado ao tratamento de resíduos biológicos, utilizar o protocolo de tratamento de carcaças infectadas com protozoários patogênicos, no momento do descarte sem prejuízo ao operador sendo um processo simples e seguro.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABRÃO J, SILVA, VJD, REIS LC, FAGUNDES DJ. Proposição de um laringoscópio (artesanal) para intubação traqueal em ratos. *Acta Cir Bras*, 1994;

ANDRADE, N.J.; MACEDO, J.A.B. **Higienização na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182p.

ARAÚJO, F. M., BAHIA, M. T., MAGALHÃES, N. M., MARTINS-FILHO, O. A., VELOSO, V. M., CARNEIRO, C. M., TAFURI, W. L. LANA, M.: Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. **Acta Trop.**, v. 81, n. 1, p. 21-31, Jan 2002.

BARBOSA, R. L., DIAS, V. L., PEREIRA, K. S., SCHMIDT, F. L., FRANCO, R. M., GUARALDO, A. M., ALVES, D. P., PASSOS, L. A.: Survival in vitro and virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp in experimental acute Chagas disease. **J Food Prot.**, v. 75, n. 3, p. 601-6, Mar 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006. 182 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) ISBN 85-334-1176-6, 1. Gerenciamento de resíduos. 2. Serviços de saúde. I. Título. II. Série, NLMWA

BURG, J. L. GROVER, C. M. POULETTY, P. BOOTHROYD, J. C.; Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 8, p. 1787-92, Aug 1989.

CALVO-MENDEZ, M. L., B. NOGUEDA-TORRES, R. ALEJANDRE-AGUILAR, and M. CORTES-JIMENEZ. 1994. Infección experimental con *Trypanosoma cruzi* a través de agua y alimentos contaminados. *Rev. Latino-Am. Microbiol.* 36(1):67—69.

CAMANDAROBA, E. L.; PINHEIRO LIMA, C. M.; ANDRADE, S. G. Oral

transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 44, n. 2, p. 97-103, 2002 Mar-Apr 2002.

CAMARGO ME, SILVA SM, LESER PG,; Avidéz de 23. anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1991

CARRIAZO, C. S. SEMBAJ, A. AGUERRI, A. M. REQUENA, J. M. ALONSO, C. BÚA, J. RUIZ, A. SEGURA, E. BARRAL, J. M.; Polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 3, p. 183-6, Mar 1998.

CONCEA - CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos**. Brasília-DF. 2013.

CONCEA - CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos**: DBCA. Brasília, DF, 2013. 50 p.

CONTRERAS, D.; HUTCHINSON, D.N. How to produce a hospital disinfection policy. **Journal Hospital Infection**, London, UK, v. 26, p.57-68, 1994.

Costa TL, Silva MG, Avelar JB

DASCHNER, F. The hospital and pollution role of the hospital epidemiologist in protecting the environment. In: WENZEL, R **prevention and control of nosocomial infections**. 3 ed. Baltimore: Williams e Williams, 1997. 27p.

DE SOUZA GODOI, P. A., PIECHNIK, C. A., DE OLIVEIRA, A. C., SFEIR, M. Z., DE SOUZA, E. M., ROGEZ, H., THOMAZ SOCCOL, V.; qPCR for the detection of foodborne *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Int**, Jun 2017.

DEANE, MP, LENZI HL, JANSEN A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984;79(4):513-5.

DIAS JCP, SCHOFIELD CJ. The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas Discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999.

DIAS, J. C.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention] **Rev Soc. Bras Med Trop**, v. 44, n. 3, p. 375-9, 2011 May-Jun 2011.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clan. Microbial. Rev.**, v. 11, n. 2, p. 267-99, Apr 1998.

ELOY, L. J.; LUCHEIS, S. B. Hemoculture and Polymerase Chain Reaction Using Primers TCZ1/TCZ2 for the Diagnosis of Canine and Feline Trypanosomiasis. **SIR Vet Sic**, v. 2012, p. 419378, 2012.

FALKOWSKI-TEMPORINI, G. J., LOPES, C. R., MASSINI, P. F., BRUSTOLIN, C. F., FERRAZ, F. N., SANDRI, P. F., HERNANDES, L., ALEIXO, D. L., BARION, T. F., ESPER, L. G., DE ARAÚJO, S. M.; Increased of the hepatocytes and splenocytes apoptosis accompanies clinical improvement and higher survival in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with highly diluted *Lycopodium clavatum*. **Microb. Pathog**, v. 110, p. 107-116, Sep. 2017.

FALLAHI, S., KAZEMI, B., SEYYED TABAEI, S. J., BANDEHPUR M., LASJERDI, Z., TAGHIPOUR, N., ZEBARDAST, N., NIKMANESH, B., OMRANI, V. F., EBRAHIMZADEH, F. Comparison of the RE and B1 gene for detection of *Toxoplasma gondii* infection in children with cancer. **Parasitol Int**, v. 63, n. 1, p. 37-41, Feb 2014.

GERMANO, P.M.L; GERMANO M.I.S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. São Paulo : Varela, 2001, 629 p.

GEUTHNER, A. C., KOETHE, M., LUDEWIG, M., POTT, S., SCHARES, G. DAUGSCHIES, A., BANGOURA, B; Persistence of *Toxoplasma gondii* tissue stages in poultry over a conventional fattening cycle. **Parasitology**, v. 141, n. 11, p. 1359-64, Sep. 2014.

HIDE, G. Role of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in prevalence of infection. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 14, n. 3, p. 335-44, 2016.

JONES, C. D., OKHRAVI, N., ADAMSON, P., TASKER, S., LIGHTMAN, S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. **Invest. Ophthalmol. Vis Sci**, v. 41, n. 3, p. 634-44, Mar 2000.

KASS, E. The viability of toxoplasma in mouse carcass. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 37, n. 1, p. 84-8, 1955.

KOMPALIC-CRISTO A, NOGUEIRA AS, GUEDES AL Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão **J Bras Patol Med Lab** v. 41. n.4. p. 229-35. Agosto. 2005.

LIESENFELD, O. **Immune responses to Toxoplasma gondii in the gut. Immunobiology.** 1999.

LIU Y, BALLMAN K, KHAN S, DERR-YELLIN E, SHOU W, HANELINE LS. Impaired function of Fanconi anemia type C-deficient macrophages. **J Leukoc Biol** 2012; .

MARCON, G. E., ANDRADE, P. D., DE ALBUQUERQUE, D. M., WANDERLEY, J.A S, DE ALMEIDA, E. A., GUARIENTO, M. E., COSTA, S. C. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 43, n. 1, p. 39-43, May 2002.

MARTINS E.C.; KUYAE, A.Y. Sanitizantes na indústria de alimentos. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.235, p. 58-64, 1996.

McDONNELL, G; RUSSELL, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, London, p. 147- 179, 1999.

MECCA, J. N.; MEIRELES, L. R.; DE ANDRADE, H. F. Quality control of *Toxoplasma gondii* in meat packages: standardization of an ELISA test and its use for detection in rabbit meat cuts. **Meat Sci**, v. 88, n. 3, p. 584-9, Jul. 2011.

MORROT, A., VILLAR, S. R., GONZÁLEZ, F. B., PÉREZ, A. R.; Evasion and Immuno-Endocrine Regulation in Parasite Infection: Two Sides of the Same Coin in Chagas Disease? **Front Microbiol**, v. 7, p. 704, 2016.

MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 7, p. 1477-82, Jul. 1989.

MOUSAVI, M., SARAVANI, R., JAFARI MODREK, M., SHAHRAKIPOUR, M. SEKANDARPOUR, S., Detection of *Toxoplasma gondii* in Diabetic Patients Using the Nested PCR Assay via RE and B1 Genes. **Jundishapur J Microbiol**, v. 9, n. 2, p. e29493, Feb 2016.

NÓBREGA, A. A., GARCIA, M. H., TATTO, E., OBARA, M. T., COSTA, E., SOBEL, J., ARAUJO, W. N.; Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 4, p. 653-5, Apr 2009.

OLINDA, R. G., PENA, H. F., FRADE, M. T., FERREIRA, J. S., MAIA, L., GENNARI, S. M., OLIVEIRA, S., DANTAS, A. F., RIET-CORREA, F.. Acute toxoplasmosis in pigs in Brazil caused by *Toxoplasma gondii* genotype Chinese 1. **Parasitol Res**, v. 115, n. 7, p. 2561-6, Jul. 2016.

PASSOS, LAC. Sobrevivência e infectividade do *Trypanosoma cruzi* na polpa de açai: estudo in vitro e in vivo. **Epidemiol. Serv. Saúde** [online]. 2012, vol.21, n.2, pp. 223-232.

PEREIRA, K. S., SCHMIDT, F. L., GUARALDO, A. M., FRANCO, R. M., DIAS, V. L., PASSOS, L. A., Chagas' disease as a foodborne illness. **J Food Prot**, v. 72, n. 2, p. 441-6, Feb 2009.

PUJOL-RIQUÉ, M., DEROUIN, F., GARCÍA-QUINTANILLA, A., VALLS, M.E., MIRÓ, J.M., JIMÉNEZ DE ANTA, M.T., 1999. Design of a one-tube hemi-nested PCR for detection of *Toxoplasma gondii* and compariston of three DNA purification methods. **J. Med Microbiol.** 48, 857 e 862

RULATA,W APIC Guideline for selection and use of disinfectants. **American Journal of infection Control**, ST Louis, MO, v 23,p.30-65,1995.

SALES, André Nunes de. Padronização dos Procedimentos Operacionais para a Gestão da Qualidade no Biotério de Experimentação de Farmanguinhos – Fiocruz. 2013. 83f. Dissertação de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

SÁNCHEZ, L. V.; RAMÍREZ, J. D. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. **Parasitology**, v. 140, n. 2, p. 147-59, Feb 2013.

VALENTE SAS, VALENTE VC, PINTO AYN. Por que ocorrem episódios familiares de doença de Chagas associado à transmissão oral na Amazônia brasileira? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 2002; 35(I):165. In: **Anais do 38<sup>a</sup> Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 2002; Foz do Iguaçu. Brasil.

VERONESI, F., SANTORO, A., MILARDI, G. L., DIAFERIA, M., ORGANTI, G. RANUCCI, D., GABRIELLI, S.; Detection of *Toxoplasma gondii* in faeces of privately owned cats using two PCR assays targeting the B1 gene and the 529-bp repetitive element. **Parasitol Res**, v. 116, n. 3, p. 1063-1069, Mar 2017.

VIRREIRA, M., TORRICO, F., TRUYENS, C., ALONSO-VEGA, C., SOLANO, M., CARLIER, Y., SVOBODA, M.; Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Trop Med Hyg**, v. 68, n. 5, p. 574-82, May 2003.

WANG, H., ZHANG, L., REN, Q., YU, F., YANG, Y.; Diagnosis of Swine Toxoplasmosis by PCR and Genotyping of *Toxoplasma gondii* from pigs in Henan, Central China. **BMC Vet Res**, v. 13, n. 1, p. 152, May 2017

WONG SY, REMINGTON JS. Toxoplasmosis in Pregnancy. *Clin Infect Dis*. 1994;18:853-62.

WONG, S. Y. *l.*, Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute toxoplasma infection and toxoplasmosis. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 11, p. 2952-9, Nov. 1993.

Wright DK, Manos MM: Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al., eds. *PCR protocols. A guide to methods and applications*. San Diego: Harcourt, Brace, Jovanovich; 1990:154–156.

YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104 Supl 1, p. 101-7, Jul. 2009.

ZHOU, D. H., Molecular detection and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in farmed raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in Shandong province, eastern China. **Acta Trop.**, v. 172, p. 143-146, Aug 2017.

# ANEXOS

**ANEXO I – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA  
TRECHO ABAIXO RETIRADO DE “RESOLUÇÃO DA DIRETORIA  
COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004”.**

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE  
DEZEMBRO DE 2004.

Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o  
gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

CAPÍTULO II.

**ABRANGÊNCIA**

Este Regulamento aplica-se a todos os geradores de Resíduos de Serviços de Saúde-  
RSS. Para efeito deste Regulamento Técnico, definem-se como geradores de RSS  
todos os serviços relacionados com o atendimento à saúde humana ou animal, inclusive  
os serviços de assistência domiciliar e de trabalhos de campo; laboratórios analíticos de  
produtos para saúde; necrotérios, funerárias e serviços onde se realizem atividades de  
embalsamamento (tanatopraxia e somatoconservação); serviços de medicina legal;  
drogarias e farmácias inclusive as de manipulação; estabelecimentos de ensino e  
pesquisa na área de saúde; centros de controle de zoonoses; distribuidores de produtos  
farmacêuticos, importadores, distribuidores e produtores de materiais e controles para  
diagnóstico in vitro; unidades móveis de atendimento à saúde; serviços de acupuntura;  
serviços de tatuagem, dentre outros similares.”

**ANEXO II- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA**  
**TRECHO RETIRADO DA “RESOLUÇÃO Nº 358, DE 29 DE ABRIL DE 2005”.**

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA RDC Nº 358, DE 29 DE ABRIL DE 2005.

Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos  
resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências.

**Art. 1º.**

Esta Resolução aplica-se a todos os serviços relacionados com o atendimento à saúde humana ou animal, inclusive os serviços de assistência domiciliar e de trabalhos de campo; laboratórios analíticos de produtos para saúde; necrotérios, funerárias e serviços onde se realizem atividades de embalsamamento (tanatopraxia e somato conservação); serviços de medicina legal; drogarias e farmácias inclusive as de manipulação; estabelecimentos de ensino e pesquisa na área de saúde; centros de controle de zoonoses; distribuidores de produtos farmacêuticos; importadores, distribuidores e produtores de materiais e controles para diagnóstico in vitro; unidades móveis de atendimento à saúde; serviços de acupuntura; serviços de tatuagem, entre outros similares.

**ANEXO III - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA  
TRECHO ABAIXO RETIRADO DE “RESOLUÇÃO DA DIRETORIA  
COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004”.**

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE  
DEZEMBRO DE 2004.

Apêndice I

Classificação

**GRUPO A Resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características, podem apresentar risco de infecção.**

A1 - Culturas e estoques de microrganismos; resíduos de fabricação de produtos biológicos, exceto os hemoderivados; descarte de vacinas de microrganismos vivos ou atenuados; meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas; resíduos de laboratórios de manipulação genética. - Resíduos resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais, com suspeita ou certeza de contaminação biológica por agente classe de risco 4, microrganismos com relevância epidemiológica e risco de disseminação ou causador de doença emergente que se torne epidemiologicamente importante ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido. - Bolsas transfusionais contendo sangue ou hemocomponentes rejeitadas por contaminação ou por má conservação, ou com prazo de validade vencido, e aquelas oriundas de coleta incompleta. - Sobras de amostras de laboratório contendo sangue ou líquidos corpóreos, recipientes e materiais resultantes do processo de assistência à saúde, contendo sangue ou líquidos corpóreos na forma livre.

**A2 - Carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos, bem como suas forrações, e os cadáveres de animais suspeitos de serem portadores de microrganismos de relevância epidemiológica e com risco de disseminação, que foram submetidos ou não a estudo anátomo-patológico ou confirmação diagnóstica.**

A3 - Peças anatômicas (membros) do ser humano; produto de fecundação sem sinais vitais, com peso menor que 500 gramas ou estatura menor que 25 centímetros ou idade gestacional menor que 20 semanas, que não tenham valor científico ou legal e não tenha havido requisição pelos pacientes ou familiares.

A4 - Kits de linhas arteriais, endovenosas e dialisadores, quando descartados. - Filtros de ar e gases aspirados de área contaminada; membrana filtrante de equipamento médico-hospitalar e de pesquisa, entre outros similares. - Sobras de amostras de laboratório e seus recipientes contendo fezes, urina e secreções, provenientes de pacientes que não contenham e nem sejam suspeitos de conter agente Classe de Risco 4, e nem apresentem relevância epidemiológica e risco de disseminação, ou microrganismo causador de doença emergente que se torne epidemiologicamente importante ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido ou com suspeita de contaminação com príons. - Resíduos de tecido adiposo proveniente de lipoaspiração, lipoescultura ou outro procedimento de cirurgia plástica que gere este tipo de resíduo. - Recipientes e materiais resultantes do processo de assistência à saúde, que não contenha sangue ou líquidos corpóreos na forma livre. - Peças anatômicas (órgãos e tecidos) e outros resíduos provenientes de procedimentos cirúrgicos ou de estudos anátomo-patológicos ou de confirmação diagnóstica. - Carcaças peças anatômicas vísceras e outros resíduos provenientes de animais não submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos, bem como suas forrações. - Bolsas transfusionais vazias ou com volume residual pós-transfusão.

A5 - Órgãos, tecidos, fluidos orgânicos, materiais perfurocortantes ou escarificantes e demais materiais resultantes da atenção à saúde de indivíduos ou animais, com suspeita ou certeza de contaminação com príons.

GRUPO B - Resíduos contendo substâncias químicas que podem apresentar risco à saúde pública ou ao meio ambiente, dependendo de suas características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade. - Produtos hormonais e produtos antimicrobianos; citostáticos; antineoplásicos; imunossuppressores; digitálicos; imunomoduladores; anti-retrovirais, quando descartados por serviços de saúde,

farmácias, drogarias e distribuidores de medicamentos ou apreendidos e os resíduos e insumos farmacêuticos dos Medicamentos controlados pela Portaria MS 344/98 e suas atualizações. - Resíduos de saneantes, desinfetantes, desinfestantes; resíduos contendo metais pesados; reagentes para laboratório, inclusive os recipientes contaminados por estes. - Efluentes de processadores de imagem (reveladores e fixadores). - Efluentes dos equipamentos automatizados utilizados em análises clínicas - Demais produtos considerados perigosos, conforme classificação da NBR 10.004 da ABNT (tóxicos, corrosivos, inflamáveis e reativos).

GRUPO C Quaisquer materiais resultantes de atividades humanas que contenham radionuclídeos em quantidades superiores aos limites de isenção especificados nas normas do CNEN e para os quais a reutilização é imprópria ou não prevista. - Enquadram-se neste grupo os rejeitos radioativos ou contaminados com radionuclídeos provenientes de laboratório de análise clínica, serviços de medicina nuclear e radioterapia, segundo a resolução CNEN-6.05.

GRUPO D. Resíduos que não apresentem risco biológico, químico ou radiológico à saúde ou ao meio ambiente, podendo ser equiparados aos resíduos domiciliares. - papel de uso sanitário e fralda, absorventes higiênicos, peças descartáveis de vestuário, resto alimentar de paciente, material utilizado em anti-sepsia e hemostasia de venoclises, equipo de soro e outros similares não classificados como A1; - sobras de alimentos e do preparo de alimentos; - resto alimentar de refeitório; - resíduos provenientes das áreas administrativas; - resíduos de varrição, flores, podas e jardins - resíduos de gesso provenientes de assistência à saúde.

GRUPO E Materiais perfurocortantes ou escarificantes, tais como: Lâminas de barbear, agulhas, escalpes, ampolas de vidro, brocas, limas endodônticas, pontas diamantadas, lâminas de bisturi, lancetas; tubos capilares; micropipetas; lâminas e lamínulas; espátulas; e todos os utensílios de vidro quebrados no laboratório (pipetas, tubos de coleta sanguínea e placas de Petri) e outros similares.

**ANEXO IV- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA**  
**TRECHO RETIRADO DA “RESOLUÇÃO Nº 358, DE 29 DE ABRIL DE 2005”.**

RESOLUÇÃO Nº 358, DE 29 DE ABRIL DE 2005.

Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos  
resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências.

**Art. 16.**

Os resíduos do Grupo A2, constantes do Anexo I desta Resolução, devem ser submetidos a processo de tratamento com redução de carga microbiana compatível com nível III de inativação e devem ser encaminhados para:

I - aterro sanitário licenciado ou local devidamente licenciado para disposição final de resíduos dos serviços de saúde, ou;

II - sepultamento em cemitério de animais.

Parágrafo único. Deve ser observado o porte do animal para definição do processo de tratamento. Quando houver necessidade de fracionamento, este deve ser autorizado previamente pelo órgão de saúde competente.

**ANEXO V – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA  
TRECHO RETIRADO DA “RESOLUÇÃO Nº 358, DE 29 DE ABRIL DE 2005”.**

RESOLUÇÃO Nº 358, DE 29 DE ABRIL DE 2005.

Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos  
resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências.

**Art. 2º.**

Para os efeitos desta Resolução considera-se: VIII - nível III de inativação microbiana: inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, **parasitas** e microbactérias com redução igual ou maior que **6Log10**, e inativação de esporos do bacilo *stearothermophilus* ou de esporos do bacilo *subtilis* com redução igual ou maior que 4Log10;...”

**ANEXO VI - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA  
TRECHO ABAIXO RETIRADO DE “RESOLUÇÃO DA DIRETORIA  
COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004”.**

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE  
DEZEMBRO DE 2004.

APÊNDICE IV

**TABELA I - NÍVEIS DE INATIVAÇÃO MICROBIANA DE ACORDO COM A  
ENVIRONMENT PROTECTION AGENCY - EPA, EUA.**

	NÍVEIS DE INATIVAÇÃO MICROBIANA
Nível I	Inativação de bactérias vegetativas, fungos e vírus lipofílicos com redução igual ou maior que 6Log10
Nível II	Inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias com redução igual ou maior que 6Log10
Nível III	<b>Inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias com redução igual ou maior que 6Log10, e inativação de esporos do B. stearothermophilus ou de esporos do B. subtilis com redução igual ou maior que 4Log10.</b>
Nível IV	Inativação de bactérias vegetativas, fungos, vírus lipofílicos e hidrofílicos, parasitas e micobactérias, e inativação de esporos do B. stearothermophilus com redução igual ou maior que 4Log10.

Fonte: Technical Assistance Manual: State Regulatory Oversight of Medical Waste Treatment Technologies - State and Territorial Association on Alternate Treatment Technologies - Abril de 1994.

**ANEXO VII - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA  
TRECHO ABAIXO RETIRADO DE “RESOLUÇÃO DA DIRETORIA  
COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004”.**

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE  
DEZEMBRO DE 2004.

Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o  
gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

**CAPÍTULO III**

**GERENCIAMENTO DOS RESÍDUOS DE SERVIÇOS DE SAÚDE - RSS.**

O gerenciamento dos RSS constitui-se em um conjunto de procedimentos de gestão, planejados e implementados a partir de bases científicas e técnicas, normativas e legais, com o objetivo de minimizar a produção de resíduos e proporcionar aos resíduos gerados, um encaminhamento seguro, de forma eficiente, visando à proteção dos trabalhadores, a preservação da saúde pública, dos recursos naturais e do meio ambiente. O gerenciamento deve abranger todas as etapas de planejamento dos recursos físicos, dos recursos materiais e da capacitação dos recursos humanos envolvidos no manejo dos RSS.

**ANEXO VIII - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA TRECHO ABAIXO RETIRADO DE “RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004”.**

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004.

CAPÍTULO VI.

MANEJO DE RSS Para fins de aplicabilidade deste Regulamento, o manejo dos RSS nas fases de Acondicionamento, Identificação, Armazenamento Temporário e Destinação Final, será tratado segundo a classificação dos resíduos constante do Apêndice I.

**6 - GRUPO A2**

**6.1 - Carcaças, peças anatômicas, vísceras e outros resíduos provenientes de animais submetidos a processos de experimentação com inoculação de microrganismos, bem como suas forrações, e os cadáveres de animais suspeitos de serem portadores de microrganismos de relevância epidemiológica e com risco de disseminação, que foram submetidos ou não a estudo anátomo-patológico ou confirmação diagnóstica. Devem ser submetidos a tratamento antes da disposição final.**

6.1.1 - Devem ser inicialmente acondicionados de maneira compatível com o processo de tratamento a ser utilizado. Quando houver necessidade de fracionamento, em função do porte do animal, a autorização do órgão de saúde competente deve obrigatoriamente constar do PGRSS.

6.1.2 - Resíduos contendo microrganismos com alto risco de transmissibilidade e alto potencial de letalidade (Classe de risco 4) devem ser submetidos, no local de geração, a processo físico ou outros processos que vierem a ser validados para a obtenção de

redução ou eliminação da carga microbiana, em equipamento compatível com Nível III de Inativação Microbiana (Apêndice IV) e posteriormente encaminhado para tratamento térmico por incineração.

6.1.3 - Os resíduos não enquadrados no item 6.1.2 devem ser tratados utilizando-se processo físico ou outros processos que vierem a ser validados para a obtenção de redução ou eliminação da carga microbiana, em equipamento compatível com Nível III de Inativação Microbiana (Apêndice IV). O tratamento pode ser realizado fora do local de geração, mas os resíduos não podem ser encaminhados para tratamento em local externo ao serviço.

6.1.4 - Após o tratamento dos resíduos do item 6.1.3 estes podem ser encaminhados para aterro sanitário licenciado ou local devidamente licenciado para disposição final de RSS, ou sepultamento em cemitério de animais.

6.1.5 - Quando encaminhados para disposição final em aterro sanitário licenciado, devem ser acondicionados conforme o item 1.2, em saco branco leitoso, que devem ser substituídos quando atingirem 2/3 de sua capacidade ou pelo menos 1 vez a cada 24 horas e identificados conforme item 1.3.3 e a inscrição de “PEÇAS ANATÔMICAS DE ANIMAIS”.

**ANEXO IX- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA  
TRECHO ABAIXO RETIRADO DE “RESOLUÇÃO DA DIRETORIA  
COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004”.**

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE  
DEZEMBRO DE 2004.

**GRUPO B**

**11.18 - Resíduos químicos que não apresentam risco à saúde ou ao meio ambiente**

**11.18.1 - Não necessitam de tratamento, podendo ser submetidos a processo de reutilização, recuperação ou reciclagem.**

11.18.2 - Resíduos no estado sólido, quando não submetidos à reutilização, recuperação ou reciclagem, devem ser encaminhados para sistemas de disposição final licenciados.

11.18.3 - Resíduos no estado líquido podem ser lançados na rede coletora de esgoto ou em corpo receptor, desde que atendam respectivamente as diretrizes estabelecidas pelos órgãos ambientais, gestores de recursos hídricos e de saneamento competentes.

**ANEXO X - FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTOS QUÍMICOS (FISPQ) LYSOFORM BRUTO.**

<p><b>FISPQ</b> (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) <b>LYSOFORM BRUTO</b></p>		
Elaborado: 08/04/2010 Revisão: 01	Elaboração: P&D Solange Hernandes	Aprovação: P&D Químico: Adelize F. de Moraes CRQ no : 004215189
<p><b>1 - IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO E DA EMPRESA:</b></p> <p>Nome: Lysoform Bruto Códigos internos: 12001 (500ml), 12002 (1L) e 12003 (5L)</p> <p>Empresa: BOMBRIL S/A</p> <p>TELEFONE DE EMERGÊNCIA: 0800 014 8110</p> <p><b>2 - COMPOSIÇÃO E INFORMAÇÕES SOBRE OS INGREDIENTES</b></p> <p>Aplicação: O produto Lysoform Bruto é um Desinfetante para Uso Geral, de uso doméstico.</p> <p>Categoria: Desinfetante para Uso Geral.</p> <p>Natureza Química: este produto químico é um preparado contendo Tensoativo Catiônico, Sequestrante, Alcalinizante, Conservante, Fragrância e Veículo.</p> <p>Componente Ativo: Cloreto de Cocobenzil alquil dimetil amônio / Cloreto de didecil dimetil amônio.</p>		

Ingredientes ou impurezas que contribuam para o perigo:

Nome químico	N°CAS	Concentração %	Função	Formula molecular	Sinônimos	Classificação de risco
Hidróxido de Amônio	1336-21-6	< 0,2	Alcalinizante	NH <sub>4</sub> OH	Amoníaco / Amônia	Corrosivo/ tóxico

Os demais ingredientes da formulação não contribuem para o perigo e não há impurezas toxicologicamente significativas.

### 3 - IDENTIFICAÇÃO DE PERIGOS

Perigos mais importantes: em condições normais de uso o produto não é considerado perigoso.

Efeitos adversos à saúde humana: o contato com os olhos causa irritação. O contato por período prolongado com a pele pode causar irritações.

Efeitos ambientais: pode contaminar rios e solo.

Perigos específicos: o produto não é classificado como produto perigoso.

Perigo Químico: ingestão, inalação ou aspiração, contato com os olhos e contato prolongado com a pele.

### 4 - MEDIDAS DE PRIMEIRO SOCORROS

Contato com a pele: remova roupas e sapatos contaminados, lave as partes atingidas com água em abundância durante 15 minutos. Se a irritação persistir consulte um médico, levando a embalagem ou o rótulo do produto.

Contato com os olhos: retirar lentes de contato se presentes. Lavar com água em

abundância durante 15 minutos. Se a irritação persistir consulte um médico, levando a embalagem ou o rótulo do produto.

Ingestão: não induzir o vômito. Consulte um médico de imediatamente, levando a embalagem ou o rótulo do produto. ATENÇÃO: Não dê nada por via oral a uma pessoa inconsciente.

Inalação: remova a pessoa para local arejado e se houver sinais de intoxicação, chame socorro médico Tel. emergência 0800 014 8110.

Recomendações para o Médico: avaliar a composição descrita no rótulo. Componente Ativo: Cloreto de Cocobenzil alquil dimetil amônio / Cloreto de didecil dimetil amônio.

## **5 - MEDIDAS DE COMBATE A INCÊNDIO**

**Meios de extinção apropriados:** produto não inflamável. Porém se ocorrer princípio de incêndio com outros materiais utilizar agente extintor de CO<sub>2</sub>, Pó Químico e Água.

**Meios impróprios de extinção:** não utilizar agente extintor de água, quando houver fontes energizadas no local.

**Perigos específicos:** não há perigo específico devido sua formulação conter mais de 90% de água.

**Métodos especiais de combate a incêndio:** o produto não oferece riscos específicos para métodos especiais de combate a incêndio. Produto não inflamável.

**Equipamentos especiais para proteção dos bombeiros:** devido às características do produto, não é necessário o uso de equipamentos especiais, além dos utilizados habitualmente.

## **6 - MEDIDAS DE CONTROLE PARA DERRAMAMENTO OU VAZAMENTO**

Precauções pessoais: retire da área pessoas desnecessárias. Use EPI's. Se possível pare a fonte de derramamento ou vazamento.

Precauções para o meio ambiente: evitar a contaminação dos cursos d'água vedando a entrada de galerias de águas pluviais (boca de lobo). Evitar que resíduos do produto derramado atinjam coleções de água, absorvendo o produto com material absorvente (ex.: serragem, areia ou argila). Contate as autoridades de segurança local.

Métodos para limpeza: conter e recolher o derramamento. Colocar os resíduos em recipiente para eliminação de acordo com as regulamentações locais. Limpar preferencialmente com água, evitando o uso de solventes. Para grandes vazamentos, conter o líquido em diques e bombear para recipientes apropriados.

Prevenção de perigos secundários: não permitir o escoamento para o solo, córregos, rios ou esgotos.

## **7 - MANUSEIO E ARMAZENAGEM:**

### **MANUSEIO**

O produto é destinado ao uso doméstico pelo consumidor final. Precauções para manuseio seguro: ANTES DE USAR LEIA AS INSTRUÇÕES DO RÓTULO. Não comer, beber ou fumar durante o manuseio. Lave-se bem após o manuseio. Não ingerir. Evite a inalação, aspiração, contato com os olhos e a pele. Conserve fora do alcance das crianças e dos animais domésticos. Lave em água corrente os objetos usados como medida antes de reutilizá-los para outros fins. Não misture com produtos a base de cloro. Não misturar com outros produtos. Não utilizar para desinfecção de alimentos. Manter o produto em sua embalagem original. Não reutilizar as embalagens.

Medidas técnicas: manter pessoas, principalmente crianças e animais domésticos longe do local de trabalho.

Prevenção da exposição do trabalhador: utilizar EPI conforme descrito no item 8.

### **ARMAZENAGEM**

Condições de armazenamento adequadas: CONSERVE FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS E DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS. Mantenha o produto em sua embalagem original adequadamente fechada, em local seco e fresco, protegido do Sol e do calor.

Produtos e materiais incompatíveis: produtos contendo cloro.

### **8 - CONTROLE DE EXPOSIÇÃO E PROTEÇÃO INDIVIDUAL**

Exposição ocupacional: com práticas de trabalho adequadas, medidas de higiene e precauções de segurança é improvável que o uso do produto apresente perigos para aqueles ocupacionalmente expostos.

Equipamentos de Proteção Individual:

Proteção respiratória: Não aplicável.

Proteção das mãos: em grandes quantidades usar Luvas de Borracha.

Proteção dos olhos: em grandes quantidades usar óculos de Segurança.

Medidas de higiene: não comer, beber ou fumar durante o manuseio. Depois de utilizar este produto, lave e seque as mãos

Precauções especiais: Manter os EPIs em bom estado de conservação.

### **9 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS:**

Estado Físico: líquido.

Cor: incolor de acordo com o padrão.

Odor: de acordo com o padrão.

pH (sol. 1% água p/p 25oC): 9,3 - 11,3

pH puro: 10,45 - 11,3

% Matéria Ativos Catiônicos: 0,38 - 0,52%

Peso molecular médio: 355,5

#### **10 - ESTABILIDADE E REATIVIDADE:**

O produto é estável á temperatura ambiente, sob condições normais de uso e armazenagem.

Reações perigosas: a mistura com produtos à base de cloro pode liberar gases tóxicos.

Condições a evitar: temperaturas superiores a 50oC, exposição à luz solar direta.

Materiais ou substâncias incompatíveis: produtos a base de cloro.

Produtos perigosos da decomposição: não há a liberação de gases tóxicos e irritantes.

#### **11 - INFORMAÇÕES TOXICOLÓGICAS:**

Contato com a pele: o contato com a pele por período prolongado, pode causar irritação.

Contato com os olhos: o contato com o produto pode causar irritação nos olhos e mucosas.

Ingestão: a ingestão do produto pode causar intoxicações.

#### **12 - INFORMAÇÕES ECOLÓGICAS:**

Efeitos Ambientais: pode causar problemas somente no caso de derramamento ou de mau uso.

Persistência / Degradabilidade: o produto é considerado degradável.

**13 - CONSIDERAÇÕES SOBRE TRATAMENTO E DISPOSIÇÃO:**

Restos de Produtos: o tratamento e disposição dos resíduos devem ser feitos de acordo com normas de órgãos ambientais e legislações específicas.

Embalagem usada: é proibida ao usuário a reutilização das embalagens vazias. Nenhum tipo de destinação especial é recomendado. Esta embalagem poderá ser lavada e reciclada. Jogue no lixo a embalagem vazia. A destinação inadequada das embalagens vazias e restos de produto no meio ambiente causam contaminação do solo e da água, prejudicando a fauna, a flora e a saúde das pessoas.

**14 - INFORMAÇÕES SOBRE TRANSPORTE:**

Regulamentações nacionais e internacionais O PRODUTO NÃO É CLASSIFICADO PELA LEGISLAÇÃO DE TRANSPORTE DE PRODUTOS PERIGOSOS.

Regulamentações: Produto registrado na ANVISA conforme legislação vigente, sob o número 3.0589.0219

Informações sobre risco de segurança conforme escritas no rótulo:

**ANTES DE USAR LEIA AS INSTRUÇÕES DO RÓTULO.**

Não ingerir. Evite a inalação ou aspiração, contato com os olhos e a pele. CONSERVE FORA DO ALCANCE DAS CRIANÇAS E DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS. Usar luvas para sua aplicação. Em caso de contato com os olhos e pele, lavar com água em abundância durante 15 minutos. Se a irritação persistir consulte um médico, levando a embalagem ou o rótulo do produto. Não dê nada por via oral a uma pessoa inconsciente. Em caso de ingestão acidental, não induzir o vômito. Consulte um médico imediatamente, levando a embalagem ou o rótulo do produto. Em caso de inalação ou aspiração, remova a pessoa para local arejado e se houver sinais de intoxicação chame socorro médico. Tel. de Emergência: 0800 014 8110 (CEATOX - Centro de Assistência Toxicológica do Hospital das Clínicas).

**ADVERTÊNCIAS:**

Manter o produto em sua embalagem original. Não misturar com outros produtos. Não utilizar para desinfecção de alimentos. Não reutilizar as embalagens. Não misture com produtos à base de cloro. Lave em água corrente os objetos usados como medida antes de reutilizá-los para outros fins. Lave em água corrente os objetos usados como medida antes de reutilizá-los para outros fins.

**16 - OUTRAS INFORMAÇÕES:**

As informações e recomendações contidas nesta FISPQ foram obtidas de fontes idôneas e baseadas em experiências anteriores, referem-se a este produto específico e tem validade quando utilizadas de acordo com as orientações do rótulo. Qualquer outra utilização é de responsabilidade do usuário. Bibliografia: NBR 14.725

**ANEXO XI - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA  
TRECHO RETIRADO DA LEI Nº 6.938, DE 31 DE AGOSTO DE 1981,  
REGULAMENTADA PELO DECRETO Nº 99.274, DE 6 DE JUNHO DE 1990,  
ANEXO À PORTARIA Nº 326, DE 15 DE DEZEMBRO DE 1994; RESOLUÇÃO  
RDC/ANVISA Nº 316, DE 29 DE OUTUBRO DE 2002.**

**RESOLUÇÃO RDC/ANVISA Nº 316, DE 29 DE OUTUBRO DE 2002.**

Dispõe sobre procedimentos e critérios para o funcionamento de sistemas de tratamento térmico de resíduos.

Considerando que os sistemas de tratamento térmico de resíduos são fontes potenciais de risco ambiental e de emissão de poluentes perigosos, podendo constituir agressão à saúde e ao meio ambiente se não forem corretamente instalados, operados e mantidos; Considerando que, entre estes poluentes destacam-se, pela sua periculosidade, os poluentes orgânicos persistentes, e que deve ser buscada a redução das emissões totais dos poluentes mencionados, com a finalidade de sua contínua minimização e, onde viável, sua eliminação definitiva;

Art. 14.

Os estabelecimentos geradores de resíduos de serviço de saúde, que optarem pelo tratamento térmico dos resíduos, devem fazer constar esta opção do Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde, em conformidade com a Resolução CONAMA nº 283, de 12 de julho de 2001, aprovado pelos órgãos de meio ambiente e de saúde, dentro de suas respectivas esferas de competência, de acordo com a legislação vigente.

Art. 15.

Os resíduos de serviços de saúde, recebidos pelo sistema de tratamento térmico,

deverão ser documentados por meio de registro dos dados da fonte geradora, contendo, no mínimo, informações relativas à data de recebimento, quantidade e classificação dos resíduos quanto ao grupo a que pertencem, em conformidade com a Resolução CONAMA nº 283, de 2001.

**Art. 16.**

Os resíduos de serviços de saúde, quando suscetíveis ao tratamento térmico, devem obedecer, segundo a sua classificação, ao que se segue:

**I - GRUPO A: resíduos que apresentam risco à saúde pública e ao meio ambiente, devido à presença de agentes biológicos, devem ser destinados a sistemas especialmente licenciados para este fim, pelo órgão ambiental competente;**

II - GRUPO B: resíduos que apresentam risco à saúde pública e ao meio ambiente devido as suas características físicas, químicas e físico-químicas, devem ser submetidos às condições específicas de tratamento térmico para resíduos de origem industrial;

III - GRUPO D: resíduos comuns devem ser enquadrados nas condições específicas de tratamento térmico para resíduos sólidos urbanos.

**ANEXO XII- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA  
TRECHO ABAIXO RETIRADO DE “RESOLUÇÃO DA DIRETORIA  
COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004”.**

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE  
DEZEMBRO DE 2004.

Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o  
gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.

**1.6 TRATAMENTO**

Consiste na aplicação de método, técnica ou processo que modifique as características dos riscos inerentes aos resíduos, reduzindo ou eliminando o risco de contaminação, de acidentes ocupacionais ou de dano ao meio ambiente. O tratamento pode ser aplicado no próprio estabelecimento gerador ou em outro estabelecimento, observadas nestes casos, as condições de segurança para o transporte entre o estabelecimento gerador e o local do tratamento. Os sistemas para tratamento de resíduos de serviços de saúde devem ser objeto de licenciamento ambiental, de acordo com a Resolução CONAMA nº. 237/1997 e são passíveis de fiscalização e de controle pelos órgãos de vigilância sanitária e de meio ambiente”.

1 6 2 - Os sistemas de tratamento térmico por incineração devem obedecer ao estabelecido na Resolução CONAMA nº. 316/2002.

**ANEXO XIII - MINNESOTA POLLUTION CONTROL AGENCY, INFECTIOUS WASTE: MANAGEMENT GUIDANCE FOR STORAGE AND DECONTAMINATION FACILITIES.**

***Minnesota Pollution Control Agency, Infectious Waste:***

*Management guidance for storage and decontamination facilities.*

What must a facility's infectious waste management plan include?

All facilities:

- Corporate identity of the facility owner registered with the Minnesota Secretary of State to do business in Minnesota. If the facility operator is different than the owner, the same information for the operator.
- Facility street and mailing address.
- Types of infectious waste intended to be handled.
- Method of receiving waste that ensures infectious wastes are properly identified and packaged and not comingled with other wastes, such as hazardous waste. For example, list waste acceptance criteria for customers and reference contract terms requiring compliance with those criteria.
- Description of how infectious waste will be packaged and labeled at the facility.
- BBP exposure control plan, or the steps taken to minimize potential employee exposure during handling.
- Methods used to disinfect reusable containers and facility equipment.
- Systems to prevent putrefaction of infectious waste.
- Spill response procedures and equipment, including how the facility will notify the MPCA immediately after any fire or explosion at the facility or release of infectious waste to the environment.
- Identity, location, and contact staff for all infectious waste storage, decontamination, and infectious or solid waste disposal facilities to be used.
- Name of the designated individual responsible for implementing the management plan.
- Authorized signature of the designated individual or the facility operator's chief

executive officer.

- Date of the version of the plan submitted.
- Maximum length of time that infectious waste may be held at the facility before being decontaminated or shipped off-site. If this time could be more than 48 hours (72 hours over a weekend), then the additional information in the Storage facilities section below must also be included. Storage facilities. In addition to the information in the All facilities section above:

- Maximum volume of infectious waste that may be stored at the facility.
- Estimated closure cost of the facility. Include a per-unit cost for transport, decontamination, and disposal by another vendor of the maximum volume of infectious waste that may be stored. Identify the potential vendor(s) and the market rate for this management.

- One of the following financial assurance instruments in an amount equal or greater than the estimated closure cost:

- Currency or acceptable securities deposited with the State of Minnesota for this purpose.

- Surety bond from an accepted surety company.

- Letter of credit from a federally-regulated or Minnesota-regulated institution. Surety bond and letter of credit language must conform to Minn. R. 7035.9150. Government-owned and operated storage facilities that will store less than 100 pounds of regulated infectious waste do not need to estimate closure cost or provide financial assurance. Decontamination facilities. In addition to the information in the All facilities section above:

- Decontamination method used to treat the infectious waste. Autoclave treatment must consist of at least one-hour exposure of the waste at 250° Fahrenheit and 15 pounds per square inch gauge pressure or its equivalent. All other methods must demonstrate verified decontamination. Decontamination must be verified by standard biological indicators, such as *Geobacillus stearothermophilus* and *Bacillus atrophaeus* spores.

Enclosing an infectious waste within a container or binding it into a matrix is not decontamination.

- Contingency plan of alternate decontamination off-site facilities or on-site methods to be used during an unplanned shutdown of the primary decontamination process.

<https://www.pca.state.mn.us/sites/default/files/w-sw4-32.pdf>.

**ANEXO XIV - BIOSAFETY MANUAL****BIOSAFETY MANUAL**

O objetivo deste manual é definir as políticas e procedimentos de segurança biológica referentes a operações de pesquisa na Universidade de Boston e no Centro Médico de Boston. Essas políticas e procedimentos são projetados para proteger o pessoal e o meio ambiente de materiais biologicamente perigosos e cumprir os requisitos regulamentares federais, estaduais e locais. Todos os investigadores principais da BU e da BMC e os trabalhadores de laboratório devem aderir às políticas e procedimentos de segurança biológica na condução de suas pesquisas e no gerenciamento de seus laboratórios.

## Appendice D

## Autoclave Quality Assurance Program

Autoclaving is an accepted procedure for the decontamination of certain biohazardous waste. Biological cultures and stocks, contaminated solid waste, liquid waste, and small animal carcass waste can be sterilized through autoclaving. After sterilization in a steam autoclave, these materials are considered non-infectious. At BU/BMC, all autoclaved waste is placed into the solid biohazard waste stream. Materials that contain hazardous chemicals or radioisotopes are not to be autoclaved. To ensure that biohazardous waste is properly decontaminated during autoclaving, the following procedures should be followed by laboratory personnel

1. Infectious waste must be treated in an autoclave for a minimum of 30 minutes at 121° C (250° F); however, the total processing time required to decontaminate infectious waste depends on the specific loading factors (container type, water content, quantity, etc.). A total processing time of 60 minutes is recommended for gravity

displacement autoclaves and 10 minutes for vacuum-type autoclaves (132° C).

• **Sterilization by autoclaving is accomplished through exposure and penetration of the contaminated material by superheated steam for an adequate amount of time. Because steam will not penetrate a sealed plastic autoclave bag, bags containing dry loads must not be tightly sealed (rubber band closures will allow bags to “breathe”) or adequate amounts of water must be added to the load. Consult the manufacturer’s instructions for sterilizing materials inside plastic autoclave bags. Liquid waste and fresh animal carcass waste may be autoclaved inside a tightly sealed bag.**

2. All autoclaved waste must include a steam sterilization indicator (the use of biohazard bags with a “builtin” indicator is recommended).

3. Steam autoclaves used to treat infectious waste must operate at a minimum temperature of 121° C. The operating temperature of the autoclave must be verified for each run by maintaining a record of the temperature either as a chart or paper tape recording or a manual recording in a logbook.

4. On a monthly basis, confirm that adequate sterilization conditions are being met through the use of ampoules containing heat-resistant spores (*Bacillus stearothermophilus*) placed in the center of an autoclave load. In conjunction with the *B. stearothermophilus* testing, measure and record the maximum temperature achieved during the autoclave cycle through the use of a maximum registering (or “holding”) thermometer.

5. Maintain records of *B. stearothermophilus* testing and maximum autoclave temperature recordings for a minimum of one year (see Autoclave QC Log at end of appendix).

[http://www.bu.edu/ehs/files/2010/05/Boston\\_University\\_Biosafety\\_Manual12.pdf](http://www.bu.edu/ehs/files/2010/05/Boston_University_Biosafety_Manual12.pdf)

**ANEXO XV - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA  
TRECHO ABAIXO RETIRADO DE “RESOLUÇÃO DA DIRETORIA  
COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE DEZEMBRO DE 2004”.**

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 306, DE 7 DE  
DEZEMBRO DE 2004.

Para fins de aplicabilidade deste Regulamento, o manejo dos RSS nas fases de Acondicionamento, Identificação, Armazenamento Temporário e Destinação Final, será tratado segundo a classificação dos resíduos constante do Apêndice I.

CAPÍTULO VI.

MANEJO DE RSS

5 – GRUPO A1

**5.1 - culturas e estoques de microrganismos resíduos de fabricação de produtos biológicos, exceto os hemoderivados; meios de cultura e instrumentais utilizados para transferência, inoculação ou mistura de culturas; resíduos de laboratórios de manipulação genética. Estes resíduos não podem deixar a unidade geradora sem tratamento prévio.**

5.1.1 - Devem ser inicialmente acondicionados de maneira compatível com o processo de tratamento a ser utilizado.

5.1.2 - Devem ser submetidos a tratamento, utilizando-se processo físico ou outros processos que vierem a ser validados para a obtenção de redução ou eliminação da carga microbiana, em equipamento compatível com Nível III de Inativação Microbiana

(Apêndice IV).

5.1.3 - Após o tratamento, devem ser acondicionados da seguinte forma:

5.1.3.1 - Se não houver descaracterização física das estruturas, devem ser acondicionados conforme o item 1.2, em saco branco leitoso, que devem ser substituídos quando atingirem  $2/3$  de sua capacidade ou pelo menos 1 vez a cada 24 horas e identificados conforme item 1.3.3.

## ANEXO XVI – NÍVEIS DE BIOSSEGURANÇA.

### NÍVEIS DE BIOSSEGURANÇA.

Os níveis são designados em ordem crescente, pelo grau de proteção proporcionado ao pessoal do laboratório, meio ambiente e à comunidade.

**Nível de Biossegurança 1 (NB1)** é o nível de contenção laboratorial que se aplica aos laboratórios de ensino básico, onde são manipulados os microrganismos pertencentes a **classe de risco 1**. Não é requerida nenhuma característica de desenho, além de um bom planejamento espacial e funcional e a adoção de boas práticas laboratoriais.

**Nível de Biossegurança 2 (NB2)** diz respeito ao laboratório em contenção, onde são manipulados microrganismos da classe de risco 2. Se aplicam aos laboratórios clínicos ou hospitalares de níveis primários de diagnóstico, sendo necessário, além da adoção das boas práticas, o uso de **barreiras físicas primárias (cabine de segurança biológica e equipamentos de proteção individual)** e secundárias (desenho e organização do laboratório).

**Nível de Biossegurança 3 (NB3)** é destinado ao trabalho com microrganismos da classe de risco 3 ou para manipulação de grandes volumes e altas concentrações de microrganismos da classe de risco 2. Para este nível de contenção são requeridos além dos itens referidos no nível 2, desenho e construção laboratoriais especiais. Deve ser mantido controle rígido quanto à operação, inspeção e manutenção das instalações e equipamentos e o pessoal técnico deve receber treinamento específico sobre procedimentos de segurança para a manipulação destes microrganismos.

**Nível de Biossegurança 4 (NB4)**, ou laboratório de contenção máxima, destina-se a manipulação de microrganismos da classe de risco 4, onde há o mais alto nível de contenção, além de representar uma unidade geográfica e funcionalmente independente de outras áreas. Esses laboratórios requerem, além dos requisitos físicos e operacionais dos níveis de contenção 1, 2 e 3, barreiras de contenção (instalações, desenho equipamentos de proteção) e procedimentos especiais de segurança.

Adaptado de: Centers for Disease Control and Prevention – CDC Biosafety microbiological and biomedical laboratories, 4° ed. U.S Department of Health and Human Services, Atlanta, 1999. 250p.

[http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/lab\\_virtual/niveis\\_de\\_biosegaranca.html](http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/lab_virtual/niveis_de_biosegaranca.html)

**ANEXO XVII – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS –  
ABNT NBR 9191:2008 SACO PLÁSTICO PARA ACONDICIONAMENTO DE  
LIXO CLASSE II.**

SACO PLÁSTICO PARA ACONDICIONAMENTO DE LIXO CLASSE II.  
ABNT NBR 9191:2008.

4.5 Cor.

A cor do saco plástico deve ser a seguinte:

- a) Saco classe I podem apresentar qualquer cor, exceto branca;
- b) Saco classe II só podem apresentar a cor branca leitosa.**

7.2 No caso de sacos classe II, devem constar em cada saco individualmente identificação do fabricante por seu CNPJ, a capacidade nominal em litros e quilogramas e o símbolo de substância infectante conforme ABNT NBR7500, com inscrição, RESÍDUO INFECTANTE. O símbolo deve ser centralizado a  $1/3$  de altura de baixo para cima, ocupando uma área mínima equivalente a 5% daquela face do saco.



Figura – Símbolo de resíduo infectante

Observação: As especificações para o símbolo de substância infectante estão estabelecidas na NBR 7.500:2005. Segundo essa norma, o símbolo deve estar localizado a  $1/3$  de altura, de

baixo para cima, e ocupar área mínima equivalente a 5% da face do saco plástico.

Casse II – para resíduos infectantes (resíduo de serviço de saúde)

Tipo, dimensões, capacidade nominal em litros e em quilogramas

Tipo	Dimensões planas		Capacidade nominal	
	Largura (cm)	Altura(cm)	Volume (l)	Carga (kg)
A	39	58	15	4,5
B	59	62	30	9
C	63	80	50	15
D	92	90	90	27
E	75	105	100	30

**ANEXO XVIII – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA  
TRECHO RETIRADO DA RESOLUÇÃO CONAMA Nº 5, DE 5 DE AGOSTO  
DE 1993.**

RESOLUÇÃO CONAMA nº 5, de 5 de agosto de 1993

Art. 7º

Os resíduos sólidos serão acondicionados adequadamente, atendendo às normas. Aplicáveis da ABNT e demais disposições legais vigentes.

§ 1o Os resíduos sólidos pertencentes ao grupo “A” do anexo I desta Resolução, serão. Acondicionados em sacos plásticos com a simbologia de substância infectante.

§ 2o Havendo, dentre os resíduos mencionados no parágrafo anterior, outros perfurantes ou cortantes estes serão acondicionados previamente em recipiente rígido, estanque, vedado e identificado pela simbologia de substância infectante.

Art. 10º

Os resíduos sólidos pertencentes ao grupo “A” não poderão ser dispostos no Meio ambiente sem tratamento prévio que assegure:

- a) a eliminação das características de periculosidade do resíduo;
- b) a preservação dos recursos naturais; e,
- c) o atendimento aos padrões de qualidade ambiental e de saúde pública.

Parágrafo único. Aterros sanitários implantados e operados conforme normas técnicas vigentes deverão ter previstos em seus licenciamentos ambientais sistemas específicos que possibilitem a disposição de resíduos sólidos pertencentes ao grupo “A”.

Art. 11º.

Dentre as alternativas passíveis de serem utilizadas no tratamento dos resíduos sólidos, pertencentes ao grupo “A”, ressalvadas as condições particulares de emprego e.

operação de cada tecnologia, bem como se considerando o atual estágio de desenvolvimento tecnológico, recomenda-se a esterilização a vapor ou a incineração.

§ 1o Outros processos de tratamento poderão ser adotados, desde que obedecido o disposto no art.10 desta Resolução e com prévia aprovação pelo órgão de meio ambiente e de saúde competentes.

§ 2o Após tratamento, os resíduos sólidos pertencentes ao grupo “A” serão considerados “resíduos comuns” (grupo “D”), para fins de disposição final.

§ 3o Os resíduos sólidos pertencentes ao grupo “A” não poderão ser reciclados.

Art. 14º.

Os resíduos sólidos pertencentes ao grupo “D” serão coletados pelo órgão municipal de limpeza urbana e receberão tratamento e disposição final semelhante aos determinados para os resíduos domiciliares, desde que resguardadas as condições de proteção ao meio ambiente e à saúde pública.

