



ANAIS DA III MOSTRA DOS TRABALHOS DE CONCLUSÃO DE CURSO DA ESPECIALIZAÇÃO EM VIGILÂNCIA LABORATORIAL EM SAÚDE PÚBLICA

ORGANIZADORES:

CRISTIANE BONALDI CANO

ELAINE LOPES DE OLIVEIRA

JACKSON ANDSON DE MEDEIROS

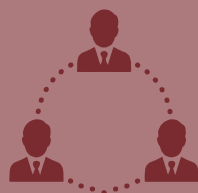
CAROLINA MADAZIO NIRO



Venda proibida



Open access



Revisado por pares

EDITOR CHEFE

Jackson Andson de Medeiros

CORPO EDITORIAL

Carolina Madazio Niro

Jackson Andson de Medeiros

Jaelyson Max Pereira de Medeiros

REVISÃO FINAL

Jackson Andson de Medeiros

CAPA

Jackson Andson de Medeiros

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Mostra dos Trabalhos de Conclusão de Curso da
Especialização em Vigilância Laboratorial em
Saúde Pública (3. : 2022 : Jardim do Seridó, RN)
Anais da III mostra dos trabalhos de conclusão
de curso da especialização em vigilância laboratorial
em saúde pública [livro eletrônico] / organização
Cristiane Bonaldi Cano...[et al.]. -- 1. ed. --
Jardim do Seridó, RN : Ed. dos Autores, 2022.
PDF.

Outros organizadores : Elaine Lopes de Oliveira,
Jackson Andson de Medeiros, Carolina Madazio Niro.
Bibliografia.
ISBN 978-65-00-47531-9

1. Saúde pública 2. Vigilância laboratorial
I. Cano, Cristiane Bonaldi. II. Oliveira, Elaine
Lopes de. III. Medeiros, Jackson Andson de.
IV. Niro, Carolina Madazio.

22-115782

CDD-614.09813

Índices para catálogo sistemático:

1. Saúde pública : Congressos 614.09813

Aline Grazielle Benitez - Bibliotecária - CRB-1/3129

Todas as opiniões e textos presentes neste livro são de inteira responsabilidade de seus autores e coautores.

Agron Science
agronscience.com

COMISSÃO AVALIADORA

ADRIANA PARISE COMPRI
ANA CAROLINA CHIOU NASCIMENTO
AURORA MARQUES CIANCIARULLO
BRENO PANNIA ESPOSITO
BRIGIDA HELENA DA SILVA MENEGHELLO
CARLOS HENRIQUE CAMARGO
CARMEM APARECIDA DE FREITAS OLIVEIRA
CECILIA GERALDES MARTINS
CESAR CILENTO PONCE
CHRISTIANE A R COSTA
CLEIDE MARQUES FERREIRA
CYRO ALVES DE BRITO
DENISE MARIA BUSSONI BERTOLLO
ELAINE LOPES DE OLIVEIRA
FERNANDA MODESTO TOLENTINO BINHARDI
GABRIELA MOTOIE
ACQUELINE TANURY MACRUZ PERESI
JAMILA BARBOSA
JANETE ALABURDA
JULIANA GALERA CASTILHO KAWAI
JULIANA MAIRA WATANABE PINHATA
LAÍS FERNANDA DE PAULI YAMADA
LEYVA CECILIA VIEIRA DE MELO
LOURDES APARECIDA ZAMPIERI D'ANDREA
LUCAS XAVIER BONFIETTI
MÁRCIA LOMBARDO
MARISA AILIN HONG
NAIADY KONNO MADELA PORTO
PAULA ORDONHEZ RIGATO
PRISCILLA DANTAS DE SOUZA VENTURA
REGINA MARIA CATARINO
RENATO PEREIRA DE SOUZA
RITA DE CASSIA COMPAGNOLI CARMONA
ROSÂNGELA AGUILAR DA SILVA
ROSANGELA SIQUEIRA DE OLIVEIRA
SANDRA LORENTE
SERGIO BOKERMANN
TATIANA ELIAS COLOMBO

Agron Science
agronscience.com

SUMÁRIO

1. CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO: OS IMPACTOS DA PANDEMIA DE COVID-19 E EDUCAÇÃO A DISTÂNCIA NO INSTITUTO ADOLFO LUTZ	5
2. O CONTROLE DE IMPUREZAS DO TIPO NITROSAMINA EM MEDICAMENTOS E INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS.....	12
3. AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES E SUA IMPORTÂNCIA	18
4. AVALIAÇÃO DAS CEPAS COM RESULTADOS NEGATIVOS PARA O COMPLEXO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> NO TESTE GENOTYPE MTBDRPLUS NA ROTINA DO NÚCLEO DE TUBERCULOSE E MICOBACTERIOSES	24
5. O IMPACTO DA COVID-19 NA ROTINA DO LABORATÓRIO DE MICOBACTÉRIAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ CLR II BAURU – SP: QUANTITATIVO DE EXAMES, CASOS DIAGNOSTICADOS E COINFECÇÃO TUBERCULOSE/COVID-19.....	31
6. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE CHIKUNGUNYA EM REGIÕES DE CO-CIRCULAÇÃO DE ARBOVIROSES.....	38
7. COMPARAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA AVALIAÇÃO DE AGENTES CAOTRÓPICOS PARA ANÁLISE DO ÍNDICE DE AVIDEZ DE ANTICORPOS IGG EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i>	45
8. ANÁLISE DE DADOS SECUNDÁRIOS DOS CASOS SUSPEITOS DE COQUELUCHE NO ESTADO DE SÃO PAULO	52
9. ANÁLISE DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATOGÊNICAS.....	59
10. EFEITO DAS MEDIDAS DE CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL ADOTADAS NO BRASIL E NOS MUNICÍPIOS DO ESTADO	

DE SÃO PAULO - UMA AVALIAÇÃO CRÍTICA DA POLÍTICA DE SAÚDE PÚBLICA.....	65
11. AVALIAÇÃO DA FLUORETAÇÃO DE ÁGUAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO EM MUNICÍPIOS PERTENCENTES À REGIÃO DE MARÍLIA E ASSIS – SP.....	71
12. IMPACTO DA COVID-19 NA DISSEMINAÇÃO DAS CARBAPENEMASES DO TIPO NDM.....	77
13. AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS EM ESPÉCIES DE LEVEDURAS INCOMUNS IDENTIFICADAS EM LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA EM MICOLOGIA MÉDICA.....	83
14. RASTREIO CITOPATOLÓGICO NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 2016 E 2021: BASE DE DADOS DATASUS	89
15. PERFIL DE QUALIDADE DOS LABORATÓRIOS QUE REALIZAM EXAMES CITOPATOLÓGICOS NA REDE PÚBLICA DO ESTADO DE SÃO PAULO	95
16. OBSERVAÇÕES PRELIMINARES DE CÉLULAS C6/36 E SIRC INFECTADAS COM VÍRUS ZIKA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	101
17. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO NO ESTADO DE SÃO PAULO	107
18. PERFIL DE VIRULÊNCIA DE <i>SALMONELLA</i> SPP. PROVENIENTES DE PRODUTOS CÁRNEOS E ÁGUA.....	113
19. LEISHMANIOSE VISCERAL EM MUNICÍPIOS PRIORITÁRIOS DA REGIÃO DE SAÚDE DE PRESIDENTE PRUDENTE/SP E O IMPACTO DA PANDEMIA DE COVID-19.....	120
20. LEISHMANIOSE VISCERAL EM ÁREAS PRIORITÁRIAS DO MUNICÍPIO DE PRESIDENTE PRUDENTE/SP.....	128
21. ANÁLISE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE EM PACIENTES PORTADORES DO VÍRUS HIV, NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP	135

22. IMPLICAÇÕES DA CO-INFECÇÃO DA DENGUE EM PACIENTES CRONICAMENTE INFECTADOS PELOS VÍRUS HBV E HCV NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP.....	140
23. A EVOLUÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL	147
24. SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS ASSOCIADOS AO CONSUMO DE ALIMENTOS DE ORIGEM VEGETAL, BRASIL, 2000 -2020	153
25. COINFECÇÕES BACTERIANAS EM PACIENTES COM A COVID-19 – REVISÃO DE LITERATURA.....	160
26. PREVALÊNCIA DE DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS EM PACIENTES COM INFECÇÃO POR SARS-COV-2 NO ESTADO DE SÃO PAULO, ENTRE JULHO DE 2020 E JULHO DE 2021.	167
27. REVISÃO: CONCENTRAÇÃO DE IODO NO SAL REFINADO IODADO E NO SAL ROSA DO HIMALAIA COMERCIALIZADOS NO BRASIL	174
28. ÁLCOOL GEL PARA COMBATE AO COVID-19: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE COM BASE NO ESTUDO DE ESTABILIDADE	180
29. PERFIL DAS DOENÇAS DIARREICAS AGUDAS NA REGIÃO METROPOLITANA DA BAIXADA SANTISTA: ANÁLISE DOS DADOS DE NOTIFICAÇÃO.....	186
30. COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE INTERVALOS DE CALIBRAÇÃO – ESTUDO DE CASO APLICADO A TERMÔMETRO DIGITAL.....	193
31. A AVALIAÇÃO DE COLORAÇÕES HISTOQUÍMICAS NA PESQUISA HISTOPATOLÓGICA DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	200
32. CARGA VIRAL E PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIRRETROVIRAIS EM UMA POPULAÇÃO PEDIÁTRICA DO ESTADO DE SÃO PAULO EXPOSTA OU INFECTADA COM HIV-1.....	206

33. MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA TRANSMITIDA EM PACIENTES RECÉM-DIAGNOSTICADOS E NÃO EXPOSTOS AO TRATAMENTO ANTIRRETROVIRAL AO HIV-1 (2020-2021) 212

34. ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES *RPOB*, *KATG* E *INH*A EM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* NO TESTE GENOTYPE MTBDRPLUS-LPA 218

35. AVALIAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE RT-QPCR, RT-SNPCR E ISOLAMENTO DE ENTEROVIRUS EM CULTURA CELULAR EM CASOS SUSPEITOS DE DOENÇA DE MÃO-PÉ-BOCA NO ESTADO DE SÃO PAULO 224

36. LEISHMANIOSE: IDENTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA UTILIZANDO MÉTODOS HISTOQUÍMICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS 231

37. AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO DA EUROANGIOSTRONGILÍASE: DOS TESTES INTRADÉRMICOS AO SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E PESQUISAS COM MIRNA 237

DOI: <https://doi.org/10.53934/10101010-2>

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO: OS IMPACTOS DA PANDEMIA DE COVID-19 E EDUCAÇÃO A DISTÂNCIA NO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Cristiane Bonaldi Cano¹; Elaine Lopes de Oliveira²

¹Coordenadora e docente do Curso de Especialização - IAL;

²Vice-coordenadora e docente do Curso de Especialização – IAL.

Resumo: No ano de 2020 o mundo passa pela pandemia da COVID-19 que rapidamente aumenta o seu contágio, afetando o cotidiano das pessoas e promovendo o isolamento social. As aulas presenciais são afetadas e suspensas devido aos vários planos de quarentena propostos pelo governo estadual de São Paulo. O objetivo deste estudo foi descrever as mudanças que o curso de especialização do Instituto Adolfo Lutz (IAL) passa no ano letivo de 2020-2021. Devido a formação de uma força tarefa para o diagnóstico do novo coronavírus, o curso de especialização, realiza uma mudança dos componentes curriculares teóricos presenciais para educação a distância, ministrando aulas síncronas e assíncronas. Apesar disso, o curso precisou ser suspenso em 2020 e as atividades presenciais só foram retomadas em 2021. Durante o período de aulas remotas foi observado uma maior frequência de aulas assíncronas em relação às aulas síncronas, acompanhadas de grande quantidade de atividades na plataforma Moodle e utilização de chats e fóruns, que proporcionaram a interatividade entre alunos e docentes. Ao retornarem às atividades presenciais, os alunos elaboraram e apresentaram seus Trabalhos de Conclusão de Curso em um evento on-line. Essa pandemia trouxe uma reflexão sobre a educação a distância como uma ferramenta de apoio à educação, incluindo o curso de especialização do IAL, tornando-se uma tecnologia indispensável para o futuro do ensino.

Palavras-chave: Pandemia; COVID-19; Ensino a distância

INTRODUÇÃO

Em 2017 o Instituto Adolfo Lutz (IAL) foi credenciado pelo Conselho Estadual de Educação do Estado de São Paulo, como uma Unidade Didática de Apoio do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, da Secretaria de Estado da Saúde (CEFOP SUS/SP), passando a oferecer, a partir do ano seguinte, o *Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública*. Este curso foi elaborado de acordo as diretrizes e princípios do SUS, de modo a desenvolver, de forma ampla e integrada, as diferentes ações e processos de trabalhos em que o IAL participa, em resposta às demandas dos Sistemas Estadual e Nacional de Vigilância em Saúde. Sendo uma oportunidade de formação profissional para atuação no SUS, onde se pretende qualificar e aperfeiçoar o processo de trabalho nos vários níveis do sistema de saúde municipal, regional e federal, a fim de melhorar o acesso, qualidade e humanização na prestação de serviços.

O objetivo do curso é promover a capacitação de profissionais que atuam na área de saúde, por meio da integração entre conhecimentos teóricos e práticos, nos diagnósticos e análises realizados em um Laboratório de Saúde Pública. Sendo seu maior diferencial, o tempo em que o aluno passa em treinamento prático nos laboratórios do instituto. Este curso de especialização é dividido em módulos teóricos e um módulo prático, sendo estruturado em três grandes áreas: Vigilância Epidemiológica (VE), Vigilância Sanitária e Ambiental (VSA) e Vigilância Epidemiológica e Sanitária em Sub-Redes Regionais(VES_CRL), que contemplam as diferentes áreas de atuação do Instituto Adolfo Lutz Central (São Paulo/SP) e de seus doze Centros de Laboratórios Regionais (CLR), localizados nos municípios de: Araçatuba, Bauru, Campinas, Marília, Presidente Prudente, Rio Claro, Ribeirão Preto, Santo André, Santos, São José do Rio Preto, Sorocaba e Taubaté.

O curso conta com uma organização curricular de 1720 horas, contendo 520 horas de componentes teóricos e 1200 horas de prática. Na parte prática são oferecidas diversas áreas de concentração, em que os alunos escolhem durante o processo seletivo e na qual eles desenvolvem atividades laboratoriais de rotina e pesquisa, incluindo o Trabalho de Conclusão de Curso (TCC).

A modalidade do curso é presencial, entretanto, por ter alunos matriculados em diferentes municípios do Estado de São Paulo, algumas aulas são ministradas no Instituto Central e transmitidas aos laboratórios regionais em tempo real, por meio de ferramentas de webconferência, e com apoio de tutores em cada CLR. Desde a implantação do curso, utilizamos a plataforma Moodle, como ferramenta de apoio aos alunos e docentes, para disponibilização de materiais de apoio, fóruns e realização de atividades.

Em 2019 o mundo se depara com um novo coronavírus (SARS-CoV-2) proveniente da China, que alastra rapidamente por vários países do mundo devido a seu alto potencial de transmissão. No início do ano de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece os protocolos de Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional – o mais alto nível de alerta da Organização, classificando posteriormente esse agravo como uma pandemia. (OPAS, 2020).

No Brasil foram feitas várias mudanças nas rotinas das pessoas, impostas pelos governos federal, estadual e municipal a fim de controlar a pandemia através de quarentenas para controlar a disseminação da COVID-19. Uma das áreas mais afetadas neste período foi a educação, sendo assim o Ministério da Educação pública através da Portaria nº 343/2020 a substituição das aulas presenciais por aulas em meios digitais enquanto durar a situação de pandemia do Novo Coronavírus - COVID-19, com o objetivo de evitar aglomerações, que poderiam contribuir para a disseminação do novo vírus. (Brasil, 2020).

[...]Art. 1º Autorizar, em caráter excepcional, a substituição das disciplinas presenciais, em andamento, por aulas que utilizem meios e tecnologias de informação e comunicação, nos limites estabelecidos pela legislação em vigor, por instituição de educação superior integrante do sistema federal de

ensino, de que trata o art. 2º do Decreto nº 9.235, de 15 de dezembro de 2017.[..] (Brasil, 2020).

Este trabalho vem contextualizar o momento em que o curso de especialização do Instituto Adolfo Lutz passa pelas mudanças no ensino no ano letivo de 2020-2021 em decorrência da pandemia do COVID-19 no Estado de São Paulo.

Pandemia COVID_19 e a atuação do Instituto Adolfo Lutz

O Instituto Adolfo Lutz foi o primeiro laboratório a confirmar o diagnóstico e sequenciar o vírus SARS-CoV-2 no Brasil, no final de fevereiro de 2020.

Por se tratar de um laboratório de referência, capacitado pelo Ministério da Saúde para realizar o diagnóstico desse novo coronavírus, passou a receber milhares de amostras com suspeita de COVID-19 em questão de semanas. Devido a essa demanda expressiva e inusitada a instituição se mobilizou e constituiu uma força tarefa para auxiliar nesse desafio com atuação de dois polos para realização dos ensaios no Laboratório Central e estruturou seis de seus laboratórios regionais (Bauru, Ribeirão Preto, Santo André, Santos, São José do Rio Preto e Sorocaba), reunindo vários profissionais do Instituto, incluindo a maioria dos pesquisadores, que também são os docentes do curso de especialização. Com estes esforços conjuntos foram possíveis ter 25.595 resultados liberados pelos laboratórios, dados obtidos em final de abril de 2020. (IAL, 2020).

Pandemia COVID-19 e Curso de Especialização do IAL

O curso de especialização do IAL do ano letivo de 2020-2021 iniciou suas atividades em março de 2020 e foram matriculados 62 alunos em 38 áreas de concentração prática, sendo 14 áreas na VE, 7 áreas da VSA e 17 áreas da VES_CRL. No período de 01 a 18 de março, os alunos tiveram as aulas presenciais teóricas referentes ao módulo I.

Nesse ínterim, o governo do estado de São Paulo publica vários decretos, dentre eles os decretos nº 64.862/2020 e nº 64.881/2020, que institui entre outras medidas, a suspensão das aulas e a quarentena no estado. O Conselho Estadual de Educação do Estado de São Paulo (CEE-SP), por meio da deliberação 177/2020, normatiza a reorganização dos calendários escolares e permite a realização de aulas remotas, excetuando-se as práticas profissionais, principalmente na área da saúde. Dessa forma, o CEFOR segue as orientações do CEE e reorganiza os calendários escolares e as aulas junto às instituições, para dar continuidade ao curso na forma a distância (São Paulo a, b, c, 2020).

[...]Art. 1º - As instituições vinculadas ao Sistema de Ensino do Estado de São Paulo, públicas ou privadas da Educação Básica e públicas de Educação Superior, tendo em vista a importância da gestão do ensino e da aprendizagem, dos espaços e dos tempos escolares, bem como a compreensão de que as atividades escolares não se resumem ao espaço de uma sala de aula, deverão reorganizar seus calendários escolares nesta situação emergencial, podendo propor, para além de reposição de aulas de forma presencial, formas de realização de atividades escolares não presenciais.[...].(Deliberação CEE nº197, 2020).

A figura 1 descreve a linha do tempo dos acontecimentos relacionados ao curso de especialização durante a pandemia da COVID-19.

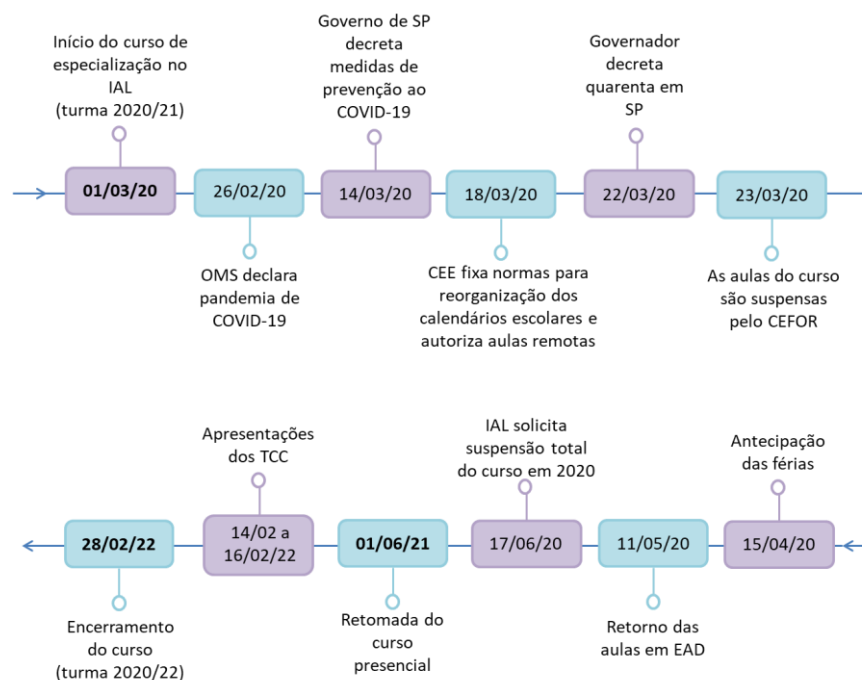


Figura1: linha do Tempo do Curso de especialização do Instituto Adolfo Lutz, no período de Pandemia COVID-19

Neste novo panorama o Instituto Adolfo Lutz iniciou um processo dinâmico para propor as atividades do curso especialização, em curto espaço de tempo para cumprir o novo calendário escolar e ministrar os componentes teóricos na modalidade de Educação à Distância (EAD). Na organização foram propostos aos docentes que cada componente curricular mantivesse as atividades de frequência, material de apoio (vídeos, artigos, textos de livros e etc.) exercícios e avaliação final e uso de fóruns e chats dentro na plataforma Moodle. E iniciasse uma produção de aulas gravadas em formatos de vídeos para serem disponibilizados aos alunos na forma em EAD.

Para a realização das aulas síncronas foi utilizado Zoom, como ferramenta de transmissão, com o apoio da sala de situação da Coordenadoria de Controle de Saúde da Secretaria de Saúde e para as aulas assíncronas foram realizadas a gravação de aulas em Power Point e transformadas em vídeos no formato mp4. Para manter uma comunicação ativa entre os docentes e os estudantes foram utilizados os chats e fóruns do Moodle.

Conforme a figura 1, em maio de 2020, inicia a proposta do novo calendário escolar de 2020, com as aulas os componentes curriculares do módulo II na modalidade EAD. Neste momento o IAL continuava em grande atividade na execução dos exames para o diagnóstico da COVID-19. Como grande parte do corpo docente estava completamente envolvido nessa força-tarefa, tornou-se inviável ministrar as aulas do módulo específico teórico e prático. Sendo assim, em junho de 2020, a coordenação solicita ao CEFOR que encaminhe ao CEE a suspensão do curso.

Em junho de 2021 o curso retorna as suas atividades, mas ainda na forma em EAD, continuando a organização curricular módulo III nas áreas três áreas VE, VSA, VES_CRL, onde foram utilizadas a mesma organização realizada no módulo II em 2020, com aulas síncronas e assíncronas, com auxílio das plataformas Zoom e do Moodle.

Na Tabela 1 e Figura 2 foi realizado um levantamento de todas as atividades desenvolvidas no período dos componentes curriculares teóricos nos anos de 2020-2021.

Tabela 1: Análise descritiva das atividades adotadas para realização dos componentes curriculares no ano letivo de 2020.

Componentes Curriculares	Aulas síncronas	Aulas assíncronas	Fóruns	Chats	Atividades
Módulo II	11	36	5	12	16
Modulo III-VE	42	51	12	14	29
Módulo III-VSA	10	91	28	47	62
Módulo III-VEVS_CRL	6	113	11	20	70
Total	63	291	56	93	177

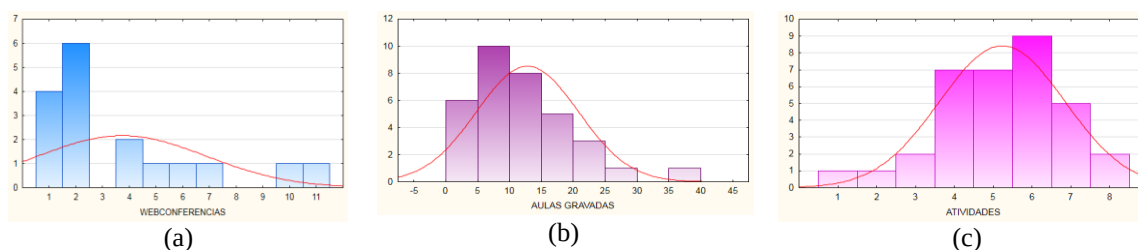


Figura 2: Gráficos de histogramas mais representativos no curso de especialização em EAD para ano letivo 2020: (a) webconferências (síncronas), (b) aulas gravadas (assíncronas), (c) atividades (exercícios, prova e seminários).

Com este novo formato o curso especialização teve, conforme a Tabela 1 e Figura 2, um maior número de aulas na forma assíncronas em relação as aulas síncronas, o que permitiu maior flexibilidade de estudo para os alunos que se encontravam a distância. Como atividade de apoio para discussão de temas que envolviam o componente curricular foram utilizados fóruns e para tirar dúvidas com os docentes foi aplicado com maior frequência os chats. Para as atividades foram utilizados questionários, tarefas, resenhas de artigo e seminários, com intuito de envolver os alunos numa discussão mais dinâmica com o docente sobre o assunto desenvolvido nas aulas, valorizando aprendizado.

Após autorização do retorno das aulas presenciais, os alunos reingressam presencialmente para dar continuidade dos componentes práticos nas diversas áreas de VE, VSA e VES_CRL nos respectivos laboratórios do IAL Central e Centro de Laboratórios Regionais, cumprindo o novo calendário de 2021-2022.

Normalmente, o curso de especialização termina com a entrega do TCC dos alunos, que são corrigidos por uma banca e apresentados de forma oral para toda a comunidade do Instituto Adolfo Lutz de forma presencial. No entanto, devido a continuidade da pandemia da COVID-19 ainda no início de fevereiro de 2022, foi realizada uma parceria com Agron-Food Academy, para a realização das apresentações dos TCC no formato online.

Entre os dias 14 a 16 de fevereiro de 2022 foi realizada a *III Mostra de Apresentação dos Trabalhos de Conclusão do Instituto Adolfo Lutz* completamente online, onde todos os alunos do laboratório Central e dos doze Centros de Laboratórios Regionais

puderam apresentar seus trabalhos e serem arguidos pelos avaliadores. O evento foi transmitido por meio do site da Agron-Food Academy, podendo ser assistido por todos docentes e demais profissionais do Instituto. Os trabalhos expostos neste evento estão publicados neste e-book.

CONCLUSÕES

O ano letivo de 2020-2021 do curso de especialização do Instituto Adolfo Lutz foi bem diferente dos anos interiores por causa da pandemia COVID-19, onde durante sua realização houve aulas presenciais, suspensão do curso, reorganização do curso em EAD, com aulas síncronas e assíncronas, fóruns, chats, atividades na plataforma moodle e posterior retomada das aulas e atividades presenciais, que exigiram esforços de todos os docentes e organizadores para manter o conteúdo programático com qualidade e uma comunicação ativa entre docente e alunos, neste período de distanciamento social.

Com a suspensão do curso pelo período de 1 ano houve a desistência de 30% dos alunos, mas 99% dos alunos que retornaram, concluíram o curso, fazendo um balanço positivo para esse ano letivo.

A pandemia da COVID-19 trouxe uma reflexão sobre a modalidade de ensino à distância em várias áreas da educação, incluindo o curso de especialização do IAL. O distanciamento social imposto por essa doença trouxe à tona a necessidade de ações que permitissem a integração entre alunos e docentes que não estivessem presentes no mesmo local. Situação essa que o IAL já vivenciava devido aos seus laboratórios regionais, na qual os alunos não podem estar presentes no mesmo local de onde são transmitidas as aulas. Sendo assim, as soluções tecnológicas e ferramentas que foram disponibilizadas durante esse período continuarão servindo para auxiliar a transmissão das aulas a todos os alunos de forma igualitária, sendo um grande aliado no processo de ensino-aprendizagem.

AGRADECIMENTOS

A coordenação do Curso de Especialização do Instituto Adolfo Lutz agradece à Diretoria Geral do Instituto, aos docentes e aos profissionais da Sala de Situação da CCD e da UITIC por proporcionar a continuidade do curso nesse período atípico;

Agradecemos à Agron Food Academy pela organização do evento;

Agradecemos em especial aos alunos, por terem enfrentado todos esses momentos conosco e se manterem firmes no propósito de se qualificar como profissionais na área de saúde.

REFERÊNCIAS

BRASIL, Opas. OMS declara emergência de saúde pública de importância internacional por surto de novo coronavírus. **Brasília, DF: OPAS Brasil, 2020.**

BRASIL. Portaria nº 4.059, de 10 de dezembro de 2004. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n. 238, 13 dez. 2004. Executivo, Seção 1, p. 34

SÃO PAULO (a). Decreto nº 64.862, de 13 de março de 2020. Dispõe sobre a adoção, no âmbito da Administração Pública direta e indireta, de medidas temporárias e emergenciais

de prevenção de contágio pelo COVID-19 (Novo Coronavírus), bem como sobre recomendações no setor privado estadual. Diário Oficial, São Paulo, SP, Executivo, 14 de março de 2020, p.1.

SÃO PAULO (b). Decreto nº 64.881, de 22 de março de 2020. Decreta quarentena no Estado de São Paulo, no contexto da pandemia do COVID-19 (Novo Coronavírus), e dá providências complementares. Diário Oficial, São Paulo, SP, Executivo Suplemento, 23 de março de 2020, p.1.

SÃO PAULO (c). Deliberação CEE n. 177/2020, de 19 de março de 2020. Fixa normas quanto reorganização dos calendários escolares, devido ao surto global do Coronavírus, para o Sistema de Ensino do Estado de São Paulo, e dá outras providências. São Paulo: Diário Oficial do Estado. 2020a. Disponível em: <<https://cegep.com.br/deliberacao-177-2020-ceesp/>>. Acesso em: 26 de jun. 2021.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. A atuação do Instituto Adolfo Lutz no enfrentamento à pandemia da COVID-19. São Paulo: SES/SP, 2020. Disponível em:<http://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/04/1095266/atuacao_ial_covid-19_abr2020.pdf>. Acesso em: 26 de jun. 2021.

O CONTROLE DE IMPUREZAS DO TIPO NITROSAMINA EM MEDICAMENTOS E INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS

Juliana Yi Dan Wu¹; Márcia Lombardo²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública/Unidade didática Instituto Adolfo Lutz - CEFOR/SUS – IAL. E-mail: julianayidanwu@hotmail.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos/Instituto Adolfo Lutz – NFQM – IAL. E-mail: marcia.lombardo@ial.sp.gov.br

Resumo: Nitrosaminas (NAs) são compostos orgânicos caracterizados pela ligação de um grupo nitroso a um grupo amina e potencial carcinogênico em exposições por longos períodos. Recentemente, a presença de NAs foi identificada em medicamentos e insumos farmacêuticos ativos, acarretando no recolhimento de produtos disponíveis no mercado. O objetivo deste trabalho foi elaborar uma revisão narrativa sobre NAs em medicamentos. O levantamento bibliográfico foi realizado em sítios eletrônicos de órgãos nacionais e internacionais de saúde e nas bases de dados Google acadêmico e Pubmed. Verificou-se que a causa mais discutida para a ocorrência de NAs em medicamentos é o emprego de agentes nitrosantes durante a síntese de fármacos e a principal estratégia de controle consiste no gerenciamento de risco quanto à formação e toxicidade. As análises laboratoriais para identificação e quantificação das NAs incluem técnicas de cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectroscopia de massas. Na área farmacêutica, o controle de NAs é um tema que ainda se encontra em ampla discussão quanto aos impactos na saúde, limites de aceitação, métodos de eliminação, detecção e monitoramento.

Palavras-chave: impurezas em medicamentos; insumos farmacêuticos; nitrosaminas; vigilância sanitária

INTRODUÇÃO

As nitrosaminas (NAs) são compostos orgânicos frequentemente encontrados como contaminantes de produtos para uso humano e que podem apresentar carcinogenicidade em exposições crônicas. O termo N-nitrosamina é usado para caracterizar um amplo grupo de compostos N-nitrosos alifáticos ou aromáticos que possuem o grupo funcional nitroso ligado a uma amina, como mostra a Figura 1 (ANVISA, 2021a).

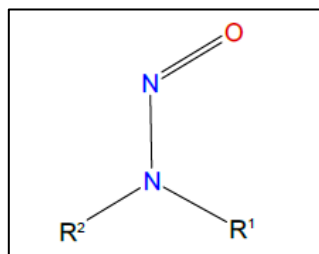


Figura 1 - Fórmula estrutural da N-nitrosamina
Fonte: ANVISA (2021b)

De maneira geral, as NAs são formadas a partir da nitrosação de aminas, principalmente aminas secundárias, com agentes nitrosantes (Figura 2), e tal reação ocorre em pH ácido (RATH; CANAES, 2009).

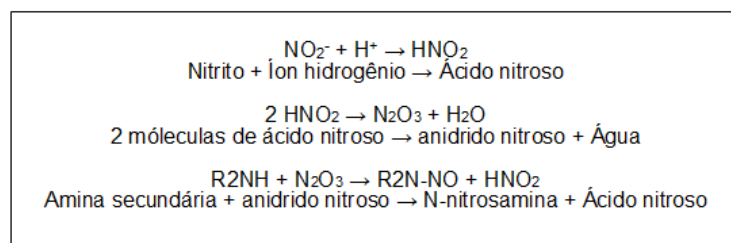


Figura 2 - Reações químicas de formação de N-nitrosaminas
Fonte: Adaptado de Rath e Canaes (2009)

Primeiramente identificadas como importantes poluentes ambientais, as NAs são frequentemente encontradas em águas cloradas e cloraminadas, como também em alimentos curados ou fertilizados, produtos derivados do tabaco e produtos cosméticos e de higiene pessoal. Recentemente, estas impurezas foram encontradas em diversos produtos farmacêuticos comercializados (PASCHOAL, 2015; GUSHGARI, HALDEN, 2018; THRESHER et al., 2020).

A descoberta de NAs em medicamentos iniciou-se em meados de 2018, quando a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) informou a presença de dimetilnitrosamina (NDMA) no insumo farmacêutico ativo (IFA) de valsartana (anti-hipertensivo) fornecido por uma empresa chinesa. Posteriormente, diferentes NAs foram detectadas em vários fármacos (EMA, 2019; ANVISA, 2021a).

Diante disso, as agências reguladoras e indústrias farmacêuticas iniciaram investigações sobre a ocorrência de NAs em medicamentos e insumos farmacêuticos, e priorizaram o desenvolvimento de métodos para controle e monitoramento destas impurezas (ANVISA, 2021a; FDA, 2021a).

Considerando os impactos negativos das NAs para a saúde da população e que ainda existem poucos estudos acerca de NAs na área farmacêutica, o objetivo deste trabalho foi elaborar uma revisão bibliográfica sobre o tema, abordando aspectos regulatórios, analíticos e toxicológicos de impurezas do tipo NA em medicamentos e IFAs.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma revisão bibliográfica narrativa foi realizada por meio de buscas on-line, divididas em três etapas: (i) consulta de endereços eletrônicos oficiais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *European Medicines Agency* (EMA) e *Food and Drug Administration* (FDA), para a seleção de notícias, informes técnicos, guias e normas relacionadas com NAs em medicamentos e IFAs; (ii) busca ampla empregando-se a ferramenta de pesquisa Google Acadêmico e a palavra-chave nitrosaminas, para a seleção de publicações relacionadas com NAs em produtos para uso humano; (iii) busca direcionada empregando-se a ferramenta de pesquisa Pubmed e os descritores *nitrosamines pharmaceutical products*, *nitrosamines valsartane*, *nitrosamines ranitidine* e *nitrosamines metformine*, para a seleção de artigos científicos com abordagem direta do tema, publicados nos últimos cinco anos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foi possível verificar que existem muitas causas para a ocorrência de NAs em medicamentos, como: uso de agentes nitrosantes durante a síntese de fármacos, sendo o nitrito de sódio o mais utilizado; uso de matérias-primas, materiais recuperados ou reciclados (solventes, reagentes e catalisadores) contaminados com NAs; fornecedores que utilizam matérias-primas ou processos contendo agentes nitrosantes ou NAs residuais; degradação de matérias-primas durante a fabricação ou armazenamento do produto, como é o caso dos solventes dimetilformamida e metilpirrolidona, que podem sofrer hidrólise ácida ou básica, formando um substrato vulnerável à nitrosação; transferência de NAs durante o processo de fabricação; embalagens contendo película de nitrocelulose, que pode reagir com aminas de baixo peso molecular durante a selagem por calor; presença de grupos funcionais nitrosáveis em IFAs ou suas impurezas, que podem reagir durante a fabricação ou armazenamento do produto (ANVISA, 2021a; EMA, 2021a).

Para garantir a segurança do paciente, as agências reguladoras do Brasil e do mundo determinaram o recolhimento voluntário e a suspensão de manipulação, comercialização, distribuição e uso de inúmeros lotes de medicamentos e/ou IFAs que continham impurezas do tipo NA (Tabela 1). Atualmente, a produção de IFAs e produtos acabados de cloridrato de ranitidina estão proibidos, visto que durante o armazenamento ocorre a degradação espontânea da molécula e a formação de NDMA, não havendo ainda uma possibilidade de estabilização deste fármaco (ANVISA, 2020; EMA, 2021b).

Tabela 1 - Fármacos suspeitos de contaminação com impurezas do tipo nitrosamina

Fármaco	Classe Terapêutica/Mecanismo de ação
valsartana irbesartana losartana	Anti-hipertensivo/Antagonismo de receptores de angiotensina II, levando à redução da pressão arterial
nizatidina ranitidina	Antiulceroso/Antagonismo de receptores de histamina H ₂ , levando à inibição da produção de ácido gástrico
metformina	Antidiabético do grupo da biguanida/Ativação da proteína quinase dependente de AMP, levando à redução da lipogênese e da gliconeogênese
rifampicina rifapentina	Antibiótico do grupo da rifamicina/Impede a síntese do RNA bacteriano
vareniclina	Medicamento antitabagismo/Agonista de receptores colinérgicos nicotínicos, levando à liberação de dopamina e diminuição da compulsão em períodos de abstinência por nicotina

Fonte: Brunton, Chabner e Knollmann (2012); FDA (2021b)

Como os compostos N-nitrosos geralmente apresentam elevada atividade mutagênica, os limites aceitáveis de ingestão diária devem ser determinados caso a caso, com base na literatura e em estudos de relação estrutura-atividade e carcinogenicidade. As NAs mais discutidas na área farmacêutica estão apresentadas na Tabela 2 (ICH, 2017; ANVISA, 2021a; FDA, 2021a).

Os limites de ingestão diária de NAs dependem da dose máxima diária do medicamento em questão. No caso de NAs novas ou desconhecidas, pode ser adotado um valor conservador de 18 ng/dia. Ressalta-se que os limites atualmente disponíveis são passíveis de alteração diante do surgimento de novas evidências científicas (ANVISA, 2021a).

A ação carcinogênica das NAs requer ativação enzimática no organismo, isto é, a hidroxilação do carbono α do grupo alquila, catalisada pela monoxigenase do citocromo

P450, com formação de aldeído ou cetona e uma NA primária instável. A tautomerização para um alquildiazoidróxido dá origem ao íon diazônio, que é responsável pela alquilação dos sítios nucleofílicos do material genético, causando lesões citotóxicas e mutações (RATH; CANAES, 2009; ADAMSON; CHABNER, 2020).

Tabela 2 - Nitrosaminas encontradas em medicamentos e limites de ingestão diária

N - Nitrosamina	Ingestão Aceitável (ng/dia)
dimetilnitrosamina (NDMA)	96,0
dietilnitrosamina (NDEA)	26,5
etilisopropilnitrosamina (EIPNA)	26,5
di – isopropilnitrosamina (DIPNA)	26,5
carboxipropilmetilnitrosamina (NMBA)	96,0
metilnitrosopiperazina (MeNP)	26,5
dibutilnitrosamina (NDBA)	26,5
fenilmetilnitrosamina (NMPA)	34,3

Fonte: ANVISA (2021a); FDA (2021a)

A ferramenta mais importante a ser utilizada na investigação de NAs em medicamentos e IFAs é o gerenciamento de risco, que abrange três etapas: (i) avaliação do risco relacionado a qualquer elemento envolvido na obtenção do IFA e do produto acabado, incluindo a revisão de processos, meios para a eliminação (purga) e grau de carcinogenicidade de possíveis NAs; (ii) testes confirmatórios utilizando métodos analíticos sensíveis para a quantificação; (iii) alterações pós-registro caso seja necessário adequar especificações e propor medidas de monitoramento (ICH, 2005; ANVISA, 2021a).

Estudos de carcinogenicidade e mutagenicidade podem ser necessários às investigações. O ensaio Salmonella/microsoma, conhecido como teste de Ames, é adotado por muitos laboratórios para avaliação de mutagenicidade, visto que é um ensaio *in vitro* reprodutível e de curta duração, que utiliza linhagens bacterianas (ANVISA, 2013; CETESB, 2021).

O desenvolvimento de métodos analíticos aplicáveis ao controle de impurezas do tipo NA em medicamentos e IFAs é uma necessidade emergente e um grande desafio. As NAs podem ser voláteis ou não voláteis, o que influencia no desenvolvimento de metodologias. A maioria das NAs encontradas em medicamentos são de natureza volátil, tais como NDMA, NDEA, NDPA e NDBA (RATH; CANAES, 2009).

Diferentes metodologias são descritas para a determinação de NAs nas mais variadas matrizes. Os métodos de pré-tratamento mais comuns são extração em fase sólida, extração líquido-líquido e procedimentos de microextração. Já os métodos de quantificação incluem cromatografia líquida (CLAE) ou gasosa (CG), cromatografia de fluido supercrítico, métodos eletroquímicos, entre outros (PARR; JOSEPH, 2019; ALSHEHRI; ALGHAMDI; ALDAWSARI, 2020; BIAN et al., 2020).

Segundo Tuesuwan e Vongsutilers (2021), há atualmente mais de 40 métodos analíticos disponíveis para a determinação de NAs em medicamentos e IFAs, porém apenas alguns deles fornecem o limite de quantificação recomendado de 0,03 ppm. Dentre estes métodos se destacam a CLAE em fase reversa acoplada à espectroscopia de massas (EM) de alta resolução ou EM em tandem, utilizando fontes de ionização por spray de elétrons ou ionização química à pressão atmosférica e analisadores do tipo quadrupolo ion

trap ou triplo quadrupolo (QqQ). No caso de CG acoplada à espectrometria de massas, destaca-se a injeção direta ou headspace, com fonte de ionização eletrônica e analisadores QqQ ou ion trap.

Neste contexto, opções de métodos para a detecção e quantificação de impurezas do tipo NA em alguns IFAs e produtos acabados já foram publicados pelo FDA. Estes métodos são úteis para apoiar avaliações de qualidade ou submissões regulamentares e devem ser previamente validados pelo usuário (FDA, 2021b).

CONCLUSÕES

O controle de impurezas do tipo NA em medicamentos e insumos farmacêuticos ativos é um tema recente e que ainda se encontra em ampla discussão entre os órgãos reguladores, o setor regulado e a comunidade científica. O gerenciamento de risco é a principal estratégia adotada, necessitando da atuação multiprofissional de farmacêuticos, químicos e toxicologistas. As análises laboratoriais de identificação e quantificação requerem técnicas de elevada sensibilidade, como a cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectroscopia de massas. Apesar das NAs se apresentarem em concentrações reduzidas, as ações de vigilância são relevantes, especialmente quando envolve medicamentos de uso contínuo e prolongado para tratar doenças crônicas.

REFERÊNCIAS

ADAMSON, R.H.; CHABNER, B.A. The finding of N-nitrosodimethylamine in common medicines. **The Oncologist**, v.25, n.6, p.460–462, 2020.

ALSHEHRI, Y.M.; ALGHAMDI, T.S.; ALDAWSARI, F.S. HS-SPME-GC-MS as an alternative method for NDMA analysis in ranitidine products. **Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, v.191, p.1-6, 2020.

ANVISA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 2013.

ANVISA. Parecer nº 3/2020/Sei/Gimed/Ggfs/Dire4/Anvisa: proposta de RDC sobre avaliação de risco e controle de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em medicamentos de uso humano. Brasília, 2020.

ANVISA. Guia sobre o controle de nitrosaminas em insumos farmacêuticos ativos e medicamentos: guia nº 50/2021, versão 1. Brasília, 2021a.

ANVISA. RDC nº 494, de 15 de abril de 2021. Altera a RDC nº 283, de 17 de maio de 2019, que dispõe sobre investigação, controle e eliminação de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em antagonistas de receptor de angiotensina II. Brasília, 2021b.

BIAN, Y.; et al. Progress in the pretreatment and analysis of N-nitrosamines: an update since 2010. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.61, n.21, p.1-35, 2020.

BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. (org.). As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman. 12. ed. Brasil: Amgh Editora, 2012.

CETESB. Ensaios de Genotoxicidade. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2013/11/ensaios-genotoxicidade-saiba-mais.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2021.

EMA. Referral under article 31 of directive 2001/83/EC angiotensin-II-receptor antagonists (sartans) containing a tetrazole group. Assessment report EMA 217823, p.1-41, 2019.

EMA. Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) N° 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products. EMA/409815/2020 Rev.6, p.1-17, 2021a.

EMA. Ranitidine-containing medicinal products. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/ranitidine-containing-medicinal-products>. Acesso em: 07 dez. 2021b.

FDA. Control of nitrosamine impurities in human drugs: guidance for industry, Revision 1. Silver Spring, 2021a.

FDA. Information about nitrosamine impurities in medications. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/information-about-nitrosamine-impurities-medications>. Acesso em: 06 dez. 2021b.

GUSHGARI, A.J.; HALDEN, R.U. Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines. **Chemosphere**, v. 210, p.1124–1136, 2018.

ICH. Manual tripartite harmonizado do ICH Gestão do Risco à Qualidade Q9, 2005.

ICH. Guia harmonizado do ICH Avaliação e controle de impurezas reativas ao DNA (mutagênicas) em produtos farmacêuticos para limitar o risco carcinogênico em potencial M7 (R1), 2017.

PARR, M.K.; JOSEPH, J.F. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.164, p.536-549, 2019.

PASCHOAL, A.D. O orgânico nosso de cada dia. **Rede Câncer**, v.31, p. 20–21, 2015.

RATH, S.; CANAES, L.S. Contaminação de produtos de higiene e cosméticos por N-nitrosaminas. **Química Nova**, v.32, n.8, p.2159–2168, 2009.

THRESHER, A.; et al. Are all nitrosamines concerning? A review of mutagenicity and carcinogenicity data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.116, article 104749, 2020.

TUESUWAN, B.; VONGSUTILERS, V. Nitrosamine contamination in pharmaceuticals: threat, impact, and control. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.110, n.9, p.3118-3128, 2021.

AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS CELULARES E SUA IMPORTÂNCIA

Gabrielle Yuriiko Batista de Moraes¹; Ana Cristina Scarparo de Miranda²; Tamiko Ichikawa Ikeda²; Aurea Silveira Cruz Garçon²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - IAL; E-mail: gabrielle.yuriko@gmail.com

²Docente/Pesquisadora do Núcleo de Cultura de Células – NCC – IAL.

Resumo: As culturas de células são amplamente utilizadas em diversas áreas, na pesquisa ou diagnóstico, além de serem uma excelente alternativa ao uso de testes com animais. Essas culturas devem ser autenticadas, tendo as suas características conhecidas, a espécie de origem comprovada e estarem livres de contaminação cruzada e microbiológica, especialmente por micoplasmas, o que pode evitar a perda de recursos financeiros, conhecimento científico e a credibilidade dos trabalhos publicados. Esta revisão tem como objetivo abordar e discorrer sobre algumas técnicas recomendadas para autenticação celular, assim como suas vantagens e limitações, colaborando com a conscientização da comunidade científica sobre a necessidade de utilizar linhagens celulares obtidas de coleções reconhecidas e a importância do constante monitoramento das mesmas. Sendo assim, foi realizada uma vasta busca na literatura sobre este tema e, de acordo com o levantamento, a comprovação da ausência de micoplasmas pode ser feita por cultura microbiológica, coloração fluorescente, técnica de ELISA, PCR, microscopia eletrônica ou método bioquímico (MycoAlertTM). Com relação à verificação de espécie, as metodologias disponíveis são eletroforese de isoenzimas, análise cromossômica, marcação imunológica e técnicas de biologia molecular para análise de regiões conservadas do genoma. Como toda técnica possui vantagens e limitações, deve-se empregar mais de uma para assegurar a identidade e ausência de contaminantes da linhagem utilizada. Além do uso destes ensaios para controle é essencial a utilização de técnicas assépticas em todas as etapas da manutenção das culturas, evitando a introdução de possíveis contaminantes. Todos estes cuidados são fundamentais para o sucesso dos estudos realizados com culturas celulares.

Palavras-chave: autenticação de linhagens celulares; contaminação; contaminação cruzada; cultura de células.

INTRODUÇÃO

Cultura de células é definida como um modelo *in vitro* que permite manter as células vivas, não mais organizadas em tecidos e órgãos. Essa técnica apresenta muitas vantagens em comparação aos modelos *in vivo* que utilizam animais em ensaios experimentais, tais como homogeneidade das linhagens, são mais econômicos, de fácil manipulação e controle, além de ser uma alternativa para substituir e/ou reduzir a utilização de animais em pesquisa. Suas aplicações vão da área de pesquisa ao diagnóstico, principalmente em Biologia Celular e Molecular, Bioquímica, Virologia, Farmacologia, Toxicologia e Oncologia, entre outras (PERES; CURI, 2005; ALVES; GUIMARÃES, 2010; MIGITA, 2012; GONÇALVES; SOBRAL, 2020).

Para que o conhecimento produzido com a utilização de células seja válido e reprodutível, é essencial que as linhagens celulares sejam autenticadas, ou seja, que sua

identidade seja confirmada, espécie de origem comprovada e estejam livres de contaminantes, seja micro-organismos e/ou outras linhagens celulares. O uso de culturas contaminadas ou erroneamente identificadas gera resultados inválidos e consequentemente compromete a credibilidade da pesquisa realizada, além de disseminar informações equivocadas (CAPES-DAVIS et al., 2010; MARX, 2014; FREEDMAN et al., 2015; HORBACH; HALFFMAN, 2017; COSME et al., 2017).

Os principais micro-organismos que podem contaminar as culturas celulares são as bactérias, fungos e vírus. Dentre esses, os micoplasmas são as menores bactérias de vida livre, não possuem parede celular e pertencem à classe Mollicutes. São os contaminantes mais comuns em culturas celulares e um dos mais difíceis de identificar, podendo permanecer indetectáveis por várias passagens e alterar diversas características e respostas celulares (DREXLER; UPHOFF, 2002; MAHMOOD; ALI, 2017). Outro tipo de contaminação que pode ocorrer durante a cultura de células é a cruzada, quando diferentes linhagens celulares são misturadas ou identificadas erroneamente, resultando em uma cultura que não é mais condizente ao seu doador, tecido ou espécie de origem (ICLAC, 2022). As estimativas são de que cerca de 20 a 30 % das linhagens celulares possam estar contaminadas com outras ou erroneamente identificadas e de 5 a 35 % por micoplasmas, demonstrando a extensão desse problema (DREXLER; UPHOFF, 2002; CAPES-DAVIS et al., 2010; YOUNG; SUNG; MASTERS, 2010).

Por isso, antes de iniciar qualquer estudo é importante buscar maiores informações sobre as células que serão utilizadas em sites especializados como do Comitê Internacional de Autenticação de Linhagens Celulares – ICLAC e *The Cellosaurus*, entre outros (BAIROCH, 2018). Além disso, as linhagens celulares devem ser adquiridas, preferencialmente, de bancos de células reconhecidos, que possuem um controle de qualidade rigoroso (CAPES-DAVIS et al., 2010; GERAGHTY et al., 2014; MARX, 2014).

Para reduzir essa problemática, Nardone (2007) também sugere que as revistas e instituições de fomento à pesquisa exijam a comprovação da autenticação das linhagens para publicação de resultados e liberação de recursos financeiros, o que vem sendo adotado por algumas organizações, entre outras ações.

Este trabalho tem como objetivos abordar a importância da autenticação de linhagens celulares, discorrer sobre as principais técnicas disponíveis, assim como suas vantagens e limitações, o que colabora com a conscientização da comunidade científica sobre a necessidade de utilizar células obtidas de coleções reconhecidas e necessidade do constante monitoramento das mesmas.

METODOLOGIA

Esta revisão de literatura aborda o tema de autenticação celular e as principais técnicas recomendadas. Sendo assim, foi realizada uma consulta a base de dados do PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), utilizando os descritores: “cell culture”, “authentication”, “contamination”, “cross-contamination”, “misidentification”, “authentication techniques”; “authentication methods of cell culture”. As publicações foram avaliadas de acordo com título e resumo pertinentes ao tema e importância histórica e científica. Informações complementares foram obtidas no site do Comitê Internacional de Autenticação de Linhagens Celulares – ICLAC (<https://iclac.org/>).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Existem diversas técnicas que podem ser empregadas para autenticar as linhagens celulares, tanto na comprovação da ausência de contaminação por micoplasmas, quanto na

verificação da espécie de origem para garantir que as mesmas não foram contaminadas com outra linhagem celular ou erroneamente identificadas.

Para a detecção de micoplasmas pode-se utilizar ensaios de cultivo microbiológico, coloração fluorescente, imunocoloração, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), microscopia eletrônica e detecção bioquímica. O cultivo microbiológico foi uma das primeiras técnicas padronizadas, muito utilizado e considerado como “padrão-ouro”. Esse método possui alta sensibilidade e especificidade, permitindo o reconhecimento visual das colônias em ágar, com aspecto típico de “ovo frito”. No entanto, o crescimento desses micro-organismos é um processo demorado (três a quatro semanas) e nem todas as espécies de micoplasmas são cultiváveis (ATCC, 1992; DREXLER; UPHOFF, 2002; PERES; CURI, 2005; YOUNG; SUNG; MASTERS, 2010; GERAGHTY et al., 2014; WRIGLEY et al., 2014).

O método de coloração fluorescente, utilizando DAPI (*4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride*) ou Hoechst 33258 (*2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride hydrate*), é uma opção barata e relativamente rápida de ser realizada. Essas substâncias coram diretamente o DNA de forma inespecífica e, ao ser visualizado em microscópio com luz ultravioleta, permite observar pontos fluorescentes sobre e ao redor dos núcleos celulares, indicando contaminação (DREXLER; UPHOFF, 2002; PERES; CURI, 2005; GERAGHTY et al., 2014; ATCC, 2022).

A técnica de PCR também pode ser empregada na detecção de micoplasmas, é rápida e com elevada sensibilidade, geralmente empregando *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) universais que identificam regiões conservadas entre as diferentes espécies. Há muitos protocolos disponíveis, seja por PCR convencional ou em tempo real, além de opções de kits comerciais de diversos fornecedores (DREXLER; UPHOFF, 2002; WRIGLEY et al., 2014).

Além dessas, é possível realizar a detecção bioquímica por meio de kits comerciais, como o MycoAlertTM, baseado na detecção de enzimas desses micro-organismos, avaliando os níveis de adenosina trifosfato (ATP) por luminescência. Embora tenha uma sensibilidade mediana, apresenta alta especificidade, permite a obtenção do resultado rapidamente, além de possuir controle positivo interno sem necessitar manipular culturas de micoplasmas (PERES; CURI, 2005; GERAGHTY et al., 2014; MAHMOOD; ALI, 2017; ATCC, 2022).

Para a confirmação da espécie de origem existem várias técnicas disponíveis, como eletroforese de isoenzimas, cariótipo, marcação imunológica, DNA *fingerprint* para análises das regiões de *Short Tandem Repeat* (STR), *Variable Number of Tandem Repeat* (VNTR), *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) e DNA *barcode* (CAPES-DAVIS et al., 2010; NIMS; REID, 2017; CAPES-DAVIS, 2018; ATCC, 2022).

Dentre essas, a eletroforese de isoenzimas é um método bioquímico que se baseia na diferença dos padrões estruturais apresentados por algumas enzimas entre as espécies, sem alterar sua função. Essas variações estruturais podem ser identificadas pela mobilidade eletroforética das isoenzimas presentes no extrato celular. A revelação do gel é feita utilizando substratos e cofatores específicos para a isoenzima desejada. Após a coloração das bandas, as distâncias de migração podem ser mensuradas e devem ser comparadas às linhagens usadas como controle e padrão do ensaio, NCTC clone 929 e HeLa, respectivamente (KAPLAN; HUKKU, 1998; NIMS et al., 1998; NIMS et al., 2010; ATCC, 2022).

Mesmo com o surgimento de metodologias baseadas em biologia molecular, a técnica de isoenzimas é de grande valia na comprovação da espécie de origem de linhagens celulares, pois a mesma é acessível, rápida, apresenta custo relativamente baixo e é capaz

de detectar contaminação cruzada quando as células contaminantes correspondem a cerca de 10 % do número de células totais (NIMS et al., 1998; MACHADO et al., 2016; NIMS; REID, 2017).

Outra técnica disponível é a análise cromossômica, uma das primeiras técnicas utilizadas para identificação interespecífica, capaz de detectar rearranjos cromossômicos que são característicos de cada espécie. Para tal, devem ser analisadas ao menos 50 metáfases, o que permite a identificação do número de cromossomos, presença de possíveis marcadores, variações na ploidia e diferenciação de espécies (KAPLAN; HUKKU, 1998; CAPES-DAVIS et al., 2010). Porém, é uma metodologia trabalhosa e demorada, que necessita profissionais experientes para a correta interpretação dos resultados obtidos (KAPLAN; HUKKU, 1998; RAMYA et al., 2009; CAPES-DAVIS, 2018; ATCC, 2022).

A técnica de PCR é relativamente simples, robusta e sensível, amplamente utilizada para detecção de espécies (STACEY et al., 1997; RAMYA et al., 2009). Para a autenticação de linhagens não humanas pode ser empregada a técnica de DNA *barcode*, com a amplificação do gene do Citocromo C Oxidase subunidade I (COI) ou Citocromo B, ambos presentes no DNA mitocondrial (DNA Mt) e que apresentam variações entre as espécies, permitindo diferenciá-las. Ono e colaboradores (2007) utilizaram *nested*-PCR, com *primers* universais para uma região mitocondrial conservada (citocromo B, alça-D, RNAr 12S e 16S) na primeira reação e, em seguida, esse produto deve ser amplificado utilizando *primers* específicos para distinguir as espécies. Essa variação da PCR apresentou maior sensibilidade que a análise de isoenzimas, sendo capaz de detectar contaminações menores que 1% (ONO et al., 2007; RAMYA et al., 2009; NIMS; REID, 2017).

Para linhagens de células humanas, recomenda-se a técnica de STR *fingerprint*, baseado em sequências curtas de DNA, que permite a diferenciação de linhagens de indivíduos distintos. Essa técnica amplifica regiões de repetições com até cinco pares de bases dos marcadores polimórficos do genoma humano, com subsequente separação dos fragmentos em eletroforese capilar, que resulta em um padrão único. Recomenda-se analisar ao menos oito *locus* de STR mais amelogenina para diferenciação sexual. Os padrões obtidos consistem no número de repetições das sequências em cada alelo para os *locus* analisados e devem ser comparados com aqueles disponíveis em bancos de dados, como do ICLAC ou de biorrepositórios. Como variações nos padrões de STR podem ser observadas, foi estabelecido um mínimo de 80% de coincidência para que uma linhagem seja considerada autêntica; valores abaixo disso sugerem identidade suspeita ou mesmo que não corresponde à esperada, se a comparação revelar menos que 55% de compatibilidade (ICLAC, 2014). A análise de STR não permite identificar se uma linhagem humana foi contaminada por células de outra espécie animal, sendo necessário complementar a verificação com outro método.

Por conseguinte, é necessário que sejam feitos testes periódicos para garantir a autenticidade das linhagens celulares, tanto para ausência de micoplasmas quanto para confirmação da espécie de origem. Como todas as técnicas apresentam vantagens e limitações, o recomendado é empregar mais de uma metodologia para confirmar os resultados obtidos nos ensaios.

CONCLUSÕES

A autenticação das linhagens celulares é fundamental para garantir a validade dos resultados obtidos com sua utilização, evitando dois grandes problemas que afetam o uso de culturas de células, a ocorrência de contaminação cruzada e por micro-organismos, especialmente por micoplasmas. Há várias técnicas disponíveis para essas verificações e a escolha do método de autenticação, bem como a periodicidade, dependem da estrutura e condições do laboratório. Além disso, recomenda-se que seja empregada mais de uma metodologia, já que todas possuem suas vantagens e limitações. Ao assegurar a espécie de origem das células e a ausência de contaminantes, evita-se o desperdício de recursos financeiros e a perda de credibilidade, além de garantir a reprodutibilidade dos estudos com culturas celulares.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v. 2. Rio de Janeiro: **EPSJV**, p. 215-253, 2010.
- ATCC. American Type Culture Collection. Authentication Test Recommendations. <<https://www.atcc.org/resources/technical-documents/cell-line-authentication-test-recommendations>>. Acesso em: 04 jan. 2022.
- ATCC. American Type Culture Collection. **Quality Control Methods for Cell Lines**. 2 ed. United States of America, 1992.
- BAIROCH, A. The Cellosaurus, a cell-line knowledge resource. **Journal of Biomolecular Techniques**. v. 29, n. 2, 2018.
- CAPES-DAVIS, A. Cell Line Detective Work. **Advances in Molecular Pathology**, v. 1, n. 1, p. 229–238, 2018.
- CAPES-DAVIS, A. et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 1, p. 1–8, 2010.
- COSME, B. et al. Are your results valid? Cellular authentication a need from the past, an emergency on the present. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 53, n. 5, p. 430–434, 2017.
- DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. **Cytotechnology**, v. 39, n. 2, p. 75–90, 2002.
- FREEDMAN, L. P. et al. Reproducibility: Changing the policies and culture of cell line authentication. **Nature Methods**, v. 12, n. 6, p. 493–497, 2015.
- GERAGHTY, R. J. et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 6, p. 1021–1046, 2014.
- GONÇALVES, J. C. R.; SOBRAL, M. V. **Cultivo de células: da teoria à bancada**. João Pessoa: Editora UFPB, 2020.
- HORBACH, S. P. J. M.; HALFFMAN, W. The ghosts of HeLa: How cell line misidentification contaminates the scientific literature. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–16, 2017.
- ICLAC. International Cell Line Authentication Committee. Disponível em: <<https://iclac.org/>>. Acesso em: 04 jan. 2022.
- ICLAC. International Cell Line Authentication Committee. Guide to human cell line authentication, 2014. Disponível em: <<https://iclac.org/resources/human-cell-line-authentication/>>. Acesso em: 04 jan. 2022.
- KAPLAN, J.; HUKKU, B. Cell line characterization and authentication. **Methods in Cell Biology**, v. 57, n. 57, p. 203–216, 1998.

- MACHADO, J. Z.; MIRANDA, A. C. S.; CRUZ, A. S. G6PD and MDH Isoenzyme Electrophoresis for Cell Lines Authentication. **Virus Review and Research**, v. 21, p. 1-4, 2016.
- MAHMOOD, A.; ALI, S. Microbial and Viral Contamination of Animal and Stem Cell Cultures: Common Contaminants, Detection and Elimination. **Journal of Stem Cell Research & Therapeutics**, v. 2, n. 5, p. 149–155, 2017.
- MARX, V. Cell-line authentication demystified. **Nature Methods**, v. 11, n. 5, p. 483–488, 2014.
- MIGITA, N. A. “Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares”. **Monografia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP**, 2012.
- NARDONE, R. M. Eradication of cross-contaminated cell lines: A call for action. **Cell Biology and Toxicology**, v. 23, n. 6, p. 367–372, 2007.
- NIMS, R. W. et al. Sensitivity of isoenzyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 34, n. 1, p. 35–39, 1998.
- NIMS, R. W. et al. Short tandem repeat profiling: Part of an overall strategy for reducing the frequency of cell misidentification. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 46, n. 10, p. 811–819, 2010.
- NIMS, R. W.; REID, Y. Best practices for authenticating cell lines. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 53, n. 10, p. 880–887, 2017.
- ONO, K. et al. Species identification of animal cells by nested PCR targeted to mitochondrial DNA. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 43, n. 5–6, p. 168–175, 2007.
- PERES, C. M.; CURI, R.; PAFFARO, A. M. D. A.; MARTINS, A. K. A.; PIMENTA, A.; GONÇALVES, C. R.; MARTINS, E. F. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2005.
- RAMYA, R. et al. Identification of cross-contaminated animal cells by PCR and isoenzyme analysis. **Cytotechnology**, v. 61, n. 3, p. 81–92, 2009.
- STACEY, G. N.; HOELZL, H.; STEPHENSON, J. R.; DOYLE, A. Authentication of animal cell cultures by direct visualization of repetitive DNA, aldolase gene PCR and isoenzyme analysis. **Biologicals** v. 25, p. 75–85, 1997.
- WRIGLEY, J. D. et al. Cell banking for pharmaceutical research. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 10, p. 1518–1529, 2014.
- YOUNG, L.; SUNG, J.; MASTERS, J. R. Detection of mycoplasma in cell cultures. **Nature Protocols**, v. 5, n. 5, p. 929–934, 2010.

AVALIAÇÃO DAS CEPAS COM RESULTADOS NEGATIVOS PARA O COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis* NO TESTE GENOTYPE MTBDR_{plus} NA ROTINA DO NÚCLEO DE TUBERCULOSE E MICOBACTERIOSES

Leonora Feitosa De Carvalho¹; Juliana Maira Watanabe Pinhata²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - CB - IAL; E-mail: leonora.fdc@gmail.com

²Pesquisadora Científica do Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses - CB – IAL.

RESUMO

O Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses (NTM) é o laboratório de referência estadual para tuberculose, e recebe cepas de micobactérias enviadas pelos laboratórios públicos do estado de São Paulo. No NTM, as cepas sugestivas de *Mycobacterium tuberculosis* com critérios para teste de sensibilidade são submetidas ao teste GenoType MTBDR_{plus} (fita Hain). As cepas sugestivas de micobactérias não tuberculosas (MNTs) são enviadas para identificação da espécie. Este trabalho avaliou as cepas identificadas presuntivamente como *M. tuberculosis* encaminhadas para a fita Hain, mas que tiveram resultado negativo para *M. tuberculosis*, caracterizando-as quanto aos seus aspectos macroscópicos e ao resultado de identificação. Entre fevereiro/2019 a agosto/2021, 13.144 cepas foram encaminhadas para a fita Hain. Destas, 424 (3,2%) foram negativas para *M. tuberculosis*, sendo que 377 (88,9%) foram encaminhadas para identificação de espécie. Das culturas encaminhadas para identificação, 235 (62,3%) possuíam características de crescimento de *M. tuberculosis*, 113 (30%) apresentavam características de contaminação, 27 (7,2%) tinham pouco crescimento e 2 (0,5%) foram identificadas visualmente como mistura de *M. tuberculosis*+MNT (0,5%). As espécies de MNT mais prevalentes foram *M. fortuitum* (n=71, 18,8%), *M. abscessus* (n=28, 7,4%), complexo *M. avium* (n=26, 6,9%), complexo *M. kansasii* (n=21, 5,6%) e *M. intracellulare/M. chimaera* (n=20, 5,3%). A análise presuntiva das culturas e a posterior identificação da espécie de micobactéria são muito importantes, pois permitem a diferenciação entre *M. tuberculosis* e MNTs. Algumas espécies de MNTs podem apresentar floculação com ou sem turbidez em meio líquido, características comuns a *M. tuberculosis*, confundindo o observador no momento da triagem das culturas.

Palavras-chave: complexo *Mycobacterium tuberculosis*; fita Hain; GenoType MTBDR_{plus}; micobactérias não tuberculosas

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença contagiosa e crônica que atinge principalmente os pulmões. A forma clássica de transmissão da TB pulmonar acontece por via respiratória, de pessoa a pessoa, quando o doente com a forma ativa da doença tosse, fala ou espirra, eliminando os bacilos (DUCATI et al., 2015).

O principal agente etiológico da TB é o *Mycobacterium tuberculosis*. Outras espécies de micobactérias que causam TB são *M. bovis* (*M. bovis* subsp. *bovis* e *M.*

bovis BCG), *M. microti*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. pinnipedi*, *M. canettii*, *M. suricattae*, *M. dassie*, *M. orygis* e *M. mungi*. Essas espécies de micobactérias, juntamente com o *M. tuberculosis*, são estritamente patogênicas e fazem parte do complexo *M. tuberculosis*, infectando tanto o homem como alguns animais. O *M. leprae*, agente etiológico da hanseníase, é a outra espécie estritamente patogênica dentro do gênero *Mycobacterium* (COSCOLLA E GAGNEUX, 2014; TORTORA et al., 2017).

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) são espécies de micobactérias encontradas amplamente distribuídas no ambiente, sendo consideradas patógenos oportunistas principalmente em imunodeprimidos, causando infecções que são conhecidas como micobacterioses (BRASIL, 2021).

O Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses (NTM) do Instituto Adolfo Lutz é o laboratório de referência estadual para TB, e recebe culturas de micobactérias enviadas pelos laboratórios públicos do estado de São Paulo. No NTM são analisadas as culturas em meio líquido e sólido e dependendo de suas características macroscópicas, estas são identificadas presuntivamente como *M. tuberculosis* ou MNT. As cepas sugestivas de *M. tuberculosis* cujos pacientes possuam critérios para o teste de sensibilidade seguem para a identificação e detecção de mutações associadas à resistência aos fármacos de 1ª linha pelo kit GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience, Alemanha), aqui denominado fita Hain, implantado na rotina do NTM em fevereiro de 2019. As culturas sugestivas de MNT são enviadas para identificação da espécie.

O objetivo deste trabalho é descrever as características das cepas identificadas presuntivamente como *M. tuberculosis* que apresentaram resultado negativo no teste de fita Hain para o complexo *M. tuberculosis*. Pretende-se, assim, avaliar os fatores e as características dessas culturas que interferem diretamente nos erros do processo, buscando corrigir e melhorar a identificação presuntiva das espécies de micobactérias e seu direcionamento para os testes, garantindo um resultado eficaz no método de triagem e economia de tempo e insumos no laboratório, além de diminuir as perdas e atrasos nos exames.

MATERIAL E MÉTODOS

O NTM recebe culturas de micobactérias isoladas em meio líquido ou meio sólido dos laboratórios públicos do estado de São Paulo, para que seja realizada a identificação de espécie e o teste de sensibilidade pelo método de fita Hain (HAIN LIFESCIENCE, 2015). A triagem para este teste é feita através da análise das características de crescimento das culturas para que estas possam ser identificadas presuntivamente como sendo do complexo *M. tuberculosis* ou MNTs.

As bactérias do complexo *M. tuberculosis* isoladas em meio sólido apresentam colônias de cor creme, rugosas e de aspecto seco. O crescimento em meio líquido deve estar límpido e com presença de floculação (PINHATA et al., 2018). Uma vez identificadas presuntivamente como sendo do complexo *M. tuberculosis*, as culturas são enviadas para o teste de fita Hain.

Como a fita Hain é um teste molecular e detecta apenas sequências específicas de DNA do *M. tuberculosis*, as culturas visualmente contaminadas e com pouco crescimento, mas com aspecto das colônias do complexo *M. tuberculosis*, são também enviadas para o teste.

As colônias das MNT em meio sólido apresentam-se de cor creme ou pigmentada, lisas, úmidas ou rugosas. Em meio líquido, elas apresentam crescimento turvo e/ou pigmentado, mas também podem estar floculadas. Culturas com essas

características são enviadas para a identificação molecular da espécie pela técnica Speed-Oligo *Mycobacteria* (Vircell, Espanha). As MNTs que não puderem ser identificadas por esta técnica são encaminhadas para a metodologia *in house* de PRA-*hsp65*, onde uma PCR é realizada para a amplificação de uma sequência de 440 pb do gene *hsp65*, presente em todas as espécies de micobactérias (CHIMARA et al., 2008).

Para a análise dos dados, criou-se uma planilha no programa Excel para onde foram repassadas todas as informações constantes nas listas de realização do teste de fita Hain, contendo os seguintes dados das cepas encaminhadas para o teste: tipo de meio de cultura onde foram isoladas, número da amostra, número da cepa, resultados do teste e possíveis observações.

Os resultados tanto dos testes de fita Hain como da identificação da espécie de micobactéria liberados no sistema GAL (Gerenciamento de Ambiente Laboratorial) foram obtidos por meio da geração de relatórios epidemiológicos, em formato compatível com o Excel. Estes dados foram agrupados aos dados levantados a partir das listas do teste de fita Hain.

A partir do banco de dados criado, foram avaliados: (i) o número e frequência de cepas com resultado negativo para o complexo *M. tuberculosis* no período de estudo, (ii) os anos de recebimento das cepas, (iii) o tipo de meio de cultura (sólido ou líquido) no qual a cepa foi isolada, (iv) as características macroscópicas das culturas e (v) o número e frequência das espécies de MNT identificadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de fevereiro de 2019 a agosto de 2021, 13.144 cepas foram submetidas ao teste de fita Hain, sendo que 424 (3,2%) tiveram resultado negativo para o complexo *M. tuberculosis*. Esta baixa taxa de isolados negativos para o complexo *M. tuberculosis* encaminhados para a fita Hain demonstra que a triagem das culturas através da observação visual é bastante acurada.

A Tabela 1 mostra os critérios avaliados referentes às 424 cepas negativas no teste de fita Hain. As maiores frequências de cepas negativas no teste foram observadas em 2019 (n=172, 40,6%) e em 2020 (n=183, 43,2%). Dentre as 424 cepas, 345 (81,4%) estavam sementeadas em meio de MGIT e 75 (17,7%) em meio sólido (Tabela 1).

Foram enviadas para identificação de espécies 377 (88,9%) cepas, sendo que 113 (30,0%) estavam visualmente contaminadas, 235 (62,3%) estavam visualmente puras e com características de *M. tuberculosis*, 27 (7,2%) tinham pouco crescimento e 2 (0,5%) foram identificadas visualmente como mistura de *M. tuberculosis* + MNT (0,5%) (Tabela 1).

Das 47 (11,1%) cepas que tiveram o resultado liberado direto da fita Hain, ou seja, não foram encaminhadas para identificação, 2 (4,3%) foram liberadas como culturas contaminadas, 5 (10,6%) como complexo *M. tuberculosis* após a realização do teste imunocromatográfico TBAg MPT64 e 40 (85,1%) como não houve crescimento de BAAR (bacilos álcool-ácido resistentes), o que significa que havia pouco ou nenhum crescimento na cultura, impedindo a realização da identificação (Tabela 1).

Tabela 1 - Critérios avaliados referentes às 424 cepas que tiveram resultado negativo para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* no teste de fita Hain

Ano de recebimento	Nº de cepas	Frequência (%)
2018	3	0,7
2019	172	40,6
2020	183	43,2
2021	66	15,6
Tipo de meio de cultura		
MGIT	345	81,4
Sólido	75	17,7
DNA*	1	0,2
Sem informação	3	0,7
Encaminhamento		
Culturas encaminhadas para identificação	377	88,9
Culturas não encaminhadas para identificação	47	11,1
Características das cepas enviadas para a identificação**		
Cultura contaminada	113	30,0
Cultura pura	235	62,3
Pouco crescimento	27	7,2
Mistura de <i>M. tuberculosis</i> e MNT	2	0,5

*Foi encaminhada a amostra de DNA para o NTM.

**Características avaliadas por meio da observação visual das culturas.

A Tabela 2 mostra as espécies de micobactérias identificadas a partir das culturas visualmente puras e das culturas visualmente contaminadas. Dentre as 113 (30,0%) culturas que estavam visualmente contaminadas, mas foram encaminhadas para a fita Hain por possuírem também características visuais de *M. tuberculosis*, as espécies mais frequentes isoladas foram *M. fortuitum* (n=29, 25,7%), *M. intracellulare/M. chimaera* (n=9, 8,0%), complexo *M. avium* (n=8, 7,1%), *M. peregrinum* (n=7, 6,2%), *M. abscessus* (n=6, 5,3%) e *M. gordonae* (n=6, 5,3%). Em 16 culturas (14,2%) foi liberado o resultado de não houve crescimento de BAAR. Pinhata e col. (2018) observaram que espécies de MNT como *M. intracellulare/M. chimaera*, *M. nebraskense* e micobactérias de crescimento rápido podem apresentar crescimento floculado e turvo em meio líquido de MGIT, levando o observador a interpretar essas características como sendo de *M. tuberculosis* com contaminação.

Entre as culturas puras, ou seja, com características de *M. tuberculosis*, as espécies mais frequentes isoladas foram *M. fortuitum* (n=41, 17,4%), *M. abscessus* (n=21, 8,9%), *M. kansasii* (n=15, 6,3%), *M. avium* (n=14, 6,0%) e *M. peregrinum* (n=12, 5,1%). Em 28 culturas (11,9%) foi liberado o resultado de Não houve crescimento de BAAR (Tabela 2). Pinhata e col. (2018) observaram crescimento característico de *M. tuberculosis* (floculado em MGIT) em espécies como *M. fortuitum*, *M. intracellulare/M. chimaera*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, semelhante ao encontrado neste trabalho.

Tabela 2 - Número e frequência das espécies identificadas a partir das culturas contaminadas e puras após análise visual e que tiveram resultado negativo para o complexo *Mycobacterium tuberculosis* no teste de fita Hain

Espécies identificadas	Cultura contaminada	%	Cultura pura	%	Total	%
<i>M. fortuitum</i>	29	25,7	41	17,4	70	20,1
Não cresceu BAAR	16	14,2	28	11,9	44	12,6
<i>M. intracellulare/M. chimaera</i>	9	8,0	9	3,8	18	5,2
<i>Mycobacterium sp.</i>	8	7,1	21	8,9	29	8,3
Complexo <i>M. avium</i>	8	7,1	14	6,0	22	6,3
<i>M. peregrinum</i>	7	6,2	12	5,1	19	5,5
<i>M. abscessus</i>	6	5,3	21	8,9	27	7,8
<i>M. gordonae</i>	6	5,3	11	4,7	17	4,9
Complexo <i>M. kansasii</i>	5	4,4	15	6,4	20	5,7
Cultura Mista de Micobactérias	3	2,7	10	4,3	13	3,7
<i>M. chelonae</i>	2	1,8	11	4,7	13	3,7
<i>M. lentiflavum/M. florentinum/M. simiae</i>	2	1,8	7	3,0	9	2,6
<i>M. nonchromogenicum/M. mucogenicum/M. chitae</i>	2	1,8	3	1,3	5	1,4
<i>M. neoaurum/M. parafortuitum</i>	1	0,9	5	2,1	6	1,7
<i>M. celatum</i>	1	0,9	3	1,3	4	1,1
<i>M. parascrofulaceum</i>	1	0,9	3	1,3	4	1,1
<i>Nocardia sp</i>	1	0,9	2	0,9	3	0,9
<i>M. asiaticum</i>	1	0,9	1	0,4	2	0,6
<i>M. immunogenum</i>	1	0,9	1	0,4	2	0,6
<i>M. scrofulaceum</i>	1	0,9	1	0,4	2	0,6
<i>M. alvei</i>	1	0,9	0	0,0	1	0,3
<i>M. nebraskense</i>	1	0,9	0	0,0	1	0,3
<i>M. senegalense/M. boenickei</i>	1	0,9	0	0,0	1	0,3
Grupo <i>M. mucogenicum</i>	0	0,0	5	2,1	5	1,4
Complexo <i>M. tuberculosis</i>	0	0,0	2	0,9	2	0,6
<i>M. flavescens</i>	0	0,0	2	0,9	2	0,6
<i>M. montefiorensense</i>	0	0,0	2	0,9	2	0,6

Entre as 27 culturas com pouco crescimento negativas para o complexo *M. tuberculosis* na fita Hain, 9 não puderam ser identificadas devido ao pouco crescimento e 2 foram identificadas apenas como sendo do gênero *Mycobacterium*. O restante das espécies identificadas foram: complexo *M. avium* (n=4), *M. lentiflavum/M. florentinum/M. simiae* (n=3), *M. gordonae* (n=2), *M. intracellulare/M. chimaera* (n=2), complexo *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. lentiflavum/M. florentinum/M. simiae* e *M. neoaurum/M. parafortuitum*, com 1 isolado cada.

Das 2 culturas identificadas visualmente como sendo mistura de *M. tuberculosis* + MNT e negativas na fita Hain, 1 foi identificada como sendo mistura de micobactérias (cultura mista) e a outra como *M. lentiflavum/M. florentinum/M. simiae*.

De acordo com o Manual de Recomendações para o diagnóstico e tratamento das doenças causadas por micobactérias não tuberculosas no Brasil (BRASIL, 2021), entre 2013 a 2019, as espécies mais prevalentes causadoras de micobacterioses em São Paulo foram as do complexo *M. avium*, complexo *M. abscessus*, complexo *M. fortuitum* e *M. kansasii*, corroborando os resultados do nosso estudo.

CONCLUSÕES

Podemos concluir que a análise presuntiva das culturas e a posterior identificação da espécie de micobactéria são muito importantes na rotina do laboratório, pois permitem a diferenciação entre o complexo *M. tuberculosis* e as MNTs. Como os sinais e sintomas da TB pulmonar são semelhantes aos das micobacterioses pulmonares, identificar a espécie causadora de doença é primordial para se indicar o tratamento correto.

Algumas espécies de MNTs apresentam floculação com ou sem turbidez em meio líquido de MGIT, aspectos que confundem o observador no momento da triagem das culturas, pois são características comuns ao complexo *M. tuberculosis*, causando erros no direcionamento das culturas. Portanto, o treinamento dos técnicos que realizam a triagem macroscópica e microscópica das culturas é de extrema importância para o laboratório, visto que um direcionamento incorreto das culturas gera gastos, acúmulo de trabalho e atraso no laudo do paciente.

AGRADECIMENTOS

A Aparecida A. Pereira pelo recepcionamento das amostras no laboratório; a Andreia R. Souza, Erica Chimara, Fernanda C. S. Simeão, Juliana F. Gallo e Romilda A. Lemes pela realização da identificação da espécie; a Fabiane M. A. Ferreira, Sonia M. Costa, Vera L. M. Silva e Rosângela S. Oliveira pela realização dos testes de fita Hain; a Flavia F. Mendes e Gabriela M. Moraes pela contribuição no levantamento dos dados; e a Rosângela S. Oliveira, Angela P. Brandão e Lucilaine Ferrazoli pelas contribuições científicas.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações para o diagnóstico e tratamento das doenças causadas por micobactérias não tuberculosas no Brasil**. P95. Brasília: 2021.
2. CHIMARA, E. et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. **BMC Microbiol.** 2008; 8, 48.
3. COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Semin Immunol.** 2014; 26:431–44.
4. DUCATI, R. G. et al. Micobactérias. **Microbiologia Médica**. 6ed. São Paulo: Editora, Atheneu: 2015.
5. HAIN LIFESCIENCE. GenoType MTBDR_{plus}. Hain Lifescience. Versão 2.0; 06/2015. Disponível em:

https://www.hainlifescience.de/include_datei/kundenmodule/packungsbeilage/download.php?id=936. Acesso em: 18 out. 2021.

6. PINHATA, J. M. W. et al. Growth characteristics of liquid cultures increase the reliability of presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. **J Med Microbiol.** 2018; 67(6):828-33.

7. TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. **Microbiologia.** 12^a ed. Porto Alegre: Atheneu, 2017.

8. VIRCELL. Instrução de uso do produto. Disponível em: <https://vircell.com.br>. Acesso em: 20 set. 2021.

O IMPACTO DA COVID-19 NA ROTINA DO LABORATÓRIO DE MICOBACTÉRIAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ CLR II BAURU – SP: QUANTITATIVO DE EXAMES, CASOS DIAGNOSTICADOS E COINFECÇÃO TUBERCULOSE/COVID-19

Nathália Namie Asito¹; Luciana da Silva Ruiz Menezes²

¹Estudante do Curso de Vigilância Epidemiológica em Saúde Pública – IAL CLR II Bauru-SP; E-mail: nathalia.namie@hotmail.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Ciências Biomédicas – IAL CLR II Bauru-SP.

O *Mycobacterium tuberculosis* é o principal agente causador da tuberculose, doença milenar, que persiste como um grande problema de saúde pública, acometendo milhões de pessoas anualmente, sendo considerada uma das doenças infecciosas mais letais do mundo. Agravando este cenário, a pandemia de COVID-19 tem tido um impacto significativo no diagnóstico e tratamento da tuberculose, ocasionando uma queda significativa nas notificações e diagnósticos de tuberculose, principalmente nos primeiros meses. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da COVID-19 na rotina dos exames para diagnóstico de tuberculose no Laboratório de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz CLR II Bauru/SP, bem como realizar levantamento dos casos de coinfeção tuberculose/COVID-19 entre os pacientes com exames enviados aos Laboratórios de Doenças Respiratórias e de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz CLR II Bauru/SP. Os dados obtidos foram coletados no sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) para tuberculose e COVID-19. Não foram observadas alterações relevantes em relação ao número de exames e casos diagnosticados de tuberculose quando comparados os anos de 2019, 2020 e 2021. Tal achado pode estar relacionado a população atendida, representada em sua maioria por indivíduos privados de liberdade. No período, de um total de 112 amostras com solicitação de exames para diagnóstico de TB e COVID-19, concomitantemente, foram identificados quatro casos de coinfeção tuberculose/COVID-19, salientando a importância de diagnóstico adequado e rápido para ambas as doenças, tanto para uma coinfeção tuberculose/COVID-19 quanto para o diagnóstico de infecção por tuberculose ou por COVID-19, separadamente.

Palavras-chave: COVID-19. *Mycobacterium tuberculosis*. SARS-CoV-2. Tuberculose. Coinfeção.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis stricto sensu* (BRASIL, 2019). Acomete ambos os sexos e atinge várias faixas etárias. A forma pulmonar é a mais frequente, mas há também, a tuberculose extrapulmonar. A transmissão ocorre principalmente de pessoa para pessoa, por via respiratória em que há a inalação de aerossóis produzidos pela tosse, fala ou espirro de um doente com tuberculose ativa pulmonar ou laringea (WHO, 2020).

Desde os anos 90, a TB é considerada uma emergência global de saúde pública, acometendo milhões de pessoas anualmente, sendo considerada uma das doenças

infecciosas mais letais do mundo, além de ser a principal causa de morte entre pessoas com diagnóstico por HIV (Human Immunodeficiency Virus - Vírus da imunodeficiência humana) (BRASIL, 2021; BERRA, *et al.*; 2021; WHO, 2020).

É uma infecção que pode ser prevenida e curada, no entanto, ainda permanece como um grande problema de saúde pública, acometendo prioritariamente os países de baixa e média renda, e responsável pela morte de aproximadamente 1,5 milhão de pessoas todos os anos (BRASIL, 2019). Está associada a pessoas em situação de pobreza, dificuldades econômicas, em vulnerabilidade e marginalização (WHO, 2020). A coinfeção com HIV e o surgimento de isolados resistentes às drogas (tratamento inadequado e uso indiscriminado de antibióticos) tornam a situação ainda mais alarmantes (WHO, 2015). Além disso, a TB é uma doença negligenciada, sem muito investimento da indústria e do governo na descoberta de novos fármacos ou novos métodos diagnósticos, e diante do advento da pandemia, este cenário foi ainda mais agravado, o que futuramente poderá ocasionar graves consequências.

No Brasil, preconizado pelo Ministério da Saúde, o diagnóstico de TB é feito a partir da baciloscopia e cultura de escarro (TB pulmonar) ou de outros espécimes clínicos (TB extrapulmonar). A cultura é considerada a técnica padrão ouro para identificação da doença (BERRA *et al.*, 2021). A OMS, em 2010, aprovou o uso do sistema GeneXpert MTB/RIF para realizar testes moleculares rápidos para TB, com resultados liberados em menos de 2 horas (LIMA, *et al.*, 2017).

A chegada da pandemia de COVID-19 ameaça a sustentabilidade das ações de controle da TB bem como a manutenção dos avanços já obtidos (BRASIL, 2021). Tal cenário apresenta um impacto significativo no diagnóstico e tratamento da TB, em que se observa a piora dos indicadores laboratoriais, de tratamento e busca de novos casos da doença, que poderá refletir nas futuras taxas de incidência e mortalidade desta doença (MIGLIORI, *et al.*, 2020). Essa redução poderá sobrecarregar a rede de atenção à saúde para suprir as demandas de COVID-19, a baixa procura da população aos serviços de saúde e erros diagnósticos pela similaridade de alguns sintomas entre TB e COVID-19, acarretando implicações significativas no diagnóstico laboratorial e tratamento da infecção.

Além disso, desde o início da pandemia, têm sido notificados casos de tuberculose e COVID-19 concomitantes (TADOLINI, *et al.*, 2020). A associação apresenta grande potencial de morbidade e mortalidade. Pacientes que apresentam coinfeção tuberculose/COVID-19 apresentam maiores riscos de desfechos negativos e óbito do que pacientes que apresentam somente a infecção por COVID-19. Devido a isso, a detecção prévia de uma infecção conjunta, é muito necessária, para que sejam realizados seus manejos adequados, avaliando as individualidades de ambas as doenças (SILVA, *et al.*, 2021).

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da COVID-19 na rotina de exames para tuberculose no Laboratório de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz CLR II Bauru/SP. Foram pesquisados e comparados, o número de exames de baciloscopia, cultura e teste rápido molecular para TB, o número de casos diagnosticados e realizado um levantamento dos casos de coinfeção tuberculose/COVID-19, no período de 2019 a 2021.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo e quantitativo baseado na coleta de dados. Os dados obtidos no estudo foram provenientes de demanda de exames para diagnóstico de TB do Laboratório de Micobactérias do Núcleo de Ciências Biomédicas do Instituto Adolfo Lutz CLR II Bauru/SP, e coletados por meio de pesquisa no sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) para TB e COVID-19. Foram pesquisados dados

referentes ao quantitativo de exames de baciloscopia, cultura e gene Xpert realizados, além, do número de casos diagnosticados com entrada para diagnóstico da tuberculose. Os dados coletados foram referentes ao período de janeiro a outubro de 2019 a 2021, e a presença da coinfeção tuberculose/COVID-19, no período de abril de 2020 a novembro de 2021.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em primeiro de abril do ano de 2020, a COVID-19 superou a TB e se tornou a doença infecciosa que mais mata a cada dia (SAUNDERS e EVANS, 2020). Durante a pandemia muitas ações foram implementadas em resposta à COVID-19, principalmente o reaproveitamento de equipamentos de diagnóstico, profissionais e instalações de saúde, orçamentos e lacunas na comunicação de dados, impactando assim, nos programas de monitoramento da TB (SARINOGLU, *et al.*, 2020).

Jain *et al.* (2020), identificaram no início da pandemia de COVID-19, consideráveis interrupções nos serviços de saúde relacionados à TB, tanto na atenção primária quanto em hospitais. Outro estudo que incluiu 37 centros de TB do mundo inteiro, comparou o primeiro trimestre de 2019 com o de 2020 e concluiu que houve redução do número de novos casos de tuberculose, e também, do número de consultas ambulatoriais (MIGLIORI, *et al.*, 2020).

Na tabela 01, é observado o total de exames realizados (TRM, baciloscopia e cultura) para diagnóstico de TB nos meses de janeiro a outubro nos anos de 2019, 2020 e 2021 no IAL CLR II Bauru. De janeiro a outubro de 2020 houve um aumento de 10,32% nas solicitações de exames para diagnóstico de TB quando comparado a 2019. E de janeiro a outubro de 2021 houve um aumento de 17,6% e 9% em relação a janeiro a outubro de 2019 e 2020, respectivamente.

Tabela 01: Número total de exames realizados por TRM, baciloscopia e cultura para diagnóstico de TB, durante os meses de janeiro a outubro dos anos de 2019, 2020 e 2021, no Laboratório de Micobactérias do IAL CLR II Bauru/SP.

Ano	Exames realizados
2019	6135
2020	6841
2021	7454

O ano de 2020 (janeiro a outubro) apresentou um aumento de 9,83% no número de baciloskopias realizadas em relação ao mesmo período de 2019. Em 2021, entre os meses de janeiro a outubro, foi observada uma redução de 22% em relação as baciloskopias realizados nos mesmos meses de 2020 (Figura 01).

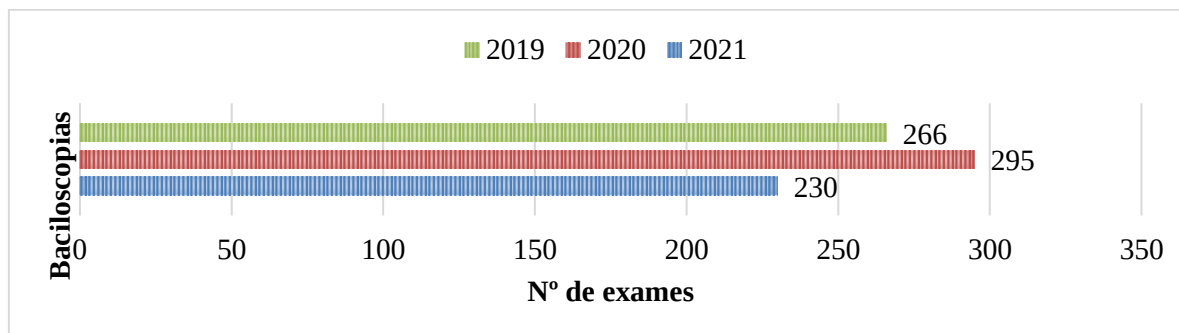


Figura 01: Número total de baciloskopias realizadas para diagnóstico de TB, durante os meses de janeiro a outubro dos anos de 2019, 2020 e 2021, no Laboratório de Micobactérias do IAL CLR II Bauru/SP.

Em relação à bacilosopia, os casos controles foram excluídos, assim, o número total de baciloskopias no ano de 2020, são para diagnóstico de casos novos. Neste ano, foi observado um número maior de amostras de escarro sendo enviadas com volume abaixo do recomendado. Possivelmente este exame não mostrou uma queda em função do baixo acesso ao serviço, mas talvez, por questões relacionadas a quantidade de material coletado, o que justificaria também, a diminuição de TRM no ano de 2020, que durante os meses avaliados no estudo apresentou um quantitativo de exames de 5% e 4,7% menor que os anos de 2019 e 2021, respectivamente (Figura 02). Amostras com volume abaixo do recomendado não são recomendadas para TRM, sendo assim a bacilosopia é realizada.

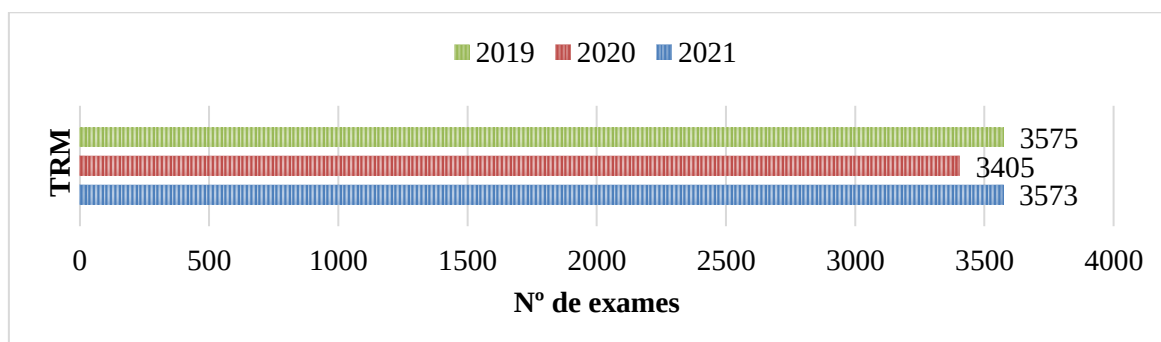


Figura 02: Número total de TRM realizados para diagnóstico de TB, durante os meses de janeiro a outubro dos anos de 2019, 2020 e 2021, no Laboratório de Micobactérias do IAL CLR II Bauru/SP.

O total de exames de cultura para diagnóstico de TB, de janeiro a outubro de 2020, foi 26,9% maior comparado a 2019, e 13,9% menor em relação a 2021 (Figura 03).

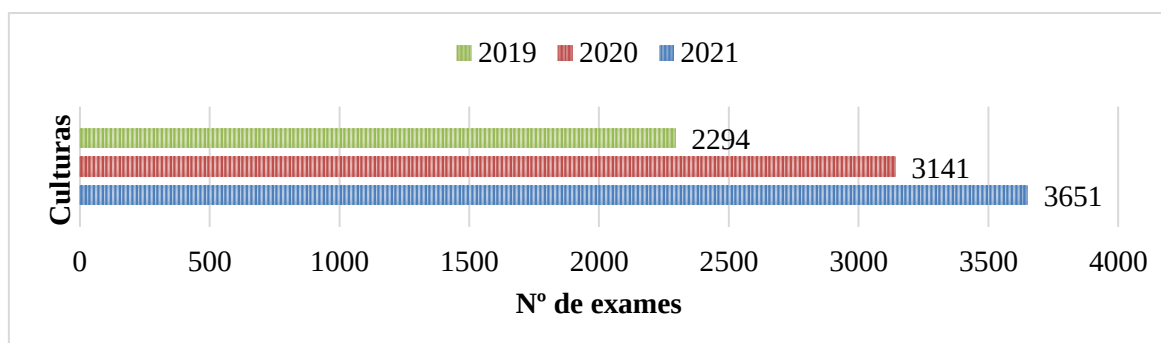


Figura 03: Número total de culturas realizadas para diagnóstico de TB, durante os meses de janeiro a outubro dos anos de 2019, 2020 e 2021, no Laboratório de Micobactérias do IAL CLR II Bauru/SP.

Em relação ao quantitativo de casos diagnosticados por meio da cultura (padrão ouro), os anos de 2020 e 2021 apresentaram 7,3% menos casos positivos comparados ao ano de 2019. Um número maior de casos negativos foi observado nos anos de 2020 (29%) e 2021 (40%), em relação ao ano de 2019 (Tabela 02).

Tabela 02: Casos diagnosticados de TB, por meio da cultura (padrão ouro), durante os meses de janeiro a outubro dos anos de 2019, 2020 e 2021, no Laboratório de Micobactérias do IAL CLR II Bauru/SP.

Ano	Cultura (padrão ouro)		
	Positiva	Negativa	Contaminada

2019	231	1946	117
2020	214	2754	173
2021	214	3247	190
Total	659	7947	480

Diferentemente dos estudos relatados, quando comparamos 2019 e 2020, neste estudo, não foi observada diminuição de diagnóstico de novos casos de TB no Laboratório de Micobactérias do IAL CLR II Bauru/SP. No ano de 2021 foi observado um aumento de 9% no diagnóstico de TB em relação ao ano de início da pandemia (2020). Talvez, pelo fato de que a maioria da população atendida, é composta por indivíduos privados de liberdade, provenientes de 13 diferentes unidades prisionais do Estado de São Paulo, não tenha sido observado queda no diagnóstico de casos novos entre o ano de 2019 e os anos de surgimento e estabelecimento da pandemia, já que é uma população confinada, suas condições são conhecidas e existe um vínculo estabelecido entre o Sistema Penitenciário e o Serviço de Saúde, além de uma logística determinada para exame de escarro.

Em 2020, He *et al.*, demonstraram a ocorrência de três casos de coinfeção tuberculose/COVID-19, dentre os 139 casos estudados. Dois pacientes já haviam tido TB pulmonar e recebido terapia, enquanto um paciente apresentava TB não tratado por 50 anos. Dois dos pacientes eram mais idosos e assim, um desenvolveu um tipo crítico e o outro um tipo grave de COVID-19. Os três pacientes apresentaram uma longa recuperação antes de receberem alta hospitalar. Neste estudo, para um total de 112 pacientes com exames para diagnóstico de TB e COVID-19, concomitantemente, foi observada a coinfeção tuberculose/COVID-19 em quatro pacientes (Figura 04).

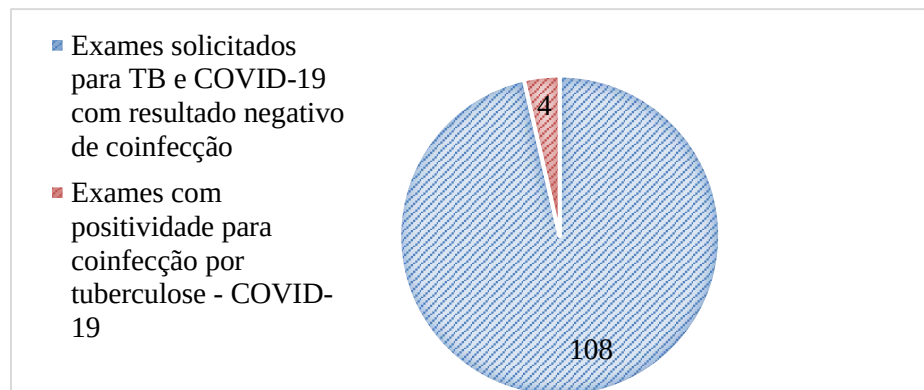


Figura 04: Solicitações de diagnóstico para TB e COVID-19 e identificação de coinfeção tuberculose/COVID-19, nos meses de janeiro a outubro de 2019 a 2021 no Laboratório de Micobactérias do IAL CLR II Bauru/SP.

He *et al.* (2020) e Jain *et al.* (2020), observaram que doenças pulmonares prévias (TB tratada ou não) e a idade avançada do paciente, são fatores de risco para um pior prognóstico de pessoas infectadas com COVID-19, podendo apresentar danos pulmonares prévios, agravando com a infecção por SARS-CoV-2. Algumas características comuns dos pacientes: comorbidades crônicas, hipertensão crônica, doenças crônicas cardíacas, diabetes, pacientes imunossuprimidos e doença crônica longa (SARINOGLU, *et al.*, 2020). Jain *et al.* (2020), sugeriram que pacientes com TB latente e doença estabelecida apresentam risco aumentado de infecção por SARS-CoV-2 e maior predisposição aos sintomas da COVID-19.

A pandemia de COVID-19, teve impacto significativo na execução de vários programas de prevenção, tratamento e vigilância da tuberculose. As novas diretrizes de saúde implementadas com a chegada da pandemia, fizeram com que outras áreas da saúde ficassem sem a devida atenção, resultando em desafios no tratamento tradicional da tuberculose e exigiram a reorganização da metodologia para dar suporte aos pacientes, incluindo até, a utilização das consultas remotas (JAIN *et al.*, 2020). A importância do diagnóstico rápido e adequado em ambas as doenças é um fator crucial, pois o isolamento do paciente infectado é a medida preventiva mais importante para que seja limitada a transmissão das duas doenças (HE, *et al.*, 2020; SARINOGLU, *et al.*, 2020). A prevenção é o caminho, reaproveitando as metodologias disponíveis para combater novas pandemias, e também, garantir a continuidade no monitoramento e controle das pessoas que buscam tratamento para doenças previamente existentes (CHOPRA, ARORA e SINGH, 2020).

CONCLUSÕES

Com este estudo pode-se observar que no laboratório de Micobactérias do CLR II Bauru/SP, não foram verificadas alterações relevantes que confirmem as informações encontradas nos demais estudos citados, em relação ao diagnóstico de TB no período da pandemia por COVID-19, o que pode estar relacionado com a população atendida pelo serviço do laboratório de Micobactérias do CLR II Bauru/SP, representada em sua maioria por indivíduos privados de liberdade. A identificação de casos de coinfeção tuberculose/COVID-19 salienta a necessidade de uma identificação diagnóstica adequada e rápida tanto para uma coinfeção tuberculose/COVID-19 quanto para o diagnóstico de infecção por tuberculose ou por COVID-19, separadamente, para que sejam realizados o tratamento e controle adequados de ambas as doenças, principalmente por serem doenças que se disseminam rapidamente na população e juntas podem ocasionar a evolução para quadros mais graves.

REFERÊNCIAS

- BERRA, T. Z.; *et al.* Effectiveness and Trend Forecasting of Tuberculosis Diagnosis After Introduction of GeneXpert in a City in South-eastern Brazil. **PLoS One**, v. 16, n. 5, 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Recomendações Para o Controle da Tuberculose no Brasil**. Brasília – DF, 2019.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Indicadores Operacionais da Tuberculose no Brasil e a COVID-19: análise comparativa dos anos de 2019 e 2020. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 22, 2021.
- CHOPRA, K. K.; ARORA, V. K.; SINGH, S. COVID 19 and tuberculosis. **Indian J Tuberc**, v. 67, n. 2, p. 149-151, 2020.
- HE, G.; *et al.* COVID-19 in Tuberculosis patients: a report of three cases. **J Med Virol**, 2020.
- JAIN, V. K.; *et al.* Tuberculosis in the era of COVID-19 in India. **Diabetes Metab Syndr**, v. 15, n. 5, p. 1439-1443, 2020.
- LIMA, T. M.; *et al.* GeneXpert MTB/RIF assay for diagnosis of tuberculosis. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 8, n. 2, p. 67–78, 2017.

MIGLIORI, G. B.; *et al.* Worldwide Effects of Coronavirus Disease Pandemic on Tuberculosis Services, January-April 2020. **Emerg Infect Dis**, v. 26, n. 11, p. 2709-2712, 2020.

SARINOGLU, R. C.; *et al.* Tuberculosis and COVID-19: Na overlapping situation during pandemic. **J Infect Dev Ctries**, v. 14, n. 7, p. 721-725, 2020.

SAUNDERS, M. J.; EVANS, C. A. COVID-19, tuberculosis and poverty: preventing a perfect storm. **Eur Respir J**, v. 56, n. 1, p. 1-5, 2020.

SILVA, D. R.; *et al.* Tuberculose e COVID-19, o Novo Dueto Maldito: quais as diferenças entre Brasil e Europa. **J Bras Pneumol**, v. 47, n. 2, 2021.

TADOLINI, M.; *et al.* Active tuberculosis, sequelae and COVID-19 coinfection: first cohort of 49 cases. **Eur Respir J**, v. 56, n. 1, p. 1-5, 2020.

WHO, World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**: Global Tuberculosis Control. Geneva. 2015.

WHO, World Health Organization. **Global Tuberculosis Report**. Geneva, 2020.

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE CHIKUNGUNYA EM REGIÕES DE CO-CIRCULAÇÃO DE ARBOVIROSES

Rafaela Nascimento Cont¹; Gabriela Bastos Cabral²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CLR IAL; E-mail: rafaela.cont@hotmail.com

² Núcleo de Ciências Biomédicas do Instituto Adolfo Lutz Regional de Santos, SP

Resumo: A febre Chikungunya, é a doença causada pela infecção do vírus Chikungunya, um *alphavirus*, da família *Togaviridae*, transmitida por mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que circula no Brasil desde 2014. No ano vigente, até setembro, ocorreram 87.748 casos prováveis, e 10 óbitos confirmados por critérios laboratoriais. A co-circulação de arboviroses, como Dengue e Zika, é uma realidade em muitas regiões, o que dificulta o diagnóstico clínico, devido a semelhança dos sintomas entre essas doenças. Para um diagnóstico mais específico, utiliza-se os testes laboratoriais. Entretanto, um dos desafios primários na interpretação dos testes sorológicos de infecções agudas por arboviroses, são os resultados falsos-positivos devido a reatividade-cruzada. Através de uma revisão bibliográfica, demonstrou-se a ocorrência de reação-cruzada nos testes sorológicos de Chikungunya em diversos estudos, variando de 1% a 37%, dependendo do kit comercial e da quantidade de amostras utilizados. Além disso, apresentamos estudos para o desenvolvimento de testes capazes de minimizar essa ocorrência.

Palavras-chave: arboviroses; chikungunya; ELISA; reação-cruzada

INTRODUÇÃO

A febre Chikungunya (CHIKF), é a doença causada pela infecção do vírus Chikungunya (CHIKV), um *alphavirus*, da família *Togaviridae*, transmitida por mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* principalmente. O CHIKV foi isolado pela primeira vez na década de 50, na Tanzânia, onde originou-se o termo Chikungunya, derivada da língua Makonde, que significa “encurvado”, referindo-se a forma que o indivíduo infectado fica devido as dores nas articulações (MORCERF *et al.*, 2015).

No Brasil, os anos de maior incidência de casos de CHIKF até o ano vigente, foram 2016 e 2017, com mais de 151.000 casos/ano, e mais de 190 óbitos (BRASIL, 2018). Em 2021, foi emitido um alerta sobre a ocorrência de surto de Chikungunya no estado de São Paulo, localizado mais especificamente na região da Baixada Santista, com aumento de 380% nas notificações e 33 vezes mais casos confirmados comparado ao ano anterior (SÃO PAULO, 2021).

Assim como a CHIKF, outras arboviroses, como Dengue, Zika e Febre amarela, existem há séculos, e são encontrados frequentemente, porém não exclusivamente, em regiões equatoriais e subtropicais do planeta. Ao longo da história, observa-se o aumento dos casos de surtos e epidemias ao redor do mundo, justificados pela globalização, adaptação dos vetores e falhas no controle das doenças, tornando-se assim uma problemática de saúde pública (FERREIRA *et al.*, 2021; ZAID *et al.*, 2021).

Uma realidade em diversos países, é a co-circulação dessas doenças, o que traz alguns desafios para um diagnóstico adequado. Por apresentarem sintomas muito similares,

o diagnóstico clínico é dificultoso, exigindo assim a confiabilidade diagnóstica dos testes laboratoriais (NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019; LIMA *et al.*, 2021).

Por ser uma região endêmica para outras arboviroses, principalmente a dengue que causa epidemias no país há mais de 40 anos, se faz necessário a compreensão sobre a capacidade dos testes diagnósticos em diferenciar essas doenças. O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento bibliográfico sobre os principais intercorrentes e desafios encontrados no diagnóstico sorológico da infecção pelo Chikungunya.

MATERIAL E MÉTODO

Foi realizada uma revisão bibliográfica priorizando literaturas publicadas nos últimos 5 anos, utilizando bases de dados da National Center for Biotechnology Information (NCBI – PubMed). Artigos que abordavam o tema da febre Chikungunya, como: diagnóstico sorológico, reação-cruzada e co-circulação de arboviroses foram incluídos no estudo.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Para um diagnóstico mais específicos, utiliza-se os testes laboratoriais. Atualmente, as duas principais formas de diagnóstico de CHIKV e diferenciação com outras doenças são os testes moleculares e exames sorológicos. A partir dos testes moleculares temos a detecção do RNA viral por RT-PCR (Reação em Cadeira da Polimerase com Transcriptase Reversa), até o quinto dia após o início dos sintomas. Já os testes sorológicos, detecta-se a presença de anticorpos IgM/IgG após o sexto dia do início dos sintomas (BRASIL, 2017).

Sabe-se que a detecção de anticorpos específicos é de suma importância na infecção por arboviroses. A curta duração da viremia, torna os testes sorológicos a melhor opção para o diagnóstico, visto que dificilmente os pacientes procuram o auxílio médico no início dos sintomas. Assim, algumas das técnicas de diagnóstico sorológico que podem ser utilizados são ELISA, MAC-ELISA, testes imunocromatográficos (teste rápido) e o teste de neutralização por redução de placas (PRNT) por exemplo (FISCHER *et al.*, 2021).

O teste padrão ouro para confirmação pela sorologia é o teste de neutralização (PRNT). Neste método, podemos observar o grau de infecção celular, após a incubação do vírus com anticorpos neutralizantes presentes no soro. O resultado fornece uma estimativa direta da quantidade de anticorpos funcionais. Seus dados podem ser úteis principalmente na detecção de casos subclínicos, auxiliando na avaliação do impacto da doença, na compreensão do comportamento do vírus e no desenvolvimento de vacina, entretanto, é uma metodologia dispendiosa, tanto de custos como de tempo, é de difícil acesso e interpretação subjetiva (MARQUES *et al.*, 2017; PIANTADOSI; KANJILAL, 2020).

O IgM Antibody Capture Enzyme-linked immunosorbent assay (MAC-ELISA) é usado para uma detecção mais específica de IgM. Comparado ao ELISA, a competição de IgG é menor, reduzindo o risco de ligações não-específicas. Em uma avaliação do Center for Disease Control and Prevention (CDC), os resultados positivos no MAC-ELISA, tiveram 90% de concordância com PRNT (JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016; PIANTADOSI; KANJILAL, 2020).

A partir dessas considerações, os testes mais avaliados, utilizados e disponíveis são, portanto, ELISA e o teste rápido. Segundo recomendações do Ministério da Saúde, os testes imunocromatográficos devem ser utilizados como técnicas de triagem, dessa forma, quando um resultado é positivo, a confirmação por ELISA é necessária (BRASIL, 2017).

Segundo Piantadosi e Kanjilal (2020), um dos desafios primários na interpretação dos testes sorológicos de infecções agudas por arboviroses, são os resultados falsos-positivos devido a reatividade-cruzada.

A reação-cruzada é definida como a habilidade de elementos estruturalmente diferentes realizarem a mesma função. Agentes infecciosos frequentemente compartilham similaridade molecular com antígenos-próprios, os quais os auxiliam no escape do sistema imune do hospedeiro. Assim como também pode ocorrer reação-cruzada entre epítomos de patógenos diferentes, possibilitando a neutralização de ambos, o que pode ser uma boa escolha para o desenvolvimento de vacinas contra essas duas ou mais doenças (ROJAS *et al.*, 2018; JAIN; SALUNKE, 2019).

A provável razão da ocorrência dessa multi-especificidade nos anticorpos, é a existência de epítomos comuns em diferentes antígenos. O mimetismo molecular é a semelhança sequencial, estrutural, química ou imunológica compartilhada entre dois epítomos que os leva a interagir com o mesmo paratopo, ademais os anticorpos podem utilizar diferentes paratopos para a ligação com epítomos semelhantes. Essa promiscuidade na ligação de anticorpos contra antígenos diferentes não está diretamente relacionada a especificidade e nem com a interação de baixa afinidade desses anticorpos segundo Jain e Salunke (2019).

A reação-cruzada entre vírus de famílias diferentes, como o caso do CHIKV com o DENV ou ZIKV, é muitas vezes reportado como um evento improvável, devido suas diferenças estruturais e antigênicas. Entretanto, há alguns estudos que demonstram essa ocorrência.

Lima *et al.* (2021) reportou em seu estudo, a reatividade-cruzada com amostras positivas para Dengue em um kit comercial ELISA CHIKV IgM (Euroimmun). As amostras para Dengue, foram coletadas antes da entrada do CHIKV no Brasil, excluindo a possibilidade de co-infecção, além da retestagem dessas amostras com testes moleculares e sorológicos. No geral, 37% (58 de 155 amostras) dos pacientes positivos para DENV também positivaram no ELISA CHIKV IgM.

Em uma pesquisa realizada na Tailândia por Suwanmanee *et al.* (2018), 6 amostras positivas para DENV (RT-PCR), no total de 129 amostras (4,6%), apresentaram reação-cruzada com CHIKV, mais especificamente amostras do sorotipo DENV-2 e DENV-3.

Na análise para o desenvolvimento de um teste rápido diferencial para DENV e CHIKV, Wang *et al.* (2019) observou a presença de alta reatividade-cruzada entre proteínas do envelope do sorotipo DENV-3 e DENV-4, com anticorpos anti-CHIKV. Essas proteínas então, não foram utilizadas para compor o teste, limitando um pouco os resultados, porém evitando ligações equivocadas.

No estudo de Mendoza *et al.* (2019), uma análise de reação-cruzada foi realizada entre diferentes kits de ELISA para CHIKV. Em amostras positivas para flavivírus, confirmados por PRNT, a porcentagem de falsos-positivos para os teste da Euroimmun IgM, Euroimmun IgG e Abcam IgG foram 10,7%, 1,2% e 1,2% respectivamente. Neste mesmo estudo, reação-cruzada intrafamiliar (4%) para os kits da Euroimmun (IgM e IgG) também foram observados.

Quando se utiliza epítomos mais específicos como base do ELISA, como utilizou Kam *et al.* (2015), a porcentagem de falsos-positivos para flavivírus é relativamente baixa (7% - 4/60 amostras), porém para vírus do mesmo gênero, no caso *Alphavirus*, devido à proximidade filogenética, mais da metade dos pacientes com alphavirose tiveram ELISA positivo, e 50% dessas amostras também apresentaram PRNT reagente.

No cenário epidemiológico atual do Brasil, não há outro alfavírus de grande circulação no país, como o CHIKV. Entretanto, o vírus Mayaro (MAYV), do mesmo gênero, é endêmico na região Amazônica, e a ocorrência de reatividade cruzada foi demonstrada por Fischer *et al.* (2020) e Fumagalli (2018). Portanto, é importante a constante

atenção a essa doença também, sendo essenciais medidas de prevenção e controle, através de notificações e desenvolvimento de diagnósticos diferenciais (BARROS *et al.*, 2021).

A proposta de Damle *et al.* (2016) foi desenvolver um anticorpo anti-proteína C, para sua utilização no MAC-ELISA. Durante a execução do teste com o anticorpo, observou-se 3% de reação-cruzada com Dengue (1/35 amostras), 10% com leptospirose (1/10 amostras) e 10% para Fator-reumatóide (1/10).

É necessário o desenvolvimento de testes laboratoriais capazes de diferenciar os casos de arboviroses de forma segura e rápida. Isso será possível, através de exames sensíveis e específicos, que possam ser facilmente realizados, e que viabilizem tempo e custo para sua realização.

Damle *et al.* (2016) desenvolveu um MAC ELISA, utilizando anticorpos contra a proteína C (capsídeo) do CHIKV. Comparando com o MAC ELISA CHIKV desenvolvido no Instituto Nacional de Virologia de Pune (NIV MAC ELISA) a sensibilidade do teste foi de 87% e 100% de especificidade.

A possibilidade de uma detecção simultânea, de forma sensível e específica seria o ideal para regiões de co-circulação de arboviroses. Wang *et al.*, (2019), desenvolveu um teste imunocromatográfico colorimétrico, capaz de detectar IgM e IgG contra DENV e CHIKV simultaneamente.

CONCLUSÕES

A CHIKF é uma doença debilitante, e desde sua introdução no país, vem gerando preocupações na saúde pública. A eminência de surtos e epidemias em diferentes regiões, chama atenção para certos cuidados no manejo da doença.

A co-circulação de arboviroses, dificulta o diagnóstico baseado nos sintomas, exigindo assim, a confiabilidade dos testes laboratoriais para um diagnóstico correto. Apesar da principal medida de prevenção dessas doenças ser a mesma, ou seja, controle dos vetores, um diagnóstico incorreto dificulta a escolha do tratamento, e o monitoramento do cenário epidemiológico.

Os métodos sorológicos são muito utilizados para o diagnóstico, devido sua praticidade e custo-efetividade, porém, está sujeito a interferentes, como a reação-cruzada. Por meio de estudos, pode-se observar a ocorrência de resultados falsos-positivos, mesmo entre vírus de famílias diferentes.

Para contornar esse problema, é importante a combinação de testes, aumentando a acurácia diagnóstica, por meio da detecção de antígeno e anticorpo, como a associação dos testes moleculares com os sorológicos. Além disso, temos diversos estudos para o desenvolvimento de novos testes, capazes de diferenciar essas doenças, ainda que seja um desafio obter um teste com alta sensibilidade e especificidade.

REFERÊNCIAS

BARROS, Elizabeth Regina de *et al.* **Epidemiologia do vírus mayaro na américa latina entre 2009 a 2019.** 2021. Disponível em: <http://www.recima21.com.br/index.php/recima21/article/view/327>. Acesso em: 05 dez. 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Chykungunya: manejo clínico.** 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/chikungunya_manejo_clinico.pdf. Acesso em: 11 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**: monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus zika até a semana epidemiológica 52, 2017. 2018. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>. Acesso em: 06 nov. 2021

DAMLE, R G *et al.* **Diagnostic potential of monoclonal antibodies against the capsid protein of chikungunya virus for detection of recent infection**. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27016930/>. Acesso em: 02 dez. 2021.

EISEN, Herman N.. **Affinity Enhancement of Antibodies: How Low-Affinity Antibodies Produced Early in Immune Responses Are Followed by High-Affinity Antibodies Later and in Memory B-Cell Responses**. 2021. Disponível em: <https://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/canimm/2/5/381.full.pdf>. Acesso em: 24 out. 2021.

FERREIRA, Andreia Silva *et al.* **Biomarkers of severity and chronification in chikungunya fever: a systematic review and meta-analysis**. 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimts/a/WqLJ3gCt3gkH5T7Tjxprhps/>. Acesso em: 10 out. 2021.

FISCHER, Carlo *et al.* **Challenges towards serologic diagnostics of emerging arboviruses**. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34111589/>. Acesso em: 23 out. 2021.

FISCHER, Carlo *et al.* **Robustness of Serologic Investigations for Chikungunya and Mayaro Viruses following Coemergence**. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32024703/>. Acesso em: 01 dez. 2021.

FUMAGALLI, Marcilio Jorge. **Desenvolvimento de métodos sorológicos para diagnóstico de infecções pelos vírus Chikungunya e Mayaro**. 2018. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17147/tde-15102018-115825/pt-br.php>. Acesso em: 03 dez. 2021.

JAIN, Deepti; SALUNKE, Dinakar M. **Antibody specificity and promiscuity**. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30723137/>. Acesso em: 08 nov. 2021.

JOHNSON, Barbara W; RUSSELL, Brandy J; GOODMAN, Christin H. **Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays**. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27920176/>. Acesso em: 10 nov. 2021.

KAM, Yiu-Wing *et al.* **Sero-Prevalence and Cross-Reactivity of Chikungunya Virus Specific Anti-E2EP3 Antibodies in Arbovirus-Infected Patients**. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4287563/>. Acesso em: 15 nov. 2021

LIMA, Monique da Rocha Queiroz *et al.* **Analysis of a Routinely Used Commercial Anti-Chikungunya IgM ELISA Reveals Cross-Reactivities with Dengue in Brazil: a new challenge for differential diagnosis?. A New Challenge for Differential Diagnosis?.** 2021. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8147240/pdf/diagnostics-11-00819.pdf>. Acesso em: 18 set. 2021.

MALE, David; PEEBLES JUNIOR, R. Stokes; MALE, Victoria. **Immunology**. 9. ed. Polônia: Elsevier, 2020. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=GIDRDwAAQBAJ&lpg=PP1&hl=pt-BR&pg=PA154&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. Acesso em: 24 out. 2021.

MARQUES, Claudia Diniz Lopes *et al.* **Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia para diagnóstico e tratamento da febre chikungunya. Parte 1 – Diagnóstico e situações especiais**. 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbr/a/8w8g4dCBcTYg5zR4TGvRWWhD/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 11 nov. 2021.

MENDOZA, Emelissa J *et al.* **Combining anti-IgM and IgG immunoassays for comprehensive chikungunya virus diagnostic testing**. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31449360/>. Acesso em: 30 nov. 2021.

MORCERF, Cely Carlyne Pontes *et al.* **CHIKUNGUNYA: ARBOVIROSE COMO PROBLEMA DE SAÚDE EM EXPANSÃO – UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**. 2015. Disponível em: <http://publicacoes.unigranrio.edu.br/index.php/rcs/article/view/2688>. Acesso em: 23 nov. 2021.

NATRAJAN, Muktha s; ROJAS, Alejandra; WAGGONER, Jesse J. **Beyond Fever and Pain: Diagnostic Methods for Chikungunya Virus**. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30995993/>. Acesso em: 20 set. 2021.

PIANTADOSI, Anne; KANJILAL, Sanjat. **Diagnostic Approach for Arboviral Infections in the United States**. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32938736/>. Acesso em: 11 nov. 2021.

ROJAS, Manuel *et al.* **Molecular mimicry and autoimmunity**. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30509385/>. Acesso em: 14 nov. 2021.

SÃO PAULO. SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. **ALERTA 01 SURTO DE CHIKUNGUNYA ESTADO DE SÃO PAULO Sala de Situação Estadual de Enfrentamento às Arboviroses 2021**. 2021. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/chikung/chikung21_alerta01_surto.pdf. Acesso em: 06 nov. 2021.

SUWANMANEE, San *et al.* **Monitoring arbovirus in Thailand: Surveillance of dengue, chikungunya and zika virus, with a focus on coinfections**. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30248317/>. Acesso em: 05 dez. 2021.

WANG, Ruisheng *et al.* **Rapid Diagnostic Platform for Colorimetric Differential Detection of Dengue and Chikungunya Viral Infections**. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30896928/>. Acesso em: 02 dez. 2021.

ZAID, Ali *et al.* **Arthritogenic alphaviruses: epidemiological and clinical perspective on emerging arboviruses.** 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33160445/>. Acesso em: 21 out. 2021.

DOI: <https://doi.org/10.53934/10106-2>

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA AVALIAÇÃO DE AGENTES CAOTRÓPICOS PARA ANÁLISE DO ÍNDICE DE AVIDEZ DE ANTICORPOS IgG EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *NEISSERIA MENINGITIDIS*

Jéssica Silva Santos¹; Elizabeth Natal de Gaspari²

¹Estudante do Curso de Vigilância Epidemiológica Laboratorial em Saúde Pública- CIM- Instituto Adolfo Lutz; E-mail: santos.jessica@outlook.com

²Pesquisadora do Centro de Imunologia- CIM- Instituto Adolfo Lutz

Resumo: A resposta imune a vacinas, importante ferramenta em saúde pública, é amparada por ensaios laboratoriais, como a avaliação de anticorpos. Testes que indiquem a funcionalidade dos anticorpos são importantes, pois demonstram as propriedades dessas imunoglobulinas. Tratando-se da doença meningocócica invasiva, o teste funcional para correlato de proteção é o ensaio de atividade bactericida sérica, que revela a capacidade das imunoglobulinas de lisar o meningococo. Porém, este ensaio tem aplicação limitada devido ao elevado nível de biossegurança e refinamento técnico para manipulação da cepa viva, tempo de execução e custo. Em contrapartida, o ensaio de avidéz indica a força de ligação entre o antígeno e os anticorpos, sendo capaz de sugerir a atividade bactericida do soro, e pode ser realizado a partir de uma técnica simples de ELISA modificado. Todavia, o protocolo utilizado pode interferir nos resultados finais. Neste trabalho, serão comparados os efeitos de agentes caotrópicos e diferentes temperaturas de incubação nos resultados de ensaio de avidéz com soro de camundongos imunizados com antígenos de *Neisseria meningitidis*, a fim de se destacar a importância da padronização desse ensaio, que pode ser utilizado como ferramenta para estudo de vacinas.

Palavra-chave: agente caotrópico; avidéz; doença meningocócica; vacinas

INTRODUÇÃO

Neisseria meningitidis é uma bactéria pertencente à família Neisseriaceae, gram-negativa, fastidiosa, em formato de diplococos, aeróbico e que pode ou não apresentar cápsula. Seu crescimento ideal necessita de uma temperatura entre 35 a 37°C com 5-10% (v/v) de CO₂ (dióxido de carbono), sua cultura pode ocorrer nos meios: ágar sangue, ágar triptona soja, ágar chocolate suplementado e ágar Mueller-Hinton (ROUPHAEL; STEPHENS, 2011).

A bactéria *N. meningitidis* apresenta alguns fatores de virulência que otimizam sua capacidade de invasão e aumentam sua sobrevivência no organismo hospedeiro, um dos fatores de virulência é a cápsula que auxilia na invasão em ambientes estéreis como o sangue e o líquido cefalorraquidiano protegendo a bactéria contra a resposta do sistema imunológico (SIDDIQUI; AMEER; GULICK, 2021). Além disso o meningococo é envolto por uma membrana externa que apresenta pili, proteínas de membrana externa e lipooligossacarídeos (LOS) que de acordo com sua constituição de antígenos expressos irá classificar a bactéria nos 12 sorogrupos: A, B, C, E, H, I, K, L, M, W, X, Y e Z, sendo que os de maior patogenicidade são o A, B, C, W e Y responsáveis por 90% dos casos da

doença meningocócica invasiva (ROMANELLI, 2012; PIZZA; BEKKAT-BERKANI; RAPPUOLI, 2020).

A doença meningocócica invasiva (DMI) pode ser potencialmente mais grave e fatal na infância, seguida pela ocorrência na adolescência e por fim em jovens adultos, a infecção por *Neisseria meningitidis* pode resultar em choque séptico se manifestando como meningite, septicemia ou uma associação de ambas com acometimento súbito e potencialmente fatal entre 24 a 48 horas do início dos sintomas e com taxa de letalidade de 20%, mesmo em casos de recuperação pode permanecer sequelas como a perda auditiva, doenças no neurodesenvolvimento e amputações (SIDDIQUI; AMEER; GULICK, 2021) (PIZZA; BEKKAT-BERKANI; RAPPUOLI, 2020).

A vacinação é uma medida profilática que se fundamenta no reconhecimento dos polissacarídeos capsulares associados ou não adjuvantes, atualmente estão disponíveis contra os sorogrupos A, C, W e Y. O sorogrupo B é o objeto de intensas pesquisas no atual momento, uma vez que apresenta dificuldade na elaboração de uma vacina por possuir a estrutura do seu polissacarídeo semelhante ao ácido polisiálico presente nas células humanas, gerando o risco de estimular uma resposta autoimune através da vacinação para este sorogrupo (ANDREWS; POLLARD, 2014).

O Programa Nacional de Imunização (PNI) foi criado em 18 de setembro de 1973 por determinação do Ministério da Saúde, com o objetivo de coordenar as ações de imunização. Em 1975 o PNI é institucionalizado por fatores nacionais e internacionais que estimulam a utilização e expansão dos agentes imunizantes, com o objetivo de garantir a integridade das ações de imunização no país e é fortalecido pela legislação sobre imunizantes e vigilância epidemiológica Lei 6.259 de 30-10-1975 e Decreto 78.231 de 30-12-1976 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003)

A avidéz é dada através da interação bivalente e multivalente entre um epítipo e um anticorpo. Sua análise é importante uma vez que pode ser empregada como critério auxiliar para avaliação da eficácia da resposta a vacinas, uma vez que anticorpos que apresentam alta afinidade podem gerar uma função otimizada e ser indicativos de anticorpos com maior potencial protetor (CORRÊA *et al.*, 2021). O ensaio de ELISA é o método mais simples e rápido para análise do índice de avidéz e por isso é a metodologia mais comum empregada, entretanto, outras técnicas também permitem a análise do índice de avidéz como a precipitação com sulfato de amônio, radioimunoensaio em fase sólida e ressonância plasmônica de superfície (CORRÊA *et al.*, 2021).

O tiocianato de potássio (KSCN) é um dos principais agentes caotrópicos empregado nos estudos de nosso laboratório, entretanto é descrito na literatura o uso de Ureia e Dietanolamina como agentes caotrópicos para a análise do índice de avidéz. Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo analisar se há diferenças na efetividade de ação dos três agentes caotrópicos citados e analisar se a exposição em diferentes temperaturas poderia ser um fator de otimização da reação.

MATERIAIS E MÉTODOS

A cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.9 empregada no ensaio se originou através da amostra clínica de um indivíduo brasileiro que desenvolveu a doença invasiva durante uma epidemia de Meningococo B e foi isolada pelo Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz. A partir desta cepa obteve-se as preparações antigênicas, vesículas de membrana externa (OMVs) empregadas na imunização, suspensões de células integras e ensaios laboratoriais. As cepas liofilizadas foram reativadas em ágar chocolate (Difco Laboratories) e então, cultivadas em caldo soja tripticaseína (TSB) (Difco Laboratories), suplementado com 1% de soro de cavalo (Sigma Chemical Company), a 37°C, durante 24

horas. Para extrair as suspensões de células íntegras, as placas foram cobertas com tampão-fosfato salino (PBS) (pH 7,4)-0,02% azida sódica e homogeneizou-se as células gentilmente com alça de Drigalski. A suspensão foi transferida para tubos e inativada por calor, em banho-maria 56°C por 30 minutos. Mensurou-se a densidade ótica (DO) a 600 nm e conservou-se a suspensão a 4°C. A extração das OMVs seguiu a descrição de De Gaspari e Zollinger (2001).

O estudo utilizou amostras provenientes de ensaio que comparou a imunização de camundongos de meia-idade com OMVs complexadas a hidróxido de alumínio (HA) ou brometo de dioctadecildimetilamônio (DDA) como adjuvantes (TRZEWIKOSWIKI DE LIMA *et al.*, 2021), conforme aprovação pelo Comitê de Ética e Uso Animal (CEUA) IAL-Pasteur, nº 06/2012. Utilizou-se camundongos (*Mus musculus*), fêmeas, da linhagem heterogênea Swiss (não isogênicos), com 12 meses de vida (meia-idade), provenientes do Biotério de Criação do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, SP, Brasil). Imunizou-se os camundongos com 3 doses subcutâneas de 100 µL de preparações antigênicas descritas na tabela 1, nos dias 0, 20 e 35. As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas por punção do plexo oftálmico nos dias 0 (controle pré-imune) e no dia 50, ou seja, 15 dias após a última dose. Após coleta, o sangue foi separado por centrifugação e armazenou-se o soro a -20°C. A obtenção e caracterização das preparações antigênicas está descrita em Trzewikoswki de Lima *et al.* (2021).

Tabela 1: Preparação antigênica para imunização.

Grupo	Preparação antigênica
OMV	10 µg/ml OMVs
OMV+DDA	10 µg/ml OMVs + 0,1 Mm DDA
OMV+HÁ	10 µg/ml OMVs + 0,1 Mm HA
DDA	0,1 Mm
HA	0,1 Mm

Para determinação da avidéz utilizou-se o ensaio de ELISA indireto empregando placas MaxiSorp Loose Nunc-immuno module. A placa foi sensibilizada com antígeno *Whole Cells* diluídas em tampão fosfato-salino (PBS) até a densidade ótica de 0,1nm. As lavagens foram realizadas com solução de PBS-tween 0,05% e o bloqueio realizado com diluição 5% de leite-PBS-tween 0,05%. Como amostra, empregou-se soro de camundongos da linhagem swiss imunizados com a terceira dose para OMV de *N. meningitidis* diluídos 1:3200. Utilizou-se como agentes caotrópico o Tiocianato de potássio (KSCN), ureia e Dietanolamina (DEA) incubando em câmara úmida e expondo nas temperaturas 4°C, temperatura ambiente (TA) e 37°C. Como anticorpo conjugado utilizou-se Anti-IgG de camundongos marcado com peroxidase cadeia pesada específico (γ) da KPL (Lote: 10219636) diluído 1:20.000 em PBS-tween em leite 2,5%. Empregou-se como substrato cromogênico a tetrametilbenzidina (TMB) e para solução *stop* ácido sulfúrico (H₂SO₄).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para determinação do índice de avidéz foi medido a resistência dos complexos de antígeno-anticorpo em exposição aos agentes KSCN, ureia e DEA em condições de temperatura de 4°C, temperatura ambiente e 37°C por 20 minutos. O índice de avidéz foi calculado realizando a média das duplicatas das densidades ótica (DO) das amostras e posteriormente realizando o cálculo para o índice de avidéz que é dado pela divisão da DO do soro tratado com o agente caotrópico dividido pela DO do soro sem tratamento e o resultado multiplicado por 100. A interpretação do resultado obtido é representada pela tabela 2

Tabela 2 - Parâmetros para interpretação do índice de avides.

Índice de Avides (%)	Interpretação
<30%	Baixo
30-49%	Intermediário
>50%	Elevado

Fonte: CHACKERIAN; LOWY; SCHILLER, 2001

O levantamento das publicações disponíveis na base de dados do PubMed até a data de 04/01/2022 demonstrou uma prevalência no uso do Tiocianato de Potássio, enquanto outros agentes caotrópicos como Ureia e Dietanolamina não se apresentam tão expressivos para o uso no modelo camundongo, sugerindo assim a prevalência do uso do KSCN nos ensaios de avides, corroborando com nossos atuais protocolos de laboratório. Sendo assim, podemos sugerir que há uma maior utilização do uso deste agente caotrópico na comunidade científica, permitindo a abertura de questões a respeito da possível obtenção de resultados mais satisfatórios e reprodutíveis em relação a outros agentes caotrópico existentes para camundongos (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de publicações no banco de dados PubMed empregando os agentes caotrópicos até a data 04/01/2022.

Tema pesquisado	Publicações disponíveis
Thiocyanate mouse antibodies avidity	255
Urea agent and mouse sera avidity	1
Dietanolamina and mouse sera avidity	0

Fonte: PubMed, 2022

Os grupos experimentais foram delimitados de acordo com o tipo de adjuvante utilizado ou sua ausência compondo os grupos: OMV+ DDA (N=4), HA+OMV (N=5), DDA (N=3), HA (N=2), OMV (N=4). Os dados obtidos com esses ensaios preliminares demonstraram a utilização do KSCN como agente caotrópico não apresentou diferenças significativas ao uso dos diferentes agentes caotrópico utilizados. A alteração mais significativa ocorreu na amostra de soro de camundongos quando imunizados com HA+OMV, onde se obtêm um índice de avides elevado (54%) na temperatura de 4°C, um índice intermediário (43%) na temperatura ambiente e um índice baixo (26%) na temperatura de 37°C, podendo assim se atribuir o uso da temperatura de 37°C a protocolos já estabelecidos. Entretanto essas condições não se reproduzem nos outros grupos imunizados com outros adjuvantes, podendo ser uma possível característica da heterogeneidade do adjuvante utilizado e da espécie dos animais Swiss, tão bem quanto pode estar vinculado a quantidade de anticorpos presente na amostra (CORRÊA, 2021).

Diferentemente dos outros dois agentes caotrópico, mesmo com a exposição a três temperaturas distintas a ureia não apresentou em nenhuma das amostras índices de avides baixos, ou seja, inferiores a 30%. Também foi observado que algumas respostas a imunização apresentaram índices de avides extremamente altos, atingindo 100%, mas tal resultado pode ser justificado em virtude do tipo de cálculo utilizado, pois os valores com as amostras sem tratamento ficaram próximos aos das amostras tratadas. Apesar das análises realizadas ainda se trata de observações iniciais sem cálculo estatístico e passível das limitações cabíveis da análise de índice de avides utilizado. Em relação ao dietanolamina apenas um animal imunizado com OMV apresentou índice de avides baixo e sem alteração na exposição nas diferentes temperaturas. Os resultados obtidos com a avaliação da avides dos grupos supracitados são expressos na figura 1.

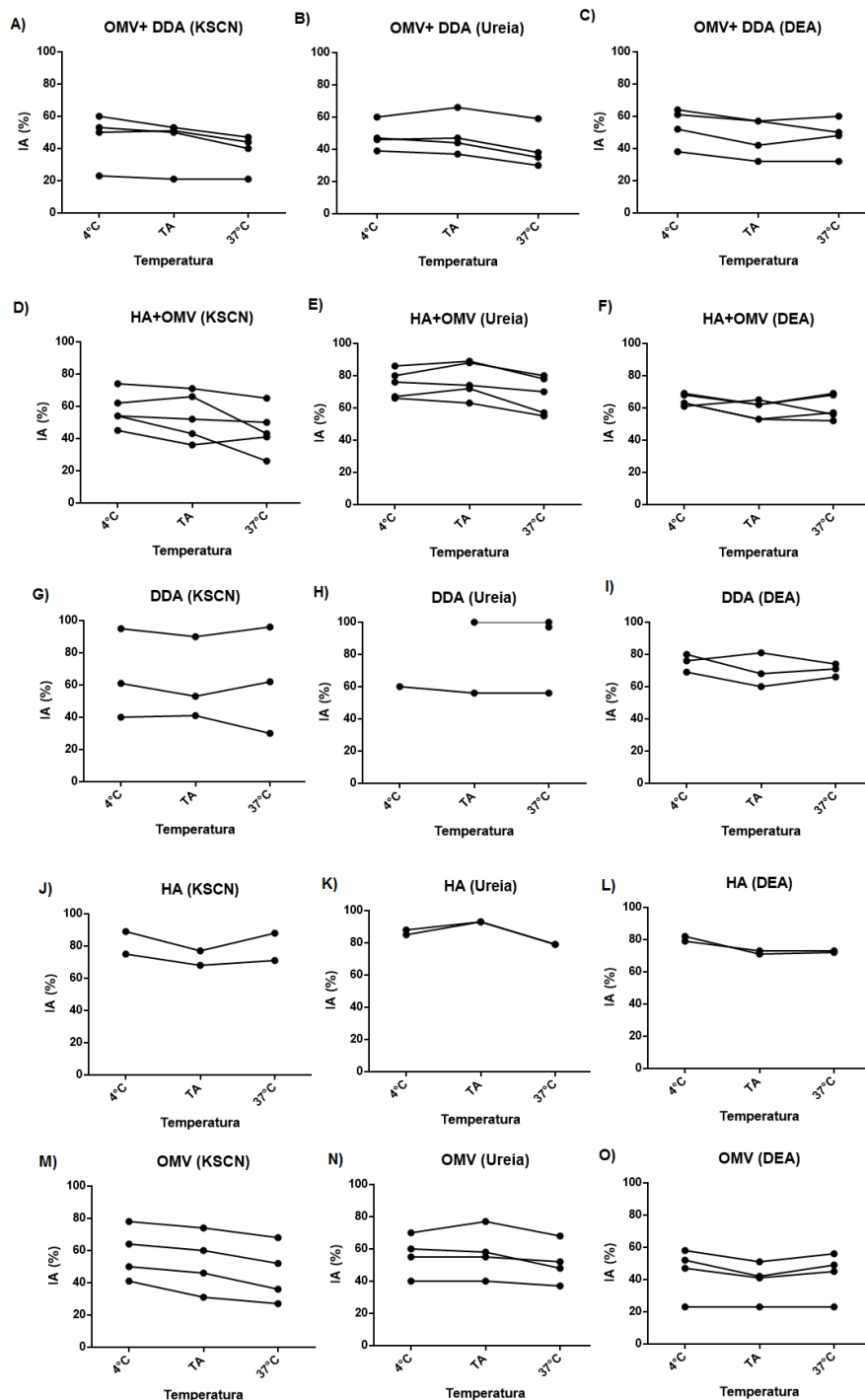


Figura 1: Avaliação do índice de avidéz do soro de 3ª dose, obtidos em camundongos Swiss imunizados com diferentes adjuvantes e em diferentes temperaturas e agentes caotrópico.

Legenda: Figura 1- ELISA: Estudo comparativo de diferentes agentes caotrópico avaliados após a terceira dose de camundongos imunizados na diluição 1:3200, avaliando as temperaturas e adjuvantes. (A) OMV+DDA tratados com agente caotrópico KSCN incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. (B) OMV+DDA tratados com agente caotrópico Ureia incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. (C) OMV+DDA tratados com agente caotrópico DEA incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. (D) HA+OMV tratados com agente caotrópico KSCN incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. (E) HA+OMV tratados com agente caotrópico ureia incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. (F) HA+OMV tratados com agente caotrópico DEA incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. (G) DDA tratados com agente caotrópico

KSCN incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. **(H)** DDA tratados com agente caotrópico ureia incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. **(I)** DDA tratados com agente caotrópico DEA incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. **(J)** HA tratados com agente caotrópico KSCN incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. **(K)** HA tratados com agente caotrópico ureia incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. **(L)** DEA incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. **(M)** OMV tratados com agente caotrópico KSCN incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. **(N)** OMV tratados com agente caotrópico ureia incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C. **(O)** OMV tratados com agente caotrópico DEA incubado em temperatura 4°C, temperatura ambiente e 37°C.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados que obtivemos podemos observar a possibilidade de expandir os estudos empregando a primeira e segunda dose dos soros utilizados para avaliar se ocorreu diferença de avidéz em períodos diferentes de imunização. Os agentes caotrópico inicialmente não apresentam grandes diferença entre si, mesmo aplicando temperaturas diversas. Os levantamentos da literatura indicam uma prevalência no uso de tiocianato de potássio para avaliação de soro de camundongos, possibilitando um questionamento a respeito de uma maior afinidade deste agente caotrópico com o tipo de amostra utilizada em relação aos demais estudados. A aplicação de apenas uma metodologia de análise de afinidade aparenta não ser suficiente para gerar resultados conclusivos a respeito das questões geradas no decorrer deste trabalho, necessitando assim de mais estudos acerca do tema.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, Sophie M.; POLLARD, Andrew J. **A vaccine against serogroup B *Neisseria meningitidis*: dealing with uncertainty**. The Lancet Infectious Diseases, v.14, n. 5, p.426-434, 2014.

CORRÊA, Victor Araujo *et al.* **Modified ELISA for antibody avidity evaluation: The need for standardization**. Biomedical Journal, v. 44, n. 4, p.433-438, 2021.

De GASPARI, E.; ZOLLINGER, W. **Expression of class 5 antigens by meningococcal strains obtained from patients in Brazil and evaluation of two new monoclonal antibodies**. Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 5, n. 3, p. 143-153, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa Nacional de Imunizações**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2003

PIZZA, Mariagrazia; BEKKAT-BERKANI, Rafik; RAPPUOLI, Rino. **Vaccines against Meningococcal Diseases**. Microorganisms. V.8, n.10, 2020.

ROMANELLI, C. S. S. **Prevalência e variabilidade genética de antígenos candidatos vacinais em isolados clínicos de *N. meningitidis* circulantes no Brasil**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

ROUPHAEL, Nadine G; STEPHENS, David S. ***Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology**. Methods in molecular biology, v. 799, p. 1-20, 2011

SIDDIQUI, J. A; AMEER, M.A; GULICK, Peter G. **Meningococemia**. StatPearls, 2021.

TRZEWIKOSWKI DE LIMA, G.; RODRIGUES, T.S.; PORTILHO, A.I.; *et al.* **Immune responses of meningococcal B outer membrane vesicles in middle-aged mice.** Pathogens and Disease, v. 78, n. 5, fta 0028, 2021.

ANÁLISE DE DADOS SECUNDÁRIOS DOS CASOS SUSPEITOS DE COQUELUCHE NO ESTADO DE SÃO PAULO

Juliana Lourenço da Silva Pereira¹; Daniela Leite².

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde- Centro de Bacteriologia- IAL. Email: julianaloureco22@gmail.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Doença Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais – NDEI – IAL

RESUMO: A coqueluche é uma doença de transmissão respiratória, altamente contagiosa, causada pela *Bordetella pertussis*, que pode acometer indivíduos de todas as idades. O grupo de maior risco são os bebês menores de seis meses, não vacinados ou incompletamente imunizados. O diagnóstico laboratorial é realizado pelo isolamento por cultura e/ou pela identificação por qPCR de *B. pertussis*. Por ser um importante agravo em saúde pública, o objetivo do trabalho foi realizar uma análise epidemiológica dos dados secundários da doença no Estado de São Paulo entre os anos de 2010 a 2020. As informações foram obtidas a partir do banco de dados criado pelo NDEI. Os resultados demonstraram uma maior sensibilidade da qPCR em relação a cultura; um aumento gradual na positividade entre os anos de 2010 e 2014, e maior positividade entre indivíduos do sexo feminino. A faixa de crianças até seis meses foram os mais acometidos pela doença, e as unidades com maior número de exames e positividade foram o IAL Central, CLR de Campinas, Ribeirão Preto e Taubaté respectivamente. Conclui-se que, apesar da coqueluche ser uma doença imunoprevenível, ainda ocorre muitos casos da doença, inclusive epidemias como a de 2010 a 2014. A qPCR é uma técnica de maior sensibilidade em relação a cultura e esta é imprescindível para o diagnóstico, já que é fundamental para realização de estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: coqueluche, epidemiologia; cultura; qPCR.

INTRODUÇÃO

Bordetella pertussis é o agente causal da coqueluche, doença infecciosa que apresenta altas taxas de transmissão (90%) e que pode acometer indivíduos de qualquer idade, sendo o grupo de maior risco os bebês menores de seis meses que ainda não completaram o esquema de imunização primária [1; 2; 3]. É um importante problema de saúde pública e apesar de uma redução significativa na carga global da doença com o advento da vacina, a doença permanece endêmica em todo o mundo, com surtos e picos epidêmicos ocorrendo a cada 3-5 anos [4]. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que, em 2018, ocorreram, em todo o mundo, cerca de 151.000 casos de coqueluche, sendo 90% deles em países em desenvolvimento [5].

A doença é transmitida de pessoa a pessoa através de gotículas de saliva de indivíduos contaminados. Possui uma duração média de quatro a 12 semanas, com três estágios: **catarral**, na qual os pacientes são mais contagiosos e os sintomas são confundidos com infecções respiratórias leves, apresentando febre baixa, coriza, tosse seca e mal-estar; **paroxística**, na qual a manifestação típica são os paroxismos caracterizados por uma crise súbita e incontrolável de tosse, seguida de falta de ar e vômitos, ocorre estreitamento da glote que ao respirar profundamente pode emitir um som chamado de

“guincho” e **convalescença**, onde ocorre a diminuição dos paroxismos e vômitos [4; 6;7;8].

O diagnóstico laboratorial para o agravo é realizado pelo isolamento da *B. pertussis* pela cultura e pela realização do diagnóstico rápido pelo método da PCR em Tempo Real-qPCR, ambos de material colhido de secreção nasofaríngea [9; 10].

Atualmente estão disponíveis dois tipos de vacinas (i) a vacina de células inteiras (wP) produzidas a partir da suspensão de bacilos inteiros mortos e a vacina acelular (aP) composta por um a cinco antígenos purificados [11]. No Brasil, a vacina pentavalente (DTP - toxóides diftérico e tetânico e pertussis + hepatite B e *Haemophilus influenzae* tipo b) é aplicada aos dois, quatro e seis meses de idade, com primeiro reforço com a DTP aos 15 meses e o segundo, entre os quatro e seis anos de idade. Em 2014, foi incluído no calendário vacinal a imunização de gestantes aplicada a cada gestação entre a 20^a e a 36^a semana (vacina dTpa) [12].

O Centro de Bacteriologia (CB) do Instituto Adolfo Lutz Central (IAL) é o Laboratório de Referência Nacional para Coqueluche, sendo responsável pelo diagnóstico laboratorial pelo método da cultura, e pelo método molecular da qPCR. O IAL também é responsável pelo desenvolvimento de pesquisas para caracterizar os isolados de *B. pertussis* circulantes no país.

Este trabalho teve como objetivo ampliar o conhecimento da epidemiologia da coqueluche em nosso meio por meio de análise de dados secundários dos casos suspeitos de coqueluche no Estado de São Paulo, cujos materiais biológicos foram encaminhados ao CB do IAL, para realização do diagnóstico laboratorial pelas técnicas de cultura e da qPCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de *swab* nasofaríngeo, provenientes da assistência do Estado de São Paulo e encaminhadas ao IAL Central e aos Centros dos Laboratórios Regionais do IAL (CLR – IAL) entre janeiro/2010 a dezembro/2020, para a rotina diagnóstica de coqueluche. As informações obtidas foram organizadas em bancos de dados no Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais – NDEI do CB/IAL. Não foram incluídas informações que permitissem identificar os pacientes, de forma a garantir a privacidade das informações e o anonimato dos sujeitos da pesquisa, utilizando-se os dados obtidos exclusivamente para os propósitos desta pesquisa. As variáveis que foram consideradas para a análise dos dados foram: ano calendário, área geográfica, faixa etária, sexo e resultados da cultura e qPCR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram processadas 39.140 amostras de casos suspeitos de coqueluche no estado entre o período estudado.

Na figura 1, temos que a técnica de qPCR foi capaz de detectar um maior número de casos positivos em relação a cultura, 5.289 (13,51%) e 1.596 (4,1%) (somatória do período) para qPCR e cultura respectivamente, demonstrando a maior sensibilidade da qPCR entre as duas técnicas. Essa maior sensibilidade tem sido bastante evidenciada e relatada por diversos grupos ao redor do mundo. Um estudo realizado por LEE *et al.* (2018) [9] nos Estados Unidos, foi verificado a sensibilidade de diversas técnicas diagnósticas para a coqueluche dentre elas a qPCR e a cultura, os dados foram coletados de sete Estados entre os anos de 2007 e 2011, e os resultados demonstraram que a cultura

apresentou 64% de sensibilidade enquanto a qPCR apresentou 90,6% do total de 868 amostras analisadas.

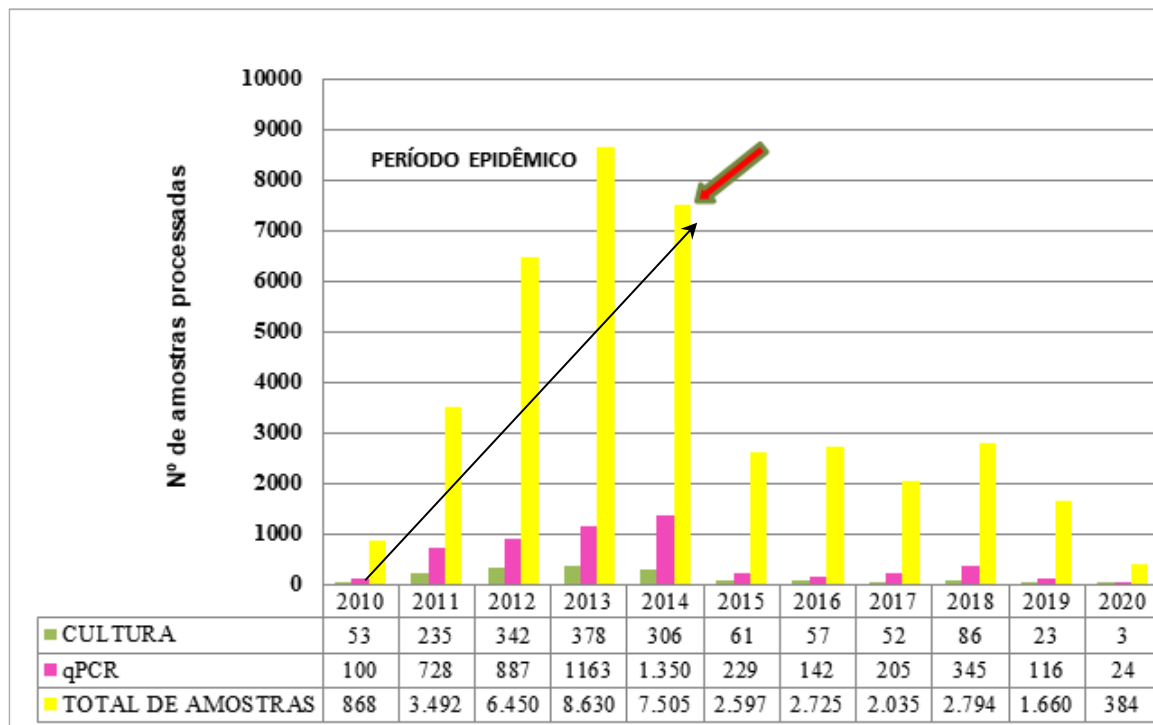


Figura 1. Total de amostras analisadas e número total de amostras positivas, 2010 – 2020.

Observamos um aumento gradual da confirmação de casos suspeitos por qPCR, sendo o ano de 2014 o de maior positividade no Estado de São Paulo, correspondendo a 25,5% (1.350) do total de casos positivos por qPCR. Esses dados corroboram com os dados epidemiológicos do Brasil onde os anos de 2010-2014 foram considerados os anos do período epidêmico no país e no mundo.

O Estado da Califórnia, nos Estados Unidos, notificou um aumento no número de casos de coqueluche em 2014, tendo um aumento de cinco vezes mais registrado em anos anteriores, com um total de 9.935 casos reportados, descrevendo um caráter epidêmico cíclico (três a cinco anos) no aumento de número de casos confirmados [13]

Ainda podemos observar que o ano de 2018 deveria corresponder ao início do próximo período epidêmico, no entanto isso não se confirmou já que ocorreu uma queda nos casos confirmados e também no número de amostras processadas. Não se pode confirmar exatamente o porquê de não ter havido uma nova epidemia de coqueluche, mas o que se supõe é que a queda dos casos suspeitos e positivos seja um reflexo dos efeitos da vacinação de gestante, mas não se tem estudos suficientes para confirmar esta hipótese.

O ano de 2020 foi o período com menor número de amostras processadas e também de resultados positivos, o que pode ser relacionado com a pandemia de Covid-19, já que nesse ano toda a atenção estava voltada para esta doença o que fez com que o diagnóstico para outras doenças respiratórias tenha ficado em segundo plano e também o uso de máscara pode ter levado a diminuição da transmissão de outras doenças respiratórias influenciando a queda nas amostras processadas.

Na figura 2, observamos a distribuição das faixas etárias obtidas na análise dos resultados positivos da qPCR. O grupo etário de maior positividade corresponde ao das crianças com idade menor ou igual a dois meses, 2.411 (45,6%) amostras positivas. Essa

faixa etária corresponde às crianças que ainda não receberam nenhuma dose de imunizante, sendo o grupo mais vulnerável, seguido pelo grupo de três a seis meses, com 1.235 (23,4%), ou seja, dos incompletamente vacinados.

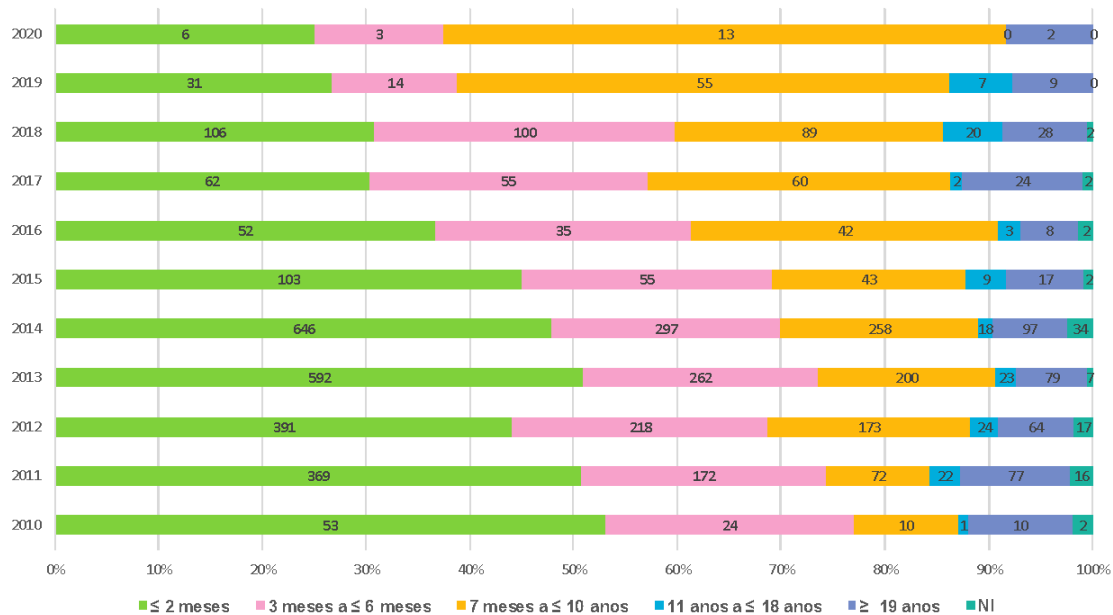


Figura 2. Distribuição por Faixa etária das amostras positivas por qPCR- 2010 a 2020.

Entre o período de 2011 a 2014, o Ministério da Saúde (2020) registrou 22.772 casos positivos de coqueluche em todo o Brasil, onde 61% (13.935) desses casos em crianças menores de um ano de vida, sendo ainda 12.135 menores de seis meses, com esquema vacinal não iniciado ou incompleto, o que está de acordo com o observado em São Paulo [14].

Na tabela 1, a análise do sexo, mostrou que 55,4% (2.932) dos resultados positivos correspondiam ao sexo feminino, enquanto 44,4% (2.346) ao masculino, 0,2% ao grupo de sexo não informado (ou seja, recém-nascidos). Apesar de pequena a diferença de positividade entre os sexos, existe um predomínio entre as mulheres. Essa proporção também foi registrada por PEER *et al.* (2020), no qual foi feito um levantamento da incidência do sexo feminino e masculino em relação aos casos positivos em nove países no período entre os anos de 1990- 2017, variando a positividade entre os países, 48,1% e 54,7% para sexo masculino e feminino, respectivamente [15].

Na tabela 2 temos a análise da realização de exames processados em cada CLR - IAL nos 11 anos de estudo. O IAL Central (01) foi o que processou mais amostras e obteve o maior número de resultados positivos, correspondendo a 38,9% do total de amostras processadas entre 2010 e 2020, sendo seguido pelo CLR de Campinas (03), CLR de Ribeirão Preto (06) e CLR de Taubaté (12), com respectivamente 14,2%; 10,6% e 9,8% de amostras processadas. Presume-se que o alto número de amostras processadas seja atribuído ao intenso trabalho de vigilância epidemiológica e a presença de hospitais sentinelas nessas regiões o que permite um melhor rastreamento de casos suspeitos e notificação dos casos positivos.

Tabela 1. Resultados positivos por qPCR em relação ao sexo, 2010 – 2020.

SEXO			
ANO	Feminino (n)	Masculino (n)	NI (n)
2010	59	41	0
2011	414	311	3
2012	512	373	2
2013	649	510	4
2014	747	603	0
2015	116	113	0
2016	77	65	0
2017	104	101	1
2018	183	161	0
2019	63	52	1
2020	8	16	0
TOTAL	2.932	2.346	11

Tabela 2. Total de amostras processadas e relação da positividade entre Cultura e qPCR nas unidades Central e Regionais do IAL, 2010 – 2020.

CLR	CULTURAS	qPCR	Total de Amostras
	Positivas (n)	Positivas (n)	Processadas (n)
01	714	2.430	15.226
02	94	221	1.510
03	290	639	5.545
04	37	160	993
05	14	43	313
06	178	416	4.157
07	12	91	774
08	84	149	1.387
09	04	86	618
10	67	210	2.723
11	37	287	1.640
12	58	515	3.826
13	07	42	428
TOTAL	1.596	5.289	39.140

CONCLUSÕES

A análise dos dados epidemiológicos da coqueluche no Estado de São Paulo nos 11 anos estudados permitiu verificar que é um importante agravo em saúde pública. Apesar de ser uma doença imunoprevenível, ainda existem surtos e epidemias cíclicas, como a ocorrida entre 2010-2014. Assim como, verificou-se que a qPCR é uma ferramenta diagnóstica muito importante, quando comparada à cultura, pois possui maior sensibilidade e especificidade. Mas apesar de suas vantagens em relação à cultura, a qPCR é uma técnica auxiliar no diagnóstico, sendo a cultura necessária no diagnóstico pois sem ela seria impossível a realização de estudos epidemiológicos. E em relação à faixa etária, também se pode observar que a faixa mais atingida são as crianças menores de seis meses, ou seja, não imunizadas. Esse grupo é o mais vulnerável, mais exposto a adoecer e vir a óbito, sendo necessária a imunização materna para que os anticorpos produzidos ajudem a proteger esse grupo nos primeiros meses de vida.

REFERÊNCIAS

- [1] MATTOO, S; CHERRY, J.D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 2, p. 326–382, 2005.
- [2] CALVERT, A.; HEATH, P.T. Pertussis. **Medicine**, v. 45, n. 12, p. 735-738, 2017.
- [3] MS. Ministério da Saúde. Coqueluche. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/coqueluche> Acesso em: 09 de dez. de 2021.
- [4] NIEVES, D.J.; HEININGER, U. *Bordetella pertussis*. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 3, EI10, 2016.
- [5] WHO. World Health Organization. Pertussis. 2019. Disponível em: who.int/health-topics/pertussis#tab=tab_1. Acesso em 05 de agosto de 2021.
- [6] OLIVEIRA, D.R.; LEITE, D.; BEREZIN, E.; RENOINER, E.I.M.; ROSA, F.M.; LOBO F.C.B.; et al. Coqueluche. In: **Ministério da Saúde, Guia de Vigilância em Saúde**, Ministério da Saúde, 3ªed, v. único. Brasília, DF, 2019, p.70 -82.
- [7] KILGORE, P.E; SALIM, A.M.; ZERVOS, M.J.; SCHMITT, H-J. Pertussis : Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. **Clin Microbiol Rev**, v. 29, n. 3, p. 449– 486, 2016.
- [8] POLINORI, I.; ESPOSITO, S. Clinical Findings and Management of Pertussis. In: FEDELE, G.; AUSIELLO, C. (eds) **Pertussis Infection and Vaccines. Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1183. Springer, Cham., 2019.
- [9] LEE, AD.; CASSIDAY, P.K.; PAWLOSKI, L.C.; TATTI, K.M.; MARTIN, M.D.; BRIERE, E.C.; et al. Clinical evaluation and validation of laboratory methods for the diagnosis of *Bordetella pertussis* infection: Culture, polymerase chain reaction (PCR) and anti- pertussis toxin IgG serology (IgG-PT). **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, e0195979, 2018.
- [10] LEITE, D. **Prevalência e caracterização de cepas de *Bordetella pertussis* deficientes em pertactina em um país com vacina de células inteiras contra coqueluche**. 2019. 102f. Tese (Doutorado em Ciências). Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.
- [11] GUIZO, N.; MEADE, B.D.; WIRSING VON KÖNIG, C-H. Pertussis vaccines: The first hundred years. **Vaccine**, v. 38, n. 5, p. 1271-1276, 2020.
- [12] MS. Ministério da Saúde. Brasil. Nota informativa sobre mudanças no calendário nacional de vacinação para o ano de 2017. 2016
- [13] WINTER, K.; GLASER, C.; WATT, J.; HARRIMAN, K. Pertussis Epidemic. **MMWR**, v.63, n. 48, p. 1129–1132, 2014.
- [14] MS. Ministério da Saúde. Brasil. Nota informativa sobre mudanças no calendário nacional de vacinação para o ano de 2017. 2016

[15] PEER, V.; SCHWARTZ, N.; GREEN, M.S. A multi-country, multi-year, meta-analytic evaluation of the sex differences in agespecific pertussis incidence rates. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, e0231570,2020.

ANÁLISE DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS *Escherichia coli* PATOGÊNICAS

Amilson da Silva Ribeiro

Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – NCB – IAL CLR III
E-mail: amilsondasilva@gmail.com

RESUMO

Introdução: A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria bacilar anaeróbia facultativa pertencente a família Enterobacteriaceae presente na flora intestinal de humanos. Geralmente não são patogênicas, porém existem alguns sorogrupos que possuem diversos fatores de virulência que são capazes de produzir toxinas provocando quadros diarreio gênicos e outras doenças extraintestinais. O diagnóstico laboratorial é realizado através de culturas de amostras biológicas, provas bioquímicas de identificação e testes de biologia molecular. **Objetivo:** Este trabalho propõe descrever as características das *E. coli* patogênicas e o seu perfil epidemiológico. **Metodologia:** Foi realizado uma revisão bibliográfica baseando-se em livros, dissertações de mestrado, teses de doutorado, monografias e artigos científicos. **Resultados e discussão:** A EHEC/STEC O157:H7 é uma das principais linhagens causadoras de surtos de origem hídrica e alimentar e também é responsável por causar a Síndrome Hemolítico Urêmica (SHU). Outras cepas também podem provocar a SHU como a O104:H4 causadora de um surto de enorme proporção na Alemanha em 2011. No Brasil nos anos de 2009 a 2018, a *E. coli* foi o patógeno de maior relevância em surtos de doenças de origem alimentar. A EPEC foi o sorotipo mais identificado em surtos no estado de São Paulo entre 2009 e 2018. **Conclusão:** As *E. coli* patogênicas são constantemente isoladas em surtos no Brasil e pelo mundo, desse modo, portanto é preciso fortalecer o sistema de vigilância epidemiológica com o objetivo de prevenir novos casos de contaminação e surtos subnotificados.

Palavras-chave: Doenças transmitidas por alimentos, Epidemiologia, *Escherichia coli* e Surtos.

INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria bacilar anaeróbia facultativa pertencente a família Enterobacteriaceae que possui habitat no intestino de humanos e animais. Foi identificada pela primeira vez pelo médico pediatra Theodor Von Escherich em 1885 (GOMES *et al*, 2016).

A maior parte das cepas de *E. coli* não são patogênicas, porém as linhagens que possuem potencial patogênico são capazes de produzir toxinas acarretando doenças específicas provocando sintomas graves que necessitam hospitalização (MADIGAN *et al*, 2016). São bastonetes não esporulados que em sua maioria são móveis, pois possuem a presença de flagelos peritríquios (GARCIA, 2021).

Existem ao total seis tipos de *E. coli* patogênicas que provocam infecção entérica em humanos, sendo elas: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica ou produtoras de toxina Shiga (EHEC/STEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) (SOUZA *et al*, 2016).

Algumas espécies de *E. coli* patogênicas podem provocar sintomas como diarreia, enquanto outros causam infecções do trato urinário, doenças respiratórias, pneumonia, e outras doenças (CDC, 2021).

Dentre os sorogrupos mais virulentos as ETEC e STEC possuem uma distribuição mundial afetando majoritariamente crianças menores que 5 anos de idade. Cepas de ETEC provocam em média anualmente 380.000 mortes, principalmente em regiões com saneamento básico precário (OLIVEIRA, 2012).

Vale ressaltar que algumas cepas de *E. coli* possuem duas ou mais características de diferentes patótipos e, dessa forma, são denominadas espécies híbridas tornando-as mais virulentas e agressivas (GOMES *et al*, 2016). Como exemplo tem-se a *E. coli* O104:H4 que possui características da *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e também da *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (CVE, 2011).

As cepas de *E. coli* patogênicas e comensais são similares fenotipicamente, dificultando sua identificação nos laboratórios de análise, assim o uso de métodos moleculares são importantes para o seu diagnóstico clínico (MOLINA *et al*, 2021).

Neste sentido este trabalho tem o objetivo de apresentar as principais características patológicas das *E. coli* patogênicas relatando os surtos e a frequência de infecção provocada por esses patótipos através de dados epidemiológicos. Apresentar a importância desse grupo de enterobactérias responsáveis por grande parte dos surtos alimentares e de outras infecções de notificação compulsória.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi elaborado através de uma revisão bibliográfica baseando-se em livros, manuais, monografias, sites de pesquisa, teses de mestrado e doutorado e artigos científicos. Foi utilizado como organizador de artigos e referências, o software Mendeley. Definiu-se trabalhar com as seguintes bases de dados Biblioteca virtual em saúde (BVS), MEDLINE, SciELO, EBESCO, LILACS e Google acadêmico. Assim foram consultadas informações referentes ao perfil epidemiológico das *E. coli* patogênicas nas esferas mundial, nacional e estadual, utilizando-se de descritores como *Escherichia coli*, Surtos, doenças transmitidas por alimentos e epidemiologia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Situação epidemiológica das *E. coli* no mundo

Nos Estados Unidos em 1993, um surto de enorme proporção provocado por *E. coli* O157:H7 envolveu mais de 700 pessoas em 4 estados do país, com 51 casos de SHU e 4 mortes confirmadas.

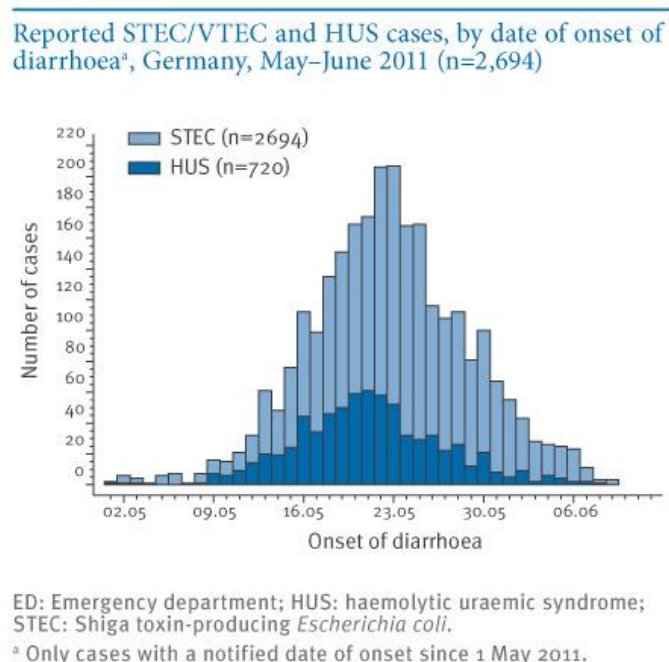
Em 1996, no Japão, ocorreu o maior surto provocado por *E. coli* O157:H7 no qual mais de 8.000 pessoas foram infectadas, 106 crianças desenvolveram SHU e três foram a óbito (PAULA *et al*, 2014).

Em 2011, na Alemanha, iniciou-se um surto que se expandiu até outros países da Europa e América do Norte contaminando 4.000 pessoas, sendo que desse total houve 845 casos de SHU com 54 mortes.

De acordo com alguns estudos, o patógeno causador deste surto foi o sorotipo O104:H4 que possui fatores de aderência agregativa e produção de *stx2*, o que indica um perfil híbrido de EAEC e STEC (SANTOS *et al*, 2020).

O gráfico 1 demonstra o número de casos identificados no surto que ocorreu na Alemanha entre maio e junho de 2011. Nesse período foram registrados 2694 casos de STEC e 720 casos de SHU associados com quadros de diarreia aguda.

Gráfico 1. Total de casos identificados de STEC e SHU na Alemanha entre Maio e Junho de 2011



Fonte: Wadl *et al* (2011)

Situação epidemiológica das *E. coli* no Brasil

Na década de 1980, o patotipo EPEC foi responsável por causar aproximadamente 30% dos casos de diarreia infantil, sendo os sorotipos O111, O55 e O119 os principais causadores (GOMES *et al*, 1991).

De acordo com dados epidemiológicos, na década de 1990, os patotipos EPEC atípica e EAEC foram os sorotipos mais encontrados nos casos de diarreia aguda, tanto em crianças como em adultos (ORLANDI *et al*, 2006).

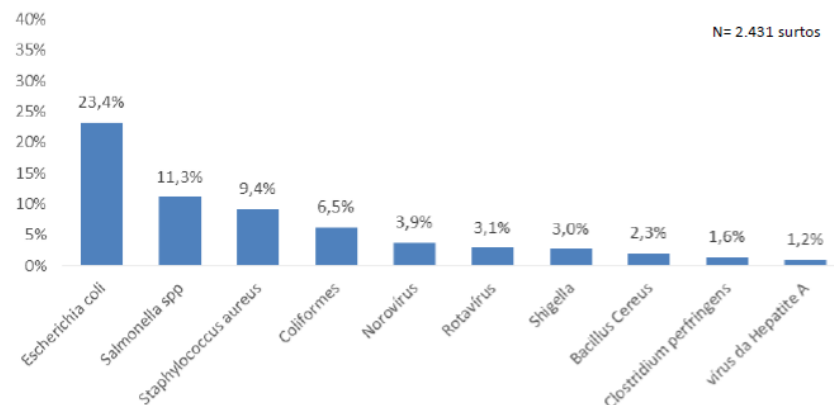
No ano de 2002, ocorreu o primeiro caso registrado de *E. coli* O157 em doenças em humanos, o patotipo foi isolado de três pacientes que apresentavam um quadro de diarreia sanguinolenta que é um dos principais sintomas da doença (IRINO *et al*. 2002).

Em 2019, ocorreu um surto em uma creche no estado do Espírito Santo com 22 pessoas atingidas e 1 óbito registrado. Segundo a Vigilância Epidemiológica, o patotipo identificado continha o gene *stx2* demonstrando a presença da *E. coli* STEC/EHEC (SESA, 2019).

Os surtos provocados pelas *E. coli* patogênicas geralmente estão associados a doenças transmitidas por alimentos (DTA) que corresponde a um incidente com 2 ou mais pessoas que apresentam como principal sintoma a doença diarreica aguda que provoca diversas evacuações com fezes aquosas (CVE, 2011).

Observando o gráfico 2 fica evidente que a *Escherichia coli* é o agente etiológico mais identificado em surtos de DTA no período de 2009 a 2018 com cerca de 23,4% dos surtos, seguido de *Salmonella spp* com 11,3% confirmados.

Grafico 2. Distribuição dos 10 agentes etiológicos mais identificados nos surtos de DTA
Brasil, 2009 a 2018.



Fonte: SINAN/SVS/Ministério da Saúde

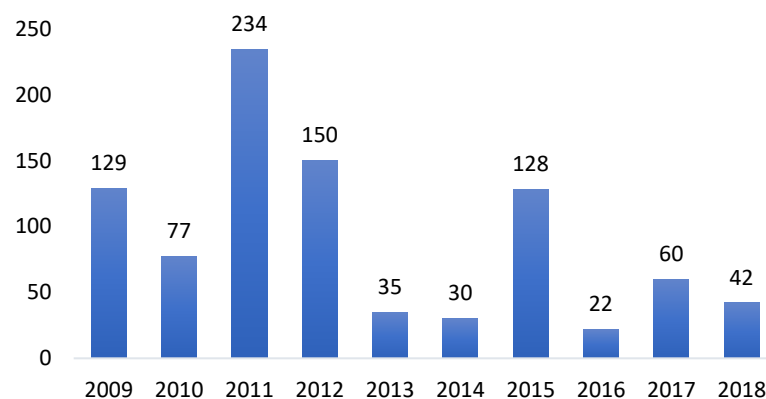
Situação epidemiológica das *E. coli* no estado de São Paulo

Na cidade de São Paulo, as EPEC típicas foram os principais agentes etiológicos de diarreia infantil desde a década de 50, o que corresponde a 30% dos casos somente no primeiro ano de vida (OLIVEIRA, 2012).

Em 2006, foram identificados 106 casos de EPEC sorogrupo O128, sendo o patotipo EPEC o mais identificado nesse período. Nos anos 2006, 2013 e 2014 ocorreram três óbitos provocados por *E. coli* patogênica (AGUIAR, 2019). Na cidade de São Paulo, sorotipos não O157:H7 foram identificados como causadores de SHU (Souza *et al*, 2007).

De acordo com o gráfico 3, no período de 2009 a 2018, o número de casos provocados por *E. coli* no estado de São Paulo foi maior em 2011 com o total de 234 casos e o menor índice ocorreu em 2016 com 22 casos. Nesse mesmo período, o sorotipo de *E. coli* mais identificado foi a EPEC como o total de 210 casos.

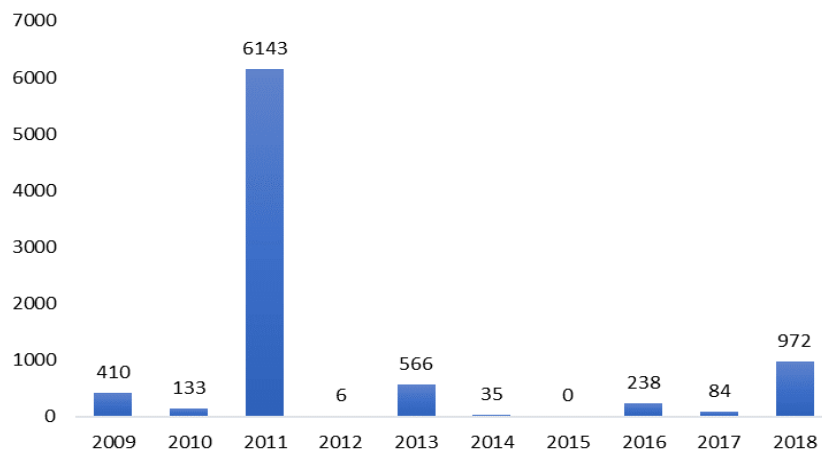
Grafico 3. Número de casos provocados por *E. coli* notificados no estado de São Paulo no período de 2009 a 2018



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Observando o gráfico 4, o ano de 2011 obteve o maior número de casos ocasionados por *E. coli* associados a outros patógenos totalizando 6.143 casos, ao contrário do ano de 2015 no qual não houve registros.

Gráfico 4. Número de casos provocados por *E. coli* associados a outros patógenos notificados no estado de São Paulo no período de 2009 a 2018



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

CONCLUSÕES

As *E. coli* patogênicas podem representar um potencial risco para a saúde pública, pois é um microrganismo versátil com facilidade de adquirir vários fatores de virulência criando novos sorotipos com capacidade de causar novas doenças.

Entre 2009 a 2018, as *E. coli* foram os patógenos mais identificados em surtos transmitidos através de alimentos ressaltando a importância de realizar inquéritos epidemiológicos para identificar o patógeno causador de um surto.

Os números de surtos causados por DTHA são subnotificados no Brasil e a investigação da maioria acabam não chegando no agente causador. É preciso melhorar os sistemas de vigilância e bem como treinar melhor as equipes para as investigações dos surtos.

Dessa forma, espera-se que as *E. coli* patogênicas continuem aparecendo, sendo em casos esporádicos ou em surtos, pois ainda são frequentemente isoladas como contaminantes em amostras de alimentos e de reservatórios animais.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, M. L. **Ocorrência de diarreias associadas as *Escherichia coli* diarreio gênicas**. 47f. Monografia (Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública) – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. ***E. coli* (*Escherichia coli*)**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/>>. Acesso em: 20 out. 2021.

- CVE/SES-SP – Centro de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Divisão de doenças de transmissão hídrica e alimentar. **Síndrome Hemolítico-Urêmica e *Escherichia coli* O104:H4 e o surto na Alemanha.** São Paulo, 2011.
- GARCIA, L. N. H. **Identificação e caracterização de *Escherichia coli* diarreogênica de abatedouro misto de bovinos e suínos.** 69f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021.
- GOMES, T. A. T. et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **Journal of Infectious Disease**, v. 164, n. 2, p. 331-337, 1991.
- GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 3–30, 2016.
- IRINO, K. et al. O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 446-447, 2002.
- MADIGAN, T. M.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCLEY, D. H.; DAVID, A. S.; **Microbiologia de Brock**. 14. ed., Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MOLINA, N. B. et al. Primer reporte de *Escherichia coli* diarreogénica en población pediátrica ambulatoria con diarrea atendida en la ciudad de La Plata, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, La Plata, abr. 2021.
- OLIVEIRA, J. J. **Surtos alimentares de origem bacteriana: uma revisão.** 36f. Seminário (Disciplina Seminários aplicados do Programa de Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondônia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 4, p. 507- 517, 2006.
- PAULA, C. M. D. et al. *Escherichia coli* O157:H7 — patógeno alimentar emergente. **Vig Sanit Debate**. v. 2, n. 4, p. 23-33, 2014.
- SANTOS, A. C. M. et al. Diversity of Hybrid and Hetero Pathogenic *Escherichia coli* and their Potential Implication in More Severe Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 10, n. 339, p. 131-141, 2020.
- SESA, Secretaria do estado da Saúde do Espírito Santo. **Investigação do Surto de doença diarreica aguda ocorrido no município de Vila Velha.** Vila Velha, 2019.
- SOUZA, C. O. et al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreioagênica versátil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 7, n. 2, p. 79-91, 2016.
- SOUZA, R. L.; NISHIMURA, L. S.; GUTH, B. E. C. Uncommon Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O165:HNM as cause of hemolytic uremic syndrome in São Paulo, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 59, n. 2, p. 223-225, 2007.

DOI: <https://doi.org/10.53934/10109-2>

EFEITO DAS MEDIDAS DE CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL ADOTADAS NO BRASIL E NOS MUNICÍPIOS DO ESTADO DE SÃO PAULO - UMA AVALIAÇÃO CRÍTICA DA POLÍTICA DE SAÚDE PÚBLICA

Clélia Carolina Alves¹; Tatiane Ferreira Petroni²; Juliana Galera Castilho Kawai³

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – NCB – CLR IAL; E-mail: Carolina_22_alves@hotmail.com

²Docente do Departamento do Núcleo de Ciências Biomédicas – NCB – CLR IAL.

³Pesquisador do Departamento do Núcleo de Ciências Biomédicas – NCB – CLR IAL.

Introdução: A Leishmaniose Visceral é uma zoonose que acomete o sistema imunológico de animais e seres humanos. É transmitida pela picada do mosquito flebotomíneo infectado pela *Leishmania infantum*, o qual foi detectado no Estado de São Paulo. A dispersão do vetor vem ocorrendo gradativamente, passando dos municípios contíguos à Araçatuba, local onde em 2014 a 2019 ocorreram 42 casos e três óbitos para o centro do Estado. No mesmo período foram registrados, em São Paulo, 642 casos com 55 óbitos em humanos. **Objetivo:** Avaliar o efeito das medidas de controle da Leishmaniose Visceral adotadas no Brasil e Estado de São Paulo. **Metodologia:** Trata-se de revisão da literatura, utilizando dados de artigos publicados em bases indexadas, como, BVS – Biblioteca Virtual em Saúde, PubMed, SciELO – Scientific Eletronic Library Online, manuais contidos em sites do Ministério da Saúde, Google Acadêmico e artigos de revista, selecionados a partir de 1997, período em que foram encontradas pesquisas elaboradas com a finalidade de investigar a efetividade das medidas de controle da doença no país. **Conclusão:** É urgente a união entre as três esferas de governo, gestores e ciência, para que a tomada de decisões sobre ações de enfrentamento da Leishmaniose Visceral seja norteadas por evidências científicas capazes de fornecer ferramentas menos agressivas, mais eficazes e justas em conjunto a implantação de educação em saúde na prática cotidiana da comunidade e de serviços de controle desta zoonose.

Palavras-chave: Diagnóstico; Leishmaniose Visceral; Saúde Pública

INTRODUÇÃO

As Leishmanioses compreendem um conjunto de doenças infecciosas de caráter zoonótico ocasionadas por espécies distintas de protozoários digenéticos do gênero *Leishmania spp.*, que infecta animais e seres humanos (1). É endêmica em 13 países das Américas, ocasionando 65.934 novos casos da infectividade entre os anos de 2001 a 2019 (2). No Brasil, a identificação e eliminação de cães infectados é uma das alternativas adotada contra o reservatório canino para minimizar as fontes de infecção ao vetor (3) e, embora teoricamente existam condições de controle da Leishmaniose, as medidas convencionais de controle da sua expansão utilizadas até o momento não têm surtido efeito (4), nos levando a crer que essas ações não tem sido capazes de enfraquecer a incidência da Leishmaniose no país (5). No período de 2014 a 2019, foram registrados, em São Paulo,

642 casos da infecção e 55 óbitos em humanos. Nesse mesmo período, em Araçatuba, ocorreram 42 casos e três óbitos em decorrência da doença (6). Considerando que os municípios do Estado de São Paulo, considerados altamente endêmicos para a Leishmaniose Visceral canina e humana, continuam apresentando índices elevados de infecção e mortalidade, este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão da literatura sobre o efeito das medidas de controle desta zoonose adotadas nos municípios que integram o Estado de São Paulo, área endêmica para esta doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Revisão da literatura realizada com dados extraídos de artigos publicados nas bases indexadas, como, BVS – Biblioteca Virtual em Saúde, PubMed, SciELO – Scientific Electronic Library Online, manuais contidos em sites do Ministério da Saúde, Google Acadêmico e de artigos de revista, selecionados a partir de 1997, período em que foram encontradas pesquisas sobre a efetividade das medidas de controle da Leishmaniose Visceral no país por meio dos descritores: Expansion of Visceral Leishmaniasis or deltamethrin or control of canine Visceral Leishmaniasis in Sao Paulo State and guidelines of the Visceral Leishmaniasis Control Program.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos trinta anos as estratégias de controle da LV têm sido duramente criticadas no que tange as políticas públicas, sobretudo aquelas implementadas contra os cães domésticos, vistos como principais carreadores da infecção no meio urbano (7).

A tentativa de controle da LV no Brasil teve início em 1953 no Nordeste, com aplicação do dicloro difenil tricloroetano (DDT), prescrição do tratamento dos indivíduos infectados e eliminação dos cães com sorologia reativa (8). Após pulverização com DDT em 14 municípios, constatou-se queda de 52% na incidência da LV em humanos versus um incremento de 11,9% em 14 municípios que aplicaram só a eutanásia (9). Em 1999 em Araçatuba, considerada endêmica, foram implantados o monitoramento entomológico, controle químico da população vetorial, inquérito censitário anual de cães em áreas de transmissão e eutanásia dos animais soropositivos (10). A realização da eutanásia canina é baseada na Resolução n.º 714, de junho de 2002, Conselho Federal de Medicina Veterinária, voltada à todos os cães soropositivos/parasitológico positivo (11) e é motivo de discussão. De acordo com Costa (12), o Brasil é o único país no mundo a eutanasiar cães para controlar a LV. De 1990 a 1994 aproximadamente 80.000 animais soropositivos foram eliminados, porém, aumentou quase 100% a incidência em humanos (13). Em estudo no Nordeste a incidência de contágio entre os cães diminuiu; porém, em área em que a estratégia não foi aplicada, não houve variação significativa na incidência cumulativa da LV, sugerindo ser incoerente a remoção de cães soropositivos. Todavia, a medida contribuiu para baixar a transmissão entre os cães (14).

Costa et al (15) ao elaborarem estudo em Araçatuba e Birigui utilizando modelagem matemática, mostraram que a eliminação de cães reagentes sintomáticos e assintomáticos enfraqueceu a transmissão canina, mesmo havendo a reposição de 100% desses animais. Já, Sevá et al (16) por meio de modelagem matemática, ao comparar o uso de coleiras impregnadas com deltametrina com a eliminação dos cães, mostraram que encoleirar 90% dos canídeos, reduziu a prevalência de infecção nesses animais e diminuiu a quase zero a incidência em humanos, além de ser aceitável pela comunidade. Autores argumentaram que a prevalência de cães infectados não teve associação com a incidência da patologia nos humanos e que é mais eficiente o uso de coleiras impregnadas com

inseticidas, adoção de vacinas e intervenções nutricionais (12,17). Kazimoto et al (18) no Rio Grande do Norte, constataram eficácia das coleiras com deltametrina após queda de 59% na incidência da LV. Brazuna (19), no Mato Grosso do Sul apresentou diminuição de 50% na prevalência após uso de coleiras com inseticida. No entanto, a eutanásia junto a borrifação de áreas infectadas é a principal medida adotada pelo Ministério da Saúde (10). Avaliação em 16.373 cães de Votuporanga usando coleiras impregnadas com inseticida mostrou queda da prevalência e da incidência de casos humanos (20). Camargo-Neves et al (21) realizaram trabalho parecido em Andradina, onde ocorreram 20 óbitos humanos entre 2001 a 2002. Neste trabalho mais de 15.000 cães saudáveis utilizaram coleiras com deltametrina a 4%, e os com sorologia reagente foram eutanasiados, diminuindo a incidência em humanos e a quantidade de cães infectados.

Pesquisas no Maranhão mostraram que embora os flebotomíneos ocorram durante todo o ano é no período chuvoso que o vetor encontra condições favoráveis disseminação (22). Neste contexto, o manejo ambiental é fundamental no controle dos flebotomíneos e deve preceder qualquer intervenção química, visto que, a retirada dos focos desses indivíduos através da limpeza de domicílio e peridomicílio e orientação da comunidade sobre esse vetor são ações que contribuem para diminuir a proliferação desses insetos (23). De 2009 a 2012 o Estado da Bahia registrou uma redução de 1,6% do número de casos da doença (24). Medidas como limpeza de quintais e abrigo de animais podem ter contribuído para essa queda. Porém em 2009, o Estado de São Paulo registrou 169 casos da patologia em humanos, distribuídos entre Bauru, Araçatuba e Dracena, locais endêmicos para LV (25). Entretanto, Dietze et al (13), ao estudarem uma área endêmica do Brasil, constataram não haver elevação no número de crianças afetadas pela LV devido a conviverem com canídeos, mesmo com alta taxa de soro positividade entre os cães pesquisados (38%). Porém, a pesquisa relacionada apenas a humanos, pelo mesmo autor apresentou correlação entre o número de casos da infecção em crianças que mantiveram convivência com pessoas infectadas (13).

Zuben (26) observou que nos municípios de Campo Grande, Fortaleza, Belo Horizonte e Bauru, os quais possuem elevado número de casos em humanos, assim como em Goiânia e Campinas, as quais apresentam quantidade semelhante de habitantes, porém com transmissão canina, a principal ação de controle da zoonose adotada nesses locais é dirigida contra o reservatório doméstico e, tal ação é recebida com resistência pelos tutores dos animais, bem como pela comunidade, havendo interferência judicial contra a eutanásia por parte dos tutores, dificultando a aplicação desta medida. Igualmente Romero (27,28) inferiu que a intervenção voltada ao reservatório canino é a menos aceitável a nível comunitário. A resistência oferecida pela população em permitir o acesso as residências para o cumprimento dessas ações, particularmente no que diz respeito à eutanásia. Apesar das controversas, há trabalhos que sugerem ser efetiva a eliminação de canídeos infectados (29), um exemplo é o trabalho de Nunes et al (30), que ao considerarem um período de 24 meses para a transmissão em humanos, observaram a correlação entre a queda da incidência em humanos e eutanásia dos cães em Araçatuba. Mesmo resultado foi evidenciado em uma revisão sistemática, contudo, todos os cães sintomáticos e não sintomáticos foram eliminados naquele estudo (12). Para Romero (27) a remoção de cães não é efetiva, pois os animais eliminados são rapidamente substituídos. Essas dificuldades também foram destacadas por Vulpiani et al (31), os quais apontam para o conflito ético que envolve a medida impedindo-a de ser instrumento efetivo contra a LV. Uma alternativa para eles seria a vacina, no entanto a ausência de método de diagnóstico com alcance

suficiente para diferenciar animais soropositivos vacinados dos soropositivos pela infecção inviabiliza a incorporação desta ferramenta. Desta forma, práticas indiretas, como o uso de coleiras impregnadas com deltametrina surtem maior efeito na diminuição da incidência e prevalência da *Leishmania infantum*. Para Werneck (28) a inefetividade da ferramenta adotada pelo MS se deve a problemas estruturais, os quais somados a carência de insumos e recursos financeiros enfraquecem a cobertura das ações de controle da Leishmaniose. Além disso, o autor abordou a falta de prioridade da Leishmaniose em relação a outras doenças, a inacurácia dos testes para detecção da infecção canina, a interferência judicial contra a eutanásia e o baixo impacto das ações voltadas para educação em saúde. Em concordância, Dye et al (32) ao investigarem o desempenho de um método indireto de anticorpos fluorescentes, concluíram que os mesmos possuem baixa eficácia na detecção da infecção canina ao observarem que a especificidade e a sensibilidade em relação à doença podem ser simultaneamente altas, entretanto, a sensibilidade máxima foi < 80%.

Diversos autores têm defendido o investimento em pesquisas científicas que avaliem novas estratégias contra a Leishmaniose, de forma que as ações não sejam centradas apenas no controle vetorial e reservatórios caninos, mas que envolvam a participação da comunidade e abranjam recursos voltados ao saneamento ambiental (28,33). Da mesma forma, Silva et al (7) afirmam ser urgente que medidas sanitárias implantadas, particularmente as usadas contra o reservatório doméstico, para o qual outras alternativas podem ser adotadas no controle a Leishmaniose, sejam pensadas, assim como ocorre com sucesso na minimização da incidência da doença e dos riscos para os canídeos em diferentes regiões do mundo. O MS emitiu nota técnica reconhecendo a carência de evidências relacionadas à efetividade das estratégias adotadas e, em 2010 financiou uma pesquisa para testar o nível de proteção conferido por coleiras impregnadas com inseticida em 300 mil cães, a qual mostrou queda de 50% da prevalência da infecção. Após esse resultado o MS elaborou uma pesquisa a fim de testar a sua custoefetividade e, essa comprovou se tratar de um insumo custoefetivo (34).

CONCLUSÕES

É urgente a união entre as três esferas de governo, gestores e ciência, para que a tomada de decisões sobre ações de enfrentamento da LV seja norteadas por evidências científicas capazes de fornecer ferramentas menos agressivas, mais eficazes e justas em conjunto a implantação de educação em saúde na prática cotidiana da comunidade e de serviços de controle desta zoonose.

REFERÊNCIAS

1. SOLANO-GALLEGOS, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. et al. The LeishVet Group, LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v.4, n. 86, 2011.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. **Organização Pan-Americana da Saúde**. 2020.
3. FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. Diagnóstico da Leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Americana de saúde**, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.
4. SOUZA, V.M.M.; JULIÃO, F.S.; NEVES, R.C.S. et al. Ensaio comunitário para avaliação da efetividade de estratégias de prevenção e controle da Leishmaniose Visceral humana no município de Feira de Santana, Estado da Bahia, Brasil. **Revista Epidemiologia e Serviços da Saúde**. v.17, n. 2, jun. 2008.
5. SALOMÓN, O.D.; FELICIANGELI, M.D.; QUINTANA, M.G. *Lutzomyia*

- longipalpis* urbanização e controle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.110, n.7, p.831-46, 2015.
6. SÃO PAULO - Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjak”. LVAH – Casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificação, Estado de São Paulo, 2014 a 2019; Fonte: SINANNET/Divisão de 47 Zoonoses CVE/CCD/SES-SP e dados provisórios atualizados em 10/04/2019.
7. SILVA, R.A.; ANDRADE, A.J.; QUINT, B.B. et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 2018; 113(5):1–9.
8. LACERDA M.M. O programa brasileiro de controle da leishmaniose. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 1994; 89:489-495.
9. ALENCAR J. Profilaxia do calazar no Ceará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 1961; 3:175-180.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia e Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde** – 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016b
11. BRASIL. Ministério da Saúde. Medidas de Controle. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo**. 1.ed. Brasília, 2004 Cap. 7, p. 66.
12. COSTA, C.H.N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.44, n.2 Mar./Apr. 2011.
13. DIETZE, R. et al. Effect of Eliminating Seropositive on the Transmission of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Magazine Clinical Infectious Diseases**. v.25, p.1240-2, 1997.
14. ASHFORD, D.A. Studies on Control of Visceral Leishmaniasis: Impact of Dog Control on Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Magazine The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.59, n.1, p.53-56, 1998.
15. COSTA, D.N.C.C et al. Controle da leishmaniose visceral canina por eutanásia: estimativa de efeito baseado em inquérito e modelagem matemática. **Caderno de Saúde Pública**. v.36, n.2, 2020.
16. SEVÁ, A.P.; OVALLOS, F.G.; AMAKU, M. et al. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral leishmaniasis in Brazil. **PLoS One**. 11(7).2016.
17. NERY, G., BECERRA, D.R.D., BORJA, L.S. Avaliação da infectividade parasitária a *Lutzomyia longipalpis* por xenodiagnóstico em cães trata - dos para leishmaniose visceral naturalmente adquirida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V.37, 2017.
18. KAZIMOTO, T.A.; AMORA, S.S.A.; FIGUEIREDO, F.B. et al. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the prevalence and incidence of canine visceral leishmaniasis. **Vector Borne Zoonotic Diseases**. 18(7):356–63. 2018
19. BRAZUNA, J.C.M. Estudos sobre leishmaniose visceral humana e canina no município de Campo Grande, MS, Brasil. 2012. Tese (Doutorado em doenças infecciosas e parasitárias). Campo Grande (MS): Universidade Federal de Mato grosso do Sul; 2012.
20. TOLEZANO, J.E.; MATSUMOTO, P.S.S.; TANIGUCHI, H.H. et al Avaliação da efetividade do uso de coleiras impregnadas com deltametrina no controle da leishmaniose visceral no município de Votuporanga, Estado de São Paulo, Brasil, 2014 – 2016. **Revista**

do Instituto Adolfo Lutz. 7:e1764. p 2-10. 2018

21. CAMARGO-NEVES, V.L.F DE; RODAS, L.A.C; PAULIQUÉVIS, JUNIOR C. et al. Avaliação da Efetividade da Utilização de Coleiras Impregnadas com Deltametrina a 4% para o Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: Resultados Preliminares. **Boletim Epidemiológico Paulista**. v.1, n.12, p.1-13, 2004.

22. REBÊLO, J.M.M.; OLIVEIRA, S.T.; SILVA, F.S. et al. Sandflies (Diptera, Psychodidae) of the amazonia of Maranhão. V. Seasonal occurrence in ancient colonization area and endemic for cutaneous leishmaniasis. **Revista Brasileira de Biologia**. 61(1):107-115. 2001.

23. BARATA, R.A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; MAYRINK, W. et al. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 38(5):421-425. 2005.

24. BRASIL. Ministério da Saúde. **Que fazer para prevenir a LV?**. Situação da Leishmaniose Visceral (LV). Estado da Bahia, 2013. n.1. Bahia, 2013, p.1.

25. BRASIL. Ministério da Saúde. **Zoonoses**. Sistema Nacional de Vigilância em saúde relatório de situação. 5.ed. Brasília. 2011a, p.16.

25. ZUBEN, A.P.B.V.; DONALÍSIO, M.R. Difficulties in implementing the guidelines of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Control Program in large cities. **Caderno de Saúde Pública** 32 (6). 2016.

27. ROMERO, G.A; BOELAERT, M. Controle da leishmaniose visceral na América Latina: uma revisão sistemática. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 4:e584. 2010

28. WERNECK, G.L. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. 2016. 32(6).

29. OLIVEIRA S.S. Avaliação de estratégia otimizada para triagem e eliminação de cães no controle da Leishmaniose Visceral Humana. 2011. Tese (Doutorado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Osvaldo Cruz. 2011.

30. NUNES, C.M.; PIRES, M.M.; SILVA, K.M. et al. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in the endemic area. **Veterinary Parasitology**. v.170, 2010.

31. VULPIANI, M.P.; IANNETTI, L; PAGANICO, D. et al. Métodos de controle do reservatório de cães *Leishmania infantum*: estado da arte. **Veterinary Medicine International**. 11:1- 13. 2011.

32. DYE C, VIDOR E, DEREURE J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**. 103: 647-656, 1993.

33. LUZ, Z.M.P. Participação da população na prevenção da leishmaniose visceral: como superar as lacunas? **Caderno de Saúde Pública**. 2016. 32(6).

34. BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota Técnica nº 5/2021**. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial. 2021.

AVALIAÇÃO DA FLUORETAÇÃO DE ÁGUAS DE ABASTECIMENTO PÚBLICO EM MUNICÍPIOS PERTENCENTES À REGIÃO DE MARÍLIA E ASSIS – SP.

Júlia Zocca Nunes de Barros¹; Rosângela Aguiar da Silva²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - NQBM – IAL; E-mail: j.zocca@hotmail.com

²Docente/Pesquisador Científico do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. – NQBM – IAL.

Resumo: Dispor de água de boa qualidade para o consumo humano é aspiração dos povos e objetivo estratégico dos governos. A vigilância da água de abastecimento público visa assegurar padrões de segurança e qualidade aceitáveis, em conformidade com a legislação vigente. Dentre os vários parâmetros, destaca-se o fluoreto, importante indicador da qualidade da água, pois em concentrações adequadas auxilia na prevenção da cárie dentária, já teores excessivos podem ser relacionados à fluorose dentária e esquelética. O objetivo deste trabalho foi avaliar as concentrações de fluoreto das águas de abastecimento público e os processos de fluoretação dos municípios da região de Marília e Assis – SP, no período de 2016 a 2020, por meio de uma pesquisa descritiva com levantamento, compilação, tratamento dos dados e interpretação dos resultados das análises de fluoreto. Do total de 6.541 amostras, 66,6% (4.360 amostras) estavam de acordo com a legislação vigente, 33,4 % (2.181) em desacordo, sendo 25,6% abaixo de 0,6 mg/L F⁻ e 7,8% acima de 0,8 mg/L F⁻, correspondentes a 1.672 e 509 amostras, respectivamente. A análise do processo de fluoretação mostrou ineficiência no processo de manutenção dos níveis de fluoreto de 50% dos municípios avaliados no período de 2016 - 2020. O monitoramento da concentração de fluoreto é de grande relevância para a avaliação da qualidade da água destinada a consumo humano, devido a proteção ou risco que pode oferecer à saúde dentária. A análise dos resultados de fluoreto deste estudo permitiu uma avaliação dos sistemas de fluoretação e aponta para a necessidade de medidas mais efetivas em relação à fiscalização dos sistemas de distribuição para a adequação do processo, que garanta água com concentração de flúor em níveis desejáveis para a proteção da cárie e fluorose dentária.

Palavras-chave: águas; fluoretação; fluoreto; monitoramento

INTRODUÇÃO

A água é um dos recursos naturais mais importantes à manutenção da vida e fundamental ao desenvolvimento das atividades econômicas e sociais. Dispor de água para consumo humano de boa qualidade é aspiração dos povos e objetivo estratégico dos governos, o que se expressa na implementação de políticas públicas que tem no saneamento um pilar importante da proteção social (FRAZÃO & NARVAI, 2017). A vigilância da água de abastecimento público visa assegurar padrões de segurança e qualidade aceitáveis para o consumo humano, em conformidade com a legislação vigente.

A água adequada para o consumo humano é aquela considerada doce, porém água doce não significa água potável e para isso ela precisa ser de boa qualidade, livre de contaminação e qualquer substância tóxica (GEO BRASIL, 2007). A depender do uso, os

padrões de qualidade da água variam, sendo os padrões de potabilidade da água para o consumo humano estabelecidos pela Portaria nº 888 de 4 de maio de 2021, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2021).

Dentre os parâmetros analisados para a determinação dos padrões de qualidade da água, destaca-se o fluoreto, um importante indicador da qualidade, pois a ingestão sem controle do flúor assim como a sua ausência na água de abastecimento público são problemas de saúde pública, uma vez que, podem indicar proteção ou risco à saúde dentária (LOPES, 2012). A legislação vigente no estado de São Paulo, Resolução SS 250 de 15 de agosto de 1995, da Secretaria de Estado da Saúde (SES), estabelece que o teor ideal de íons fluoretos seja de 0,7 mg/L e considera dentro do padrão de potabilidade a faixa de 0,6 a 0,8 mg/L F⁻ (SÃO PAULO, 1995).

A fluoretação das águas de abastecimento público pode ocorrer de maneira natural ou através da adição controlada de compostos de flúor (DUARTE, 2008). A fluoretação dos sistemas públicos de abastecimento é considerada a medida de saúde mais eficaz na prevenção da cárie dentária, por apresentar grande alcance populacional e melhor custo benefício (FERREIRA et al., 2013), entretanto, uma das principais preocupações quanto a fluoretação das águas é a incapacidade de controlar a dose ingerida pelo indivíduo, podendo contribuir para o risco da fluorose, visto que o flúor também está presente em alimentos e produtos odontológicos (MAGALHÃES, 2018).

O monitoramento do processo de fluoretação e das concentrações de fluoreto foi instituído pelo Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (PROÁGUA) e o Centro de Laboratório Regional – Instituto Adolfo Lutz de Marília realiza análises periódicas de amostras de água de 62 municípios pertencentes à região de Marília e Assis - SP.

Considerando a importância da fluoretação de águas destinadas ao consumo humano, o objetivo deste trabalho foi avaliar as concentrações de fluoreto das águas de abastecimento público e os processos de fluoretação de municípios da região de Marília e Assis – SP, no período de 2016 a 2020.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma pesquisa descritiva por meio de levantamento, compilação, tratamento dos dados e interpretações dos resultados das análises de rotina de fluoreto, referentes ao PROÁGUA. Os dados foram extraídos do sistema de gerenciamento de amostras laboratoriais (GAL) no período de 2016 a 2020. A determinação da concentração de fluoreto foi feita pelo método potenciométrico com eletrodo íon seletivo, analisando os resultados com base na Resolução SS 250 de 15 de agosto de 1995, considerando como resultados satisfatórios aqueles entre a faixa de concentração de 0,6 e 0,8 mg/L de F⁻ e insatisfatórios qualquer resultado fora dessa faixa, tanto inferior quanto superior.

A avaliação do processo de fluoretação tomou por base o critério estabelecido por Stancari, Dias Jr e Freddi (2014), com modificações e foram estabelecidos quatro perfis: satisfatório (S), para aqueles que obtiveram ao menos 4 vezes a porcentagem anual de 80% ou mais de amostras aprovadas, insatisfatório (I) para aqueles que obtiveram ao menos 4 vezes a porcentagem anual inferior a 80% ou mais de amostras condenadas, variável (V), para municípios que apresentaram variação de amostras aprovadas e condenadas e um quarto perfil foi estabelecido para aqueles municípios que apresentaram uma melhoria no desempenho (MD) da fluoretação das águas durante os anos analisados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises de flúor expressos em mg/L F^- das amostras de água provenientes dos 62 municípios das regiões de Marília e Assis – SP e a avaliação do processo de fluoretação, estão apresentados na Quadro 1.

Quadro 1 – Avaliação da concentração de fluoreto de amostras de água de abastecimento público e do processo de fluoretação de 62 municípios da região de Marília e Assis.

Município	GVs	concentração Fluoreto						Nº de amostras coletadas	Perfil do município
		< 0,6 mg/L	%	0,6 - 0,8 mg/L	%	> 0,8 mg/L	%		
Adamantina	XIX - Marília	2	1,65	119	98,35	0	0	121	S
Álvaro de Carvalho	XIX - Marília	1	2,13	42	89,36	4	8,51	47	S
Alvinlândia	XIX - Marília	10	19,61	37	72,55	4	7,84	51	V
Arco-Íris	XIX - Marília	3	5,56	51	94,44	0	0,00	54	S
Assis	XIII - Assis	0	0,00	227	96,19	9	3,81	236	S
Bastos	XIX - Marília	21	18,10	85	73,28	10	8,62	116	V
Bernard. Campos	XIII - Assis	13	14,13	71	77,17	8	8,70	92	V
Borá	XIII - Assis	3	6,12	42	85,71	4	8,16	49	S
Campos Novos Paulista	XIX - Marília	43	93,48	1	2,17	2	4,35	46	I
Cândido Mota	XIII - Assis	41	35,04	59	50,43	17	14,53	117	V
Canitar	XIII - Assis	15	23,08	42	64,62	8	12,31	65	V
Chavantes	XIII - Assis	42	38,18	48	43,64	20	18,18	110	V
Cruzália	XIII - Assis	0	0,00	52	96,30	2	3,70	54	S
Echaporã	XIX - Marília	3	5,36	52	92,86	1	1,79	56	S
Esp. Sto. Turvo	XIII - Assis	6	10,53	47	82,46	4	7,02	57	S
Fernão	XIX - Marília	4	7,41	43	79,63	7	12,96	54	S
Flórida Paulista	XIX - Marília	26	14,69	150	84,75	1	0,56	177	MD
Florinea	XIII - Assis	4	11,11	31	86,11	1	2,78	36	S
Gália	XIX - Marília	16	28,57	37	66,07	3	5,36	56	V
Garça	XIX - Marília	31	24,80	77	61,60	17	13,60	125	V
Guaimbê	XIX - Marília	37	56,92	27	41,54	1	1,54	65	V
Guarantã	XIX - Marília	39	75,00	8	15,38	5	9,62	52	V
Herculândia	XIX - Marília	188	70,94	64	24,15	13	4,91	265	V
Iacri	XIX - Marília	0	0,00	49	92,45	4	7,55	53	S
Ibirarema	XIII - Assis	79	74,53	26	24,53	1	0,94	106	I
Inúbia Paulista	XIX - Marília	4	7,14	52	92,86	0	0,00	56	S
Ipaussú	XIII - Assis	58	51,79	53	47,32	1	0,89	112	V
Júlio Mesquita	XIX - Marília	22	44,00	10	20,00	18	36,00	50	V
Lucélia	XIX - Marília	5	2,84	163	92,61	8	4,55	176	S
Lupércio	XIX - Marília	38	34,23	67	60,36	6	5,41	111	V
Lutécia	XIII - Assis	3	6,00	44	88,00	3	6,00	50	S
Maracá	XIII - Assis	17	14,41	100	84,75	1	0,85	118	V
Mariápolis	XIX - Marília	23	21,30	85	78,70	0	0,00	108	S
Marília	XIX - Marília	117	39,53	171	57,77	8	2,70	296	V
Ocaçu	XIX - Marília	70	64,81	25	23,15	13	12,04	108	V
Óleo	XIII - Assis	4	7,02	50	87,72	3	5,26	57	S
Oriente	XIX - Marília	5	8,62	43	74,14	10	17,24	58	V
Oscar Bressane	XIX - Marília	3	5,88	47	92,16	1	1,96	51	S
Osvaldo Cruz	XIX - Marília	40	22,60	136	76,84	1	0,56	177	V
Ourinhos	XIII - Assis	43	18,22	111	47,03	82	34,75	236	V
Pacaembu	XIX - Marília	112	51,14	92	42,01	15	6,85	219	V
Palmital	XIII - Assis	49	42,61	54	46,96	12	10,43	115	V
Paraguçu Pta.	XIII - Assis	1	1,02	95	96,94	2	2,04	98	S
Parapuã	XIX - Marília	3	2,83	99	93,40	4	3,77	106	S
Pedrinhas Pta.	XIII - Assis	2	3,39	57	96,61	0	0,00	59	S
Platina	XIII - Assis	15	27,78	38	70,37	1	1,85	54	V
Pompéia	XIX - Marília	22	18,97	45	38,79	49	42,24	116	V
Pracinha	XIX - Marília	7	12,96	47	87,04	0	0,00	54	S
Queiroz	XIX - Marília	1	1,89	52	98,11	0	0,00	53	S
Quintana	XIX - Marília	2	3,51	53	92,98	2	3,51	57	S
Ribeirão do Sul	XIII - Assis	11	17,46	43	68,25	9	14,29	63	V
Rinópolis	XIX - Marília	152	49,35	131	42,53	25	8,12	308	V
Sagres	XIX - Marília	9	8,26	94	86,24	6	5,50	109	S
Salmourão	XIX - Marília	7	12,28	48	84,21	2	3,51	57	MD
Salto Grande	XIII - Assis	46	39,66	33	28,45	37	31,90	116	V
São Pedro Turvo	XIII - Assis	46	60,53	14	18,42	16	21,05	76	I
Sta Cruz Rio Pardo	XIII - Assis	17	14,41	99	83,90	2	1,69	118	V
Tarumã	XIII - Assis	15	13,16	85	74,56	14	12,28	114	V
Timburi	XIII - Assis	7	13,21	46	86,79	0	0	53	V
Tupã	XIX - Marília	31	7,49	375	90,58	8	1,93	414	S
Ubirajara	XIX - Marília	3	7,14	39	92,86	0	0,00	42	S
Vera Cruz	XIX - Marília	35	30,17	77	66,38	4	3,45	116	V

S = satisfatório ; I = insatisfatório ; V = variável ; MD = melhoria de desempenho

Do total de 6.541 amostras, 4.360 (66,6%) estavam de acordo com a legislação, apresentando a concentração de flúor entre a faixa de 0,6 e 0,8 mg/L F⁻, 2.181 (33,4%) em desacordo, sendo que dessas, 1.672 (25,6%) estavam abaixo de 0,6 mg/L F⁻ e 509 (7,8%) acima de 0,8 mg/L F⁻.

O flúor presente na água destinada ao consumo humano pode ser tanto benéfico quanto maléfico à saúde. Muitas pesquisas têm comprovado o efeito benéfico da fluoretação das águas na prevenção da cárie dentária (FRAZÃO & NARVAI, 2017; SOUSA et al., 2018) desde que presente em concentrações adequadas, entretanto, teores excessivos de flúor têm sido observados e associados a fluorose dentária e esquelética (GUISSOUMA et al., 2017).

Quanto aos perfis em que 62 municípios foram classificados, 26 (41,9%) foram classificados como satisfatórios (S), 3 (4,8%) insatisfatórios (I) e 31 (50%) como variáveis, apenas 2 (3,2%) dos municípios mostraram uma melhoria no desempenho (MD) durante os anos da avaliação. Com base nessa análise, foram considerados adequados os perfis S e MD, porém a classificação de 50% dos municípios como variáveis comprova a dificuldade e a ineficácia desses municípios no processo de manutenção dos níveis de fluoretos.

CONCLUSÕES

A realização de análises para determinar as concentrações de fluoreto é de extrema importância e o monitoramento periódico permite avaliar a qualidade da água dos sistemas públicos de distribuição bem como seus processos de fluoretação. Este estudo identificou deficiências no processo de fluoretação e dos 62 municípios avaliados, 50% apresentaram um perfil variável, apontando a necessidade de medidas mais efetivas em relação a fiscalização para a adequação do processo de fluoretação, garantindo assim a presença do flúor em níveis desejáveis, promovendo a proteção contra a cárie dentária e evitando a ocorrência de fluorose.

REFERÊNCIAS

1. FRAZÃO, P.; NARVAI, P. C. Fluoretação da água em cidades brasileiras na primeira década do século XXI. **Revista de Saúde Pública**, v. 51. n. 47, 2017. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsp/a/KnfYsKXmYNNBFLgTQ5PFK4x/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em 5 de dezembro de 2021.
2. GEO BRASIL. Recursos hídricos: componente da série de relatórios sobre o estado e perspectivas do meio ambiente no Brasil. **Geo Brasil série temática**. Agência Nacional de Águas. Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, Brasília, DF. p. 264, 2007. Disponível em: < 34 http://www.cbcs.org.br/userfiles/download/6_GEO_Brasil.pdf >. Acesso em 30 de setembro de 2021.
3. BRASIL. Portaria GM/MS Nº 888 de 4 de maio de 2021. Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 de maio de 2021. Edição 85. Seção 1, p. 127. Disponível em: < <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-demaio-de-2021-318461562>>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.
4. LOPES, M. C. Comparação cinética de liberação de flúor em pastas fluoretadas. Universidade de Lisboa. **Faculdade de Medicina Dentária**, 2012 Disponível

em:<http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/26667/1/ulfmd07017_tm_Marta_Lopes.pdf>.
Acesso em 29 de novembro de 2021.

5. SÃO PAULO. **Resolução SS-250, de 15 de agosto de 1995**. Secretaria do Estado da Saúde. Disponível em: <<http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/95rcvs250.zip>>. Acesso em: 5 de dezembro de 2021.

6. DUARTE, M. E. Os fluoretos na água de consumo humano. **Administração Regional de Saúde de Lisboa e Vale do Tejo**. Setúbal, 2008. Disponível em: <<https://silo.tips/download/os-fluoretos-na-agua-de-consumo-humano>>. Acesso em: 07 de dezembro de 2021.

7. FERREIRA, R.; BENEDET, H. D. Comparação de métodos para determinação de flúor. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. Curitiba, v. 17, n. 1, p.53-58, 1999. Disponível em:<<https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/viewFile/13801/9298>>. Acesso em 07 de dezembro de 2021.

8. MAGALHÃES, H. I. C. Efeitos do Flúor na Saúde Humana. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2018. Disponível em :< https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/7327/1/PPG_29341.pdf>. Acesso em 2 de novembro de 2021.

9. SOUSA, E. T de et. al. A questão social da fluoretação das águas e a efetivação do direito à saúde. **Revista de Direito Sanitário**, v. 18, n. 3, p. 125-142, nov. 2017/fev. São Paulo, 2018. Disponível em: <http://www.mpsp.mp.br/portal/page/portal/documentacao_e_divulgacao/doc_bibliotec_a/bibli_servicos_produtos/bibli_informativo/bibli_inf_2006/Rev-DirSan_v.18_n.03.08.pdf>. Acesso em: 5 de dezembro de 2021.

10. GUISSOUMA, W. et al. Riskassessmentoffluorideexposure in drinkingwaterofTunisia. **Chemosphere**, p. 102 – 108, 2017. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4639019/mod_resource/content/1/Guissouma%20et%20al.pdf>. Acesso em 5 de dezembro de 2021.

IMPACTO DA COVID-19 NA DISSEMINAÇÃO DAS CARBAPENEMASES DO TIPO NDM

Déril Lopes Sugawara¹; Milena Polotto de Santi²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CLR – IAL – SJRP

E-mail: deril777@hotmail.com

²Docente/pesquisadora do Núcleo de Ciências Biomédicas – CLR – IAL – SJRP

Resumo: Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, especialmente as infecções causadas por bactérias multirresistentes (MDR). Com o surgimento do vírus SARS-CoV-2, houve um grande aumento de internações em unidades de terapia intensiva por pacientes infectados pelo novo coronavírus, com consequente uso intensivo de antimicrobianos nos mesmos, representando maior risco para a seleção e aumento da disseminação de bactérias MDR. Os carbapenêmicos são drogas beta-lactâmicas de amplo espectro muito utilizadas no tratamento de infecções graves causadas por bacilos Gram-negativos. Apesar do amplo espectro de ação destes antibióticos, tem sido frequente o isolamento de cepas produtoras de enzimas denominadas carbapenemases do tipo NDM, que confere resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos, inclusive os carbapenêmicos. O objetivo deste estudo foi investigar, por meio de levantamento bibliográfico de artigos científicos publicados até setembro de 2021, o impacto da COVID-19 na disseminação das carbapenemases do tipo NDM. Com o levantamento bibliográfico realizado, foi descrito a presença de cepas carreadoras de NDM em pacientes acometidos pela COVID-19 em vários países como a França e a Espanha; também foi relatado um aumento de detecções de bactérias MDR durante a pandemia. Além disso, dois estudos mostraram diminuição da disseminação de bactérias MDR devido à maior preocupação com o cumprimento de medidas de Prevenção e Controle de Infecção (PCI). A literatura científica sugere que a pandemia de COVID-19 pode ter tido um impacto negativo no aumento da resistência aos antimicrobianos e na disseminação de carbapenemases.

Palavras-chave: bactérias multirresistentes; carbapenemases; NDM; SARS-CoV-2

INTRODUÇÃO

Em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou pandemia de COVID-19, doença respiratória viral causada pelo novo coronavírus denominado SARS-CoV-2. Embora a maioria dos pacientes com COVID-19 apresentem sintomas leves, em uma minoria pode haver piora do quadro clínico com manifestações multissistêmicas, cursando com síndrome respiratória aguda com necessidade de longos períodos de internação em unidades de terapia intensiva (DAVID, 2021; SENOK *et al.*, 2021).

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, especialmente as infecções causadas por bactérias multirresistentes (MDR). O surgimento do vírus SARS-CoV-2, somado a utilização intensiva de antibióticos nestes pacientes, representam um risco para a seleção e aumento destas bactérias MDR (SENOK *et al.*, 2021).

Os carbapenêmicos são antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro e constituem uma das únicas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias multirresistentes, principalmente bacilos Gram-negativos. Entretanto, com a utilização intensiva e indiscriminada dos carbapenêmicos, houve emergência e disseminação de novos mecanismos de resistência, sendo a produção de enzimas denominadas carbapenemases do tipo KPC e NDM, um dos mecanismos de maior importância, pois as mesmas conferem resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos. A presença de cepas produtoras dessas enzimas diminui as opções de tratamento, aumentando o tempo de internação e causando grande impacto na saúde pública (CANTO'N *et al.*, 2020; MOJICA *et al.*, 2021; PERROTTA; PERRINI, 2021).

O objetivo deste estudo foi investigar, por meio de levantamento bibliográfico de artigos científicos, o impacto da COVID-19 na disseminação das carbapenemases do tipo NDM. A importância deste estudo está na pequena quantidade de publicações sobre infecções bacterianas MDR carreadoras de carbapenemases, especialmente NDM, durante a pandemia.

MATERIAL E MÉTODOS

A abordagem metodológica empregou como instrumento a pesquisa exploratória de caráter bibliográfico, de artigos publicados no período de março de 2020 a setembro de 2021, utilizando como base de dados PubMed, Google Acadêmico, LILACS e SciELO. Os unitermos selecionados para a pesquisa, associados ou não, foram: NDM, carbapenemases, carbapenem resistant, metallo-beta-lactamase, healthcare-associated infection, antibiotic resistance, antimicrobial resistance, multi-drug resistance, COVID-19, resistência bacteriana, SARS-CoV-2.

O processo de busca incluiu 46 artigos, portarias e demais investigações baseadas em evidências científicas e/ou de caráter investigativo epidemiológico/operacional.

Os critérios de exclusão foram: testes de eficácia de antimicrobianos e inibidores *in vitro*, pesquisas veterinárias, biobancos e/ou fora do período deste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos estudos relatam que um grande número de pacientes com COVID-19 foi acometido por infecções secundárias e as bactérias MDR estão entre os principais agentes (DUMITRU *et al.*, 2021; PASCALE *et al.*, 2021; PINTADO *et al.*, 2021; POLLY *et al.*, 2021).

Em um hospital de Nova York, foram detectados isolados produtores de NDM em cinco pacientes internados em UTI por COVID-19, submetidos a procedimentos invasivos, com uso de imunossupressores e exposição excessiva aos antibióticos. Este estudo foi um dos primeiros a relatar isolados produtores de NDM em pacientes com COVID-19 (NORI *et al.*, 2020).

Em um estudo conduzido por Farfour e colaboradores na França, em 2020, isolados de *Escherichia coli* produtora de NDM-5 foram encontrados em 12 leitos de UTI de pacientes com COVID-19. Já em outro estudo conduzido por Livia e colaboradores no Peru, em 2021, também com pacientes internados por COVID-19, foram detectados diversos isolados carreadores dos genes NDM e CTX-M, os quais até então nunca haviam sido identificados neste hospital peruano.

No Brasil, na cidade de Porto Alegre, em estudo realizado por Perez e colaboradores (2021), observou-se uma alta taxa de resistência por *Pseudomonas*

aeruginosa produtora de NDM-1 durante a pandemia de COVID-19 (PEREZ; CARNIEL; NARVAEZ, 2021).

Na Itália, um estudo epidemiológico realizado com pacientes internados por COVID-19, foi evidenciado que esses pacientes apresentavam um risco aumentado de adquirir cepas produtoras de NDM (PORRETTA *et al*, 2020).

Em um estudo retrospectivo realizado na Espanha, foi observado um grande aumento nas infecções por bactérias produtoras de carbapenemases ao longo dos anos, principalmente durante 2020, coincidindo com a pandemia de COVID-19. As carbapenemases mais frequentemente encontradas foram OXA, VIM, KPC e principalmente NDM (CANO-MARTÍN *et al*, 2021).

O'Toole em uma revisão da literatura, Austrália, 2021, observou um aumento da incidência de enterobactérias produtoras de NDM e de *A. Baumannii* produtora de carbapenemase ao se comparar os períodos pré e pós-pandemia de COVID-19. O aumento no tempo de hospitalização foi apontado como um fator de risco para a aquisição da coinfeção.

Apesar da maioria das pesquisas do presente estudo indicar um crescimento no número de isolados com cepas multirresistentes, alguns estudos indicaram baixa incidência de cepas multirresistentes.

No estudo de Senok e colaboradores, em 2021, foi encontrada baixa ocorrência de coinfeções em pacientes com COVID-19, mesmo com predomínio de bactérias Gram-negativas. Segundo os autores, uma possível explicação para esses achados é devido aos programas de controle antimicrobiano implantados neste hospital, localizado em Umm al-Quwain, Emirados Árabes Unidos.

No estudo retrospectivo de Chamieh e colaboradores, foi relatado o perfil de resistência antimicrobiana em hemoculturas, em um hospital de Beirut, Líbano, no período de janeiro de 2015 a dezembro de 2020. Curiosamente, houve um decréscimo de 16% nas bacteremias no período da pandemia. Eles atribuem esse decréscimo ao uso racional de antimicrobianos e da prevenção e controle das infecções (CHAMIEH *et al*, 2021).

A diminuição da disseminação de bactérias MDR tem sido atribuída a alguns fatores, dentre eles o isolamento dos pacientes com COVID-19, o aumento da assepsia das mãos e da desinfecção ambiental, a construção de novas instalações exclusivas para pacientes com COVID-19 não colonizados com bactérias multirresistentes, o distanciamento físico e o uso de máscaras que diminuiriam o contato entre os profissionais e os pacientes. Além disso, também se observou que os hospitais mais preparados para a pandemia e com mais recursos foram menos impactados com a sobrecarga (MONNET; HARBARTH, 2020).

O impacto da pandemia sobre a disseminação de microrganismos MDR é variável de acordo com Clancy, Buehrle e Nguyen (2020) e deve ser analisado conforme o hospital e a região geográfica. Monnet e Harbarth (2020) em sua revisão da literatura também observaram uma variação sobre o impacto da pandemia na propagação de MDR. Realizaram a comparação de quais fatores poderiam ter contribuído para o aumento ou para a diminuição das IRAS. Segundo os pesquisadores, alguns fatores favoráveis ao aumento foram a terapia preventiva com antibióticos de amplo espectro, a hospitalização prolongada, lotação das UTIs, escassez de profissionais treinados, uso da mesma luva em pacientes diferentes, entre outros. Já os fatores que podem ter contribuído para a diminuição foram o aumento da higienização das mãos e do uso de EPIs, melhorias na desinfecção ambiental, construção de instalações exclusivas para COVID-19, dentre outros.

CONCLUSÕES

Com o levantamento bibliográfico realizado, foi descrito a presença de cepas carreadoras de NDM em pacientes acometidos pela COVID-19 em vários países, assim como também um aumento de isolados de bactérias MDR durante a pandemia. A literatura científica sugere que a pandemia de COVID-19 pode ter tido um impacto negativo no aumento da resistência aos antimicrobianos e na disseminação de carbapenemases.

Cabe ressaltar também que dois estudos mostraram diminuição da disseminação de bactérias MDR devido à maior preocupação com o cumprimento de medidas de Prevenção e Controle de Infecção (PCI), fundamentais para garantir a segurança dos pacientes hospitalizados, pois a maioria das medidas de PCI essenciais para controlar a disseminação do SARS-CoV-2, também contribuiu para reduzir a disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

AMARSY, Rishma *et al.* Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit during the COVID-19 pandemic: another nightmare. **American J of Infection Control**, [s. l.], v. 49, n. 10, p. 1324-1326, 14 jul. 2021. DOI

<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2021.07.004>. Disponível em:

<[https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(21\)00465-X/fulltext#relatedArticles](https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(21)00465-X/fulltext#relatedArticles)>.

Acesso em: 22 set. 2021.

ARTEAGA-LIVIAS, Kovy *et al.* A multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a Peruvian hospital: another threat from the COVID-19 pandemic. **Infect Control Hosp Epidemiol**, Cambridge, p. 1-2, 5 jan. 2021. DOI <https://doi.org/10.1017/ice.2020.1401>.

Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/infection-control-and-hospital-epidemiology/article/multidrug-resistant-klebsiella-pneumoniae-outbreak-in-a-peruvian-hospital-another-threat-from-the-covid19-pandemic/2D221984A2D129FFAB5262296779E0F7>>.

Acesso em: 13 out. 2021.

CANO-MARTÍN, Estefanía *et al.* A study in a regional hospital of a mid-sized Spanish city indicates a major increase in infection/colonization by carbapenem-resistant bacteria, coinciding with the COVID-19 pandemic. **Antibiotics**, [s. l.], v. 10, n. 9: 1127, p. 1-14, 18 set. 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091127>. Disponível em:

<<https://www.mdpi.com/2079-6382/10/9/1127#cite>>. Acesso em: 1 out. 2021.

CANTO'N, Rafael; GIJÓN, Desirée; RUIZ-GARBAJOSA, Patricia. Antimicrobial resistance in ICUs: an update in the light of the COVID-19 pandemic. **Curr Opin Crit Care**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 433-441, 2020. DOI doi.org/10.1097/MCC.0000000000000755.

Disponível em: <https://journals.lww.com/criticalcare/Fulltext/2020/10000/Antimicrobial_resistance_in_ICUs__an_update_in_the.2.aspx>. Acesso em: 23 ago. 2021.

CHAMIEH, Amanda *et al.* Trends of multidrug-resistant pathogens, difficult to treat bloodstream infections, and antimicrobial consumption at a tertiary care center in Lebanon from 2015–2020: COVID-19 aftermath. **Antibiotics**, [s. l.], v. 10, n. 8: 1016, p. 1-10, 21

ago. 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/antibiotics10081016>. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/10/8/1016>>. Acesso em: 6 set. 2021.

CLANCY, Cornelius J.; BUEHRLE, Deanna J.; NGUYEN, M. Hong. PRO: The COVID-19 pandemic will result in increased antimicrobial resistance rates. **JAC-Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 1-3, 17 jul. 2020. DOI <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaa049>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jacamr/article/2/3/dlaa049/5872561>. Acesso em: 4 out. 2021.

DAVID, Maria Tereza Santos da Silva. O impacto do uso indiscriminado de antibióticos na pandemia do COVID-19. In: DUARTE, Ana Estela Brandão *et al.* **Pandemia: caminhos para aprendizagem**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2021. cap. 11, p. 165-174. ISBN 978-65-5869-403-8.

DUMITRU, Irina Magdalena *et al.* Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* associated with COVID-19. **Antibiotics**, [s. l.], v. 10, n. 5: 561, 11 maio 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050561>. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/10/5/561>>. Acesso em: 24 ago. 2021.

FARFOUR, Eric *et al.* Carbapenemase-producing Enterobacterales outbreak: another dark side of COVID-19. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 48, n. 12, p. 1533-1536, 1 out. 2020. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.09.015>. Disponível em: <[https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(20\)30895-6/fulltext](https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(20)30895-6/fulltext)>. Acesso em: 1 set. 2021.

MOJICA, Maria F. *et al.* The urgent need for metallo- β -lactamase inhibitors: an unattended global threat. **Lancet Infect Dis**, [s. l.], p. 1-7, 8 jul. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34246322/>>. Acesso em: 4 out. 2021.

MONNET, Dominique L; HARBARTH, Stephan. Will coronavirus disease (COVID-19) have an impact on antimicrobial resistance?. **Eurosurveillance**, [s. l.], v. 25, n. 45, p. 1-6, 12 nov. 2020. DOI <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.45.2001886>. Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.45.2001886>>. Acesso em: 4 out. 2021.

NORI, Priya *et al.* Emerging co-Pathogens: New Delhi Metallo-beta-lactamase producing Enterobacterales infections in New York City COVID-19 patients. **Int J Antimicrob Agents**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 1-3, dez. 2020b. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106179>. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092485792030385X?via%3Dihub>>. Acesso em: 16 set. 2021.

O'TOOLE, Ronan F. The interface between COVID-19 and bacterial healthcare-associated infections. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], p. 1-5, 6 jun. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.06.001>. Disponível em: <[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(21\)00297-4/fulltext#relatedArticles](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(21)00297-4/fulltext#relatedArticles)>. Acesso em: 28 set. 2021.

PASCALE, Renato *et al.* Carbapenem-resistant bacteria in an intensive care unit during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: a multicenter before-and-after cross-

sectional study. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s. l.], p. 1-6, 16 abr. 2021. DOI <https://doi.org/10.1017/ice.2021.144>. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/infection-control-and-hospital-epidemiology/article/carbapenem-resistant-bacteria-in-an-intensive-care-unit-during-the-coronavirus-disease-2019-covid19-pandemic-a-multicenter-before-and-after-cross-sectional-study/8D84D64731D545E3B6D91DC62ABD468B>>. Acesso em: 1 set. 2021.

PEREZ, Leandro Reus Rodrigues; CARNIEL, Eliana Carniel; NARVAEZ, Gabriel Azambuja. Emergence of NDM-producing *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients and impact on antimicrobial therapy during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. **Infect Control Hosp Epidemiol**, [s. l.], p. 1-3, 28 jun. 2021. DOI <https://doi.org/10.1017/ice.2021.253>. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/infection-control-and-hospital-epidemiology/article/emergence-of-ndm-producing-pseudomonas-aeruginosa-among-hospitalized-patients-and-impact-on-antimicrobial-therapy-during-the-coronavirus-disease-2019-covid19-pandemic/82003830FE5D77F5E87D562E234ACE0D>>. Acesso em: 2 set. 2021.

PERROTTA, Francesco; PERRINI, Marco Paolo. Successful treatment of Klebsiella pneumoniae NDM sepsis and intestinal decolonization with Ceftazidime/Avibactam plus Aztreonam combination in a patient with TTP complicated by SARS-CoV-2 nosocomial infection. **Medicina**, [s. l.], v. 57, n. 5: 424, p. 1-7, 28 abr. 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/medicina57050424>. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1648-9144/57/5/424>>. Acesso em: 27 set. 2021.

PINTADO, Vicente *et al.* Carbapenemase-producing Enterobacterales infections in COVID-19 patients. **Infectious Diseases**, London, p. 1-10, 12 ago. 2021. DOI <https://doi.org/10.1080/23744235.2021.1963471>. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23744235.2021.1963471?scroll=top&needAccess=true>>. Acesso em: 13 set. 2021.

POLLY, Matheus *et al.* Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-resistant bacterial infections in an acute care hospital in Brazil. **American J of Infection Control**, [s. l.], p. 1-7, 22 set. 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2021.09.018>. Disponível em: <[https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(21\)00618-0/fulltext](https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(21)00618-0/fulltext)>. Acesso em: 29 set. 2021.

PORRETTA, Andrea Davide *et al.* Increased risk of acquisition of New Delhi Metallo-beta-lactamase-producing carbapenem-resistant Enterobacterales (NDM-CRE) among a cohort of COVID-19 patients in a teaching hospital in Tuscany, Italy. **Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 8: 635, p. 1-4, 5 ago. 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/pathogens9080635>. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/9/8/635>>. Acesso em: 21 set. 2021.

SENOK, Abiola *et al.* Coinfections in patients hospitalized with COVID-19: a descriptive study from the United Arab Emirates. **Infect Drug Resist**, Dubai, v. 14, p. 2289-2296, 21 jun. 2021. DOI <https://doi.org/10.2147/IDR.S314029>. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/coinfections-in-patients-hospitalized-with-covid-19-a-descriptive-stud-peer-reviewed-fulltext-article-IDR>>. Acesso em: 20 ago. 2021.

AVALIAÇÃO DOS PERFIS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS EM ESPÉCIES DE LEVEDURAS INCOMUNS IDENTIFICADAS EM LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA EM MICOLOGIA MÉDICA

Gustavo de Castro Luiz¹; Gabriel Manzi Oliboni²; Mirian Rando Araujo³; Lucas Xavier Bonfietti⁴;

¹Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública em andamento - Núcleo de Micologia – Instituto Adolfo Lutz; E-mail: gustavo_castro2008@hotmail.com

² Mestrando - Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD - Núcleo de Micologia – Instituto Adolfo Lutz

³Biologista - Núcleo de Micologia – Instituto Adolfo Lutz.

⁴Docente/Pesquisador Científico - Núcleo de Micologia – Instituto Adolfo Lutz

Resumo: Nas últimas décadas os fungos microscópicos emergiram como patógenos primários e com a introdução de novas classes de antifúngicos, adoção de medidas profiláticas tem provocado uma mudança nos perfis de espécies de leveduras que causam infecções em seres humanos. Essas novas espécies de leveduras consideradas emergentes e reemergentes estão sendo cada vez mais comuns. O objetivo deste trabalho foi descrever os perfis de suscetibilidade aos principais antifúngicos utilizados na prática clínica em espécies de leveduras menos comuns/emergentes diagnosticadas no Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz entre o período de novembro de 2020 a agosto de 2021. A identificação das espécies foi feita utilizando método de proteômica MALDI-TOF-MS e realizado o teste de sensibilidade antifúngica em microdiluição em caldo com fluconazol, micafungina, voriconazol, anidulafungina e anfotericina B por método de referencia AFST EUCAST 7.3.2. Ao todo foram selecionadas 35 amostras, totalizando 17 espécies diferentes do gênero *Candida*, *Trichosporon*, *Wickerhamomyces*, *Saccharomyces* e *Rhodotorula* e outros. A maioria dos isolados mostrou ser suscetível aos antifúngicos testados. Contudo, três isolados do complexo *Candida haemulonii* apresentou resistência ao voriconazol, fluconazol e anfotericina B. Os 3 isolados do gênero *Rhodotorula* apresentaram resistência cruzada ao fluconazol e voriconazol. A incidência das infecções fúngicas tem aumentado nos últimos anos, por isso existe a necessidade da utilização de metodologias que permitam uma identificação rápida e precisa tanto das espécies quando dos perfis de sensibilidade antifúngica com finalidade de auxiliar no tratamento e manejo dessas infecções.

Palavras-chave: Identificação; Perfis de sensibilidade antifúngica; Infecções fúngicas

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas os fungos emergiram como patógenos primários e/ou oportunistas e se estabeleceram como causadores de infecções de alta morbidade, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. 2006). A partir da década de 1980, uma maior atenção tem sido dada ao diagnóstico de infecções ocasionadas por fungos devido ao surgimento de fatores de risco como as consequências ocasionadas pelo desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), maior tempo de internação de pacientes e até mesmo o aumento do uso de procedimentos invasivos (ELLIS, D. *et al.* 2000).

Apesar de poucas classes de antifúngicos disponíveis, os mais utilizados nos tratamentos de infecções fúngicas invasivas são triazóis, equinocandinas e poliênicos que possuem diferentes espectros de ação. Porém, acredita-se que o uso prolongado e indiscriminado destes fármacos para profilaxia e tratamento empírico induz a resistência a antifúngicos ocasionando falha terapêutica, além de possível seleção de espécies emergentes e reemergentes potencialmente resistentes aos antifúngicos utilizados no tratamento clínico (COLOMBO, A. L.; JÚNIOR, J. N.; GUINEA, J. 2017; TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. 2015).

A vigilância da resistência dos isolados de levedura é essencial para definir tendências, fornecer informações necessárias para estudos epidemiológicos e laboratoriais com finalidade de auxiliar o tratamento e o manejo dessas infecções que apresentam alta mortalidade (ELLIS, D. *et al.* 2000).

Desse modo, esse trabalho buscou descrever os perfis de suscetibilidade aos principais antifúngicos utilizados na prática clínica em espécies de leveduras menos comuns diagnosticadas no Núcleo de Micologia (NM) do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 35 isolados de espécies de leveduras menos comuns na rotina laboratorial, excluindo o complexo *C. albicans*, complexo *C. parapsilosis*, complexo *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Esses agentes foram identificados no laboratório do NM no período de novembro de 2020 a agosto de 2021, oriundos de hospitais do estado de São Paulo, provenientes de diversos materiais biológicos humanos: urina, sangue, líquido cefalorraquidiano, lavado broncoalveolar, secreção brônquica, secreção traqueal, escarro, abscesso e biópsia.

As amostras foram recuperadas da micoteca do NM e repicadas em ágar Sabouraud com cloranfenicol, incubadas a 30°C no período de 24 a 72 horas, para garantir a viabilidade das leveduras. Após o repique inicial as amostras foram plaqueadas em ágar cromogênico, para garantir que não houve contaminação nem mistura entre mais de um microrganismo.

Por fim, foi realizado o repique das amostras em ágar Sabouraud com cloranfenicol para a identificação pela técnica do MALDI-TOF-MS (Bruker, Massachusetts, EUA) e no ágar Sabouraud sem cloranfenicol para realização do Teste de Sensibilidade aos antifúngicos.

Para realização do método MALDI TOF MS que consiste na análise proteômica por Espectrometria de Massa e Tempo de Voo, a cultura do isolado fúngico deve ser recente, sido realizada 24 horas antes. Com a utilização de uma alça descartável, uma pequena porção da colônia foi colocada no orifício (spot) da placa de platina específica para o equipamento MALDI-TOF MS, no caso, Bruker Daltonics Microflex. Em seguida, a

extração proteica foi realizada com duas aplicações de aplicado 1 µL de ácido fórmico a 70% com o intervalo de 15 minutos de secagem entre elas. Após a secagem foi adicionado 1 µL de matriz HCCA (*α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid*), após a secagem da matriz, a placa foi levada para o equipamento para a realização da análise. O equipamento atribui uma pontuação (*score*) que varia de 0.000 até 3.000. Sendo de 0.000 a 1.699 sem identificação possível; de 1.700 a 1.999 identificação de gênero; de 2.000 a 2.299 uma identificação confiável do gênero e uma possível identificação de espécie; de 2.300 a 3.000 altamente provável identificação de espécie (PASTERNAK, J. 2012).

O preparo das placas de antifúngicos seguiu os procedimentos prescritos pelo documento E.DEF 7.3.2, 2020 – Teste de Microdiluição em caldo para leveduras do Comitê Europeu – EUCAST (ARENDRUP, M. C. *et al.* 2020). Sendo utilizados os seguintes antifúngicos: fluconazol, voriconazol, micafungina, anidulafungina e anfotericina B.

Para a realização dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos (TSA), foi realizado um repique recente das amostras (24 horas). Em cada placa é possível testar oito amostras, porém as últimas duas fileiras da placa foram adicionadas as cepas padrão *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) como controle de qualidade e para validação do método. Durante o processo as placas de anfotericina B são protegidas da luz devido à fotossensibilidade deste antifúngico. Assim, as placas contendo os antifúngicos foram retiradas do congelador -70 para realização do TSA.

Em um reservatório estéril para soluções em “v” foi adicionado o meio RPMI 1640 e com a utilização da pipeta multicanal foi pipetado 200µl na primeira coluna e 100µl na décima segunda coluna de todas as placas.

Em um tubo de ensaio contendo 5ml de solução salina foi realizada uma suspensão fúngica na escala 0,5 de Mcfarland, condizente com 1×10^6 UFC/mL (unidade formadora de colônia). Em um segundo tubo, contendo 9 mL de RPMI 1640, foi adicionado 1 ml deste inóculo, totalizando 10 mL.

A solução foi colocada em um novo recipiente estéril em “v”, sendo um para cada amostra, e com a pipeta multicanal, foi adicionado 100µl do inóculo nos poços de 2 a 12, sendo uma linha para cada amostra. Ao fim do processo as placas foram levadas para a estufa a 30°C e mantidas por até 24 horas até ser realizada a leitura e determinação da concentração inibitória mínima (MIC - *minimum inhibitory concentration*).

Desse modo, devido à ausência de pontos de corte clínicos (*breakpoints*) para as cepas utilizadas nesse trabalho, foram utilizados pontos de corte epidemiológicos (ECOF) para analisar os resultados de TSA, sendo determinado isolados selvagens que apresentam valores abaixo ou igual o ECOF e não-selvagens, que apresentam valores acima do ECOF, (RODRIGUES, D. K. B. *et al.* 2021). As interpretações segundo espécies e antifúngicos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Pontos de cortes epidemiológicos disponíveis utilizados para classificação das espécies em selvagens e não-selvagens.

Agente	FCZ	MCF	VRZ	AND	AMB
<i>Candida guilliermondii</i> *	16 mg/L	2 mg/L	0,5 mg/L	4 mg/L	2 mg/L
<i>Candida dubliniensis</i> *	1 mg/L	0,12 mg/L	0,01 mg/L	0,12 mg/L	2 mg/L
<i>Candida lusitanae</i> *	4 mg/L	0,5 mg/L	0,03 mg/L	2 mg/L	2 mg/L
<i>Candida guilliermondii</i> **	8 mg/L	-	0,25 mg/L	-	2 mg/L
<i>Candida dubliniensis</i> **	0,5 mg/L	0,12 mg/L	0,03 mg/L	0,12 mg/L	2 mg/L
<i>Candida kefyr</i> **	1 mg/L	0,12 mg/L	0,015 mg/L	0,25 mg/L	-

FCZ, fluconazol; MCF, micafungina; VCZ, voriconazol; AND, anidulafungina; AMB, anfotericina B

*LI, M. C. *et al* 2021; ** PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. 2012

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 35 amostras recuperadas, foram confirmadas 17 diferentes espécies de leveduras, das quais, o gênero *Candida* foi o mais comum, representando 60% (21/35) das amostras. Outros agentes como *Trichosporon*, *Wickerhamomyces*, *Saccharomyces* e *Rhodotorula*, aparecem em menor quantidade. A Tabela 02 apresenta os resultados das concentrações inibitórias mínimas (MIC) dos antifúngicos e a identificação proteômica em dois testes no MALDI-TOF MS para garantir um resultado mais seguro.

Tabela 2 - Resultado do Teste de Sensibilidade Antifúngica (TSA) utilizando fluconazol, micafungina, voriconazol, anidulafungina, anfotericina B.

Nº	Identificação	FCZ	MCF	VRZ	AND	AMB
01	<i>Kodamaea ohmeri</i>	8 mg/L	0,25 mg/L	0,03 mg/L	0,5 mg/L	1 mg/L
02	<i>Candida duobushaemulonii</i>	64 mg/L	0,12 mg/L	0,015 mg/L	0,5 mg/L	4 mg/L
03	<i>Candida guilliermondii</i>	32 mg/L	1 mg/L	4 mg/L	1 mg/L	1 mg/L
04	<i>Candida guilliermondii</i>	2 mg/L	0,25 mg/L	0,015 mg/L	0,25 mg/L	1 mg/L
05	<i>Geotrichum capitatum</i>	1 mg/L	0,25 mg/L	0,06 mg/L	1 mg/L	2 mg/L
06	<i>Candida norvegensis</i>	2 mg/L	0,12 mg/L	0,12 mg/L	0,12 mg/L	2 mg/L
07	<i>Trichosporon asahii</i>	4 mg/L	>8 mg/L	0,03 mg/L	>8 mg/L	2 mg/L
08	<i>Rhodotorula spp</i>	>64 mg/L	>8 mg/L	2 mg/L	>8 mg/L	1 mg/L
09	<i>Candida kefyr</i>	0,5 mg/L	0,03 mg/L	0,015 mg/L	0,06 mg/L	0,25 mg/L
10	<i>Candida kefyr</i>	0,5 mg/L	0,12 mg/L	0,015 mg/L	0,12 mg/L	2 mg/L
11	<i>Candida kefyr</i>	0,5 mg/L	0,25 mg/L	0,015 mg/L	0,25 mg/L	1 mg/L
12	<i>Candida lusitaniae</i>	1 mg/L	0,25 mg/L	0,015 mg/L	0,5 mg/L	1 mg/L
13	<i>Candida lipolytica</i>	0,5 mg/L	0,06 mg/L	0,015 mg/L	0,06 mg/L	2 mg/L
14	<i>Candida lusitaniae</i>	0,5 mg/L	0,12 mg/L	0,03 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L
15	<i>Geotrichum capitatum</i>	2 mg/L	1 mg/L	0,25 mg/L	2 mg/L	2 mg/L
16	<i>Candida dubliniensis</i>	0,25 mg/L	0,06 mg/L	>8 mg/L	0,25 mg/L	0,5 mg/L
17	<i>Candida lusitaniae</i>	0,25 mg/L	0,25 mg/L	0,03 mg/L	0,25 mg/L	1 mg/L
18	<i>Candida lusitaniae</i>	0,5 mg/L	0,25 mg/L	0,06 mg/L	0,12 mg/L	1 mg/L
19	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,25 mg/L	0,25 mg/L	0,12 mg/L	0,5 mg/L	2 mg/L
20	<i>Candida guilliermondii</i>	2 mg/L	1 mg/L	0,06 mg/L	4 mg/L	1 mg/L
21	<i>Trichosporon asahii</i>	2 mg/L	>8 mg/L	0,06 mg/L	8 mg/L	2 mg/L
22	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	64 mg/L	0,06 mg/L	4 mg/L	0,03 mg/L	1 mg/L
23	<i>Trichosporon japonicum</i>	2 mg/L	>8 mg/L	0,06 mg/L	8 mg/L	>8 mg/L
24	<i>Candida dubliniensis</i>	0,25 mg/L	0,03 mg/L	0,12 mg/L	0,25 mg/L	0,5 mg/L
25	<i>Trichosporon asahii</i>	4 mg/L	>8 mg/L	0,06 mg/L	4 mg/L	1 mg/L
26	<i>Candida Kefyr</i>	0,25 mg/L	0,12 mg/L	0,03 mg/L	0,25 mg/L	1 mg/L
27	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	>64 mg/L	>8 mg/L	1 mg/L	>8 mg/L	0,5 mg/L
28	<i>Candida duobushaemulonii</i>	2 mg/L	0,12 mg/L	2 mg/L	0,25 mg/L	8 mg/L
29	<i>Candida intermedia</i>	1 mg/L	0,12 mg/L	>8 mg/L	0,12 mg/L	0,5 mg/L
30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,5 mg/L	0,25 mg/L	0,06 mg/L	0,25 mg/L	2 mg/L

31	<i>Candida kefyr</i>	0,25 mg/L	0,12 mg/L	0,03 mg/L	0,25 mg/L	2 mg/L
32	<i>Candida norvegensis</i>	8 mg/L	0,12 mg/L	0,12 mg/L	0,25 mg/L	1 mg/L
33	<i>Wickerhamomyces anomalous</i>	2 mg/L	0,03 mg/L	0,12 mg/L	0,03 mg/L	1 mg/L
34	<i>Candida haemulonii</i>	>64 mg/L	0,06 mg/L	8 mg/L	0,25 mg/L	2 mg/L
35	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	>64 mg/L	>8 mg/L	1 mg/L	>8 mg/L	0,5 mg/L

FCZ, fluconazol; MCF, micafungina; VCZ, voriconazol; AND, anidulafungina; AMB, anfotericina B

É válido ressaltar que na ausência de estudos de farmacocinética e farmacodinâmica para caracterizar as cepas em sensíveis e resistentes a partir de pontos de cortes clínicos pode ser utilizado pontos de cortes epidemiológicos que permitem categorizar as cepas em selvagens e não-selvagens. Cepas consideradas selvagens são aquelas que provavelmente não possuem nenhum mecanismo de resistência ativado (ESPINEL-INGROFF, A; TURNIDGE, J. 2016).

Apenas um isolado de *Candida guilliermondii* (33,3%)(amostra 3) foi classificado como não-selvagem, por apresentar MICs de 32mg/L para fluconazol e 4mg/L voriconazol (LI, M. C. *et al* 2021). Os quatro isolados de *Candida lusitanae* foram consideradas cepas selvagens, apresentando baixos MICs para os 5 antifúngicos, dados semelhantes a outros estudos sobre esse agente . Os dois isolados de *Candida dubliniensis* apresentaram MICs baixos para anidulafungina (ambos com 0,25mg/L), sendo que um deles (amostra 16) apresentou MIC elevado para o antifúngico voriconazol (>8mg/L) (PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. 2012; LI, M. C. *et al* 2021).

Os cinco isolados de *Candida kefyr* foram considerados selvagens, apresentando valores de MICs abaixo do ECOF, dados similares foram observados por outros autores. (PFALLER *et. al.*, 2012;).

Apesar de não possuírem publicações sobre pontos de cortes clínicos e nem pontos de corte epidemiológicos do complexo *Candida haemulonii*, os MICs foram considerados altos quando comparados com outras espécies *Candida*. Contudo, já é conhecido que as espécie do complexo *Candida haemulonii* possuem resistência a um grande número antifúngicos utilizados na prática clínica (COLOMBO, A. L.; JÚNIOR, J. N.; GUINEA, J, 2017; BEN-AMI, R. *et al* 2017; KHAN, Z. U. *et al.* 2007). Dois isolados de *Candida duobushaemulonii* apresentaram menor sensibilidade para os antifúngicos voriconazol, fluconazol e anfotericina B. Sendo que um deles apresentou alto valor de MIC para fluconazol (64 mg/L) e anfotericina B (4 mg/L) e o outro para voriconazol (2 mg/L) e anfotericina B (8 mg/L).

O isolado de *Candida haemulonii stricto sensu* se destacou por apresentar multirresistência - resistência a mais de uma classe de antifúngicos - e resistência cruzada - resistência a mais de um antifúngico da mesma classe -, esse isolado apresentou MICs altos para fluconazol, maior que 64 mg/L; voriconazol, 8 mg/L e anfotericina B, 2 mg/L.

Outros autores têm demonstrado a importância dessas espécies devido ao aumento de casos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e também pelos altos índices de resistência clínica e *in vitro* aos principais antifúngicos utilizados para o tratamento. (RODRIGUES, D. K. B. *et al.* 2021; LI, M. C. *et al.* 2021; COLOMBO, A. L.; JÚNIOR, J. N.; GUINEA, J, 2017; BEN-AMI, R. *et al.* 2017)

O gênero *Rhodotorula* foi o que apresentou maior resistência aos antifúngicos da classe dos triazóis analisados voriconazol e fluconazol confirmando resultados descritos em outros trabalhos ao redor do mundo. (GHARAGHANI, M.; TAGHIPOUR, S.; ZAREI MAHMOUDABADI, 2020; MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A., 2011; FERA, M. T.; LA CAMERA, E.; DE SARRO. 2009).

CONCLUSÕES

O método de proteômica MALDI TOF MS apresentou resultados rápidos e acurados e foi capaz de identificar espécies raras, demonstrando ser ferramenta importante no laboratório de micologia médica.

Foram identificadas cepas apresentando resistência cruzada e multirresistência dentre as amostras estudadas, chamando a atenção para a realização da metodologia de referência de microdiluição em caldo para identificar cepas com potencial de resistência aos antifúngicos utilizados na clínica.

O diagnóstico de espécies emergentes, bem como a vigilância dos perfis de resistência desses agentes pode auxiliar o tratamento e manejo dessas infecções que apresentam altas taxas de mortalidade.

REFERÊNCIAS

- ARENDRUP, M. C.; MELETIADIS, J.; MOUNTON, J. W.; 528 LAGROU, K.; HAMAL, P.; GUINEA J, *et al.* (2020). **EUCAST Definitive Document E.DEF 7.3.2.**: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. Basel: EUCAST.<http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST>.
- BEN-AMI, R. *et al.* Multidrug-resistant candida haemulonii and C. Auris, tel aviv, Israel. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 2, p. 195, 2017.
- COLOMBO, A. L.; JÚNIOR, J. N.; GUINEA, J. Emerging multidrug-resistant Candida species. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 6, p. 528-538, 2017.
- ELLIS, D. *et al.* Epidemiology: surveillance of fungal infections. **Medical Mycology**, v. 38, n. sup1, p. 173-182, 2000.
- ENOCH, D. A.; LUDLAM, H. A.; BROWN, N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **Journal of medical microbiology**, v. 55, p. 809-818, 2006.
- ESPINEL-INGROFF, A.; TURNIDGE, J.. The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s.l.], v. 33, n. 2, p. 63-75, abr. 2016.
- FERA, M. T.; LA CAMERA, E.; DE SARRO, A. New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. **Expert Review of anti-infective therapy**, v. 7, n. 8, p. 981-998, 2009.
- GHARAGHANI, M.; TAGHIPOUR, S.; ZAREI MAHMOUDABADI, A. Molecular identification, biofilm formation and antifungal susceptibility of Rhodotorula spp. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 11, p. 8903-8909, 2020.
- KHAN, Z. U. *et al.* Outbreak of fungemia among neonates caused by Candida haemulonii resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 2025-2027, 2007.
- LI, M. C. *et al.* Species identification and antifungal susceptibility of uncommon blood yeast isolates. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2021.
- MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet infectious diseases**, v. 11, n. 2, p. 142-151, 2011.
- MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia Médica**. 8 ed. Rio De Janeiro: Editora Elsevier Ltda, 2017.
- PASTERNAK, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. **Einstein (São Paulo)**, v. 10, p. 118-119, 2012.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Progress in antifungal susceptibility testing of Candida spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, p. 2846-2856, 2012.
- RODRIGUES, D. K. B. *et al.* Antifungal susceptibility profile of Candida clinical isolates from 22 hospitals of São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, 2021.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

RASTREIO CITOPATOLÓGICO NO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 2016 E 2021: BASE DE DADOS DATASUS

Thainá Siqueira de Carvalho¹; Daniela Etlinger-Colonelli²; Sandra Lorente²

¹Biomédica e estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – NAP – IAL; E-mail: thaina.c193@gmail.com

²Docente/pesquisador do Depto. de Anatomia Patológica – NAP – IAL.

O câncer do colo do útero ainda permanece como uma importante causa de morte na população feminina. No Brasil, o exame de Papanicolaou deve ser realizado em mulheres na faixa dos 25 a 64 anos como teste de rastreamento. Durante a pandemia de COVID-19, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) recomendou o adiamento dos serviços de rastreio. O objetivo deste estudo foi descrever os dados de rastreio citopatológico entre 2016 e 2021 disponibilizados pelo departamento de informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS). O total de exames citopatológicos disponibilizados em 2016, 2017, 2018, 2019, 2020 e 2021 foi respectivamente: 5.507.311; 6.358.074; 6.862.217; 7.075.767; 4.003.199; 4.052.256. O total de exames por mulheres abaixo dos 25 anos foi de respectivamente: 841.541; 941.727; 995.887; 989.452; 529.592; 520.989. Em mulheres dos 25 aos 64 foi de respectivamente: 4.349.237; 5.056.497; 5.482.483; 5.692.118; 3.263.620; 3.340.303. Em mulheres acima dos 64 anos o total de exames por ano foi: 316.533; 359.850; 383.847; 394.197; 209.987; 190.964. Já o total de lesões detectadas por ano foi de respectivamente 138.198; 159.357; 187.580; 208.670; 132.804; 136.177. O período de pandemia afetou a quantidade de exames disponibilizados pelo DATASUS e foi observada diminuição na quantidade de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas detectadas. Mulheres com idade fora da recomendação de rastreamento continuaram realizando exames citopatológicos, ainda que em menor quantidade.

Palavras-chave: detecção precoce de câncer; neoplasias do colo do útero; pandemia COVID-19; teste de Papanicolaou.

INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é o terceiro mais incidente na população brasileira feminina e a quarta causa de morte de mulheres com câncer. Estima-se que no Brasil em 2020 ocorreram 16.710 novos casos e 6.596 mortes em 2019 (INCA, 2021a)¹. Mundialmente, são estimados 530.000 novos casos e 275.000 mortes (OLUSOLA, P; BANERJEE, H.N.; PHILLEY, J.V; DASGUPTA, 2019)². Esta neoplasia está relacionada com a infecção persistente pelo Papilomavírus humano (HPV) de alto risco (HU; MA, 2018)³ associada a outros fatores, como início precoce da vida sexual, tabagismo, uso prolongado de anticoncepcionais orais, imunidade entre outros (INCA, 2021a)¹. De acordo com o grau da doença, as lesões pré-cancerosas são classificadas como lesões de baixo grau (LSIL), que têm maior taxa de regressão espontânea e lesões de alto grau (HSIL), que têm maior probabilidade de evoluírem para carcinoma (SAWAYA; HUCHKO, 2017; SELLORS; SANKARANARAYANAN; OPAS, 2004)^{4,5}.

O período entre a infecção e o desenvolvimento do carcinoma cervical é cerca de 10 a 15 anos, criando uma janela de oportunidade para a detecção precoce das lesões pré-cancerosas através de programas de rastreio (JOHNSON et al., 2019; MAURA et al.,

2018)^{6,7}. O exame de Papanicolaou é a metodologia utilizada pelo Sistema Público de Saúde (SUS) brasileiro para detecção precoce da doença, devendo ser realizado periodicamente pela população feminina com 25 a 64 anos. Além disso, conforme as diretrizes brasileiras, mulheres com citologia anterior classificada como atipia de células escamosas de significado indeterminado (ASC-US) ou LSIL realizam o exame citopatológico com intervalo de seis meses a um ano por motivo de repetição e mulheres com atipias de células escamosas não sendo possível excluir lesão de alto grau (ASC-H), HSIL, carcinoma de células escamosas (CCE), células glandulares atípicas (AGC), adenocarcinoma in situ (AIS), adenocarcinoma invasor (AI), atipias de origem indefinida (AOI), e outras neoplasias, com biópsia negativa ou de LSIL, realizam o exame citopatológico após seis meses por motivo de seguimento (INCA, 2016)⁸. Entretanto, no contexto da pandemia da COVID-19 a partir de 2020, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) emitiu uma nota técnica orientando o adiamento do exame de Papanicolaou em mulheres sem suspeita de malignidade e o desencorajamento de práticas de rastreamento em mulheres fora da população alvo (INCA, 2020)⁹.

Como resultado da suspensão temporária do rastreio e atraso na execução das condutas de seguimento de lesões previamente diagnosticadas, alguns estudos alertam sobre a possibilidade de aumento de ocorrência de lesões avançadas e de câncer nos próximos anos (CASTANON et al., 2021; WENTZENSEN; CLARKE; PERKINS, 2021)^{10,11}. Assim sendo, devido a importância do câncer do colo do útero na saúde pública e da relevância do exame de Papanicolaou como estratégia de rastreio, este trabalho teve como objetivo descrever os dados de rastreio citopatológico entre os anos de 2016 e 2021 disponibilizados pela plataforma do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), a fim de melhor compreender o impacto da pandemia no rastreamento durante esse período.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados de rastreamento foram extraídos do DATASUS Tabnet, uma plataforma online que disponibiliza informações sobre dados epidemiológicos, demográficos etc. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021)¹². Exames citopatológicos realizados pelo SUS são registrados em dois principais sistemas: SISCAN (Sistema de Informação do Câncer) uma plataforma on-line; e SISCOLO (Sistema de Informação do Controle do Câncer do Colo do Útero). O DATASUS disponibiliza apenas os dados de exames registrados no SISCAN. Sendo assim, não foi possível incluir a totalidade de exames citopatológicos realizados pelo sistema público no período estudado. Os dados dos exames foram pesquisados segundo os critérios: população feminina rastreada entre janeiro de 2016 e setembro de 2021, população rastreada por região; motivo do exame; atipias escamosas, glandulares e outras atipias (entre janeiro de 2016 a setembro de 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra a quantidade dos exames citopatológicos registrados no SISCAN e obtidos pela plataforma DATASUS. É importante ressaltar que os dados de 2021 estão incompletos já que só foi possível coletá-los até setembro. Em 2020 houve redução acentuada na quantidade de exames realizados por motivo de rastreamento. Entretanto, observa-se maior proporção de exames realizados por motivo de repetição e parece não ter havido redução na proporção em exames realizados por motivo de seguimento em relação aos demais anos. Esse perfil provavelmente foi delineado sob influência da nota técnica emitida pelo INCA, que recomendou o adiamento do exame de Papanicolaou (INCA, 2020)⁹. Além disso, o medo de contrair a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 nas unidades de saúde tornou as pacientes elegíveis receosas em procurar os

serviços de saúde para realizar o rastreamento (BASU et al., 2021)¹³. A tabela 1 também indica tendência de aumento de testes citopatológicos em 2021, podendo refletir um processo de retomada no rastreio citopatológico.

Tabela 1 - Dados de rastreamento distribuídos por motivo do exame, regiões e faixa etária e anormalidades citológicas obtidos pelo SISCAN.

	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Rastreamento¹	5.357.696 (97,28%)	6.188.945 (97,34%)	6.696.085 (97,58%)	6.909.350 (97,65%)	3.898.972 (97,40%)	3.962.068 (97,77%)
Repetição²	27.915 (0,51%)	34.942 (0,55%)	37.658 (0,55%)	46.229 (0,65%)	31.963 (0,80%)	25.192 (0,62%)
Seguimento³	121.700 (2,21%)	134.187 (2,11%)	128.474 (1,87%)	120.188 (1,70%)	72.264 (1,81%)	64.996 (1,81%)
Total	5.507.311	6.358.074	6.862.217	7.075.767	4.003.199	4.052.256

	Faixa etária					
< 10	1.234	1.281	1.161	1.368	504	377
10 a 14	15.110	15.649	15.799	14.742	7.527	6.842
15 a 24	825.197	924.797	978.927	973.342	521.561	513.770
25 a 34	1.214.407	1.381.859	1.469.256	1.503.864	841.823	863.268
35 a 44	1.243.826	1.464.375	1.599.692	1.661.522	951.619	988.102
45 a 54	1.137.720	1.325.387	1.436.831	1.487.360	867.712	891.290
55 a 64	753.284	884.876	976.704	1.039.372	602.466	597.643
65 a 74	267.531	306.749	329.935	341.160	184.142	169.472
> 74	49.002	53.101	53.912	53.037	25.845	21.492

	Rastreamento por região					
Norte	257.414	307.844	441.114	478.956	274.460	323.609
Nordeste	1.502.023	1.944.946	2.215.190	2.201.997	1.208.641	1.302.814
Centro-Oeste	480.642	478.887	504.586	557.139	291.604	272.523
Sudeste	1.807.701	2.122.666	2.170.262	2.211.320	1.285.537	1.283.569
Sul	1.459.558	1.503.753	1.531.086	1.626.380	942.966	869.824

¹Rastreamento: exames realizados periodicamente na população sem exame anterior alterado. ²Repetição: exames refeitos após um resultado alterado (ASC-US ou LSIL). ³Seguimento: exames realizados após um resultado de ASC-H, HSIL, CCE, AGC, AIS, AI, AOI e outras neoplasias.

Na distribuição dos exames por faixa etária foi observada a realização do rastreio em meninas com idade igual ou abaixo dos 14 anos. Por ser uma doença de evolução lenta e com baixa incidência em mulheres abaixo dos 25 anos levanta-se o questionamento da necessidade e dos motivos que levam à execução do rastreio do câncer cervical em uma população tão jovem (SAWAYA; HUCHKO, 2017; DECEW et al., 2013)^{4,14}. Uma hipótese seria o caráter oportunista do rastreio citopatológico no Brasil, motivando a realização do exame por outros objetivos que não necessariamente o rastreio do câncer (INCA, 2016)⁸. Um estudo publicado em 2021 na França avaliou a realização do rastreio em mulheres abaixo dos 25 anos através de um banco de dados epidemiológico. O estudo concluiu que a execução do rastreamento em idades precoces resulta em intervenções desnecessárias e traz poucos benefícios na detecção de lesões pré-neoplásicas em uma população com baixa incidência para esse câncer (MIGNOT et al., 2021)¹⁵. De forma semelhante, Campaner e Fernandes (2021)¹⁶ demonstraram que apesar da alta prevalência de citologias anormais em mulheres de até 24 anos, a maior parte desses exames

correspondeu a lesões de baixo grau. Portanto, o rastreio em mulheres e meninas abaixo dessa faixa etária pode trazer poucos benefícios na detecção do câncer cervical e resultar em intervenções excessivas que podem afetar a vida reprodutiva dessas jovens. Todas as regiões apresentaram menor registro de exames cadastrados no DATASUS em 2020 em relação aos anos anteriores, conforme mostrado na tabela 1.

Os dados da tabela 2 mostram que em comparação aos anos anteriores, no ano de 2020 foram detectados menor número de lesões, porém as frequências de lesões parecem ter tido um aumento discreto. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que a quantidade de mulheres que realizaram exame citopatológico por motivo de rastreamento ter diminuído em maior proporção do que os exames realizados por motivo de repetição em relação aos demais anos. A história natural do câncer do colo do útero se caracteriza por um longo período de ocorrência de lesões precursoras assintomáticas com altas taxas de regressão espontânea, justificando o início do rastreio na fase adulta (SELLORS; SANKARANARAYANAN; OPAS, 2004; INCA, 2016)^{5,8}. Considerando isso, apesar da diminuição da quantidade de atipias e lesões detectadas no período avaliado por este estudo, o adiamento temporário da realização do rastreio em mulheres mais jovens ou com lesões menos graves (ASC-US, LSIL e AGC) pode não prejudicar essas mulheres. Entretanto, serão necessários mais estudos para avaliar se esta redução irá se refletir em aumento de casos de câncer do colo uterino nos próximos anos. Segundo o INCA, regiões norte e nordeste têm as menores taxas de cobertura e alta mortalidade pelo câncer do colo do útero, portanto devem-se reforçar as políticas de rastreio em regiões com baixa cobertura, pois nesses locais a população feminina pode ter mais risco de não ter suas lesões pré-neoplásicas detectadas precocemente (INCA, 2021b)¹⁷.

Tabela 2 – Total de anormalidades citológicas registrados no DATASUS e proporção em relação ao total de exames realizados em cada ano no período de janeiro de 2016 a setembro de 2021.

<i>Anormalidades citológicas</i>	2016 (%)	2017 (%)	2018 (%)	2019 (%)	2020 (%)	2021 (%)
<i>ASC-US</i> ¹	60.627 (1,101)	68.477 (1,077)	81.774 (1,192)	95.097 (1,344)	62.635 (1,565)	62.724 (1,548)
<i>LSIL</i> ²	38.327 (0,696)	43.690 (0,687)	48.996 (0,714)	50.154 (0,709)	30.236 (0,755)	30.939 (0,764)
<i>ASC-H</i> ³	14.079 (0,256)	16.911 (0,266)	21.247 (0,310)	24.242 (0,343)	15.086 (0,377)	16.468 (0,406)
<i>HSIL</i> ⁴	16.029 (0,291)	19.850 (0,312)	23.619 (0,344)	25.223 (0,356)	15.962 (0,399)	16.590 (0,409)
<i>CCE</i> ⁵	622 (0,011)	736 (0,012)	880 (0,013)	972 (0,014)	662 (0,017)	633 (0,016)
<i>AGC</i> ⁶	7.354 (0,134)	8.289 (0,130)	9.739 (0,142)	11.435 (0,162)	7.337 (0,183)	7.782 (0,192)
<i>AIS</i> ⁷	209 (0,004)	222 (0,003)	294 (0,004)	283 (0,004)	206 (0,005)	202 (0,005)
<i>AI</i> ⁸	152 (0,003)	185 (0,003)	234 (0,003)	303 (0,004)	153 (0,004)	183 (0,005)
<i>AOI</i> ⁹	710 (0,013)	863 (0,014)	681 (0,010)	823 (0,012)	436 (0,011)	566 (0,014)
<i>Outras Neoplasias</i>	89 (0,002)	134 (0,002)	116 (0,002)	138 (0,002)	91 (0,002)	90 (0,002)
<i>Total de exames</i>	138.198	159.357	187.580	208.670	132.804	136.177

¹ASC-US: atipias de células escamosas de significado indeterminado. ²LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau. ³ASC-H: atipias de células escamosas não sendo possível excluir lesão de alto grau. ⁴HSIL: lesão intraepitelial escamosa de alto grau. ⁵CCE: carcinoma de células escamosas. ⁶AGC: células glandulares atípicas. ⁷AIS: adenocarcinoma in situ. ⁸AI: adenocarcinoma invasor. ⁹AOI: atipias de origem indefinida.

CONCLUSÃO

O período de pandemia afetou a quantidade de exames realizados pelo SUS e disponibilizados pelo DATASUS. A redução ocorreu principalmente pelo motivo de rastreamento e em termos de proporção observou-se maior frequência de mulheres que realizaram citologia por motivo de repetição e frequência semelhante aos demais anos por motivo de seguimento. Houve diminuição na quantidade de lesões pré-neoplásicas detectadas. Mulheres com idade fora da recomendação de rastreamento continuaram a realizar exames citopatológicos, ainda que em menor quantidade mesmo durante a pandemia.

REFERÊNCIAS

1. INCA. **Câncer do colo do útero**, nov. 2021a. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-do-colo-do-utero>>. Acesso em: 3 out. 2021.
2. OLUSOLA, P; BANERJEE, H.N.; PHILLEY, J.V; DASGUPTA, S. Human Papilloma Virus- Associated Cervical Cancer and Health Disparities. **Cells**, v. 622, n. 8, p. 14–16, 2019.
3. HU, Z.; MA, D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 10, p. 5217–5236, 2018.
4. SAWAYA, G. F.; HUCHKO, M. J. Cervical Cancer Screening. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 4, p. 743–753, 2017.
5. SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, RENGASWAMY.; OPAS. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: manual para principiantes**. [s.l.] Centro Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, 2004.
6. JOHNSON, C. A. et al. Seminars in Oncology Nursing Cervical Cancer: An Overview of Pathophysiology and Management. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, n. 2, p. 166–174, 2019.
7. MAURA, G. et al. Cervical cancer screening and subsequent procedures in women under the age of 25 years between 2007 and 2013 in France: A nationwide French healthcare database study. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 27, n. 5, p. 479–485, 1 set. 2018.
8. INCA. **Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero 2ª edição revista, ampliada e atualizada**. 2. ed., 2016.
9. INCA. **Diretrizes para adiamento de diagnóstico de cancer (março)**, mar. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/notas-tecnicas/deteccao-precoce-de-cancer-durante-pandemia-de-covid-19>>. Acesso em: 4 out. 2021.

10. CASTANON, A. et al. Cervical screening during the COVID-19 pandemic: optimising recovery strategies. **The Lancet Public Health**, v. 6, n. 7, p. e522–e527, 1 jul. 2021.
11. WENTZENSEN, N.; CLARKE, M. A.; PERKINS, R. B. Impact of COVID-19 on cervical cancer screening: Challenges and opportunities to improving resilience and reduce disparities. **Preventive Medicine**, v. 151, n. February, p. 106596, 2021.
12. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tabnet**. Disponível em: <<https://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude-tabnet/>>. Acesso em: 1 nov. 2021a.
13. BASU, P. et al. Cancer Screening in the Coronavirus Pandemic Era: Adjusting to a New Situation. **JCO Global Oncol**, v. 7, p. 416–424, 2021.
14. DECEW, A. E. et al. The Prevalence of HPV Associated Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women under Age 21: Who Will Be Missed under the New Cervical Cancer Screening Guidelines? **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 26, n. 6, p. 346–349, 2013.
15. MIGNOT, S. et al. Correlates of premature pap test screening, under 25 years old: analysis of data from the CONSTANCES cohort study. **BMC Public Health**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2021.
16. CAMPANER, A. B.; FERNANDES, G. L. Cervical Cancer Screening of Adolescents and Young Women: Further Evidence Shows a Lack of Clinical Value. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 34, n. 1, p. 6–11, 1 fev. 2021.
17. INCA. **Mortalidade Câncer do Colo do Útero**, out. 2021b. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/mortalidade>>. Acesso em: 12 dez. 2021.

DOI: <https://doi.org/10.53934/101014-2>

PERFIL DE QUALIDADE DOS LABORATÓRIOS QUE REALIZAM EXAMES CITOPATOLÓGICOS NA REDE PÚBLICA DO ESTADO DE SÃO PAULO

Lígia Monaro Colombo dos Santos¹; Sandra Lorente²
Daniela Etlinger-Colonelli³

¹Biomédica, estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – NAP/IAL;
E-mail: ligiamonaro.lm@gmail.com

²Farmacêutica, docente/pesquisador do Núcleo de Anatomia Patológica – NAP/IAL.

³Biomédica, docente/pesquisador do Núcleo de Anatomia Patológica – NAP/IAL.

Resumo: O câncer de colo uterino é um grave problema de saúde pública. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) recomenda o exame citopatológico como método de rastreamento e propõe o monitoramento periódico de indicadores de qualidade para avaliação de desempenho dos laboratórios da rede pública de saúde (SUS). O objetivo deste trabalho foi descrever o perfil de qualidade dos laboratórios de citopatologia do Estado de São Paulo que utilizaram o SISCAN, em 2019. Os dados foram obtidos na plataforma DATASUS e tabulados no Microsoft Office Excel 2016 para cálculo do índice de positividade (IP), percentuais de células escamosas atípicas (ASC) em relação ao total de exames satisfatórios e alterados, razão ASC/lesão intraepitelial (ASC/SIL), índice de insatisfatoriedade e percentual de lesão intraepitelial de alto grau (HSIL). Em 2019, dos 118 laboratórios que realizaram exames citopatológicos no SUS, 59 (50%) emitiram resultados pelo SISCAN. O IP médio do estado foi 2,9%, ASC/exames satisfatórios 1,8%, ASC/exames alterados 61,5%, ASC/SIL 1,9 e HSIL/exames satisfatórios 0,26%. Dos 829.856 exames realizados, 0,89% foram classificados como insatisfatórios, sendo o dessecamento da amostra a principal causa. Observou-se que 50% dos laboratórios utilizaram o SISCAN para emissão dos resultados, dificultando o seguimento e acompanhamento online das pacientes. O IP e o percentual de HSIL foram abaixo do recomendado. Conscientizar os profissionais sobre a importância do SISCAN para integração dos resultados, bem como a adoção de estratégias de controle de qualidade e capacitação periódica são fundamentais para a melhoria da qualidade do rastreamento do câncer de colo uterino.

Palavras-chave: citologia; controle de qualidade; indicadores de qualidade; programa de rastreamento; teste de Papanicolaou

INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero, apesar de ser prevenível, é o terceiro tipo de câncer mais incidente na população feminina e a quarta causa de morte mais comum por câncer (IARC, 2020).¹ No Brasil, em 2019, ocorreram 6.596 mortes devido a esta doença, sendo a taxa de mortalidade de 5.33/100 mil mulheres (INCA, 2021).² Frente a este cenário, a OMS (Organização Mundial da Saúde) elaborou um guia com diretrizes para rastreamento e tratamento de lesões pré-cancerosas a fim de acelerar a eliminação do câncer cervical. Para atingir tal objetivo, foram propostas metas até o ano de 2030, sendo uma delas 70% de cobertura de triagem com teste de alto desempenho (WHO, 2021).³ No Brasil, o rastreio baseia-se na realização periódica do exame citopatológico e segue as diretrizes do Ministério da Saúde (MS) (BRASIL, 2016a).⁴

O exame citopatológico, ou exame de Papanicolaou, consiste na avaliação morfológica de células esfoliadas do colo do útero, fixadas em lâmina de vidro, coradas e analisadas sob um microscópio óptico para verificar a presença de células anormais (pré-cancerosas ou cancerosas). É um método subjetivo, pois varia de acordo com condições pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas (COLLAÇO et al., 2005; COLLAÇO; ZARDO, 2008).^{5,6}

A fim de melhorar a qualidade e confiabilidade dos exames citopatológicos o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) desenvolveu o manual de gestão da qualidade para laboratórios de citopatologia, revisado e adequado à Portaria nº 3.388, de 30 de dezembro de 2013, que redefiniu a qualificação nacional em citopatologia na prevenção do câncer do colo do útero (QualiCito). O manual direciona os procedimentos de monitoramento interno e externo da qualidade (MIQ e MEQ), com intuito de identificar não conformidades e implementar medidas corretivas e preventivas, através da avaliação de indicadores de qualidade (BRASIL, 2013a; BRASIL, 2016b).^{7,8} Sendo assim, este trabalho tem como objetivo descrever o perfil de qualidade dos laboratórios de citopatologia da Rede Pública de Saúde do Estado de São Paulo (SP) que utilizaram o Sistema de Informação do Câncer (SISCAN), em 2019.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma análise retrospectiva de dados obtidos na plataforma do DATASUS, dos laboratórios credenciados ao Sistema Único de Saúde (SUS) em SP que realizaram exames citopatológicos no ano de 2019 e utilizaram o sistema SISCAN para emissão dos laudos e faturamento.

Os dados utilizados foram o número total de exames realizados (satisfatórios, insatisfatórios e alterados), causas de insatisfatoriedade das amostras, representatividade da junção escamocolumnar (JEC) e cálculo dos indicadores de qualidade. Foram considerados como exames alterados os casos com diagnóstico de ASC-US; ASC-H; AGC-SOE; AGC-FN; LSIL; HSIL; HSIL não podendo excluir microinvasão; carcinoma epidermóide invasor; adenocarcinoma in situ; adenocarcinoma invasor cervical (BRASIL, 2012).⁹

Os cálculos foram realizados no Microsoft Office Excel 2016. Para avaliação da qualidade dos laboratórios foram analisados os indicadores: índice de positividade (IP; valor referência: 3 a 10%), percentuais de células escamosas atípicas (ASC) em relação ao total de exames satisfatórios (valor referência: <5%) e alterados (valor referência: <60%), razão ASC/lesão intraepitelial (ASC/SIL; valor referência: <3), índice de insatisfatoriedade (valor referência: <5%) e percentual de lesão intraepitelial de alto grau (HSIL; valor referência: >0,4%) (BRASIL, 2016b).⁸

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ano de 2019, 118 laboratórios prestaram serviço ao SUS em SP, sendo que 59 (50%) utilizaram o SISCAN. Estes laboratórios realizaram 829.856 exames citopatológicos cervicais, sendo que 7.359 (0,89%) foram classificados como insatisfatórios e 24.063 (2,89%) alterados. A distribuição das frequências de exames alterados foi de: 12.615 (1,5%) ASC-US, 2.186 (0,3%) ASC-H, 5.635 (0,7%) LSIL, 2.019 (0,2%) HSIL, 149 (0,02%) HSIL não podendo excluir microinvasão, 91 (0,01%) carcinoma epidermóide invasor, 1.089 (0,13%) AGC-SOE, 227 (0,03%) AGC-FN, 17 (0,002%) adenocarcinoma in situ, 35 (0,004%) adenocarcinoma invasor.

Índice de insatisfatoriedade: Para leitura e interpretação correta dos exames citopatológicos é necessário que o esfregaço citológico seja ideal e satisfatório. O MS recomenda que este índice não exceda 5% do total de exames realizados. De todos os laboratórios avaliados apenas um ultrapassou esse parâmetro, com percentual de 15,95%, sendo a principal causa o dessecamento da amostra, que está relacionado à coleta e fixação do material (KOSS; GOMPEL, 2006).¹⁰ O índice de insatisfatoriedade médio de SP foi 0,89%, sendo as principais causas o dessecamento (36,82%), piócitos (17,78%) e esfregaços hipocelulares (15,93%).

Os artefatos de dessecamento da amostra ocorrem por falha na fixação do material no momento da coleta, sendo recomendado orientação e capacitação dos profissionais responsáveis. A insatisfatoriedade por piócitos pode ocorrer devido a processo inflamatório agudo intenso, nestes casos é recomendada a repetição do exame após tratamento. (BRASIL, 2013b).¹¹ A hipocelularidade pode ocorrer devido à falha ou dificuldade na coleta, comum em mulheres pós-menopausa. Nestes casos é importante a capacitação periódica dos profissionais que realizam a coleta do material e em alguns casos, a estrogonização da paciente pode refletir em melhora da representatividade celular. Lâminas insatisfatórias devem ser repetidas, o que reflete um custo para o sistema de saúde e um desgaste para a paciente (BRASIL, 2013b, 2016a).^{11, 7} Dessa forma, faz-se necessário o aperfeiçoamento e capacitação contínua dos profissionais, especialmente para o laboratório que ultrapassou os 5% recomendados pelo MS (COSTA et al., 2021).¹²

Representatividade da JEC: A junção escamocolunar (JEC) corresponde à região de transição entre o epitélio escamoso e o epitélio colunar. É nela que, na grande maioria dos casos, se inicia a colonização pelo HPV, favorecendo o desenvolvimento de lesões precursoras e neoplasias. Foi verificado que 54,85% dos exames realizados no estado em 2019 apresentaram representatividade da JEC. Tal índice é inferior ao percentual (65,3%) encontrado por MAGALHÃES et al. (2020) em Cascavel (PR).¹³ Já JAKOBCZYNSKI et al. (2018), verificaram que, após capacitação dos profissionais responsáveis pela realização da coleta, a representatividade da JEC chegou a 85,03%. Sendo assim, sugere-se que seja implementada a educação profissional continuada, a fim de obter amostras cada vez mais representativas.¹⁴

Índice de positividade (IP): o IP médio do estado foi de 2,93%, bem próximo ao limite inferior considerado pelo MS. A análise individual dos laboratórios revelou índices entre 0% e 25,65%. Tais variações podem ser decorrentes de laboratórios com baixa escala de produção, preenchimento incorreto do SISCAN ou ainda, em laboratórios de referência secundária em patologia cervical, visto que estes recebem os exames suspeitos para

confirmação diagnóstica (BRASIL, 2016a, 2016b; JONES, 1995; SARTORI, 2016).^{4, 8, 15, 16}

Índice de ASC: Observando os indicadores relacionados às ASC, verificou-se que o índice ASC/satisfatórios foi de 1,80%; o índice ASC/alterados foi de 61,51% e a razão ASC/SIL foi 1,90. A análise conjunta dos resultados nos permite observar que apesar de um pequeno aumento dos ASC em relação aos exames alterados, os outros índices encontram-se equilibrados, evidenciando que as ASC não foram superestimadas no estado.

A análise individual demonstrou que três laboratórios ultrapassaram a recomendação do MS para o índice ASC/satisfatórios. Um deles ainda ultrapassou os parâmetros para os demais índices de ASC, sendo recomendada a capacitação continuada destes profissionais contemplando a revisão dos critérios diagnósticos de ASC para adequação dos indicadores de atipias (IARC, 2005).¹⁷ Outro laboratório que extrapolou o índice ASC/satisfatórios, trata-se de um prestador de serviço de referência secundária. Seu índice elevado de ASC/satisfatório foi compensado pelo índice ASC/alterados e razão ASC/SIL, o que significa que apesar do elevado número de casos de atipias, a frequência de lesões também é elevada, equilibrando os indicadores. O terceiro laboratório que ultrapassou as recomendações para ASC/satisfatórios e ASC/alterados manteve a razão ASC/SIL adequada, que pode ser justificado por ele utilizar a citologia em meio líquido em sua rotina. Segundo STABILE et al. (2012) o desempenho diagnóstico da citologia em meio líquido é superior quando comparado com a citologia convencional, o que poderia justificar o elevado número de alterações.¹⁸

Percentual de HSIL: esse índice representa a capacidade dos profissionais de detectar as lesões consideradas verdadeiramente precursoras do câncer cervical, visto que são as que possuem maior potencial de progressão para a doença. Países com rastreamento considerado bem-sucedido apresentam elevados percentuais de lesões de alto grau (HSIL) e consequente diminuição das taxas de incidência e de mortalidade do câncer do colo uterino (BRASIL, 2016a; CORREA et al., 2012).^{4,19} Verificou-se que grande parte dos laboratórios apresentou índice de HSIL abaixo do recomendado, assim como o percentual médio de SP se manteve inferior ao recomendado (0,26%). Tal fato sugere um déficit na capacidade de detecção das lesões precursoras do câncer do colo do útero, o que pode gerar futuramente altas taxas de incidência de câncer cervical (BRASIL, 2016b).⁸ ÁZARA et al. (2014) evidenciam a importância de se realizar o monitoramento externo de qualidade, que além de avaliar o desempenho dos laboratórios, auxilia na melhoria dos indicadores.²⁰

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo nos permitiu verificar que um dos pontos de dificuldade do programa de rastreamento brasileiro é a unificação de dados, tanto da rede pública quanto da rede privada de saúde, para se conhecer as taxas mais próximas ao real de incidência da doença. Conforme demonstrado neste estudo, apenas metade dos laboratórios da rede pública aderiu à utilização do SISCAN, sendo uma limitação do estudo, pois os dados disponíveis correspondem apenas a esta porção que utiliza. Ainda que metade dos laboratórios utilize o SISCAN, constatamos que muitos deles o utilizam apenas com o intuito de faturamento e não inserem no sistema os dados reais de diagnóstico das pacientes, emitindo seus laudos em programas internos do laboratório. Destacamos que o preenchimento correto do sistema é fundamental para as bases de dados nacionais, pois dessa forma seria possível compilar dados, traçar um panorama do estado, aprimorar o acompanhamento e seguimento das

pacientes, além de permitir o desenvolvimento de estudos como este, para identificar quais são os pontos que necessitam de intensificação de ações de melhoria e reciclagem de profissionais.

Considerando os dados obtidos, observou-se que o índice de positividade e o índice de HSIL foram inferiores ao recomendado, demonstrando que a maioria dos laboratórios apresentou baixo desempenho no rastreamento do cervical. Diante disso, fica evidente a importância de reforçar ou implementar ferramentas de monitoramento interno e externo da qualidade (MIQ e MEQ) nos laboratórios, para que os erros e dificuldades, tanto na fase pré-analítica quanto na fase analítica, sejam detectados e, a partir disso, aplicar medidas corretivas, como cursos de reciclagem periódicos e programas de capacitação profissional, com intuito de melhorar a qualidade dos exames realizados, reduzir os resultados falso-negativos, aumentar a confiabilidade do rastreio e consequentemente garantir o sucesso da prevenção do câncer do colo uterino, através do programa de rastreamento.

REFERÊNCIAS

1. IARC, I. A. FOR R. ON C.; WHO, W. H. O. **Cancer today**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acesso em: 6 dez. 2021.
2. INCA, I. N. DO C. **CONTROLE DO CâNCER DO COLO DO ÚTERO: CONCEITO E MAGNITUDE**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/conceito-e-magnitude>>. Acesso em: 6 de dezembro de 2021.
3. WHO, W. H. O. **WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, second edition**. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 2021.
4. BRASIL, M. DA S. **Diretrizes Brasileiras para o rastreamento Do Câncer Do Colo Do Útero**. 2. ed. INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2016a.
5. COLLAÇO, L. M. et al. Quality control in cervical cancer screening: Brazilian experience. *Acta cytologica*, v. 49, n. 6, p. 694–6, 2005.
6. COLLAÇO, L. M.; ZARDO, L. **Cytologic screening programs**. 3. ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2008.
7. BRASIL. Portaria nº 3388, de 30 de dezembro de 2013. **Redefine A Qualificação Nacional em Citopatologia na Prevenção do Câncer do Colo do útero (QualiCito), no âmbito da Rede de Atenção à Saúde das Pessoas Com Doenças Crônicas**. Brasília, DF: **Diário Oficial [da] União**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt3388_30_12_2013.html> Acesso em: 09 de dezembro de 2021.
8. BRASIL, M. DA S. **Manual de Gestão da Qualidade para Laboratório de Citopatologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2016b.
9. BRASIL, M. DA S. **Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais**. 3. ed. Rio de Janeiro: INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes

da Silva, 2012.

10. KOSS, L.; G., GOMPEL, C. **koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

11. BRASIL, M. DA S. **Controle dos cânceres do colo do útero e da mama**. 2. ed. Brasília: Secretaria de Atenção à Saúde - Departamento de Atenção Básica CONTROLE, 2013b.

12. COSTA, M. C. O. et al. Fatores que provocam resultados falso-negativos nos exames de citologia oncológica: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e361101019079, 2021.

13. MAGALHÃES, J. C. et al. Avaliação dos indicadores de qualidade dos exames citopatológicos do colo do útero realizados em um município do Paraná, Brasil. **ornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, p. 1–7, 2020.

14. JAKOBCZYNSKI, J. et al. Training of health professionals and its impact on the trace of precursory injuries of the uterine column cancer. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 1, 2018.

15. JONES, B. A. Rescreening in gynecologic cytology. Rescreening of 3762 previous cases for current high-grade squamous intraepithelial lesions and carcinoma--a College of American Pathologists Q-Probes study of 312 institutions. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 119, n. 12, p. 1097–103, 1995.

16. SARTORI, M. C. DA S. Avaliação da qualidade do sistema de informação do câncer do colo do útero (SISCOLO/SISCAN). 2016.

17. IARC, I. A. FOR R. ON C. **Cervix Cancer Screening**. Lyon: IARC, Internacional Agency for Research on Cancer, 2005.

18. STABILE, S. A. B. et al. Estudo comparativo dos resultados obtidos pela citologia oncológica cérvico-vaginal convencional e pela citologia em meio líquido. **Rev Einstein**, v. 10, n. 4, p. 466–472, 2012.

19. CORREA, M. DA S. et al. Cobertura e adequação do exame citopatológico de colo uterino em estados das regiões sul e nordeste do Brasil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 28, n. 12, p. 2257–2266, 2012.

20. ÁZARA, C. Z. S. et al. Avaliação do Indicadores da Qualidade dos Exames Citopatológicos do Colo do Útero de Laboratórios Privados do Estado de Goiás Credenciados pelo Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 60, n. 4, p. 295–303, 2014.

OBSERVAÇÕES PRELIMINARES DE CÉLULAS C6/36 E SIRC INFECTADAS COM VÍRUS ZIKA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Luana Barbosa de Lima¹, Noemi Nosomi Taniwaki², Gislene Mitsue Namiyama²

¹Bolsista do Curso de Especialização em Microscopia Eletrônica NME/IAL
e-mail: Luana.barbosa95@outlook.com

² Pesquisador Científico do Núcleo de Microscopia Eletrônica /CPI/IAL

Resumo: O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus transmitido pela picada de artrópodes hematófagos da espécie *Aedes*. Este vírus pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Outros *Flavivirus* conhecidos de importância para a Saúde Pública incluem: Febre Amarela, Dengue, Chikungunya e outros. O ZIKV foi descoberto na floresta de Zika, em Uganda em 1947. Após alguns relatos de transmissão na África, se espalhou para outros países e, em 2015 avançou até a América do Sul de forma preocupante, acometendo milhares de pessoas. Foi considerado um problema de Saúde Pública pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, foi associado a condições neurológicas, como microcefalia e tornou-se a primeira doença ligada a defeitos congênitos em humanos. Também foram descritos sintomas oculares em neonatos, como a primeira manifestação evidente da doença, causada pelo ZIKV, em mães infectadas durante a gravidez. O diagnóstico em infectados é impreciso, devido à variedade de sintomas que são facilmente confundidos com outros tipos de arboviroses. A identificação de linhagem celular suscetível ao ZIKV, que permite o isolamento e a identificação viral é de extrema importância, pois há poucos relatados na literatura sobre o assunto. Este trabalho tem como objetivo verificar as alterações ultraestruturais em culturas de células C6/36 e cultura de células SIRC, na presença do ZIKV, isolado de urina de uma paciente com suspeita de rubéola. Os resultados foram observados por Microscopia Eletrônica de Transmissão, sendo constatados que estas culturas celulares são susceptíveis ao vírus Zika.

Palavras-chave: *Flavivirus*; vírus Zika; cultura de células C6/36; cultura de células SIRC; Microscopia Eletrônica de Transmissão

INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) foi descoberto casualmente em 1947, durante um estudo sobre a Febre Amarela na floresta de Zika em Uganda (África), em isolamento viral feito a partir do soro de um macaco *Rhesus* sentinela febril (GUBLER; VASIL; DICK, 1952). O segundo isolamento viral foi de mosquito *Aedes africanus* encontrado no mesmo local, em 1948 (GUBLER; VASILAKIS; MUSSO, 2017). Na Ásia, entre 1960 a 1999, foram identificados ZIKV oriundos de amostras de humanos e de uma variedade de mosquitos, com prevalência do gênero *Aedes albopictus* e *Aedes aegyptie*, tidos então como os principais vetores do ZIKV (HADDOW et al., 2012). No final de 2014, houve o aparecimento de casos da doença na região Nordeste do Brasil, com sintomas aparentemente leves, como manchas no corpo e coceira e por vezes febre, que desapareciam sem tratamento, após quatro a cinco dias. Neste período, o Brasil apresentava um aumento de casos de Dengue, Chikungunya, Rubéola, Parvovírus e Enterovírus, doenças que apresentam sintomas semelhantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Em 2015, houve um

aumento de casos com sintomas clínicos como conjuntivite, erupção cutânea, febre leve e artralgia, de área endêmica de Dengue, porém apresentaram diagnóstico sorológico negativo para Dengue, concomitantemente, diante do surgimento de aumento de casos de microcefalia em neonatos e Síndrome de Guillain-Barré em adultos. Outros sintomas foram relatados neste período com menos frequência como: dor retro orbital, vômito, diarreia, dor abdominal e anorexia (HEUKELBACH et al., 2016). Apesar dessas sintomatologias, cerca de 80% dos indivíduos infectados com o ZIKV não apresentaram sintomas, ou eram particularmente leves. O ZIKV foi identificado através de exames de biologia molecular e confirmado por sequenciamento genético. A análise filogenética mostrou que o ZIKV tinha a mesma sequência daquele encontrado na Ásia entre 1960 a 1999 (ZANLUCA et al., 2015). O ZIKV é um *Flavivírus*, com morfologia icosaédrica, envelopado, medindo entre 40 nm a 50 nm de diâmetro (CHANCEY et al., 2015). Seu genoma tem aproximadamente 10,0 kilobases, e é constituído por ácido ribonucleico (RNA) de fita simples senso-positivo (ssRNA(+)). No citoplasma da célula, o RNA viral é traduzido em uma única poliproteína, posteriormente clivada por proteases que codifica proteínas estruturais e proteínas não estruturais (NS) do vírus. As proteínas estruturais são: Capsídeo (C) presente no citoplasma das células infectadas, que se ligam ao RNA viral formando o nucleocapsídeo. O Envelope (E) realiza o processo de fusão, responsável pela ligação da membrana viral com a célula hospedeira, permitindo a entrada do vírus; e o precursor Pré-Membrana (prM) que impede a fusão prematura do vírus à membrana da célula hospedeira (PIERSON; DIAMOND, 2020). As proteínas NS são: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 auxiliam na replicação e sobrevivência do vírus (SIROHI; KUHN, 2017). O processo de replicação do ZIKV tem início na adsorção da partícula viral à célula do hospedeiro através de receptores. Várias moléculas têm-se mostrado capazes de interagir com as partículas dos *Flavivírus*, mas poucos foram caracterizados (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). O vírus entra na célula através de endocitose mediada por vesículas recobertas por clatrina, sendo encaminhadas para o citoplasma dentro do endossomo, que tem o pH ácido e modifica a proteína E, provocando a trimerização do envelope de modo irreversível, resultando na fusão das membranas virais e celulares (HASAN et al., 2018). A replicação do RNA viral ocorre no citoplasma em associação com membranas celulares, formando o chamado “complexo de replicação viral”, assim iniciando a síntese de uma fita de RNA complementar (RNAc), com polaridade negativa, que servirá de molde para a produção de novas fitas de RNA positivo. A formação de novas partículas virais imaturas é iniciada no retículo endoplasmático, depois é secretado para o complexo do Golgi, onde ocorre sua maturação através da clivagem prM em E, que leva à mudança estrutural na superfície do vírion (YUN; LEE, 2017). O transporte do vírus para membrana plasmática ocorre através de vesículas que se fundem à membrana plasmática da célula do hospedeiro e liberado por exocitose (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). O ZIKV é transmitido para humanos ou animais vertebrados através da picada de mosquito da espécie *Aedes aegypti* presente em regiões tropicais e subtropicais, e *Aedes albopictus*, encontrados em regiões temperadas, tropicais e subtropicais (SAMPATHKUMAR; SANCHEZ, 2016). O ZIKV foi encontrado na urina (OLIVEIRA et al., 2017), saliva humana (BONALDO et al., 2016), no sêmen (BASARAB et al., 2016), o que sugere transmissão sexual, além de transfusão sanguínea e transplacentária (BRASIL et al., 2016). O isolamento e propagação do arbovírus em laboratório vêm sendo realizada desde a década de 50 (FIGUEIREDO, 1990), sendo a célula VERO a linhagem celular mais utilizada, originária de rim de macaco verde africano. Têm-se utilizado, as células C6/36, oriundas de larvas de *Aedes albopictus*, para estudo de Zika, Dengue e Chikungunya (WALKER et al., 2014). As Células SIRC (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea), células derivadas de córnea de coelho *Oryctolagus cuniculus* (ATCC CCL-60) são suscetíveis ao vírus da rubéola e têm sido usadas para propagar e quantificar vários

tipos de vírus (NIEDERKORN et al., 1990). Este trabalho tem como objetivo verificar as alterações ultraestruturais em células C6/36 e em células SIRC, na presença do ZIKV isolado de urina de uma paciente com suspeita de rubéola.

MATERIAL E MÉTODOS

Células C6/36 (ATCC CLR 1660) e SIRC (ATCC CL 60) foram infectadas com amostras de ZIKV (cepa do depósito da coleção de vírus do Instituto Adolfo Lutz, isolado de urina de uma paciente com suspeita de rubéola - n° BR 310161). Este material já se encontrava emblocado em Epon 812, desde 2017. O preparo prévio da amostra foi realizado no Núcleo de Microscopia Eletrônica (NME) do IAL. Células C6/36 (ATCC CLR 1660) e SIRC (ATCC CL 60) foram infectadas com ZIKV por 3 dias e 7 dias respectivamente, conforme Oliveira et al. (2017). As amostras foram fixadas com glutaraldeído a 2,5%, em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,3, logo após foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora. Foram desidratados com acetona PA em concentrações crescentes (30%,50%,70% 90% e 100%), e infiltrados em resina Epon 812 e incluídos em moldes de silicone. As amostras foram polimerizadas em estufa a 60°C por 72 horas. Após a polimerização, os blocos de resina foram desbastados, realizados cortes semifinos no ultramicrotomo com navalha de vidro. Foram corados com azul de metileno e visualizados no Microscópio de Luz, para rastreamento da área de interesse. Em seguida, foram realizados cortes ultrafinos no ultramicrotomo com navalha de diamante (Diatome). Os cortes foram colhidos em telas de cobre recobertos com parlódio e contrastados com acetato de uranila 5% aquosa por 10 minutos e citrato de chumbo (segundo Reynolds) por 10 minutos. Os cortes ultrafinos foram observados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL/JEM 1011) e as imagens foram obtidas em câmera digital (Gatan).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Modelos *in vitro* utilizados para observar o desenvolvimento do ZIKV e as alterações causadas, em nível ultraestrutural são importantes para entender o processo de replicação viral. Neste estudo, as células C6/36 (ATCC CLR 1660) e células SIRC (ATCC CL 60) mostraram serem altamente permissivas à infecção pelo ZIKV. Foram visualizados vacúolos contendo vírus em células C6/36 infectadas, e ZIKV maduro saindo do Complexo de Golgi em células SIRC.

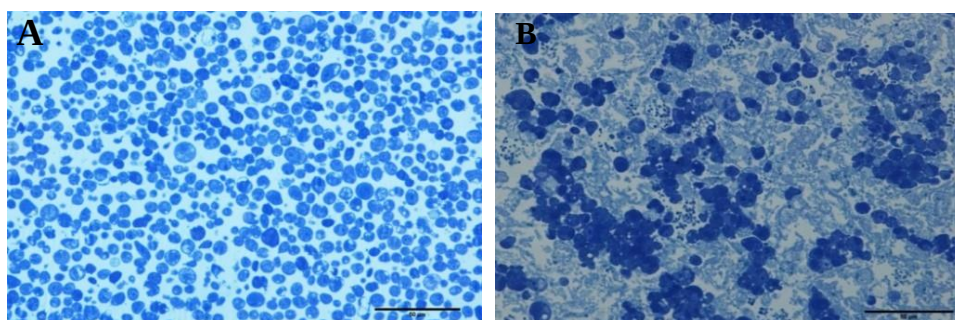


Figura 1– (A) Fotomicrografia de células C6/36 (controle) mostram células de diferentes tamanhos e coloração homogênea. Aumento de 400x. Barra=50µm (B) Fotomicrografia de células C6/36 infectada com vírus Zika mostram células justapostas, algumas mais claras, que parecem estar em estado de degeneração e outras mais escuras com citoplasma denso, onde quase não se consegue observar o núcleo; também se observam pequenos grânulos escuros espalhados entre as células. Aumento de 400x. Barra= 50µm

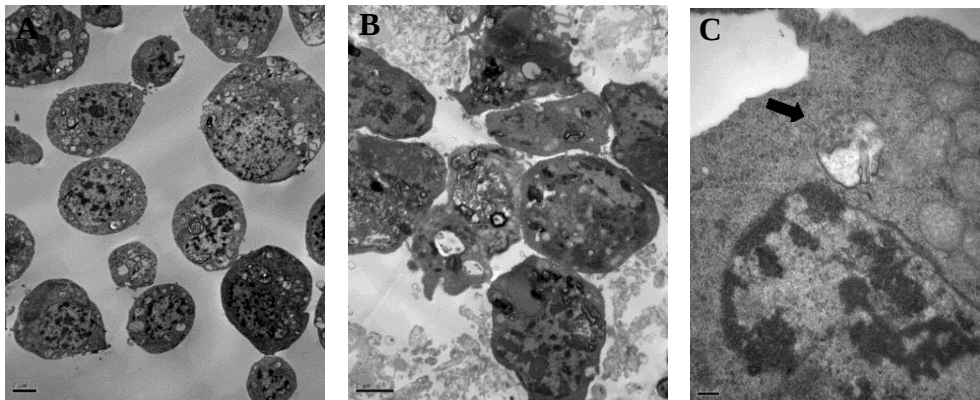


Figura 2 – Elétron micrografia (A) células C6/36 não infectadas (controle), confirmam o resultado visualizado ao microscópio de luz. Células contendo pequenos vacúolos com presença de estruturas elétron densas, núcleos com regiões de heterocromatina bastante compactada. Barra= 2µm. Em (B) e (C), células C6/36 infectadas com o ZIKV. (B) Células justapostas e células degeneradas. Barra= 2µm. (C) Mostra um vacúolo contendo várias partículas virais (seta), próximo à membrana plasmática. Barra= 0,2 µm

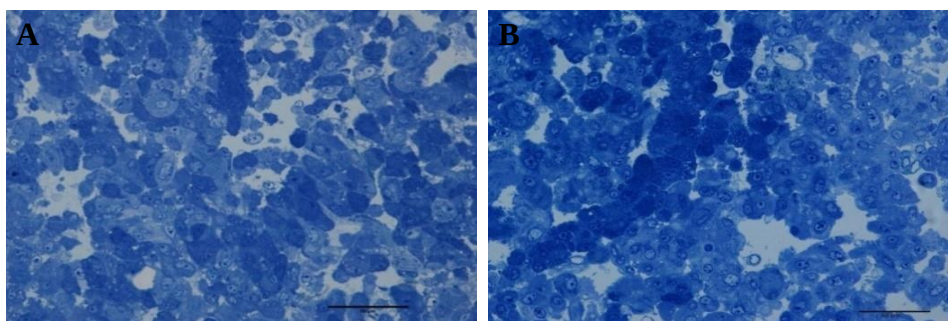


Figura 3- (A) Fotomicrografia de células SIRC (controle). Células em diferentes formatos. Apresentam células justapostas, com núcleos grandes na região central. Barra= 50µm (B) mostram células justapostas com citoplasma denso, algumas mais claras e pequenos vacúolos. Aumento de 400x. Barras= 50µm

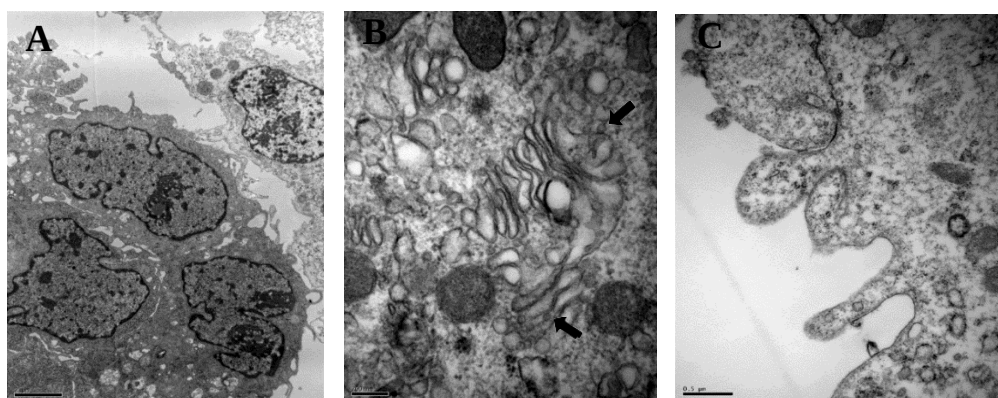


Figura 4 – Elétron micrografia de células SIRC (controle) (A) estas células apresentam vários prolongamentos na região plasmática. No canto superior direito observa-se uma célula mais clara com aspecto necrótico. Barra= 2µm. Em B e C, células SIRC infectadas com ZIKV. (B) vários perfis de complexo de Golgi ativo, visualizados em cortes transversais e longitudinais secretando partículas virais (setas), circundado por diversas mitocôndrias. Barra= 200µm. (C) prolongamentos da membrana plasmática de células infectadas pelo ZIKV, tornam-se mais dilatados. Barra= 0,5 µm

Sendo o mosquito *Aedes* o agente transmissor do ZIKV, a susceptibilidade de células C6/36 (ATCC CLR 1660) ao ZIKV está ligada diretamente ao seu vetor, pois são provenientes de larvas de *Aedes albopictus*. A disseminação do ZIKV como foi dito anteriormente, é feita através da picada do mosquito e a multiplicação do vírus nas

glândulas salivares é prova notória da adaptação que possuem nos tecidos do mosquito para replicação de arboviroses (FIGUEIREDO, 1990). Já suscetibilidade do ZIKV em células SIRC (ATCC CL 60), pode estar ligada à gama de sintomas oftalmológicos relatados em 70% de pacientes infectados pelo vírus, que incluem catarata, glaucoma, retinopatias e etc (SOUZA et al., 2021). Os sintomas oculares também foram descritos em neonatos, como a primeira manifestação evidente da doença causada pelo ZIKV em mães infectadas durante a gravidez (ZIN et al., 2017). Este trabalho mostra que esta linhagem celular, originária de córnea de coelho pode suportar a replicação do Zika vírus. O uso de células SIRC para o crescimento do ZIKV foi inicialmente realizado no trabalho de (OLIVEIRA et al., 2018), de onde o vírus foi isolado. Neste trabalho foram abordados aspectos ultraestruturais do vírus Zika e sua suscetibilidade em células C6/36 e SIRC.

CONCLUSÕES

Através da utilização da Microscopia Eletrônica de Transmissão, foi possível visualizar as alterações celulares provocadas pelo ZIKV e como este utiliza a maquinaria celular durante a sua replicação, demonstrando a suscetibilidade do ZIKV a estes tipos celulares. Os resultados apresentados neste estudo destacam a importância de investigações mais profundas sobre as alterações provocadas pelo ZIKV, especialmente em células SIRC, visto que alguns pacientes infectados por este vírus apresentam sintomas e lesões oftalmológicos bastante sérios. Mais estudos precisam ser realizados devido à complexidade do ZIKV.

REFERÊNCIAS

- Aedes albopictus clone C6/36 CRL-1660. The Global bioresource center ATCC, 2021. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/crl-1660>>
- BASARAB, M. Et al. Zika virus. **THE BMJ**, [S. L.], p. 01-07, 26 fev. 2016.
- BONALDO, M. C. Et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, 24 jun. 2016.
- CHANCEY, C. Et al. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1–20, 2015.
- DICK, G. W. A et al. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda. **National Institute for Medical Research, London**, [S. L.], p. 13-48, 11 dez. 1952.
- FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. so de células de aedes albopictus c6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias toga viridae, flaviviridae, bunya viridae e rhabdoviridae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, p. 13-18, 18 jan. 1990.U
- GUBLER, D. J.; VASILAKIS, N.; MUSSO, D. **History and Emergence of Zika virus** journal of Infectious diseases oxford University Press, , 2017.
- HADDOW, A. D. Et al. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, fev. 2012.
- HASAN, S. S. Et al. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 13–20, 8 jan. 2018. KORN, J. Et al. Ultrastructural and immunohistological characterization of sirc corneal cell line. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, [S. L.], p. 923-930, 19 jun. 1990.

OLIVEIRA, M. I. Et al. Isolation of infectious Zika virus from a urine sample cultured in SIRC cells from a patient suspected of having rubella virus. **Journal of the sao paulo institute of tropical medicine**, [S. L.], p. 01-05, 7 fev. 2018.

REYNOLDS, E.S. **The use of lead citrate at high ph as an electron-opaque stain in electron microscopy**. J Cell Biology, 17:208,12. 1963.

SANTOS, N. S.; ROMANOS, M. V.; WIGG, M.D. **Virologia Humana**.3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2015.

SAMPATHKUMAR, P.; SANCHEZ, J. L. **Zika Virus in the Americas: A Review for clinicians**mayo Clinic proceedingselsevier Ltd, , 1 abr. 2016.

SIRC [Statens Seruminstitut Rabbit Cornea] CCL-60. The Global bioresource center ATCC, 2021. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/ccl-60>>

SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **Journal of Infectious Diseases** Oxford University Press, 2017.

VERO CCL-81. The Global bioresource center ATCC,2021. Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/ccl-81>>

WALKER, T. Et al. Mosquito cell lines: History, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2014.

ZANLUCA, C. Et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 9 jun. 2015.

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO NO ESTADO DE SÃO PAULO

Gabriel Berti¹; Bárbara Braga Ferreira Marta²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - NCQB – CLR IAL;

E-mail: gabriel-berti@hotmail.com

²Docente/pesquisador do Departamento/Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas – NCQB – CLR IAL.

Introdução: A água para consumo humano pode ser definida como aquela que não oferece riscos à saúde e que atende os padrões de potabilidade. Em 1992, foi criado o Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (PROÁGUA), responsável por monitorar os ensaios físicos químicos, organolépticos e microbiológicos, melhorando as condições sanitárias e fornecendo um consumo seguro para a população. **Objetivo:** Realizar um levantamento bibliográfico e avaliar os ensaios microbiológicos, físico-químicos e organolépticos das águas para consumo humano distribuídas no estado de São Paulo durante 2001 a 2021. **Metodologia:** Os dados foram coletados através de artigos publicados nas bases de dados PubMed, BVS – Biblioteca Virtual em Saúde, SciELO – Scientific Eletronic Library Online, Google Acadêmico, além de informações providas do site da CVS – Centro de Vigilância Sanitária nos últimos 20 anos. **Resultados:** Com relação às análises físico-químicas, dentre as amostras reprovadas, a maioria estava abaixo do valor mínimo permitido de 0,6 mg/L de fluoreto. Nas análises organolépticas destacou-se a região do Vale do Ribeira/SP em 2008-2010 com 2,1% e 2,2% de amostras insatisfatórias em relação à cor aparente e turbidez, respectivamente. A respeito das análises microbiológicas, a região de Embu-Guaçu/SP apresentou maiores índices de coliformes totais (33%) e a cidade de Carapicuíba/SP, maior prevalência de *E. coli* (0,8%). **Conclusão:** Considerando os resultados levantados, ressalta-se a importância do monitoramento da água através do PROÁGUA, visando à melhoria das condições sanitárias e um consumo seguro para a população.

Palavras-chave: água de abastecimento; água potável; controle de qualidade da água

INTRODUÇÃO

A água potável ou também chamada de água para consumo humano pode ser definida como aquela que não oferece riscos à saúde e que atende os padrões de potabilidade sejam eles físico-químicos, radioativos e microbiológicos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata que 80% das doenças em países em desenvolvimento são causadas devido à má qualidade da água, falta de saneamento básico e higiene pessoal, atingindo aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas no mundo no ano de 2008 (1;2;3).

Os principais microrganismos nocivos à saúde humana são transmitidos pela via fecal-oral, através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados, provocando doenças como a cólera, giardíase, diarreia aguda, amebíase, hepatites, shigelose, entre outras (4;5).

Em 1992, foi criado o Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (PROÁGUA), coordenado pelo Centro de Vigilância Sanitária (CVS) do estado de São Paulo, com objetivo principal da promoção e proteção da saúde da população através da potabilidade da água (6;7).

O PROÁGUA estabelece o monitoramento dos ensaios físicos químicos, organolépticos e microbiológicos. Dentre os ensaios físico-químicos destaca-se a análise de fluoreto, os organolépticos, turbidez e cor, e os ensaios microbiológicos a presença e ausência de coliformes totais e *Escherichia coli* (8;9).

A fluoretação da água potável é de extrema importância, pois em concentrações normais os íons de flúor agem na prevenção da cárie, porém, em concentrações elevadas o flúor pode causar a fluorose dentária (manchas escuras nos dentes) (10;11;12).

A coloração da água para consumo humano pode variar com a presença de matéria orgânica (substâncias húmicas e taninos) e metais (ferro e manganês) provenientes da decomposição do solo. Enquanto a mensuração da turbidez pode ser influenciada pela presença de cloro, manganês, zinco, ferro, areia e matérias orgânicas (13;14). Com relação às análises microbiológicas, as bactérias do grupo coliformes são consideradas indicadores da qualidade da água, sendo a *E. coli* a principal representante (15).

Sendo assim, é essencial que ocorra o monitoramento da água fornecida para a população a fim de evitar que ela se torne um transmissor de doenças, afetando a qualidade de vida, visando à melhoria das condições sanitárias e proporcionando um consumo seguro (16;17).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar um levantamento bibliográfico afim de avaliar os ensaios microbiológicos, físico-químicos e organolépticos das águas para consumo humano distribuídas no estado de São Paulo no período 2001 a 2021.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um referencial teórico cujos dados foram coletados através de artigos publicados nas bases de dados PubMed, BVS – Biblioteca Virtual em Saúde, SciELO – Scientific Eletronic Library Online, Google Acadêmico, além de informações providas do site da CVS – Centro de Vigilância Sanitária nos últimos 20 anos (2001-2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fluoretação da água para consumo humano é de extrema importância. Em uma pesquisa realizada nos municípios que fazem parte do Grupo de Vigilância Sanitária XV-Bauru/SP, entre janeiro de 2002 a junho de 2011, Stancari e colaboradores destacaram que das 8558 amostras analisadas para determinação de íons fluoreto, 5320 (62,2%) foram consideradas aprovadas, enquanto 3238 (37,8%) foram reprovadas. Ainda, a maioria das amostras condenadas apresentavam valores abaixo da concentração estabelecida pela legislação. Resultados semelhantes foram observados em 2016 na mesma região, onde 24,66% (256/1038) das amostras foram consideradas insatisfatórias, sendo 14,93% (155/1038) com concentração de flúor inferior e 9,73% (101/1038) acima do permitido pela legislação. Esses resultados apontaram que as principais dificuldades para manter o controle do flúor conforme a legislação podem estar relacionadas a: estreita faixa de aceitação da sua concentração, condições da estação de tratamento da água, bomba de dosagem, composto de flúor utilizado, falta de capacitação da equipe e de mão de obra especializada, ausência de infraestrutura adequada, falta de padronização do método utilizado, além da presença de fontes de água com elevada concentração de flúor, principalmente na região do estado de São Paulo (10;18).

Moimaz e colaboradores analisaram 1508 amostras de água no período de 2004 a 2012, nos municípios pertencentes a DRS II de Araçatuba/SP, dessas, 495 (32,8%) amostras relevaram resultados insatisfatórios para fluoreto. Dentre as dificuldades para controlar o teor de fluoreto nessa região, destacam-se as diferentes fontes de captação da água integrada ao sistema de abastecimento e suas diversas interligações na rede de abastecimento de água (19). Em outro estudo realizado na mesma região entre os anos de 2004 e 2016, foram observados que 49,06% (15940/32.488) das amostras apresentaram valores insatisfatórios, sendo 24,46% (7945) abaixo de 0,6mg/L e 24,60% (7995) acima de 0,8mg/L. Ressalta-se que a manutenção dos equipamentos, treinamento da equipe, recursos financeiros e a complexidade da rede de distribuição representam as principais dificuldades encontradas para manutenção do flúor (12).

Em 16 municípios da região de Araçatuba/SP, foi realizado análise de fluoreto em 3.929 amostras no período de 2012 a 2016. Dessas, 735 (18,71%) amostras estavam com valor inferior a 0,6mg/L e 501 (12,75%) com valor superior a 0,8mg/L. A variação da concentração do íon fluoreto pode ser decorrente da profundidade e da composição rochosa dos mananciais dessa região, bem como da diluição das águas do manancial proveniente da chuva (20).

Em um estudo realizado na Grande São Paulo entre os anos de 2007 e 2009 os níveis de fluoreto foram considerados impróprios em 12,8% (868/6778) das amostras analisadas, dessas 11,6% (787/6778) estavam abaixo do limite mínimo recomendado de 0,6 mg/L e 1,2% (81/6778) acima do valor máximo permitido de 0,8 mg/L (17). Esse trabalho corrobora com o realizado por Dovidauskas e seus colaboradores em 88 municípios da região nordeste do estado de São Paulo entre 2015 e 2016, onde 39,8% (1730/4347) das amostras foram reprovadas, sendo que 30,2% (1313/4347) apresentaram teor de fluoreto menor que 0,6 mg/L e 9,6% (417/4347) apresentaram valores acima de 0,8 mg/L (21).

Em relação aos aspectos organolépticos, um estudo realizado no Vale do Ribeira/SP, no período 2008-2010 observou que 2,2 % (28/1254) das amostras apresentaram turbidez acima do VMP e 2,1% (26/1254) de amostras apresentaram cor aparente acima do VMP. Além disso, o ferro estava presente em 6,1 % (77/1254), dessas, 27,27% (21/77) estavam com a cor e turbidez acima do padrão recomendado, revelando que a presença de ferro na água pode ser responsável por alterar esses parâmetros, sendo proveniente do encanamento enferrujado ou da própria natureza das rochas (22).

Na região nordeste do estado de São Paulo entre 2015 e 2016, 0,39% (17/4347) e 0,30% (13/4347) das amostras foram classificadas como insatisfatórias por apresentarem resultados acima do VMP de cor e turbidez, respectivamente (21). Resultados semelhantes foram observados na região de Bauru/SP em 2016, onde, 0,35% (10/2896) e 0,48% (14/2896) das amostras foram reprovadas, devido a cor e turbidez, respectivamente. O aumento da cor e turbidez da água é resultante da presença de metais, partículas em suspensão ou de matéria orgânica vinda através de resíduos industriais e domésticos (18).

Em relação às análises microbiológicas, Passos e colaboradores desenvolveram estudos na Baixada Santista/SP em 2011 e 2012, e observaram uma prevalência de 12% (425/3519) de coliformes totais e 0,6% (23/3519) de *E. coli*. (23). Em 2016 na região de Bauru 4,31% (125/2.897) das amostras apresentaram coliformes totais e 0,35% (10/2897) *Escherichia coli*, além disso, baixas concentrações de cloro residual livre foram observadas. Esses resultados são um reflexo da higiene das águas brutas e de seu processo de tratamento, relatando que existe uma correlação entre a incidência de coliformes com os baixos níveis de cloro residual livre e elevada turbidez (18).

Resultados parecidos foram encontrados nos municípios de Carapicuíba/SP e Embu-Guaçu/SP onde foram analisadas 240 e 169 amostras respectivamente no período de julho de 2017 a julho de 2018. Coliformes totais estavam presentes em 12% (29/240) e 33% (56/169) das amostras e *E. coli* em 0,8% (2/240) e 0,6% (1/169) em cada município. A presença desses resultados insatisfatórios pode estar relacionada com a manutenção da infraestrutura e do monitoramento da qualidade da água irregular (24). Em 88 municípios da região nordeste do Estado de São Paulo, 5,9% (256/4.347) das amostras analisadas foram positivas para coliformes totais e 0,7% (32/4.347) para *E. coli*. Os autores relataram um aumento de resultados positivos durante o período chuvoso devido ao transporte de contaminantes fecais em direção as áreas de captação das águas de abastecimento público (21).

CONCLUSÕES

Com relação às análises físico-químicas, dentre as amostras reprovadas, a maioria estava abaixo do valor mínimo permitido de 0,6 mg/L de fluoreto. Nas análises organolépticas destacou-se a região do Vale do Ribeira/SP em 2008-2010 com 2,1% e 2,2% de amostras insatisfatórias em relação à cor aparente e turbidez, respectivamente. A respeito das análises microbiológicas, a região de Embu-Guaçu/SP apresentou maiores índices de coliformes totais (33%) e a cidade de Carapicuíba/SP, maior prevalência de *E. coli* (0,8%).

Dito isso, ressalta-se a importância do monitoramento da água através do PROÁGUA, devendo este ser constante, visando à melhoria das condições sanitárias e um consumo seguro para a população.

REFERÊNCIAS

- 1.TAVARES, M.; VIEIRA, A.H.; ALONSO, A.C.B.; MELLO, A.R.P.; SOUSA, C.V.; GONZALEZ, E.; GONÇALVES, F.G.; ROXO, G.S.; SOUZA, R.L.; DUARTE, V.M.; PASCHOAL, R.C.; BARSOTTI, R.C.F.; PEREIRA, T.C.; SILVA, W.A. Avaliação físico-química e microbiológica de águas procedentes de soluções alternativas de abastecimento na Região Metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, Brasil. **Vigilância Sanitária em debate: Sociedade, Ciência e Tecnologia (Visa em Debate)**. 2017, v. 5, n. 1, pp. 97-105.
- 2.MEIRA, I.A.; SILVA, T.C.; FORTUNA, J.L. Pesquisa de coliformes na água de consumo das creches da rede municipal de ensino de Teixeira de Freitas, BA. **Higiene Alimentar**. 2018, v. 32, n. 278/279, pp. 92-96
- 3.FORTES, A.C.C.; BARROCAS, P.R.G.; KLIGERMAN, D.C. A vigilância da qualidade da água e o papel da informação na garantia do acesso. **Saúde em Debate**. 2019, v. 43, n. 3, pp. 20-34.
- 4.FREITAS, M.B.; BRILHANTE, O.M.; ALMEIDA, L.M. A importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Cadernos de Saúde Pública**. 2001, v. 17, n. 3, pp. 651-660.
- 5.AMARAL, L.A.; FILHO, A.N.; JUNIOR, O.D.R.; FERREIRA, F.L.A.; BARROS, L.S.S. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista de Saúde Pública**. 2003, v. 37, n. 4, pp. 510-514.
- 6.TAVARES, M.; PASSOS, E.C.; BARSOTTI, R.C.F.; GONZALEZ, E.; MELLO, A.R.P.; SOUSA, C.V.; ALONSO, A.C.B.; SILVA, M.L.P.; JORGE, L.I.F.; DAL RI, E.S., CUNHA, T.H.; SILVA, T.C.; BRAGA, L.S.; ARAÚJO, A.L.M. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química da água para consumo humano na região metropolitana da Baixada Santista, estado de São Paulo, no biênio 2009-2010. **Boletim Epidemiológico do Instituto Adolfo Lutz**. 2011, v. 21, n. 2, pp. 53-55.
- 7.CVS - Centro de Vigilância Sanitária. **Água para consumo humano – PROÁGUA**. Acesso em 30 de agosto de 2021. Disponível em: http://www.cvs.saude.sp.gov.br/prog_det.asp?te_codigo=13&pr_codigo=13%20. [Acesso em: 31 de agosto de 2021].
- 8.TAVARES, D.S.; ALONSO, A.C.B.; MELLO, A.R.P.; SOUSA, C.V.; GONZALEZ, E.; PASSOS, E.C.; PIMENTEL, F.C.; SILVA, M.L.P.; TAVARES, M.; BARSOTTI, R.C.F. Qualidade da água de bicas localizadas nos municípios de Santos e São Vicente, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 2009, v. 68, n. 2, pp. 237-244.
- 9.BRASIL. Portaria GM/MS nº 888 de 04 de maio de 2021. Ministério da Saúde. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**. 07 de maio, 2021.
- 10.STANCARI, R.C.A.; JÚNIOR, F.L.D.; FREDDI, F.G. Avaliação do processo de fluoretação da água de abastecimento público nos municípios pertencentes ao Grupo de Vigilância Sanitária XV-Bauru, no período de 2002 a 2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. 2014, v. 23, n. 2, pp. 239-248.
- 11.SILVA, L.J.; LOPES, L.G.; AMARAL, L.A. Qualidade da água de abastecimento público do município de Jaboticabal, SP. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. 2016, v. 21, n. 3, pp. 615-622.

- 12.MOIMAZ, S.A.S.; SANTOS, L.F.P.; SALIBA, T.A.; SALIBA, N.A.; SALIBA, O. Vigilância em saúde: fluoretação das águas de abastecimento público em 40 municípios do estado de São Paulo, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**. 2020, v. 25, n. 7, pp. 2653-2662.
- 13.BRASIL - Ministério da Saúde. Manual Prático de Análise de Água. **FUNASA - Fundação Nacional de Saúde**. Ed. 4. Brasília, 2013.
- 14.WHO - World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality**. Fourth Edition, Incorporating the First Addendum. 2017, ed. 4, Geneva.
- 15.GALLOTTI, A.M.; JÚNIOR, H.F.M.; GASPARG, A. Evaluation of water quality and sanitation of reservoirs used in field activities of a military unit in the state of Rio de Janeiro. **Revista Ambiente & Água**. 2020, v. 15 n. 4.
- 16.SOUTO, J.P.; LIRA, A.G.S.; FIGUEIRA, J.S.; SILVA, A.N.; SILVA, E.S. POLUIÇÃO FECAL DA ÁGUA: MICROORGANISMOS INDICADORES. VI Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental Porto Alegre/RS – 23 a 26/11/2015. IBEAS – **Instituto Brasileiro de Estudos Ambientais**. 2015.
- 17.SCORSARFAVA, M.A.; SOUZA, A.; SAKUMA, H.; STOFER, M.; NUNES, C.A.; MILANEZ, T.V. Avaliação da qualidade da água de abastecimento no período de 2007-2009. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 2011, v. 70, n. 3, pp. 395-403.
- 18.PALMEIRA, A.R.O.A.; SILVA, V.A.T.H.; JUNIOR, F.L.D.; STANCARI, R.C.A.; NASCENTES, G.A.N. Physicochemical and microbiological quality of the public water supply in 38 cities from the midwest region of the State of São Paulo, Brazil. **Water Environment Research**. 2019, v. 91, pp. 805–812.
- 19.MOIMAZ, S.A.S.; SALIBA, O.; GARBIN, C.A.S.; GARBIN, A.J.L.; SUMIDA, D.H.; CHIBA, F.Y.; CORRÊA, M.V.; SALIBA, N.A. Fluoretação das águas de abastecimento público no município de Araçatuba/SP. **Revista Odontológica de Araçatuba**. 2012, v. 33, n. 1, p. 54-60.
- 20.MICHELIN, A.F.; SANTOS, A.F.; DONÁ, A.R.; BRONHARO, T.M.; DARÉ, F.; MARTA, B.B.F.; SANTOS, M.V. Teor de fluoreto em água para abastecimento público em municípios da região de Araçatuba/SP. **Journal of the Health Sciences Institute (JHSI) – Revista do Instituto de Ciências da Saúde**. 2018, v. 36, n. 4, pp. 270-274.
- 21.DOVIDAUSKAS, S.; OKADA, I.S.; IHA, M.H.; CAVALLINI, A.G.; OKADA, M.M.; BRIGANTI, R.C.; BERGAMINI, A.M.M.; OLIVEIRA, M.A. Mapeamento da qualidade da água de abastecimento público no nordeste do estado de São Paulo (Brasil). **Vigilância Sanitária em debate: Sociedade, Ciência e Tecnologia (Visa em Debate)**. 2017, v. 5, n. 2, pp. 53-63.
- 22.SCORSARFAVA, M.A.; SOUZA, A.; STOFER, M.; NUNES, C.A.; MILANEZ, T.V. Qualidade físico-química da água de abastecimento da região do Vale do Ribeira-SP, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. 2013, v. 72, n. 1, pp. 81-6.
- 23.PASSOS, E.C.; MELLO, A.R.P.; SOUSA, C.V.; SOUZA, C.F.; OLIVEIRA, M.K.S.; GONÇALVES, F.G.; FREITAS, A.L.S.; PEREIRA, T.C. Qualidade microbiológica da água para consumo humano na Região Metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, no biênio 2011-2012. **Boletim Instituto Adolfo Lutz**. 2014, v.24, n. 1, pp. 42-43.
- 24.SPECIAN, A.M.; SPECIAN, A.M.P.; NASCIMENTO, A.L.; COL, R.D; DAROS, V.S.M.G.; MATTOS, E.C.; SILVA, V.R. Ocorrência de bactérias heterotróficas, coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de água de abastecimento público de dois municípios do Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista –BEPA**. 2021, v. 18, n. 205, pp. 13-22.

PERFIL DE VIRULÊNCIA DE *Salmonella* spp. PROVENIENTES DE PRODUTOS CÁRNEOS E ÁGUA

Michelle de Sousa Santos¹; Christiane Asturiano Ristori²; Cecília Geraldine Martins²; Ruth Estela Gravato Rowlands²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – IAL Central; E-mail: michellessanto88@gmail.com

² Pesquisadora do Núcleo de Microbiologia do Instituto Adolfo Lutz

Resumo: Mundialmente, *Salmonella* é o agente etiológico mais comumente envolvido em casos e surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. A doença caracteriza-se por infecção gastrointestinal, mas pode evoluir para infecção sistêmica dependendo da dose infectante, do sorotipo, dos fatores de virulência expressos e da imunidade do hospedeiro. O ciclo de infecção do patógeno envolve as etapas de adesão, invasão e multiplicação intracelular, produção de toxinas e escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro, mediados por proteínas codificadas por genes de virulência presentes no cromossomo, em regiões denominadas ilhas de patogenicidade, e em grandes plasmídeos de virulência. O presente estudo teve como objetivo realizar a pesquisa dos genes de virulência *invA*, *spvC*, *pefA*, *sefA*, *fliC* em 32 cepas de *Salmonella* spp. provenientes de alimentos e água, e confirmar a identificação das cepas de Enteritidis pela pesquisa do gene *sdfl*. O gene *invA* foi detectado em todas as cepas de *Salmonella*. Com relação aos demais genes estudados, *spvC* e *sefA* foram encontrados em 12,5% das cepas e apenas em *S. Enteritidis*. O gene *pefA* foi detectado em 15,6% das cepas e o *fliC* em 34,4%, com maior prevalência em *S. Typhimurium* e sua variante monofásica *S. I 4[5],12:i:-*. Todas as cepas de *S. Enteritidis* foram positivas para o gene *sdfl*. Os resultados demonstram o potencial patogênico de *Salmonella* provenientes de produtos cárneos e água, e reforçam a importância do monitoramento e caracterização de patógenos para prevenir e diminuir os riscos à saúde do consumidor.

Palavras-chave: Água; Genes de virulência; Ilhas de patogenicidade; Produtos cárneos; *Salmonella*

INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) representam um crescente e relevante problema de saúde pública (KLINGBEIL; TOOD, 2019). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mundialmente, 1,9 bilhões de pessoas apresentaram doenças diarreicas, com 750,000 óbitos ao ano. Aproximadamente um terço dessas infecções é transmitido por alimentos (WHO, 2016).

Salmonella spp. é considerada um dos patógenos que mais causam surtos de DTA (CDC, 2021; EFSA, 2021). O micro-organismo é responsável por 180 milhões de doenças diarreicas que ocorrem globalmente a cada ano (WHO, 2016). Os animais representam uma importante fonte do micro-organismo, sendo, frequentemente, encontrado em produtos de origem animal como carne bovina, suína, pescados, ovos e outros produtos avícolas (QUAN et al., 2019). Nos últimos anos, houve aumento nos casos de DTA pelo patógeno envolvendo outros alimentos como vegetais e especiarias (WADAMORI et al.,

2017). A ocorrência de *Salmonella* spp. em água e seu envolvimento em surtos de doenças de veiculação hídrica também têm sido descritos (MURPHY et al., 2017). Em humanos, as salmonelas podem causar três síndromes: febre tifoide, febre paratifoide e salmonelose (BRENNER et al., 2000). A salmonelose, doença zoonótica de grande importância em Saúde Pública (USDA, 2020), é a forma clínica mais comum e está associada ao consumo de alimentos e água contaminados (LIU et al., 2016).

Para a infecção e colonização do hospedeiro, após ingestão do micro-organismo, ocorre a invasão dos enterócitos e células M no epitélio intestinal e, ao atravessar a camada epitelial, alcançam a lâmina própria, onde são fagocitadas por macrófagos, resultando em resposta inflamatória (HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001). O processo de invasão e colonização das células do hospedeiro é determinado pela expressão de genes, presentes em plasmídeos e/ou ilhas de patogenicidade, que codificam fatores de virulência como toxinas, fímbrias, cápsulas e flagelos (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

A adesão às células do hospedeiro é uma das primeiras etapas relacionadas à patogenicidade do micro-organismo, na qual as fímbrias exercem um papel de extrema importância (WILSON et al., 2000). O operon *sef* localizado em uma pequena ilha de patogenicidade é composto por quatro genes estruturais (*sefABCD*), necessários para translocação e biogênese das fímbrias SEF14, cuja função está relacionada com as etapas de infecção posteriores a colonização do epitélio intestinal do hospedeiro (EDWARDS; SCHIFFERLI; MALOY, 2000). A fímbria Pef é codificada pelo operon *pef* (*pefABCD*), presente em um plasmídeo de virulência, e está envolvida na adesão do epitélio intestinal e secreção de fluídos (BLAÜMLER et al., 1997).

A maioria dos genes de virulência está localizada em regiões distribuídas ao longo do cromossomo, denominadas ilhas de patogenicidades (SPI). Na SPI-1 está localizado o gene *invA*, fundamental para invasão dos tecidos do hospedeiro. Além dos fatores de virulência associados com as ilhas de patogenicidade de *Salmonella*, alguns podem ser encontrados em plasmídeos (MARCUS et al., 2000). O operon *spv* abriga cinco genes designados *spvRABCD*. A expressão dos genes *spv* desempenha papel na multiplicação intracelular de *Salmonella*, importante para disseminação e virulência do patógeno (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

Os flagelos são fatores importantes no mecanismo de virulência de muitas espécies bacterianas. Em *Salmonella*, duas fases antigênica são expressas, o gene *fliC* codifica a primeira fase, enquanto o gene *fljB* codifica a segunda fase (PARKHILL et al., 2001).

O gene *sdf1*, localizado no cromossomo, é utilizado como marcador para detecção de *Salmonella* Enteritidis, pois é o único sorotipo que possui esse gene (AGRON et al., 2001). Nos últimos anos, a análise de genes de virulência e seu envolvimento nos mecanismos de patogenicidade foram introduzidos como ferramenta para caracterizar isolados de *Salmonella*, gerando informações sobre o potencial patogênico do micro-organismo e contribuindo para ampliar os conhecimentos sobre as cepas em circulação no país e sua epidemiologia. Assim, considerando a ampla distribuição de *Salmonella* e sua relevância para Saúde Pública, como um dos principais agentes patogênicos envolvidos em doenças de transmissão hídrica e alimentar no Brasil, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil de virulência de cepas de *Salmonella* isoladas de alimentos e água.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 27 cepas isoladas de produtos cárneos crus e refrigerados (coxa de frango e linguiça suína), comercializados na cidade de São Paulo e 5 provenientes de amostras de água envolvidas em surtos, analisadas pelo Núcleo de Microbiologia do Instituto Adolfo Lutz Central. A pesquisa dos genes de virulência *invA*, *spvC* e *sefA* foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex e dos genes *pefA*, *fliC* e *sdfII* por PCR simplex. Como controle positivo foram utilizadas as cepas de referência *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e como controle negativo água destilada ultrapura livre de DNase/RNase. Para extração do DNA genômico, as cepas foram reativadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 35° C por 24 horas e, em seguida, semeadas em ágar BHI. Após incubação, a 35° C por 24 horas, foi realizada uma suspensão bacteriana, adicionando-se 2 a 3 colônias da cultura em 80 µL de solução fisiológica 0,85%. Após homogeneização em vórtex, a mistura foi submetida à fervura em termobloco por 15 minutos. As suspensões foram homogeneizadas e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min. As reações de PCR para detecção dos genes de virulência foram realizadas a partir de uma solução contendo 2 µL de DNA; 12,5 µL de GoTaq® e 1,5 mM MgCl₂ dos *primers* nas concentrações de 10 pmoles e água livre de DNase/RNase para um volume final de reação de 25 µL. As amplificações foram realizadas em termociclador. Os produtos gerados na PCR foram analisados em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 1x (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de-EDTA), contendo brometo de etídio a 0,5 µg/mL. Um volume de 8 µL do produto amplificado foi aplicado no gel de agarose e submetido à eletroforese, em cuba horizontal, em tampão TBE (Apelex, França®) a 100 Volts por 1 h. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 bp. Após a corrida, o gel foi visualizado sob transiluminação UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene de virulência *invA*, responsável pela invasão das células epiteliais do hospedeiro, foi identificado em todas as cepas de *Salmonella*. Esses resultados corroboram com diversos estudos que detectaram o gene em 100% das cepas provenientes de fontes diversas (THUNG et al., 2018). A alta frequência observada entre os isolados sugere que o gene é conservado no gênero *Salmonella*, sendo comumente utilizado como marcador para detecção do patógeno (MKANGARA et al., 2020).

Os genes *sefA* e *spvC* foram identificados em 12,5% (4/32) das cepas e somente em *S. Enteritidis* (100%). Com relação ao *sefA*, o resultado era esperado, uma vez que os genes do operon *sef* (*sefABCD*) são restritos aos sorotipos do sorogrupo D (MENDONÇA et al. 2020).

O gene *spvC* está localizado em plasmídeos de virulência presentes em determinados sorotipos (CHU; CHIU, 2006; LIU et al., 2009). Fardsanei et al. (2017) detectaram o gene *spvC* em 100% das 34 cepas isoladas de produtos cárneos e ovos. Assim como o gene *spvC*, o *pefA* também está localizado em plasmídeos de virulência, sendo a sua presença limitada a determinados sorotipos (SKYBERG et al., 2006). O gene *pefA* foi detectado em 15,6% (5/32) das cepas, estando presente em *S. Enteritidis* e *S. Infantis*. Resultados similares foram descritos por Thung et al. (2018) que verificaram 13% das cepas, isoladas de carne bovina, positivas para o gene *pefA*. Os genes *spvC* e *pefA* podem estar presentes simultaneamente ou não no plasmídeo (AMMAR et al., 2016). No presente estudo, as cepas de *S. Enteritidis* apresentaram ambos os genes. Alguns estudos relataram sorotipos de *Salmonella* negativos para o *pefA*, apesar de possuírem plasmídeos de virulência (ELHARIRI et al., 2020).

Embora diferentes genes atuem na formação de flagelos em *Salmonella*, o *fliC* é o mais conservado e amplamente distribuído entre os sorotipos (VILELA et al., 2020). No presente estudo, o gene foi detectado em 34,4 % (11/32) das cepas, com maior ocorrência em *S. Typhimurium* (8/9) e sua variante monofásica (3/3). O gene também foi detectado em uma cepa de *S. Infantis*.

A pesquisa do gene *sdfI* foi realizada para confirmação molecular do sorotipo Enteritidis. A presença exclusiva deste gene em *S. Enteritidis* foi confirmada por Agron et al. (2001) que empregou a técnica de hibridização subtrativa supressiva para isolar fragmentos de DNA presentes nesse sorotipo e ausentes em outras bactérias.

Dentre os sorotipos descritos na subespécie *enterica*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* destacam-se como os mais frequentemente isolados de fontes diversas e comumente envolvidos em surtos de DTA (EFSA, 2021; FDA, 2021). A ampla distribuição de genes de virulência observada nesses sorotipos, no presente estudo e em outros reportados na literatura (THUNG et al. 2018), demonstram o potencial patogênico dos mesmos. No entanto, vale ressaltar que a patogenicidade de *Salmonella* é complexa e outros mecanismos de virulência estão envolvidos na expressão e codificação dos genes de virulência, além dos pesquisados no presente estudo.

CONCLUSÕES

No presente estudo, genes importantes para a virulência e patogenicidade de *Salmonella* foram detectados em cepas isoladas de água e produtos cárneos crus e refrigerados. Os genes de virulência *invA*, *spvC*, *pefA* e *sefA* apresentaram ampla distribuição entre as cepas de *S. Enteritidis*, enquanto o gene *fliC* foi encontrado na maioria das cepas de *S. Typhimurium* e *S. I 4[5],12:i:-*, sendo estes os sorotipos de maior relevância em surtos de DTA, mundialmente. Os resultados demonstram o potencial patogênico de *Salmonella* provenientes de produtos cárneos e água, e reforça a importância do monitoramento e caracterização de patógenos, causadores de doenças em humanos, para prevenir e diminuir os riscos à saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

1. KLINGBEIL, D.; TODD, E. Prevention and Control of Foodborne Diseases in Middle-East North African Countries: Review of National Control Systems. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2019.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO]. Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: **Foodborne Disease Burden Epidemiology Group 2007-2015**. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1>. Acesso 25 nov. 2021
3. SCHARFF, R. Food Attribution and Economic Cost Estimates for Meat- and Poultry-Related Illnesses. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 6, p. 959–967, 2020.
4. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC] (2021). **Reports of Selected Salmonella Outbreak Investigations**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks.html>>. Acesso em: 01 out.2021.

5. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY [EFSA]. **The European Union One Health 2019 Zoonoses Report**. Disponível em:
<<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>>. Acesso em: 15 nov. 2021.
6. QUAN, G. et al. Fimbriae and related receptors for Salmonella Enteritidis. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 357-362, 2019.
7. FOOD & DRUG [FDA - USA]. **Outbreak Investigation of Salmonella Typhimurium: BrightFarms Packaged Salad Greens**, 2021. Disponível em:
<<https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/outbreak-investigation-salmonella-typhimurium-brightfarms-packaged-salad-greens-july-2021>>. Acesso em: 10 dez. 2021.
8. WADAMORI, Y.; GOONERATNE, R.; HUSSAIN, M. Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. **j sci Food Agric**, 2017.
9. MURPHY, J. et al. Environmental Survey of Drinking Water Sources in Kampala, Uganda, during a Typhoid Fever Outbreak. **American Society for Microbiology**, v. 83, 2017.
10. BRENNER, D. et al. Salmonella Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2465-2467, 2000.
11. FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE [USDA] (2020). **Reports of Salmonella Action Plan: A One and Two Year Update**, Disponível em:
<<https://www.fsis.usda.gov/science-data/data-setsvisualizations/microbiology/microbiological-testing-program-rte-meat-and-6>>. Acesso em: 21 out. 2021.
12. LIU, L. et al. Salmonella Typhimurium outbreak associated with a contaminated food container in a school in Sichuan Province, China. **Epidemiol. Infect.**, v. 144, p. 285-290, 2016.
13. HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. Salmonella pathogenicity islands encoding typeIII secretion systems. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 549-559, 2001.
14. VAN ASTEN, A.; VAN DIJK, J. Distribution of “classic” virulence factors among Salmonella spp. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 44, 2005.
15. WILSON, R.; ELTHON, J et al. Salmonella enterica serovars Gallinarum and Pullorum expressing Salmonella enterica serovar Typhimurium Type 1 fimbriae exhibit increased invasiveness for mammalian cells. **Infection and Immunity**, v. 68 p. 4782-4785, 2000.
16. EDWARDS, R.; SCHIFFERLI, D.; MALOY, S. A role for Salmonella fimbriae in intraperitoneal infections. **PNAS**, v. 97, p. 1258-1262, 2000. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.1258>>. Acesso em: 13 nov. 2021.

17. BLAUMLER, A. et al. Contribution of Horizontal Gene Transfer and Deletion Events to Development of Distinctive Patterns of Fimbrial Operons during Evolution of Salmonella Serotypes. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 317–322, 1997.
18. MARCUS, S. et al. Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, v. 2, p. 145–156, 2000.
19. PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; BARRELL, B. Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi CT18. **Nature**, 2001.
20. AGRON, P et al. Identification by Subtractive Hybridization of Sequences Specific for Salmonella enterica Serovar Enteritidis. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4984–4991, 2001.
21. THUNG, T. et al. Prevalence, Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of Salmonella Serovars from Retail Beef in Selangor, Malaysia. **Frontiers in Microbiology**, 2018.
22. MKANGARA, M.; MBEGA, E.; CHACHA, M. Molecular identification of Salmonella Typhimurium from village chickens based on invA and spvC genes. **Veterinary World**, 2020.
23. MENDONÇA, E. et al. Characteristics of virulence, resistance and genetic diversity of strains of Salmonella Infantis isolated from broiler chicken in Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research**, v. 40, p. 29-38, 2020.
24. CHU, C.; CHIU, C. Evolution of the virulence plasmids of non-typhoid Salmonella and its association with antimicrobial resistance. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1931-1936, 2006.
25. LIU, W. et al. Salmonella paratyphi C: Genetic Divergence from Salmonella choleraesuis and Pathogenic Convergence with Salmonella typhi. **University of Liverpool**, v.4, 2009.
26. SKYBERG, J.; LOGUE, C.; NOLAN, L. Virulence Genotyping of Salmonella spp. with Multiplex PCR, **Avian Diseases**, 2006.
24. FARDSANEI, F. et al. Genetic diversity and virulence genes of Salmonella enterica subspecies enterica serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, pg. 451-456, 2017.
28. AMMAR, A. et al. Virulence genotypes of clinical Salmonella Serovars from broilers in Egypt. **JIDC The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, p. 337-346, 2016.
29. ELHARIRI, M. et al. Virulence and Antibiotic Resistance Patterns of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Salmonella enterica serovar Heidelberg Isolated from Broiler Chickens and Poultry Workers: A Potential Hazard. **Foodborne Pathogens and disease**, v. 17, 2020.

30. VILELA, F. et al. Virulence traits and expression of *bstA*, *fliC* and *sopE2* in *Salmonella* Dublin strains isolated from humans and animals in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 80, 2020.

LEISHMANIOSE VISCERAL EM MUNICÍPIOS PRIORITÁRIOS DA REGIÃO DE SAÚDE DE PRESIDENTE PRUDENTE/SP E O IMPACTO DA PANDEMIA DE COVID- 19

Gabriela Sumico Afonso Hanamoto ¹; Mayla Lopes Beneti ¹, Caroline Lucio
Moreira ²; Lourdes Aparecida Zampieri D'Andrea ³

¹Estudante Curso de Especialização Vigilância Laboratorial em Saúde Pública do Centro de Laboratório Regional - Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente - CRPP - Email: gabi.hanamoto@gmail.com

²Biomédica, mestre Microbiologia - Universidade Estadual de Londrina (UEL), bolsista FÉDIAL - CRPP

³Docente/pesquisador Centro de Laboratório Regional - Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente - CRPP

Resumo: Leishmaniose visceral (LV) é uma doença zoonótica de importância em Saúde Pública no Brasil. O Ministério da Saúde (MS) estabeleceu diretrizes para elaboração do plano de ação de combate a LV em municípios prioritários. Objetivo do estudo foi avaliar o impacto das medidas de controle da pandemia de Covid-19 sobre o plano de ação de LV e o monitoramento da realização de atividades em municípios prioritários da região de saúde de Presidente Prudente– SP. O estudo compreendeu os municípios de Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio no período de janeiro de 2018 a setembro de 2021. Dados de LV humana foram fornecidos pelo Centro de Vigilância Estadual (CVE) e secretarias municipais de saúde, LV canina (LVC) no Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (SIGH) e Centro de Controle de Zoonoses (CCZs) municipais e os indicadores de monitoramento pelos serviços de vigilância em saúde municipais. Impacto da pandemia de Covid-19 em 2020 e 2021 foram avaliados pela efetividade na razão entre quantitativo de teste rápido - Dual Path Platform (TR-DPP) BioManguinhos® LVC recebido pelo programado em comparação à média do triênio 2017-2019. Dados parciais demonstraram que as ações de vigilância e controle da LV realizada nos municípios prioritários têm-se mostrado efetivas nos municípios de Dracena, Junqueirópolis e Panorama, mas em Presidente Epitácio não. Eixo comunicação e educação foi impactado pela pandemia nos anos de 2020 e 2021 nos municípios de Dracena, Panorama e Presidente Epitácio. Impacto da pandemia de Covid-19 nos anos de 2020 e 2021 foi evidenciado em três dos quatro municípios monitorados para o cumprimento da meta que é reduzir a incidência da LV em 50% até os anos de 2022.

Palavras-chave: Covid-19; leishmaniose visceral; monitoramento; plano de ação

INTRODUÇÃO

A LV é acometida pelo protozoário do gênero *Leishmania*, da espécie *infantum* (sinônimo *L. infantum chagasi*), parasita intracelular obrigatório (ABRANTES *et al.*, 2018). A transmissão ocorre através dos flebotomíneos, sendo o *Lutzomyia longipalpis* o principal vetor no Brasil (BRASIL, 2021). Os cães domésticos (*Canis familiaris*) são os principais reservatórios para a doença humana nas áreas urbanas e tem um grande papel na epidemiologia da doença (BRASIL, 2021). Segundo o MS o Programa de Vigilância e Controle da LV (PVCLV), está centrado em ações de diagnóstico e tratamento precoce dos indivíduos infectados, na identificação e recolhimento dos cães

soropositivos para LVC, no controle do vetor e educação da população (ZUBEN; DONALÍSIO, 2016). Em janeiro de 2020, um novo agente viral da família Coronaviridae (Cov), intitulado como Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) foi classificado como Coronavirus Disease 2019 (Covid-19), responsável por causar uma pneumonia viral (LIMA KUBO *et al.*, 2020). Tornou-se uma emergência em Saúde Pública mundial em 2020 foi considerada pandemia (OLIVEIRA, 2020). As medidas restritivas adotadas a fim de combater o vírus, o uso de máscara e isolamento social, afetaram também as doenças negligenciadas; leishmaniose, hepatites entre outras (MORI, 2021). Apesar da existência de importantes zoonoses, as medidas de controle de transmissão da Covid-19 tornaram-se prioridade, sobrecarregando os serviços públicos de saúde (LIMA KUBO *et al.*, 2020).

Na Rede Regional de Atenção à Saúde (RRAS) 11 de Presidente Prudente, Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE) XXII de Presidente Venceslau e, área de abrangência de atendimento do Centro de Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente (CRPP), quatro municípios (Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio) foram classificados como prioritários para as ações de vigilância e controle da LV, tendo como base a média de número de casos de LV humana (LVH) no triênio 2015-2017, dentre os 14 elencados do Estado de São Paulo (ESP). As ações estratégicas têm sido monitoradas desde janeiro de 2018, através da execução do “plano de ação”, elaborado pela Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), compactuado com o MS, cujo objetivo é reduzir a incidência e a letalidade da LV em 50% até o ano de 2022 (OPAS, 2016). O objetivo do estudo foi avaliar o impacto das medidas de controle da pandemia de Covid-19 sobre o plano de ação de LV e o monitoramento da realização das atividades nos quatro municípios prioritários da região de saúde de Presidente Prudente/SP para o cumprimento da meta que é reduzir a incidência e a letalidade da LV em 50% até o ano de 2022.

MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo compreendeu os municípios de Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio, todos pertencentes ao GVE XXII de Presidente Venceslau, RRAS 11 de Presidente Prudente e área de abrangência de atendimento do CRPP. Período de estudo foi de janeiro de 2018 a setembro de 2021. Dados de casos e óbitos de LVH foram obtidos no Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE/SES-SP e nas secretarias municipais de saúde dos municípios de estudo. Os dados de LVC foram obtidos no SIGH, CRPP, boletins informativos que constam resultados do teste confirmatório ELISA dos cães triados com TR DPP reagentes no CCZ ou Serviços de Zoonoses (SZ) e de relatórios online informados mensalmente pelos municípios. Foi utilizado o software Excel 2016 para confecção de planilhas. Análise estatística utilizada foi a descritiva e o cálculo da prevalência de anticorpos para *Leishmania sp.* foi realizada com base no número total de animais testados e sororreagentes (STEEL; TORRIE, 1960). Os dados de manejo ambiental e borrifação; eixo de vigilância epidemiológica e assistência médica; eixo de comunicação e educação foram obtidos na planilha de indicadores e monitoramento, apresentados em porcentagem (%) de acordo com a meta atingida comparada com a programação anual das atividades do plano de ação no combate a LV, fornecidos pelos responsáveis dos serviços de vigilância em saúde de cada município de estudo. O impacto da pandemia de Covid-19 foi obtido com o cálculo da efetividade da distribuição do TR DPP BioManguinhos® LVC para inquérito canino com base na razão entre o número de testes recebido pelo programado.

Os dados utilizados para comparação da efetividade foi a média do triênio completo (2017-2019) para a média anual de 2020 e do triênio de janeiro a setembro (2017-2019) para a média de janeiro a setembro de 2020 e 2021, respectivamente. O estudo obedece aos aspectos éticos e legais da pesquisa, fazem parte de resultados parciais obtidos com o protocolo avaliado e aprovado pelo Comitê Técnico Científico (CTC) do IAL – CTC 49L/2019 de 21/02/2020 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAL – CEPAL, CAAE: 30367620.2.0000.0059, parecer N°. 3975.808 de 16/04/2020.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A LV encontra-se em expansão no território paulista, vêm-se disseminado pelo Oeste do ESP e nos municípios pertencentes a RRAS 11 de Presidente Prudente, observa-se a circulação com distintos padrões de dispersão, destacando-se como importante área endêmica (D'ANDREA, 2017). Na Figura 01 encontra-se a distribuição da média de casos de LVH, segundo a estratificação trienal base 2016-2018, 2017-2019 e 2018-2020 nos quatros municípios de estudo. Observou-se redução na média de casos de LVH em Dracena de 5,3%-5,6% para 3% e um (1) óbito em 2020; Junqueirópolis de 1% para 0,3% e 0,6% e um (1) óbito em 2018; Panorama de 3,3% para 2% e se manteve nos dois últimos triênios com um (1) em 2020. Já Presidente Epitácio registrou aumento constante na média de casos nos triênios de 6,3% para 9,3% e 10,33% e notificou um (1) óbito em 2020. Resultados inferiores ao encontrado por Beneti (2020) ao avaliar o primeiro ano do plano de ação do município de Dracena, Junqueirópolis e Panorama e resultados superiores no município de Presidente Epitácio. As ações de vigilância e controle da LV nos municípios prioritários monitorados têm-se mostrado efetiva em Dracena, Junqueirópolis e Panorama. Porém, em Presidente Epitácio não. Reuniões técnicas e capacitações foram realizadas com os profissionais municipais durante os anos de estudo com o intuito de melhorar os indicadores monitorados.

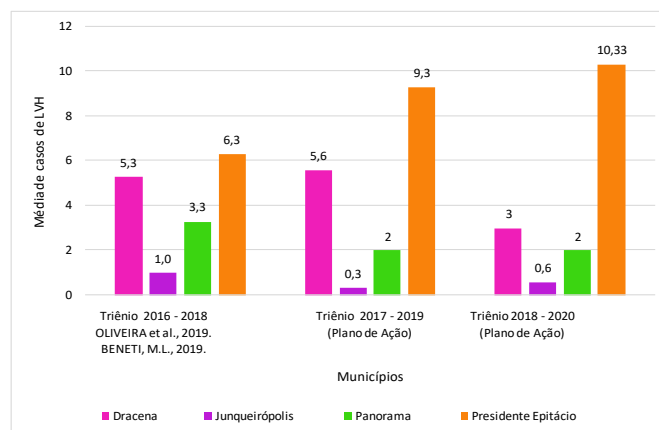


Figura 1- Distribuição da média de casos de LVH, segundo a estratificação trienal 2016-2018, 2017-2019 e 2018-2020 nos quatros municípios em estudo, pertencentes à GVE XXII de Presidente Venceslau – RRAS 11 de Presidente Prudente. Fonte: OLIVEIRA et al., 2019, BENETI, M.L., 2019. Plano de ação: CVE/SES-SP e secretarias municipais de saúde. Elaborado pela autora, 2021.

A avaliação das ações de vigilância e controle do plano de ação no controle da LV realizadas entre janeiro de 2018 a setembro de 2021 demonstrando o percentual da meta atingida em relação a meta pactuada avaliada nos eixos de manejo ambiental; borrifação; vigilância epidemiológica e assistência médica; comunicação e educação nos quatros municípios de estudo encontra-se na Figura 2. Em Dracena as ações em relação ao manejo ambiental apresentaram respectivamente 100%, 80%, 50% e 50%; as

atividades dos últimos anos (2020-2021) foram impactadas pela pandemia de Covid-19 com redução de 30 a 50% quando comparada aos anos anteriores. O mesmo aconteceu nas atividades do eixo de comunicação e educação em 2020 em Dracena, apresentando uma queda de 50% e em 2021 de 28%. Já a borrifação por sua vez, foi 0%, 25%, 75% e 0%, respectivamente, embora em 2018 tenha notificado dois (2) casos de LVH e em 2021 não foi feita, mas não registrou casos. A pandemia não afetou as atividades de manejo ambiental em Junqueirópolis, onde apresentaram uma melhora com passar dos anos, respectivamente 50%, 60%, 60% e 75%. A borrifação só foi realizada 100% em 2018, nos demais anos de estudo não. Porém, nos anos de 2020 e 2021 apresentaram um (1) caso de LHV em cada ano. No eixo de comunicação e educação as atividades foram 100%, 70%, 70% e 120% respectivamente. Não está evidente se a pandemia de Covid-19 impactou nos serviços de alguma forma. Mas, observa-se uma melhora significativa em 2021. Em Panorama em relação ao manejo ambiental, pode-se observar uma melhora gradual com o passar dos anos nessa ação, com 75%, 82%, 82% e 97% respectivamente. Na Figura 2 está demonstrado que a pandemia de Covid-19 impactou nas ações de borrifação em 2020 com apenas 67%, embora tenha notificado três (3) casos de LVH e no eixo comunicação e educação, houve queda nas ações de 100%, 95%, 79% e 76% respectivamente. Em Presidente Epitácio, nas atividades de manejo ambiental foram impactadas pela pandemia nos anos de 2020 (81%) e 2021 (95%) e no eixo de comunicação e educação também, pois conseguiram realizar apenas 60% das atividades em 2020 e 2021. Em relação à borrifação, apresentaram índices muito baixos 35%, 43%, 33% e 40% respectivamente, embora tenham registrado casos de LVH em todos os anos de estudo.

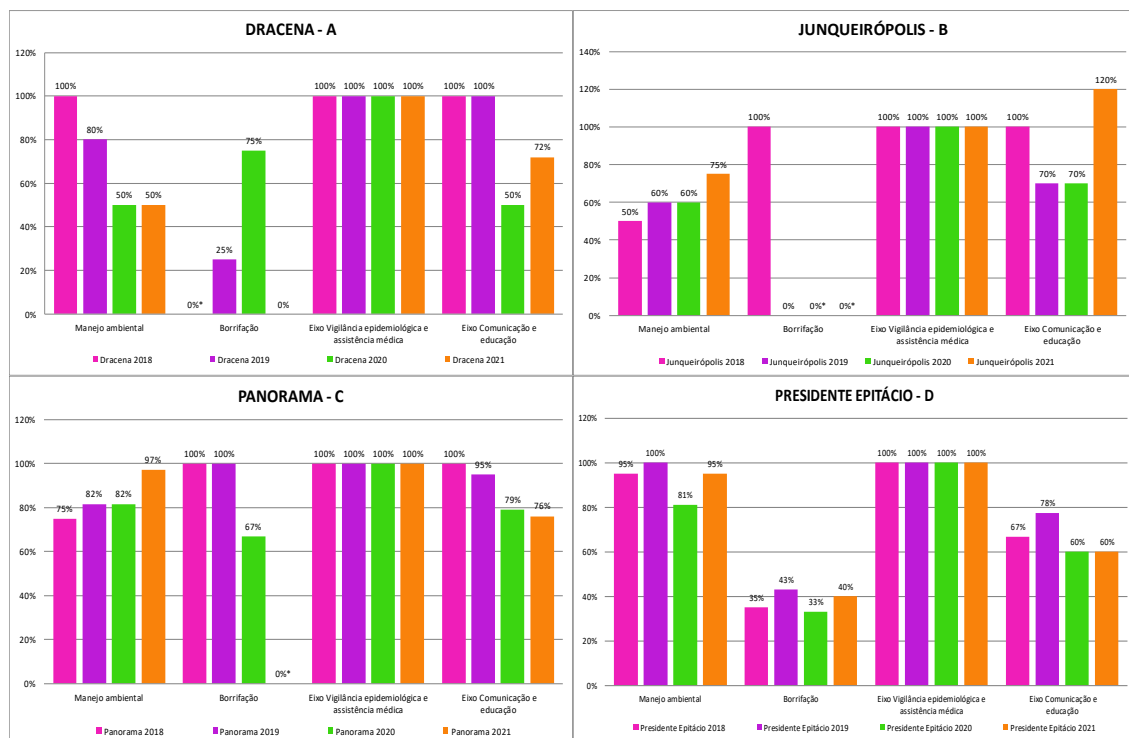


Figura 02 – Avaliação das ações de vigilância e controle do plano de ação no controle da LV realizadas no município de Dracena (A), Junqueirópolis (B), Panorama (C) e Presidente Epitácio (D) no período de janeiro de 2018 a setembro de 2021, demonstrando o percentual da meta atingida, em relação a meta pactuada em cada eixo da vigilância. *Não foi feito. Fonte: Plano de ação informada pelas Secretarias Municipais de Saúde de Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio. Elaborado pela autora, 2021.

A borrifação foi uma atividade de difícil execução e todos os municípios, independente do ano. Fato não observado nas atividades do eixo de vigilância epidemiológica e assistência médica, onde todos realizaram 100% das atividades propostas, independente da pandemia. De acordo com as medidas restritivas impostas pelo Plano São Paulo (estratégias do Governo do ESP no combate a Covid-19), o isolamento social, uso de máscaras faciais, redução da circulação de pessoas em locais públicos e privados afetaram inúmeras atividades. Conforme ANDRADE *et al.* (2020), as medidas restritivas impostas pelo MS em todo território nacional, a fim de conter o vírus responsável pela Covid-19 limitaram as ações pelos agentes de saúde e agentes de endemias.

Com relação ao eixo de vigilância e controle do reservatório, no período de estudo foram analisados um total de 4799 cães em Dracena, 4796 em Junqueirópolis, 4131 em Panorama e 2560 em Presidente Epitácio. A prevalência média de anticorpos para LVC foi de 32,66% (1437) e a taxa média de animais eutanasiados foi de 65,55% (942) em Dracena; 26,19% (867) e 42,91% (372) em Junqueirópolis; 42,92% (1073) e 65,52% (703) em Panorama e 29,49% (1183) e 48,77% (577) em Presidente Epitácio, respectivamente. D'Andrea e colaboradores (2009) no período de agosto de 2005 a janeiro de 2008 encontraram resultados similares de prevalência média de LVC em Dracena (29,25%) e inferiores em Junqueirópolis (13,38%) e Panorama (27,87%) já os resultados em relação a eutanásia de animais confirmados com a doença foram similares em Dracena (67,32%) e Panorama (59,39%) e superiores em Junqueirópolis (91,34%).

A partir de março de 2020 com o início da pandemia de Covid-19, observou-se que em alguns municípios prioritários para LV apresentaram queda na realização das atividades no eixo de vigilância do reservatório em função das medidas restritivas adotadas, esses resultados estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Comparação da atividade de inquérito sorológico canino de janeiro a dezembro de 2020 com a média do triênio de janeiro a dezembro (2017-2019) tendo como base o número de kits TR DPP LVC recebido pelo programado nos municípios de Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio

Municípios	2020				Média Triênio Rec./Prog.(%) Jan-Dez.2017-2019 (Anexo I)	Análise atividade 2020 (%) Jan -Dez. em relação Média Triênio Jan-Dez.2017-2019
	Nº cães	Rec.	Prog.	Média Rec./Prog. (%) Jan- Dez. 2020		
Dracena	4400	460	2400	19,17	58,49	-39,32
Junqueirópolis	4500	460	2000	23	105,11	-82,11
Panorama	2100	1280	1180	108,47	70,18	38,29
Presidente Epitácio	4012	860	1020	84,31	83,12	1,19
TOTAL	15012	3060	6600	46,36	74,89	-28,53

Fonte: Plano de ação – CCZ de Dracena e Presidente Epitácio e SZ de Junqueirópolis e Panorama e CRPP. Elaborado pela autora, 2021

Tabela 2 - Comparação da atividade de inquérito sorológico canino de janeiro a setembro de 2020 e 2021 com a média do triênio de janeiro a setembro (2017-2019) tendo como base o número de kits TR DPP LVC recebido pelo programado nos municípios de Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio

Municípios	2020				2021				Média Triênio	Análise atividade 2020	Análise atividade 2021
	Nº cães	Rec.	Prog.	Média Rec./Prog. (%) Jan-Set.2020	Nº cães	Rec.	Prog.	Média Rec./Prog. (%) Jan-Set.2021	Rec./Prog.(%) Jan-Set.2017-2019 (Anexo II)	Análise atividade 2020 em relação Média Triênio Jan-Set.2017-2019	Análise atividade 2021 em relação Média Triênio Jan-Set.2017-2019
Dracena	4400	300	1800	16,67	4400	1100	1800	61,11	62,48	-45,81	-1,37
Junqueirópolis	4500	460	1960	23,47	4242	720	360	200	105,40	-81,93	94,60
Panorama	2100	920	900	102,22	2100	880	900	97,78	68,31	33,91	29,47
Presidente Epitácio	4012	620	680	91,18	4012	400	1080	37,04	86,76	4,42	-49,72
TOTAL	15012	2300	5340	43,07	14754	3100	4140	74,88	78,63	-35,56	-3,75

Fonte: Plano de ação – CCZ de Dracena e Presidente Epitácio e SZ de Junqueirópolis e Panorama e CRPP. Elaborado pela autora, 2021

Ao analisar a atividade média de 2020 em relação a média do triênio (2017-2019), Dracena e Junqueirópolis apresentaram redução nas atividades de inquérito sorológico de 39,32% e 82,11%, respectivamente. Panorama e Presidente Epitácio aumentaram 38,29% e 1,19%, respectivamente. Ao comparar a média da atividade de janeiro até setembro de 2021 com a média do triênio de janeiro até setembro (2017-2019) (Tabelas 2), Dracena e Presidente Epitácio apresentaram redução de 1,37 e 49,72%, respectivamente. Junqueirópolis e Panorama apresentaram aumento 94,60% e 29,47%, respectivamente. Desta forma, os dados comprovam que o impacto da pandemia de Covid-19 sob os inquéritos sorológicos no ano de 2020 foram evidenciadas em Dracena e Junqueirópolis e em 2021 em Dracena e Presidente Epitácio.

CONCLUSÕES

Dados parciais do monitoramento das ações de vigilância e controle da LV com o plano de ação realizada nos quatro municípios prioritários analisadas de janeiro de 2018 a setembro de 2021, de uma forma geral têm-se mostrado efetivas nos municípios de Dracena, Junqueirópolis e Panorama. Porém, em Presidente Epitácio não.

No eixo de vigilância epidemiológica e assistência médica a meta foi atingida em 100% dos municípios estudados. No manejo ambiental, houve melhora crescente em Junqueirópolis e Panorama, decrescente para Dracena e de decrescente a estável no município de Presidente Epitácio. Quanto a borrifação, a meta programada não foi atingida em nenhum dos municípios de estudo conforme o pactuado, demonstrando ser uma das atividades de difícil execução do plano. O eixo comunicação e educação foi bastante impactado pela pandemia de Covid-19 nos anos de 2020 e 2021 nos municípios de Dracena, Panorama e Presidente Epitácio e no município de Junqueirópolis não.

A pandemia de Covid-19 impactou no eixo de vigilância e controle do reservatório nos municípios de Dracena e Junqueirópolis no ano de 2020 e, em Dracena e Presidente Epitácio em 2021. Panorama, apresentou um número crescente de animais testados no período de estudo e as atividades foram levemente impactadas pela pandemia em 2021. De uma forma geral foi evidenciado impacto da pandemia de Covid-19 sob as medidas de vigilância e controle do plano de ação para LV nos anos de 2020 e 2021 em três dos quatro municípios monitorados para o cumprimento da meta que é reduzir a incidência da LV em 50% até os anos de 2022.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, T. R. *et al.* Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 34, n. 1, p. 1–12, 2018.

ANDRADE, J. N.; PEIXOTO, T. M.; COELHO, M. M. P. Visita do Agente de Combate às Endemias frente pandemia por Covid-19: desafios e perspectivas. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, v. 9, n. 4, p. 709–716, 25 out. 2020.

BENETI, M. L., Municípios prioritários para leishmaniose visceral da região de saúde de Presidente Prudente/SP: avaliação do Plano de Ação 2018/ Mayla Lopes Beneti–Presidente Prudente, 2020. 48 f. Il.

BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde**, 2021. Disponível em: < https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2021

D'ANDREA, L. A. Z.; CAMARGO-NEVES, V.L.F.; SAMPAIO, S.M.P.; KRONCA, S.N.; SARTOR, I.F. American visceral leishmaniasis: disease control strategies in Dracena microregion in Alta Paulista, SP, Brazil. **Jounal Venomous Animals Toxins including Tropical Diseases**. V. 15. n. 2 p. 305-324, 2009.

D'ANDREA, L. A. Z. **Leishmaniose visceral na região de Presidente Prudente, São Paulo: distribuição espacial e rotas de dispersão**. 2017. 176 f. Dissertação (Doutorado em Geografia) – Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2017.

LIMA KUBO, H. K. *et al.* Impacto da pandemia de Covid-19 no serviço de saúde: uma revisão de literatura. **InterAmerican Journal of Medicine and Health**, v. 3, p. 1, 26 jul. 2020.

MORI, L. **Hanseníase, malária, tuberculose: pandemia reduz combate a doenças que afetam os mais pobres**. **BBC News Brasil**, 2021. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/geral-56610913>>. Acesso em: 10 dez. 2021

OLIVEIRA, P. I. DE. **Organização Mundial de Saúde declara pandemia do novo Coronavírus - Notícia - UNA-SUS. Universidade Aberta do sistema Único de Saúde (UNA-SUS)**, 2020. Disponível em: <<https://www.unasus.gov.br/noticia/organizacao-mundial-de-saude-declara-pandemia-de-coronavirus>>. Acesso em: 10 dez. 2021

OPAS. **Plano de Ação para a eliminação de doenças infecciosas negligenciadas e ações pós-eliminação 2016-202255º Conselho diretor - 68ª Sessão do comitê regional da OMS para as Américas - Washington, D.C., EUA, 26-30 Setembro de 2016**, 2016. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=35679&Itemid=270&lang=pt>. Acesso em: 10 dez. 2021.

STEEL, R.G.O.; TORRIE, J.R. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hil Book Company; 1960. 481 p.

ZUBEN, A. P. B. VON; DONALÍSIO, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes

do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. Cadernos de Saúde Pública, v. 32, n. 6, p. 1–11, 2016.

DOI: <https://doi.org/10.53934/101019-2>

LEISHMANIOSE VISCERAL EM ÁREAS PRIORITÁRIAS DO MUNICÍPIO DE PRESIDENTE PRUDENTE/SP

Éricka Stéphanhy Brandão Bueno¹; Gabriela Sumico Afonso Hanamoto¹; Natalia de Moura Fagundes¹, Lourdes Aparecida Zampieri D'Andrea²

¹Estudante do Curso de Especialização Vigilância Laboratorial em Saúde Pública do Centro de Laboratório Regional – Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente – CRPP – Email: erickastephanny@hotmail.com

²Docente/pesquisador Centro de Laboratório Regional–Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente – CRPP

Resumo: Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de distribuição mundial e fatal se não tratada precocemente. Objetivo foi avaliar as ações de vigilância e controle da LV em áreas prioritárias do município de Presidente Prudente/SP. Dados foram fornecidos pelo CCZ, vigilância epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde e Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente (CRPP). Foram testados 48.365 animais, sendo 16.864 em 2018, 17.402 em 2019, 6.179 em 2020 e 7.920 janeiro a outubro de 2021, com positividade crescente para LVC (Leishmaniose visceral canina) de 1,9%, 2,2% e 3,8%, respectivamente e discreta redução em 2021 (2,9%). O padrão de distribuição espacial da LVC no município foi irregular no território e foi trabalhado ações de vigilância e controle da LV em seis áreas críticas em 2020: Maré Mansa–Imperial, São Sebastião–Residencial Jardins, Vila Formosa, Cedral– Monte Alto, Cláudia Glória–Santa Helena e São Matheus, com positividade média para LVC de 1,67%, valor inferior ao encontrado em 2020 (3,8%) no município. Provavelmente isso ocorreu por baixa circulação do parasita e de intensas ações realizadas em anos anteriores nessas áreas. Além disso, a positividade encontrada no bairro Monte Carlo em 2020 (3,9%) foi similar ao terceiro inquérito de 2018 (4,1%), ao do bairro Cedral–Monte Alto (3%) e a média da área urbana do ano de 2020 (3,8%). Ressalta-se, nesse sentido, que o bairro Monte Carlo é um fragmento do território representativo da situação epidemiológica da doença. Assim o projeto zeladoria foi uma importante ferramenta no combate a LV, sendo necessário dar continuidade nas ações de vigilância em saúde focadas em áreas prioritárias (críticas).

Palavras-chave: Distribuição espacial, leishmaniose visceral, Presidente Prudente/SP, vigilância e controle.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é uma antropozoonose de distribuição mundial e pode ser fatal quando não tratada precocemente. Nas Américas, a doença é causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (sinonímia *Leishmania infantum chagasi*), sendo este um parasita intracelular obrigatório (ABRANTES *et al.*, 2018; BRASIL, 2021). A transmissão ocorre principalmente através da picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, por ser o vetor mais comum (SALES *et al.*, 2017). Em ambiente urbano, o principal reservatório é o cão doméstico, tanto no Brasil como em outros países das Américas (ZUBEN; DONALISIO, 2016), ao passo que em ambiente silvestre, os reservatórios são raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL, 2021).

Além disso, a LV tem sido disseminada rapidamente em todo o país, com destaque para a região oeste do Estado de São Paulo, onde a cidade de Presidente Prudente apresentou os primeiros relatos de casos da doença em cães (LVC) em 2010 (D' ANDREA

et al, 2015; ABRANTES *et al.*, 2018). Assim, o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Secretaria Municipal de Saúde tem se empenhado em controlar os casos da doença na população canina do município (D'ANDREA *et al*, 2015; PRESTE-CARNEIRO *et al*, 2019).

Em 2018, foram avaliadas as ações de vigilância e controle da LV no bairro Monte Carlo em Presidente Prudente/SP, considerada área prioritária, a qual serviu como projeto piloto (FAGUNDES, 2020). Desta forma, a mesma metodologia foi aplicada nos anos de 2019 e 2020 em outras áreas semelhantes ou de risco para LV em região urbana da cidade.

É notória a importância da avaliação dos resultados obtidos com estas ações, bem como constituir pesquisas passíveis de serem aplicadas em outros municípios. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as ações de vigilância e controle da leishmaniose visceral em áreas prioritárias do município de Presidente Prudente/SP.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado de janeiro de 2018 a outubro de 2021, em região urbana de Presidente Prudente, localizada no extremo oeste do Estado de São Paulo, com população humana estimada de 207.725 habitantes e canina de 51.931 (IBGE, 2015; ALVES *et al.*, 2005). A área pertence ao Departamento Regional de Saúde - DRS XI, com abrangência do Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente (CRPP).

Os dados foram obtidos do Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (SIGH), CRPP; boletins informativos com resultado do teste confirmatório ELISA de LVC de animais triados com teste rápido (TR-DPP®) no CCZ; e de relatórios online enviados mensalmente. Os dados obtidos de cada ano pesquisado foram analisados com o auxílio do software Excel 2016, onde foram confeccionadas planilhas, nas quais os cães com LV confirmada foram contabilizados e separados por quadras da área urbana.

Foram utilizados o mapeamento temático e a estatística descritiva com o software SIG ArcGIS, desenvolvido pela ESRI, para a identificação dos padrões de distribuição espacial. Desta forma, foi possível realizar agrupamentos dos casos, construir uma base de dados e elaborar mapas para a área urbana da região analisada, tendo como base a classificação de cães com teste rápido (TR DPP® LVC) e ELISA LVC reagentes, por quadra, no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2020.

Além do exposto, foram analisados os resultados de inquéritos sorológicos de seis áreas prioritárias dentro do município de Presidente Prudente durante no ano de 2020: 1. Maré Mansa – Imperial, 2. São Sebastião–Residencial Jardins, 3. Vila Formosa, 4. Cláudia Glória–Santa Helena, 5. São Matheus e 6. Monte Carlo.

Em relação aos aspectos éticos, os dados fazem parte de resultados parciais obtidos com o protocolo “Identificação de áreas prioritárias para as ações de vigilância e controle da leishmaniose visceral no município de Presidente Prudente/SP/Brasil”, avaliado e aprovado pelo Comitê Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz - CTC-IAL 32-L/2019, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAL – CEPAL, CAAE: 22168919.1.0000.0059, parecer N°. 3.665.220.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados 48.365 animais, sendo 16.864 em 2018, 17.402 em 2019, 6.179 em 2020 e 7.920 janeiro a outubro de 2021 no município de Presidente Prudente. No mesmo período, foram notificados cinco casos de LV humana (LVH) no município, sendo um em 2018, três em 2020 e um em 2021, não tendo sido registrados casos em 2019.

A Tabela 01 mostra a distribuição dos resultados de inquérito sorológico para LVC no município, no período de janeiro de 2018 a outubro de 2021, onde é possível observar que a positividade na triagem sorológica de LVC nos anos de 2020 (7,5%) e 2021 (6,6%) registrou aumento em relação aos anos de 2018 (4,3%) e 2019 (3,1%), uma vez que, nesse período, o volume de testes realizados foi maior devido a demanda espontânea de animais sintomáticos; bloqueio de casos de LVH e LVC; e a realização de inquéritos em áreas prioritárias.

Tabela 01 - Distribuição dos resultados de inquérito sorológico para LVC no município de Presidente Prudente/SP, segundo o ano de realização, número de Teste Rápido DPP previsto, recebido e utilizado. Período janeiro de 2018 a outubro de 2021

PERÍODO	Nº de TR DPP previsto	Nº de TR DPP recebido	Nº de TR DPP utilizado	RESULTADOS			
				Teste Rápido DPP		ELISA	
				R (%)	NR	R (%)	NR
Jan - Dez. 2018	18800	17560	16864	730 (4,3)	16138	320 (1,9)	410
Jan - Dez. 2019	15000	17900	17402	531 (3,1)	16871	378 (2,2)	143
Jan - Dez. 2020	18200	6900	6179	461 (7,5)	5711	235 (3,8)	221
Jan- Out. 2021	11000	7860	7920	519 (6,6)	7451	233 (2,9)	286
TOTAL	63.000	50.220	48.365	2.241 (4,6)	46.171	1.166 (2,4%)	1.060

Fonte: CCZ de Presidente Prudente e CRPP. Elaborado pela autora, 2021.

Em relação aos testes confirmatórios de LVC, ainda na tabela 01, observa-se aumento crescente da positividade nos anos 2018 (320-1,9%), 2019 (378-2,2 %) e 2020 (235-3,8%), no entanto no ano de 2021 (233- 2,9%) houve uma discreta redução. A positividade alta da LVC nos anos de 2020 e 2021 foi, provavelmente, em função da redução das atividades de inquérito, devido a intensificação de atendimento a demanda de animais sintomáticos e realização de bloqueio nos casos de LVH em 2020.

Esses resultados demonstram que houve dispersão do parasita no território, provavelmente pelo grande número de cães na região, além do reduzido quadro de recursos humanos do CCZ e da vigilância epidemiológica municipal. Tal cenário tornou impossível a atuação efetiva para o bloqueio da difusão da doença, tendo em vista que resultados inferiores foram encontrados por Matsumoto (2014) nos anos de 2010 a 2013 no município de Presidente Prudente onde os casos de LVC foram respectivamente: 14, 40, 30 e 19.

Outro aspecto importante observado no presente estudo foi o resultado obtido no bairro Monte Carlo, representado na tabela 2. Trata-se da continuidade de um estudo desenvolvido a partir de ações de vigilância e controle, nos anos de 2018 e 2020, onde foram realizados três inquéritos sorológicos, impulsionados pela identificação de grande número de cães com LVC em anos anteriores, além de um ambiente propício para a presença do vetor (FAGUNDES, 2020).

Tabela 02 - Distribuição dos resultados de inquérito sorológico para LVC no Residencial Monte Carlo nos anos de 2018 e 2020

Inquéritos/ Ano	TOTAL	RESULTADOS			
		TR DPP		ELISA	
		R (%)	NR	R (%)	NR
1º - 2018	180	20 (11,1)	160 (88,9)	11 (6,1)	8 (4,4)
2º - 2018	182	10 (5,4)	172 (94,6)	4 (2,1)	6 (3,2)
3º - 2018	191	12 (6,3)	179 (93,7)	8 (4,1)	2 (1,04)
2020	231	22 (9,5)	209 (9,5)	9 (3,9)	9 (3,9)
TOTAL	784	64 (8,2)	720 (91,8)	32 (4,1)	25 (3,2)

Fonte: FAGUNDES, 2020. CCZ de Presidente Prudente. Elaborado pela autora, 2021

Como resultado, é possível observar o grande número de casos positivos de LVC (3,9%) no bairro Monte Carlo, no ano de 2020 em relação a 2018. Esse fato se deu provavelmente em decorrência da baixa circulação do parasita em função do recolhimento dos animais com LVC e das ações adotadas nos três inquéritos realizados do ano de 2018 (FAGUNDES, 2020). Dentre o total de animais analisados no inquérito com TR DPP® que foram realizados pelo município em 2020 (Tabela 01), cerca de 3,8% (231) pertenciam a cães do Residencial Monte Carlo. Outro dado importante observado foi que a positividade média de cães com LVC de 2020 (3,8%) foi similar a positividade encontrada no bairro Monte Carlo (3,9%). Isso sugere que o bairro estudado como prioritário é um fragmento do território do município representante da situação epidemiológica da doença.

Além do exposto, foi realizado o levantamento de cães com sorologia confirmada para LVC e a distribuição espacial representativa do quantitativo de animais no município, segundo a quadra da área urbana de Presidente Prudente/SP, no período de 2018 a 2020 (Figura 02). Sem dúvida, esta é uma ferramenta com grande importância na gestão e amplamente utilizada, uma vez que contribuem para tomada de decisão sobre determinada situação no território.

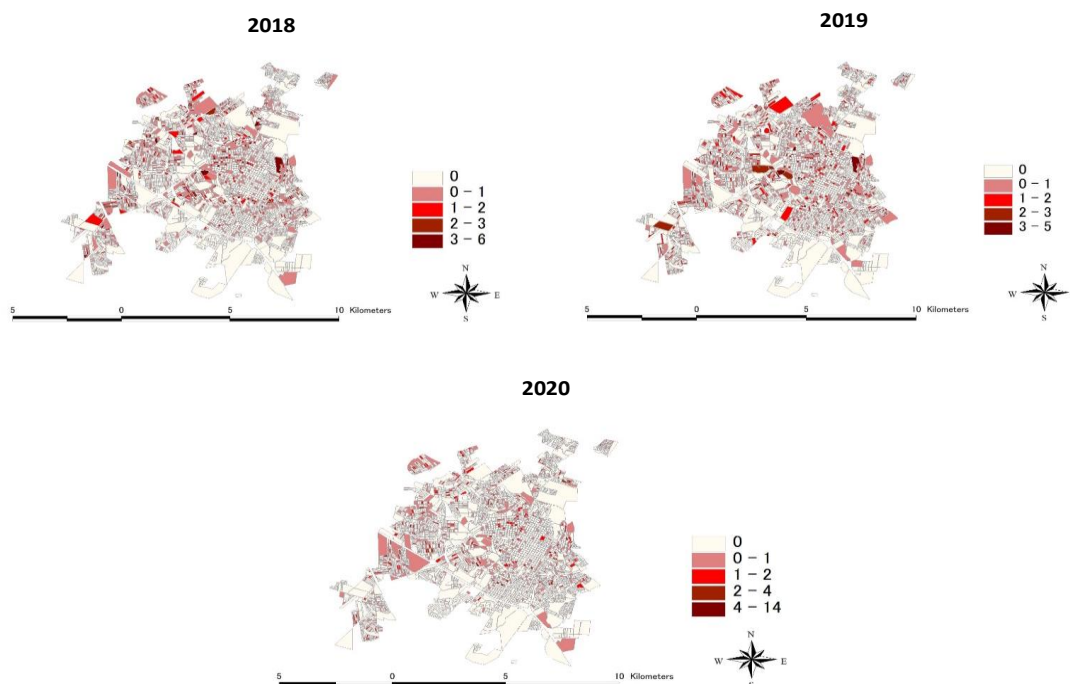


Figura 02 - Distribuição espacial representativa do quantitativo de cães com sorologia confirmada para LVC, segundo a quadra da área urbana de Presidente Prudente/SP. Período entre 2018 e 2020.

Fonte: CCZ de Presidente Prudente e CRPP. Elaborado por FLORES, E.F., 2021.

Neste ponto do trabalho, foi observada variação no padrão da distribuição espacial de cães com LVC de um ano para o outro, evidenciada na figura 02, uma vez que em 2020 houve menor número de animais testados (6.179) em relação a 2018 (16.864) e 2019 (17.402). Isso se deu em função da redução do número de *kits* recebidos e utilizados pelo município (Tabela 01); medidas restritivas impostas pela pandemia de covid-19; e sobrecarga dos serviços de saúde em 2020. Porém, houve uma positividade crescente de 1,9%, 2,2% e 3,8%, respectivamente.

Além disso, a ferramenta de distribuição espacial de cães com LVC dos anos de 2018 e 2019 propiciou a escolha de outras áreas críticas do município de Presidente Prudente, nas quais foram executadas mais intensamente as ações de vigilância e controle, bem como a realização de inquérito sorológico em 2020. Desta forma, os resultados obtidos nos inquéritos sorológicos, nas seis áreas identificadas como críticas do município de Presidente Prudente, estão descritos na Tabela 03, juntamente com a positividade no TR DPP®, ELISA para LVC, porcentagens de animais eutanasiados, tratamento e óbito.

Tabela 03 – Distribuição dos resultados de inquérito sorológico para LVC em bairros prioritários de Presidente Prudente/SP realizado no ano de 2020

Presidente Prudente/SP - Realizado no ano de 2020										
Bairro Prioritário Presidente Prudente	Total Analisado	RESULTADOS				Eutanásia (%)	Tratamento (%)	Óbito	Início	Término
		Teste Rápido DPP		ELISA						
		R (%)	NR	R (%)	NR					
Maré Mansa- Imperial	754	16 (2,1)	738	11 (1,4%)	5 (0,7)	6 (54,5)	5 (45,5)	1	M- 20/02/2020 I-06/02/2020	M- 10/03/2020 I-20/02/2020
São Sebastião - Res. Jardins	204	4 (2,1)	200	1 (0,5)	3 (1,5)	1 (100)	0	0	20/06/2020	11/07/2020
Vila Formosa	108	1 (0,9)	107	0 (0)	1 (0,9)	0	0	0	06/07/2020	SI
Cedral - Monte Alto	462	31 (6,7)	431	14*(3)	15 (3,2)	0	0	0	SI	SI
Cláudia Glória - Santa Helena	96	08 (8,3)	88	2*(2,1)	5 (5,2)	0	1 (50)	0	20/09/2020	01/10/2020
São Matheus	170	7 (4,1)	163	2 (1,2)	5 (2,9)	0	0	0	25/08/2020	03/09/2020
TOTAL	1794	67 (3,73)	1727	30 (1,67)	30 (1,89)	7	6	1	-	-

Legenda: M: (Maré Mansa), I: (Imperial), *(1 Hemolisado)

Fonte: Centro de Controle de Zoonoses de Presidente Prudente/SP. Elaborado pela autora, 2021

Outro dado significativo observado nas áreas prioritárias estudadas em 2020, as quais apresentaram altos valores de positividade nos inquéritos realizados nos anos anteriores, foi a média da positividade dos resultados de ELISA de 1,67% (30), em relação a positividade de casos confirmados no território municipal 3,8% (235) no mesmo ano. É possível notar que a área do bairro Cedral-Monte Alto apresenta uma positividade 3% (14), similar ao valor encontrado na cidade de Presidente Prudente/SP no ano de 2020. Esses bairros foram elencados como áreas críticas do município segundo critérios de positividade de cães com LVC em inquéritos anteriores, além de possuírem fatores propícios ao desenvolvimento do vetor como fundo de vale, áreas de preservação permanente, acúmulo de matéria orgânica e baixo nível socioeconômico.

Assim, em 2021 foi desenvolvido o projeto zeladoria com o objetivo de manter a cidade de Presidente Prudente limpa e organizada, concentrando os serviços de limpeza e manutenção em 11 setores da cidade. Essa ação foi uma importante ferramenta que auxiliou no combate a LV em tempos de pandemia, embora seja necessária a continuidade das atividades de vigilância em saúde focadas em áreas prioritárias do município.

CONCLUSÃO

Foi identificado grande número de cães com sorologia reagente no TR DPP® para LVC com positividade crescente de 2018 a 2020 e discreta redução em 2021 e que houve diminuição do quantitativo de animais analisados no município de Presidente Prudente nos anos 2020 e 2021. Adicionalmente, percebe-se que a pandemia de covid-19 impactou nas atividades de vigilância em saúde da LV no município, embora estudos sejam necessários para confirma essa informação.

Por outro lado, o padrão de distribuição espacial da LVC no território de Presidente Prudente foi irregular. Destaca-se neste sentido a positividade encontrada para LVC no inquérito realizado no bairro Monte Carlo em 2020 (3,9%), a qual foi similar ao terceiro do ano de 2018 (4,1%), ao da área crítica do bairro Cedral-Monte Alto (3%) e a média da área urbana do ano de 2020 (3,8%).

É importante destacar que o Bairro Monte Carlo é um fragmento do território representativo da situação epidemiológica da doença no município e que a média de

positividade de cães com LVC encontrada nas seis áreas prioritárias do município de Presidente Prudente em 2020 foi menor que a encontrada na média do município no mesmo ano, resultado das atividades de vigilância e controle realizada em anos anteriores. Este trabalho conclui também que o desenvolvimento do projeto de zeladoria no ano de 2021 foi uma importante ferramenta utilizada no combate a LV no município, embora seja necessária a continuidade das atividades de vigilância em saúde focadas em áreas prioritárias.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, T. R. *et al.* Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saude Publica**, v. 34, n. 1, p. 1–12, 2018.

ALVES, M. C. G. P. *et. al.* Dimensionamento da população de cães e gatos do interior do Estado de São Paulo. **Revista Saúde Pública**, v. 39, n. 6, p. 891-7, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. 5ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. 1.126 p. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed.pdf>. Acesso em 30/11/2021.

D'ANDREA, L.A.Z. *et al.* The shadows of a ghost: a survey of canine leishmaniasis in Presidente Prudente and its spatial dispersion in the western region of São Paulo state, an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. **BMC Veterinary Research**, n.11, p. 273, 2015.

FAGUNDES, N. M. **Leishmaniose Visceral em Área Prioritária do Município de Presidente Prudente/SP/Brasil: Avaliação das Ações de Vigilância e Controle/** Natalia de MouraFagundes– Presidente Prudente.46 f.l., 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2015. Censo 2010. Disponível em: < <https://censo2010.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 05/12/2021.

MATSUMOTO, Patricia Sayuri Silvestre. **Análise espacial da Leishmaniose Visceral Canina em Presidente Prudente – SP: abordagem geográfica da saúde ambiental.** 2014. xvii f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/115755>>. Acesso em 04/01/2022.

PRESTES-CARNEIRO, L.E. *et al.* Spatiotemporal analysis and environmental risk factors of visceral leishmaniasis in an urban setting in São Paulo State, Brazil. **Parasites & Vectors**. 2019 May 21;12(1):251.

SALES, D. P. *et al.* Epidemiological aspects of Human and Canine Visceral Leishmaniasis in the state of Maranhão, Brazil (2009-2012). **Revista brasileira de Ciência Veterinária.**, v. 24, n. 3, p. 144–150, 2017.

ZUBEN, A.P; DONALÍSIO, M.R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública.** 2016, v. 32, n. 6, e00087415.

ANÁLISE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE EM PACIENTES PORTADORES DO VÍRUS HIV, NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP

Jessica Gielize Fernandes da Silva Toscano¹; Marcia Maria Costa Nunes Soares²

1- Discente no curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública-IAL – SJRP;
jgielize@gmail.com

2-Docente e Pesquisadora Científica do Núcleo de Ciências Biomédicas – CLR - IAL -SJRP X,
marcia.soares@ial.sp.gov.br

RESUMO: A dengue e o HIV são importantes problemas de saúde pública no Brasil. A dengue é uma arbovirose dinâmica e sistêmica, distribuída nas regiões de clima tropical e subtropical. A infecção pelo vírus HIV, é considerada uma epidemia dinâmica e instável. A relação DENV/HIV tem sido pouco relatada. O objetivo deste trabalho foi analisar dados clínicos e epidemiológicos de pacientes da região de São José do Rio Preto- SP, portadores do vírus HIV, que foram infectados pelo DENV no período de 2009 a 2016. No período, foram identificados 116 pacientes portadores do vírus HIV e que se infectaram pelo DENV, sendo que 9 (50,86%) eram do sexo feminino e 57 (49,14%) masculino, com média de idade de 41 anos; a maioria 85 (73,27%) se autodeclarou branca, parda 18 (15,52%), preta 8 (6,90%) e 5 (4,31%) não informaram. Em 56% dos casos, a carga viral do HIV não detectável se manteve após a dengue, em 21% houve diminuição da carga viral e em 17% houve aumento. Com relação à contagem de linfócitos TCD4+, 54 (47%) pacientes apresentaram aumento dos níveis após a infecção com o vírus da dengue, e 51 (44%) tiveram seus níveis diminuídos. Os dados obtidos, sugerem que a infecção pelo vírus da dengue, parece não interferir de maneira importante nos portadores do HIV e a relação inversa também foi verdadeira, uma vez que, todos os pacientes coinfectados apresentaram a forma branda da doença.

Palavras-chave: Coinfecção, Vírus da dengue, HIV

INTRODUÇÃO

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que anualmente ocorram 500 milhões de novos casos e que 2,5 bilhões de pessoas possam contrai-la. É uma doença única, dinâmica e sistêmica (Ministério da Saúde, 2016). Esta arbovirose é distribuída principalmente nas regiões de clima tropical e subtropical, que se caracterizam por um clima de altas temperaturas e umidade (Tauil, 2002).

O vírus da dengue é um arbovírus que pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, e seu único vetor no Brasil é o mosquito *Aedes aegypti* (Zogbi, 2017). O mosquito apresenta como características ser doméstico, hematófago, androfilico, altamente adaptativo a diversas situações como falta de água, com sobrevivência de ovos por até 450 dias e reprodução em água poluída (Tauil, 2002; Barreto e Teixeira, 2008). Nas Américas, os sorotipos circulantes são DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4 (OPAS, 2021).

Outro agravamento de extrema importância para saúde pública é a infecção pelo vírus HIV, uma epidemia dinâmica e instável, que depende de determinantes individuais e

coletivos (Brito, 2001). Estima-se que em 2019 haviam 38 milhões de pessoas convivendo com o vírus, segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS).

O vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) é um vírus de RNA de cadeia simples, envolto por uma camada proteica e um envelope de bicamada fosfolipídica, que pertence ao gênero *Lentivirus*, e à família *Retroviridae* (Ministério da Saúde, 2018).

Ele se diferencia em dois tipos: HIV-1 e HIV-2, possuindo 50% de semelhança em seus genes (Ministério da Saúde, 2018). O HIV-1 pode ser subdividido em quatro grupos M, N, O e P, sendo o M responsável pela maioria das infecções, e N, O e P que são raros e normalmente encontrados em países em desenvolvimento. Também é considerado o tipo mais virulento e prevalente no Brasil. Já o HIV-2 é endêmico na África Ocidental (Lazzarotto, 2010; Ministério da Saúde, 2018).

O HIV infecta as células T, que modulam a resposta imunológica. Elas se dividem em duas classes, com diferenciação por proteínas de superfície celular, CD4 e CD8 (Murphy, 2014).

De acordo com Mendes e colaboradores (2006), as relações do HIV com outras doenças endêmicas foram descritas por vários autores, mas a avaliação da coinfeção HIV-DENV ainda é pouco estudada.

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar dados clínicos e epidemiológicos de pacientes portadores do vírus HIV e infectados com o DENV.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo transversal de coleta de dados de pacientes portadores do vírus HIV, que foram infectados com DENV no período de 2009 a 2016, pertencentes ao Grupo de Vigilância Epidemiológica 29 (GVE29) de São José do Rio Preto, com aprovação pelo CEPAL, CAEE: 81761318.0.0000.0059.

Os dados das planilhas obtidas do banco SIGH (Sistema de Informação e Gestão Hospitalar) do Instituto Adolfo Lutz (IAL) referente aos pacientes portadores de HIV e que faziam acompanhamento do exame de carga viral e contagem de linfócitos TCD4+, foram cruzados com o banco obtido do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, referente aos casos de dengue no período avaliado. Foram incluídos no trabalho todos os pacientes cujos dados como nome, data de nascimento, nome da mãe e número de CPF eram coincidentes em ambas as planilhas consultadas.

Os resultados de carga viral e contagem dos linfócitos TCD4+ foram obtidos por consulta no SISCEL (Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral). Foram avaliados os resultados mais próximos (anterior e posterior) a data de infecção pelo vírus da dengue.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após análises dos dados, foi obtido um total de 116 pacientes portadores do vírus HIV e que foram infectados pelo DENV, sendo que 59 (50,86%) eram do sexo feminino e 57 (49,14%) masculino, com média de idade de 41 anos.

Com relação a raça, a maioria 85 (73,27%) se autodeclarou branca, seguida pela parda 18 (15,52%) e preta 8 (6,90%) e 5 (4,31%) não informaram. Os sintomas mais citados foram dor nas costas, cefaleia e vômito, que são considerados clássicos de dengue.

Conforme a Figura 1, a análise de carga viral indicou que em 56% dos casos, não houve alteração após a dengue, sendo que todos apresentavam carga viral não detectável. Em 21% houve diminuição da carga viral, em 17% houve aumento e em 6% não havia

resultado de exame, o que pode ser devido a abandono de tratamento/acompanhamento ou óbito.

Figura 1- ANÁLISE DE CARGA VIRAL

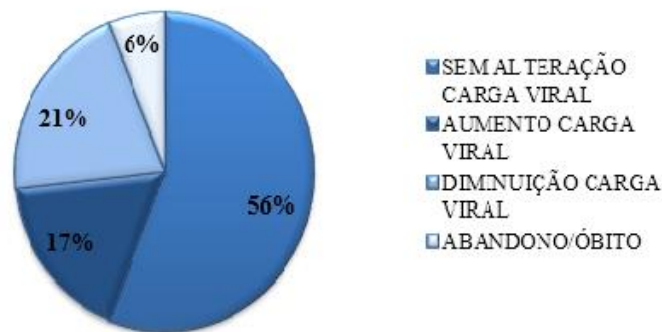


Figura 1: Análise de carga viral de HIV anterior e posterior ao período de infecção pelo vírus da dengue. Fonte: Produzido pela autora

Com relação à contagem de linfócitos TCD4+, 54 (47%) pacientes apresentaram aumento dos níveis após a infecção com o vírus da dengue, e 51 (44%) tiveram seus níveis diminuídos. O histórico de 4 (3%) pacientes não constava resultados de contagem de TCD4+ nem antes ou depois da dengue, possivelmente pelos exames de carga viral e TCD4+ serem solicitados de forma independente e outros 7 (6%) pacientes, não apresentavam histórico de resultados (Figura 2).

Figura 2 - ANÁLISE DE CD4

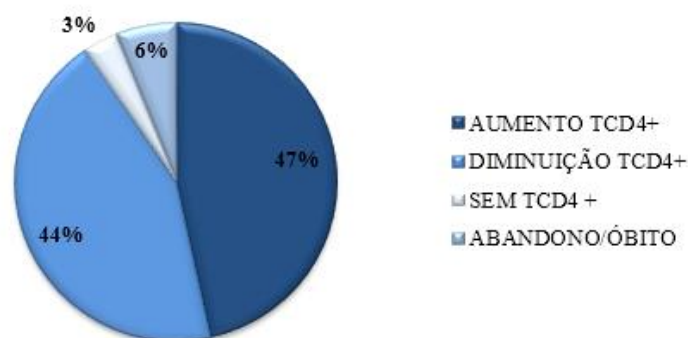


Figura 2: Análise da contagem de linfócitos TCD4+ anterior e posterior ao período de infecção pelo vírus da dengue. Fonte: Produzido pela autora.

As coinfeções em pacientes portadores do HIV são importantes temas de estudos. Os resultados aqui apresentados indicam que grande parte dos pacientes não apresentaram alterações em relação a carga viral e células TCD4, dados semelhantes a Watt e colaboradores (2003), os quais sugerem que a infecção por DENV em pacientes com HIV pode estar associada à redução da carga viral, devido a supressão da replicação do HIV.

Foi observado em alguns pacientes, um pequeno aumento nas células TCD4+, o que pode indicar uma melhor condição imunológica, corroborando com estudos de Delgado-Enciso (2016), Espinoza-Gómez (2017) e Zogbi (2017), os quais demonstram que não há gravidade nos casos de dengue em pacientes portadores do vírus HIV.

Nesse estudo, não foi possível determinar o uso de TARV nos pacientes acompanhados pela infecção do HIV, bem como outros fatores diversos que podem interferir direta ou indiretamente no prognóstico e evolução da dengue, devido à essas informações não constarem nos bancos de dados consultados. No entanto, a infecção por DENV em pessoas que vivem com HIV sob TARV estável tem sido associada a taxas mais baixas de gravidade, de fato, os sintomas mencionados pela maioria dos pacientes analisados, foram aqueles considerados clássicos, caracterizando a forma mais branda da doença, que pode estar ligada a níveis mais baixos de citocinas pró inflamatórias, a ativação intensa de células TCD4+ e CD8, bem como, a supressão do vírus do HIV pela replicação do DENV (Torrentes –Carvalho, 2016; Hottz, 2019).

Dessa forma, a análise geral dos dados obtidos, sugerem que a infecção pelo vírus da dengue, parece não interferir de maneira importante nos indivíduos portadores do HIV e a relação inversa também foi verdadeira, uma vez que, todos os pacientes coinfectados apresentaram a forma branda da doença.

CONCLUSÃO

Os sintomas ocasionados pela infecção por DENV parecem não apresentar gravidade em pacientes portadores do HIV e a infecção pelo HIV parece não sofrer alterações severas quando ocorre a coinfecção pelo DENV. Apesar dos resultados observados, são necessários estudos mais aprofundados para avaliar a interação entre os dois vírus.

REFERÊNCIAS

- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Estudos Avançados**, [s. l.], v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.
- BRITO, A.M; CASTILHO, E.A.; SZWARCOWALD, C.L. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 207-217, mar-abr 2001
- DELGADO-ENCISCO, I. et al. Dengue infection in a human immunodeficiency virus-1 positive patient chronically infected with hepatitis B virus in western Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 122-125, 11 jan. 2017.
- ESPINOZA-GOMES, F. et al. Dengue Virus Coinfection in Human Immunodeficiency Virus-1- Infected Patients on the West Coast of Mexico. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 927-930, 2017.
- HOTTZ, E.D. et al. Platelet function in HIV plus dengue coinfection associates with reduced inflammation and milder dengue illness. **ScientificReports**, [s. l.], v. 9, n. 7096, p. 1-13, 8 maio 2019.

LAZZAROTTO, A.R.; DESRESZ, L.F.; SPRINZ, E. HIV/AIDS e Treinamento Concorrente: a Revisão Sistemática. **Rev Bras Med Esporte**, [s. l.], v. 16, n. 2, abr 2010.

MENDES, W.S.; BRANCO, M.R.F.C; MEDEIROS, M.N.L. Clinical case report:dengue hemorrhagic fever in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Norhbrook, IL, v.74, n.5, p.905-907,2006.

Ministério da Saúde(Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico:adulto e criança**.5 ed.Brasília-DF; Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis,58 p., 2016.

Ministério da Saúde(Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas paraManejo da Infecção pelo HIV em Adultos**.Brasília- DF;Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. 412p. , 2018.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway** [recurso eletrônico]/ Kenneth Murphy; tradução: Denise C. Machado, Gaby Renard, LucienPeroni Gualdi; revisão técnica: Denise C. Machado. - 8. ed. - Dados eletrônicos. - Porto Alegre: Artmed, 2014.

Organização Pan-Americana de Saúde. **Dengue**. Disponível em<<https://www.paho.org/pt/topicos/dengue> > Acesso em 08 de novembro 2021a.

Organização Pan-Americana da Saúde. **HIV/AIDS**. Disponível em <<https://www.paho.org/pt/topicos/hiv aids>> Acesso em 16 de novembro de 2021b.

TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 867-861, jun 2002.

TORRENTES-CARVALHO,A. Characterization of clinical and immunological features in patients coinfectdwithdengue virus and HIV. **Clin Immunol**, v.164, p, 95–105,mar 2016.

ZOGBI,H.E.**Manifestações clínicas e laboratoriais de dengue em uma coorte de pacientes infectados pelo HIV, acompanhados no Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, Rio de Janeiro, de 2008 a 2014**. Rio De Janeiro, 2017. Dissertação [mestrado de pesquisa clínica em doenças infecciosas]. Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz.

WATT, G.; KANTIPONG, P.; JONGSAKUL, K. Decrease in human immune deficiencyvirustype1loadduringacute dengue fever.**Clinicalinfectiousdiseases**, v. 36, n. 8, p. 1067–1069, 2003.

DOI: <https://doi.org/10.53934/101021-2>

IMPLICAÇÕES DA CO-INFECÇÃO DA DENGUE EM PACIENTES CRONICAMENTE INFECTADOS PELOS VÍRUS HBV E HCV NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP

Paula Carolina Buzutti¹; Fernanda Modesto Tolentino Binhardi²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CRL X – IAL – SJRP; E-mail: biobuzutti@gmail.com

²Pesquisadora do Núcleo de Ciências Biomédicas – CRL X – IAL – São José do Rio Preto

Resumo: Dengue é uma doença tropical febril aguda de extrema importância para a saúde pública. Outro importante agravamento são as hepatites virais, que se manifestam de forma aguda ou crônica e infectam milhões de pessoas. As manifestações da dengue em uma população com alta prevalência de HBV e HCV foram pouco estudadas, apesar de estudos mostrarem que uma co-infecção entre elas pode mascarar ou complicar os sintomas. Neste estudo avaliou-se as manifestações e evoluções clínicas em pacientes portadores de HBV e HCV, co-infectados com DENV na região de S. J. Rio Preto-SP, entre 2009 a 2016. Foram comparados os dados de 502 pacientes com HBV e 1.388 com HCV com planilhas do Sinan que continham dados de pacientes com DENV. Após identificar os pacientes co-infectados, investigou-se a carga viral do HBV e HCV pré e pós infecção por DENV e a evolução do quadro clínico. Pacientes com HCV apresentaram maior taxa de co-infecção e diversidade de sintomas, enquanto que o aumento da carga viral ocorreu mais em pacientes com HBV. Não foram observadas diferenças significativas entre gênero e alteração das dosagens de TGO e TGP em ambas co-infecções. O DENV-1 foi o único sorotipo detectado e nenhuma evolução para dengue grave ou óbito.

Palavras-chave: Co-infecção; DENV; HBV; HCV

INTRODUÇÃO

A dengue é considerada uma doença tropical negligenciada de extrema importância para a saúde pública, com expressivo aumento de sua incidência nas últimas décadas (GUZMAN et al., 2016; RAMOS-CASTAÑEDA et al., 2017; MS, 2019a). É uma doença febril aguda em que o paciente acometido pode apresentar-se assintomático ou com sintomas que variam de leves a graves. Em alguns casos, o quadro pode evoluir a óbito. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a dengue em três categorias: dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave (MS, 2019a). São José do Rio Preto-SP tem apresentado uma circulação endêmica de DENV há aproximadamente 15 anos e todos os quatro sorotipos foram detectados na cidade (MONDINI et al., 2009; SOUZA et al., 2011; COLOMBO et al., 2016).

Outro grande problema para a saúde pública, no Brasil e no mundo, são as hepatites virais, que podem manifestar-se de forma aguda ou crônica e infectam milhões de pessoas (MS, 2009). As hepatites virais são inflamações do fígado causadas pelos Vírus da Hepatite A (HAV), Vírus da Hepatite B (HBV), Vírus da Hepatite C (HCV), Vírus da Hepatite D (HDV - Delta) e/ou Vírus da Hepatite E (HEV) (SILVA, 2003). O

desenvolvimento da forma crônica ocorre nos casos de infecção pelo HBV, HCV e HDV, quando a replicação viral persiste por mais de seis meses após a infecção primária (SILVA, 2003; MS, 2019b). De acordo com a OMS, a hepatite viral foi responsável por 1,34 milhão de mortes em 2015 no mundo. Estima-se ainda, que neste mesmo ano, aproximadamente 257 milhões de pessoas tinham hepatite B crônica e 71 milhões de pessoas tinham hepatite C crônica, em todo o mundo (WHO, 2017). Já no Brasil, no período de 1999 a 2016, foram notificados 212.031 casos confirmados de hepatite B e 182.389 de hepatite C. A região Sudeste apresentou maior ocorrência desses vírus quando comparada proporcionalmente com as outras regiões do país, sendo 35,4% de HBV e 62,2% de HCV (MS, 2017).

Alguns estudos mostram que a ocorrência da co-infecção HBV-DENV e/ou HCV-DENV pode mascarar ou complicar os sintomas (TANG et al, 2008; AGARWAL et al, 2011; MACHAIN-WILLIAMS et al., 2014). Entretanto, pesquisas sobre o tema ainda são escassas. É necessário conhecer e entender as manifestações e evoluções clínicas dos pacientes com HBV e HCV co-infectados com DENV, para que se possa estabelecer o risco potencial e verificar os possíveis desfechos clínicos nos mesmos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as manifestações e evoluções clínicas em pacientes cronicamente infectados pelos vírus HBV e/ou HCV, co-infectados com DENV na região de São José do Rio Preto-SP, no período de 2009 a 2016, a fim de conhecer o risco potencial para estes.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo descritivo retrospectivo dos dados dos pacientes cronicamente infectados pelos vírus HCV e HBV, co-infectados com DENV, no período de 2009 a 2016. Foram avaliados dados de pacientes dos 66 municípios do Grupo de Vigilância Epidemiológica 29 (GVE 29) de São José do Rio Preto-SP.

Inicialmente, os resultados de Sorologia, Biologia Molecular (qPCR) e Isolamento do DENV foram obtidos das planilhas de exames laboratoriais do Instituto Adolfo Lutz e do Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan. Enquanto que os dados das infecções por HBV e HCV, foram coletados no SIGH-IAL (Sistema de Informação e Gestão Hospitalar do Instituto Adolfo Lutz). Após este levantamento, os dados obtidos foram importados para uma planilha excel e comparados entre si para verificar a ocorrência de co-infecção HBV-DENV e HCV-DENV. Em seguida, realizou-se a investigação dos resultados de carga viral do HBV e HCV pré e pós-infecção por DENV, e também se houve evolução do quadro clínico para gravidade e/ou óbito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 502 pacientes com HBV, 11 (2,2%) foram diagnosticados com DENV. Quanto à idade, oito (72,7%) tinham entre 30 e 60 anos e três (27,3%) maiores de 60 anos. Os sintomas mais relatados foram cefaleia, vômito e dor nas costas. Diabetes e distúrbios hematológicos foram as comorbidades mais comuns. O levantamento dos dados dos portadores de HBV que tiveram dengue no período estudado mostrou que 46% (cinco) desses pacientes tiveram aumento na sua carga viral após a dengue. Não foi possível obter os dados de quatro pacientes, totalizando 36% dos mesmos (Figura 1A).

Dos 1.388 pacientes com HCV, 45 (3,2%) foram diagnosticados com DENV. Com relação à idade, 26 (59%) tinham entre 30 e 60 anos e 18 (41%) maiores de 60 anos. Os sintomas foram mais diversificados, sendo cefaleia, vômito, dor nas costas e dor retro-orbital os mais relatados seguidos por artralgia, mialgia, exantema, febre e náuseas. As comorbidades mais comuns foram distúrbios hepáticos, renais e diabetes. Com relação aos pacientes portadores de HCV diagnosticados com dengue, apenas 11 dos 45 pacientes (24%) tiveram aumento na carga viral, enquanto 16 (36%) permaneceram com a carga viral inalterada e 10 (22%) tiveram diminuição da mesma após a dengue. Não foi possível comparar a carga viral pré e pós Dengue de oito pacientes (18%) devido à ausência de exames após a infecção por dengue (Figura 1B). Não foram observadas diferenças significativas entre gênero, tanto nos portadores de HBV quanto nos de HCV.

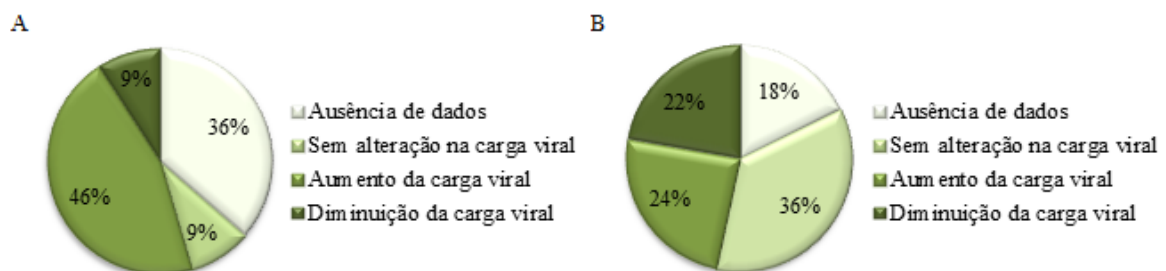


Figura 2 - A: Alteração da carga viral pacientes portadores de HBV infectados com DENV. **B:** Alteração da carga viral pacientes portadores de HCV infectados com DENV. Fonte: elaborada pela autora, 2021.

Dos cinco pacientes portadores de HBV que apresentaram aumento na carga viral de HBV, três (60%) não faziam tratamento medicamentoso para hepatite B por indicação médica no período em que foram acometidos pela dengue, e um (20%) havia abandonado o acompanhamento médico no mesmo período (Figura 2A). Com relação aos pacientes portadores de HCV, dos 11 pacientes que apresentaram aumento da carga viral, sete não faziam uso de medicamento para o tratamento da hepatite C, sendo seis (55%) por indicação médica e um (9%) por abandono do acompanhamento médico. Não foram encontrados dados sobre o tratamento de três pacientes (27%) (Figura 2B).

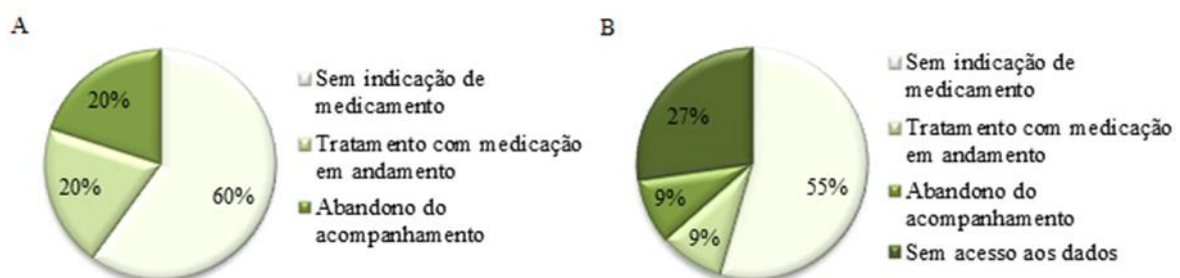


Figura 3 - A: Tratamento dos pacientes portadores de HBV infectados com DENV que tiveram aumento da carga viral de HBV. **B:** Tratamento dos pacientes portadores de HCV infectados com DENV que tiveram aumento da carga viral de HCV. Fonte: elaborada pela autora, 2021.

No tratamento das hepatites virais crônicas são utilizados medicamentos que atuam na diminuição da carga viral e a quantificação da mesma é utilizada para avaliação clínica e acompanhamento destes pacientes. O aumento da carga viral observada em alguns pacientes pode estar relacionado à ausência de tratamento e/ou à co-infecção por DENV, já que alguns estudos apontam que a co-infecção com outros vírus

pode levar ao aumento da replicação viral (EASL, 2017; FERREIRA, 2000; FONSECA, 2007; GASPARONI, 2020; ZALAC, et al, 2019). Porém, não há estudos que relacionem a alteração da carga viral de HBV ou HCV com o acometimento por DENV, sendo necessárias mais pesquisas acerca do assunto.

A ausência de dados sobre a carga viral e o tratamento de alguns pacientes foi limitante no presente estudo, pois restringiram algumas análises e possivelmente interferiram nas taxas observadas. Não foi possível ter acesso aos dados sobre a carga viral de quatro pacientes portadores de HBV e de oito de HCV, e sobre o tratamento de 21 pacientes com hepatite C, consequência da falta de acompanhamento médico dos mesmos, seja por óbito, alta médica ou provável abandono.

Os marcadores de função hepática Transaminase Oxalacética (TGO) e Transaminase Pirúvica (TGP) também foram avaliados, entretanto nenhuma alteração significativa foi encontrada. Isso pode ser devido a dosagem desses marcadores ter sido realizada meses após a cura da dengue, já que estudos relatam que tanto o TGO quanto o TGP apresentam elevação durante o curso da doença e normalizam duas semanas após a cura da mesma (KUO, et al, 1992; AZIN, 2010).

Dois pacientes foram acometidos pela dengue duas vezes no período do estudo, sendo uma portadora de HBV e um de HCV. Da paciente portadora de HBV não foram encontrados registros de exames após os episódios de dengue, não sendo possível comparar se houve alteração na sua carga viral após a doença e a relação entre o primeiro e segundo quadro de dengue. Já o paciente portador de HCV não apresentou alteração na sua carga viral após os quadros de dengue, entretanto não foi possível analisar os marcadores hepáticos e os dados de tratamento deste paciente devido à ausência de prontuário.

Apenas o sorotipo DENV-1 foi encontrado no período estudado, o que é corroborado pelos dados epidemiológicos publicados no período (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019). Nenhuma evolução para dengue grave ou óbito foi encontrada, resultados que estão em consonância com o estudo realizado por Delgado-Enciso e colaboradores (2017), que relataram não haver complicações no quadro de dengue em múltipla infecção viral por HCV e HIV; e também com o estudo realizado por Trung e colaboradores (2010), no qual se observou que o HBV não teve influência sobre a gravidade dos sintomas em pacientes com DENV (TRUNG et al, 2010; DELGADO-ENCISO, 2017). Entretanto, cabe ressaltar que os estudos ainda são controversos e que análises mais elaboradas são necessárias.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a taxa de co-infecção com DENV foi maior em portadores crônicos de HCV e também os sintomas foram mais diversificados nestes pacientes quando comparado com os portadores de HBV. Entretanto, o aumento da carga viral na Hepatite ocorreu mais em pacientes portadores de HBV.

Em ambas co-infecções não foram observadas diferenças significativas entre gênero e na taxa de pacientes sem tratamento. Os marcadores de função hepática TGO e TGP também não apresentaram alteração.

O DENV-1 foi o único sorotipo detectado e nenhuma evolução para dengue grave ou óbito foi encontrada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem especialmente a Doutoranda Brígida Meneghello pela cooperação para obtenção dos dados dos prontuários dos pacientes.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, M.P. et al. Dengue causing fulminant hepatitis in a hepatitis B virus carrier. **BioScience Trends**, India, v. 5, p. 44-45, 2011.

AZIN, F.R.F.G. **Dinamica do perfil hematológico e Bioquímico dos pacientes com dengue internado no hospital São José de doenças infecciosas em Fortaleza-Ceará no período de janeiro a maio de 2008**. Orientador: Ivo Castelo Branco Coelho. 2010. 94 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Ceará - Fortaleza, 2010.

BRANDÃO, ABM et al. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Revista Panamericana de Salud Pública**, [s. l.], v. 9, ed. 3, p. 161-168, 2001.

Boletim Epidemiológico 2019. Dengue e Chikungunya. Disponível em: https://saude.riopreto.sp.gov.br/transparencia/arqu/bolepid/2019/boletins_epidemiologico_dengue_2019.pdf. 28/12/2021

COLOMBO, T.E. et al. Dengue virus surveillance: Detection of DENV-4 in the city of Sao Jose do Rio Preto, SP, Brazil. **Acta Tropica**. Amsterdam: Elsevier Science Bv, v. 164, p. 84-89, 2016.

DELGADO-ENCISO, I et al. Case Report: Dengue Infection in a Human Immunodeficiency Virus-1 Positive Patient Chronically Infected with Hepatitis B Virus in Western Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 96, ed. 1, p. 122-125, 2017. DOI 10.4269/ajtmh.16-047.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 67, p. 370–398, 2017.

FERREIRA, MS. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 33, ed. 4, p. 389-400, 2000.

FONSECA, JCF. História natural da hepatite crônica B. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 40, ed. 6, p. 672-677, 2007.

GASPARINI, L.A.R. **Infecção por Citomagalovírus em pacientes portadores de hepatite C**. Orientador: Vanessa Salete de Paula. 2020. 90 f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, [S. l.], 2020.

GUZMAN MG, et al. Dengue infection. **Nature Reviews Disease Primers**. 18;2:16055. Ago 2016.

KUO CH, et al. Liver biochemical tests and dengue fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. [S.l.] 47(3). p. 265-270, 1992.

MACHAIN-WILIAMS C, et al. Detection of hepatitis C virus coinfection in patients with dengue diagnosis. **Biomed Research International**. [S.l.] 5 p, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hepatites virais. Separata de: MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília-DF: Ministério da saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2009. cap. Caderno 6, p. 23-45. ISBN 978-85-334-1632-1.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Dengue, Chikungunya e Zika. Separata de: MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Guia de Vigilância em Saúde**. 3. ed. Brasília-DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 2019a. v. volume único, cap. Caderno 7, p. 412-463. ISBN 978-85-334-2706-8.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Hepatites virais. Separata de: MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Guia de Vigilância em Saúde**. 3. ed. Brasília-DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços, 2019b. v. único, cap. Caderno 4, p. 264-276. ISBN 978-85-334-2706-8.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV) - **Boletim epidemiológico**: Hepatites virais 2017. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2017. V. 48, Nº 24, 65 p. ISSN 2358-9450

MONDINI, A et al. Spatio-Temporal Tracking and Phylodynamics of an Urban Dengue 3 Outbreak in São Paulo, Brazil. **PLoS: neglected tropical diseases**, Singapore, v. 3, ed. 5: e448, 2009.

RAMOS-CASTAÑEDA, J et al. Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. **PLoS: Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 11, ed. 1, p. 1-24, 2017.

SILVA, L.C. **Hepatites agudas e crônicas**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2003. 424 p. ISBN 9788573781380.

SOUZA, R.P. et al. Dengue Virus Type 4 Phylogenetics in Brazil 2011: Looking beyond the Veil. **PLoS: Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 5, ed. 2, 2011.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 34, ed. 1, p. 69-82, 2001.

TANG Y, et al. Unique impacts of HBV co-infection on clinical and laboratory findings in a recent dengue outbreak in China. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 79, ed. 2, p. 154-158, 2008.

TRUNG, DT et al. Liver Involvement Associated with Dengue Infection in Adults in Vietnam. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 83, ed. 4, p. 774-780, 2010. DOI 10.4269/ajtmh.2010.10-0090.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (Genova) (org.). **Global Hepatitis Report 2017**. Genova: [s. n.], 2017. 83 p. ISBN 978-92-4-156545-5.

ZAJAC, M. et al. Hepatitis C - New drugs and treatment prospects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 165, p. 225-249, 2019.

DOI: <https://doi.org/10.53934/101022-2>

A EVOLUÇÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

Suellen Galindo Avelino¹; Roberto Mistuyoshi Hiramoto²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CPM/ IAL - CEFOR; E-mail: suellenavelinogalindo@gmail.com

²Pesquisador do Núcleo de Parasitoses Sistêmicas – CPM - IAL.

Resumo: As notificações de doenças são de grande valia para o serviço de vigilância epidemiológica, sendo um dos fatores fundamentais para a ação de órgãos competentes visando à saúde pública. Essas ações contribuem para catalogar áreas consideradas endêmicas para determinada moléstia e criar ações voltadas a prevenção, observando a evolução das doenças ao longo dos anos. A leishmaniose visceral (LV) é considerada uma doença tropical negligenciada, possuindo ampla distribuição geográfica, atingindo todas as regiões do Brasil. No Estado de São Paulo (ESP) a cada ano tem sido localizado casos da doença em novos municípios, somando uma grande área de distribuição que avança anualmente, esta situação tem causado preocupação nas áreas de saúde, pois estas têm de estar preparadas para atender eventuais pacientes e criar estratégias para conter a propagação em regiões endêmicas. O presente trabalho teve como objetivo demonstrar a evolução da LV dentro do ESP, mostrando de forma clara e objetiva sua distribuição ao longo dos anos, foi utilizado registros de infecção humana e canina que ocorreram nos municípios do Estado. Os resultados evidenciaram que dos 645 municípios do ESP, 205 possuem notificação para LV canina (LVC) entre 1998 a novembro de 2021 e 113 para casos humanos de LV, além de 207 municípios possuírem a presença de *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da transmissão da doença no Brasil entre 1970 a novembro de 2021.

Palavras chaves: Leishmaniose visceral, distribuição epidemiológica, Estado de São Paulo

INTRODUÇÃO

A LV é uma doença parasitária causada pelo agente etiológico *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* (Ross, 1903) no velho mundo, e *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (Nicolle, 1908) no novo mundo. É uma doença crônica, grave, de alta letalidade, que apresenta aspectos clínicos e epidemiológicos diversos e característicos para cada região onde ocorre. É caracterizada pelo acometimento de órgãos importantes como fígado, baço e medula óssea, causando uma série de sinais e sintomas que senão tratados imediatamente podem levar ao óbito do acometido (NEVES *et al.* 2011).

Os vetores da doença são dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, sendo o de maior importância epidemiológica no Brasil o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (*Lu. longipalpis*), conhecidos popularmente como: mosquito palha, birigui, tatuquira, entre outros. É bastante adaptado ao peridomicílio e as mudanças de temperatura, podem ser encontradas em regiões onde possui mata nativa próxima às residências, podendo ser facilmente despercebido dentro de domicílios e em abrigos de animais domésticos, geralmente são mais ativos do crepúsculo ao amanhecer. A transmissão da doença ocorre através da picada do vetor infectado, no caso dos flebotomíneos só fêmeas transmitem a doença, pois são elas que se alimentam de sangue (BRASIL, 2019; CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2020).

Desde o século XX, quando foi identificada no país e o ciclo de transmissão foi elucidado, o controle da doença se configurou em um desafio para pesquisadores e profissionais da saúde. No Brasil o ciclo de transmissão possui caráter antroponózoótico, sendo o cão doméstico (*Canis familiaris*) o principal reservatório em áreas urbanas e periurbanas, além de também sofrer os impactos da infecção manifestando a LVC (WERNECK, 2016; BRASIL, 2019).

Atualmente é observado um crescimento exponencial da LV no ESP, esse crescimento pode ser atribuído a expansão de áreas urbanas para territórios de mata, provocados pelo desmatamento em favor da construção civil e urbanização causando alterações ecológicas acarretando fatores que propiciam o adoecimento do homem, além de movimentos migratórios e baixa renda, que levam a condições de nutrição, habitação e saneamento desfavoráveis favorecendo a expansão territorial da doença (OLIVEIRA *et al.* 2019). O presente trabalho teve como objetivo demonstrar a evolução da LV dentro do ESP, demonstrando de forma clara e objetiva sua distribuição ao longo dos anos.

MATERIAL E MÉTODOS

Tipo de estudo: Estudo epidemiológico é do tipo descritivo para avaliação do avanço da LV no Estado de São Paulo.

População de estudo: Notificações de casos e óbitos humanos por LV, que ocorreram nos municípios do ESP, entre os anos de 1999 a outubro de 2021, e casos de LVC no período de 1998 a novembro de 2021, além dos municípios onde a presença do vetor (*Lu. longipalpis* e/ou vetores secundários) foi detectada entre os anos de 1970 a novembro de 2021.

Fonte de dados: Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) para obtenção de casos e óbitos relacionados a LV em humanos.

Instituto Adolfo Lutz (IAL) para obtenção de dados relacionados a distribuição de casos caninos pelos municípios do ESP.

Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) para obtenção da distribuição de *Lu. longipalpis* e vetores secundários envolvidos na transmissão da LV no ESP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Distribuição geográfica de *Lutzomyia longipalpis* e vetores secundários envolvidos na transmissão de leishmaniose visceral no Estado de São Paulo

Os dados demonstraram um aumento no número de municípios do ESP que notificaram a presença de vetor *Lu. longipalpis* nos últimos 51 anos, dado que seu primeiro relato ocorreu em 1970 na Serra da Mantiqueira, na Região Leste do ESP (SUCEN, 2019).

Entre os anos de 1970 a 2000, 28 dos 645 municípios notificaram a presença o vetor, sendo em grande maioria em regiões limítrofes ao município de Araçatuba. A análise com um intervalo de 9 anos, demonstra um aumento de 86 novos municípios com a presença do vetor primário entre os anos de 2001 a 2011, tendo sua expansão no sentido Centro – Oeste paulista, Alta sorocabana, e Alta paulista. Atualmente o cenário de distribuição do vetor *Lu. longipalpis* soma um total de 207 municípios do ESP até dados de novembro de 2021, sendo observado que a sua distribuição segue em sentido ao litoral do Estado. (Figura 1).

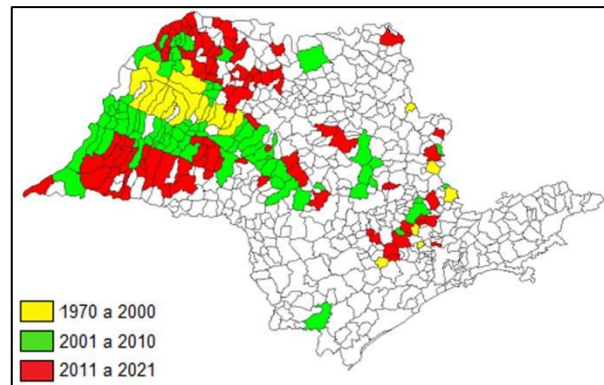


Figura 1: Distribuição de municípios do Estado de São Paulo com a presença de *Lu. longipalpis*, de 1970 a novembro de 2021. (IMUMARU MKG, IAL Taubaté).
Fonte: SUCEN/CCD/SES/SP, 2021.

A expansão geográfica da LV no ESP está quase que diretamente relacionada a distribuição do vetor *Lu. longipalpis*, segundo Oliveira *et al* (2019), a associação de mudanças climáticas e ambientais, como alterações de temperatura e umidade relativa do ar, possui repercussão significativa na densidade vetorial, e favorecem a adaptação de flebotomíneos ao peridomicílio. Outro fator a ser levado em consideração, liga o avanço da distribuição vetorial, ao avanço de rodovias que cortam o ESP, como exemplo a Rodovia Marechal Rondon, que segue da Região Oeste do ESP e se expande para outras regiões atingindo uma grande margem de território podendo contribuir para a distribuição de vetores e consequentemente casos caninos e humanos de LV como citado por Cardim, *et al* (2016).

A partir do ano de 2019, sob orientação do Ministério da Saúde (MS), foi considerada a classificação dos municípios quanto a presença e transmissão de LV e LVC por vetores secundários, sendo catalogados no ESP três espécies de interesse em saúde: *Pintomyia fischeri* (*P. fischeri*), *Migonemyia migonei* (*M. migonei*) e *Nyssomyia intermedia* (*Ny. Intermedia*). Dentro do território paulista, no ano 2020 foram notificados 22 municípios com a presença de *P. fischeri* e *M. migonei* distribuídos predominantemente nas Regiões Intermediária e Imediata de São Paulo. Nas Regiões Intermediária de São José dos Campos e Região Imediata de Caraguatatuba – Ubatuba – São Sebastião predominou a presença da espécie *Ny. Intermedia* (RANGEL, *et al* 2020).

Os vetores secundários até o ano de 2020 eram encontrados em 25 municípios do Estado, localizados nas Regiões Sedes de São Paulo e no Vale do Paraíba pegando parte do litoral norte paulista, não seguindo a mesma área de distribuição onde é encontrada *Lu. longipalpis*.

Distribuição geográfica dos casos de Leishmaniose Visceral Canina no Estado de São Paulo

O primeiro caso autóctone de LV no ESP foi notificado no ano de 1998 em um cão, oriundo do município de Araçatuba, Região Oeste do Estado. Os cães são considerados reservatórios doméstico de *L. infantum* do ponto de vista epidemiológico, a LVC no Brasil é considerada uma doença de grande importância para a saúde animal, além de o cão doméstico ser responsável pelos focos de transmissão da doença nas regiões urbanas (MATSUMOTO, *et al* 2021).

Entre os anos de 1998 a 2000, 20 municípios notificaram casos caninos LV, observando um crescente de casos para novos municípios em um período de 9 anos, entre os anos de 2001 a 2010, 71 novos municípios notificaram a presença de LVC, seguindo

uma distribuição que acomete toda a extensão da Região Oeste do Estado, seguindo para as Regiões Centro – Oeste e Centro – Sul. No cenário epidemiológico atual de casos caninos, até novembro de 2021, agregam-se 114 novos municípios com casos de cães infectados por *L. infantum*, perfazendo um total de 205 municípios dentro do ESP. (Figura 2).

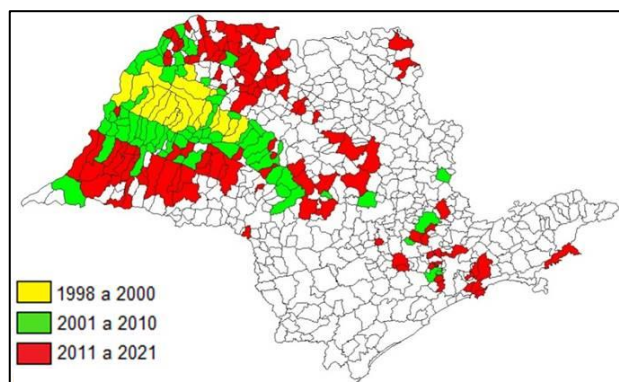


Figura 2: Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral Canina nos municípios do Estado de São Paulo, de 1998 a novembro de 2021. (IMUMARU, MKG, IAL Taubaté)
Fonte: IAL/CCD/SES/SP, 2021.

No ano de 2020 houve uma queda no número de notificações de LVC, com apenas 2 novos municípios notificando casos caninos, a baixa notificação nesse período pode ser atribuída a uma subnotificação devido a suspensão de inquéritos e busca por animais acometidos devido da pandemia de Covid-19 que afetou o Brasil em março 2020, já que a realização dos inquéritos de casos caninos implicaria na exposição dos profissionais com os tutores de cães supostamente acometidos por LV. Devido a esse fator, 2020 é o ano com a menor notificação de novos municípios com casos caninos desde 1998.

Distribuição geográfica dos casos de Leishmaniose Visceral Humana no Estado de São Paulo.

O município de Araçatuba foi o epicentro da LV dentro do ESP. O primeiro caso autóctone em seres humanos ocorreu no ano de 1999, um ano após ser relatado o primeiro caso canino no mesmo município. Entre os anos de 1999 a 2000, 4 municípios notificaram casos de LV, todos na Região de Araçatuba, somando um total de 32 casos, com 5 óbitos ocorridos nesse período. Entre os anos de 2001 a 2010, a distribuição de municípios que notificaram a presença de casos de LV cresceu significativamente, tendo um total de 65 novos municípios que notificaram casos da doença, predominando os municípios das Regiões do Extremo Oeste e Centro Oeste do ESP.

De acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) o número de casos humanos confirmados nesse período é de 1.766, destes 157 evoluíram para óbito, resultando numa letalidade de 8,92% nesse período.

Entre os anos de 2011 a novembro de 2021, foram notificados 44 novos municípios que relataram a ocorrência de casos de LV. Desde seu primeiro ano de notificação em 1999, o ESP tem ao todo 113 municípios com a presença da doença em humanos. Durante o período de 2011 a outubro de 2021, foram notificados um total de 1.412 casos de LV, destes 123 evoluíram para óbito, resultando em numa letalidade geral de 8,71% nesse período. (Figura 3).

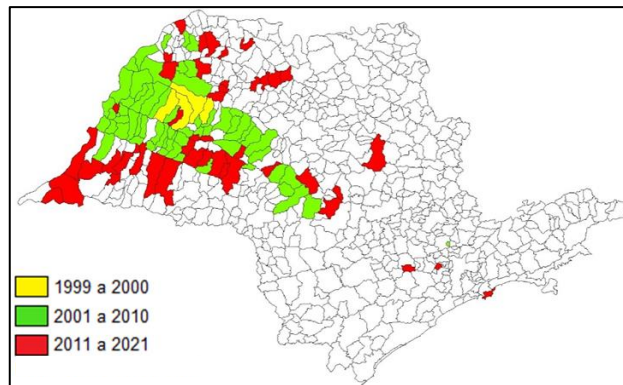


Figura 3: Distribuição de casos autóctones de Leishmaniose Visceral humana nos municípios do Estado de São Paulo, de 1999 a novembro de 2021. (IMUMARU, MKG, IAL Taubaté).
Fonte: CVE/CCD/SES/SP, 2021.

Os resultados apontam que a distribuição de casos de LVC no ESP são expressivamente maiores do que casos de LV em humanos, esses resultados coincidem com outras regiões do país, como citado por Bevilacqua *et al*, (2001), que demonstra que em Belo Horizonte no Estado de Minas Gerais, os casos caninos se sobressaem aos casos em humanos. A manutenção dos casos de LVC é um dos principais focos dos órgãos de controle, pois necessitam de medidas de logística operacionais complexas e financeiras para execução.

Até o ano de 1990, somente 10% dos casos de LV eram notificados fora da Região Nordeste do Brasil (WERNECK, 2010) ao longo dos anos, esse cenário tomou uma proporção igualitária em quase todo território nacional. No ESP os casos humanos de LV, desde 1999 apresentaram um crescente significativa, chegando no ano de 2008 com seu maior número de casos, somando 294 casos, com 24 óbitos notificados, dando uma taxa de letalidade de 8,16%. Os casos humanos de LV se concentram em sua maioria nos municípios da Região Oeste do ESP, onde foi o ponto de entrada da moléstia, atingindo principalmente crianças e idosos. Entre os anos de 2001 a 2010, existiu um pico de municípios afetados, somando 65 municípios no total, número que decaiu nos próximos anos.

No cenário epidemiológico atual, entre os anos de 2020 a 2021, houve um decaimento nas notificações de novos municípios com LV humana, somando apenas 4 municípios nesse período, o número de casos autóctones desde 2017 também apresentou uma queda, semelhante ao que vem ocorrendo em praticamente todas as regiões do Brasil, no entanto, a letalidade no ESP aumentou ligeiramente no período de 2017 a 2020, apresentando valores semelhantes a região nordeste que tem um número muito maior de casos da doença (BRASIL, 2021).

CONCLUSÃO

O presente trabalho destacou um número expressivo de municípios do Estado de São Paulo que são endêmicos para LV, ou possuem receptividade para vetores e cães. No decorrer do período estudado, pode ser notada a evolução territorial da doença que vem ocorrendo dentro do território paulista, destacando a importância da atualização dos municípios com notificação para a doença humano ou canina, com objetivo de alertar e sensibilizar os profissionais da saúde, quanto ao risco da doença em humanos. A importância do conhecimento epidemiológico de uma determinada moléstia endêmica, gera um conhecimento multidisciplinar aos profissionais da saúde, favorecendo diagnóstico mais precisos sobre a ocorrências de doenças que acometem a região onde

vivemos, destacando também a necessidade de informação para as populações residentes em áreas endêmicas para LV, afim de gerar conhecimento que contribua para a prevenção, e cuidados com a saúde humana e animal nessas regiões.

REFERÊNCIAS

BEVILACQUA P.D., PAIXÃO H.H., MODENA C.M. & CASTRO M.C.P.S. 2001. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 53(1):1-8.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 3ª edição. Brasília; Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 5ª edição. Brasília; Ministério da Saúde, 2021.

CARDIM, M.F. M; GUIRADO, M.M; DIBO, M.R; NETO, F.C. Leishmaniose visceral no Estado de São Paulo, Brasil: análise espacial e espaço-temporal. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, 2016, 50:48.

Leishmaniose visceral - Vetores. **SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias**, 2019. Disponível em <<https://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-visceral/vetores>>. Acesso: 3 de outubro de 2021.

MATSUMOTO, P.S.S et al. Impact of the dor population and household environment for the maintenance of natural foci of *Leishmania infantum* transmission to human and animal hosts in endemic areas for visceral leishmaniasis in São Paulo state, Brazil. **PLoS ONE** 16 (8): e0256534. Aug, 2021.

OLIVEIRA S.S; et al. Classificação epidemiológica dos municípios do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2018. **Boletim Epidemiológico Paulista – (BEPA)** 2019; 16 (192): 29 – 46.

Parasites – Leishmaniasis. **Centers for Disease Control and Prevention**, 2020. Disponível em <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>>. Acesso: 1 de outubro de 2021.

PARASITOLOGIA Humana: Leishmaniose Visceral. In: NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 12ª ed. São Paulo: Atheneu, 2011. cap. 10, p. 69-88.

RANGEL O; et al. Classificação epidemiológica dos municípios do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2019. **Boletim Epidemiológico Paulista – (BEPA)** 2020; 17 (204): 13 – 34.

WERNECK, G.L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 26(4): 644-645, abril. 2010.

WERNECK, GL. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 32(6): EeD010616, jun. 2016.

DOI: <https://doi.org/10.53934/101023-2>

SURTOS DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS ASSOCIADOS AO CONSUMO DE ALIMENTOS DE ORIGEM VEGETAL, BRASIL, 2000 -2020

Isabela Sestito Falanque¹; Jacqueline Tanury Macruz Peresi²

¹Estudante do Curso de Pós-Graduação em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - IAL - CLRSJ;
E-mail: isabela.sestito@outlook.com

²Pesquisador do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas- CLRSJ

RESUMO

Tem sido identificado cada vez mais surtos alimentares devido à ingestão de alimentos de origem vegetal, o que vem despertando preocupação de órgãos de saúde pública, produtores e consumidores. O presente trabalho tem como objetivo realizar um estudo da ocorrência de surtos alimentares causados pela ingestão de alimentos de origem vegetal, como hortaliças, frutas, produtos de frutas e similares, no período de 2000 a 2020, no Brasil a partir de informações do banco de dados público do Ministério da Saúde. Dos 14.033 surtos alimentares notificados no Brasil no período, 267 (1,9%) foram relacionados a hortaliças, frutas, produtos de frutas e similares totalizando 5.422 doentes e 3 óbitos. Dentre os agentes etiológicos, *Escherichia coli* foi a mais identificada (12,4%), seguida da *Salmonella* spp. (12%) e *Bacillus cereus* (9%). Os locais de maior ocorrência foram residências correspondendo a 30% do total, seguido dos restaurantes/padarias e similares (16,1%). Os estados de Pernambuco e Paraná se destacaram pelo maior número de notificações (17,2% e 14,2%, respectivamente). Diante do exposto enfatiza-se a importância da implantação/implementação de Programas de vigilância em toda a cadeia produtiva com melhoria do sistema de investigação e de notificação de surtos visando o controle e prevenção de novas ocorrências.

Palavras – Chave: contaminação de alimentos; doenças transmitidas por alimentos; frutas; hortaliças; surtos de doenças.

INTRODUÇÃO

O número de episódios de doenças transmitidas por alimentos (DTA) vêm expandindo de modo significativo em nível mundial, sendo causadas pela ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos patogênicos, toxinas microbianas ou substâncias químicas (WHO, 2015). É possível notar que as DTA também tem sido atribuídas à ingestão de alimentos de origem vegetal, o que vem despertando a preocupação de órgãos de fiscalização, produtores e consumidores (ELIAS, et al., 2018). Nos EUA, em 2006, um surto por *Escherichia coli* O157:H7 associado ao consumo espinafre acometeu 199 pessoas, sendo 102 (51%) hospitalizadas, 31 com desenvolvimento de Síndrome Urêmica Hemolítica-SHU e três óbitos (CDC, 2006). Uma das razões para as ocorrências de DTA envolvendo produtos de origem vegetal se dá pelo fato de que grande parte deles são consumidos crus, não existindo uma etapa no seu preparo que elimine os agentes patogênicos, como, por exemplo, um tratamento térmico (ELIAS, 2018). O presente trabalho tem como objetivo realizar um estudo da ocorrência de surtos alimentares causados pela ingestão de alimentos de origem vegetal, como hortaliças, frutas, produtos de frutas e similares, no período de 2000 a 2020, no Brasil.

MATERIAL E MÉTODO

Este estudo refere-se a um trabalho de revisão elaborado com base no banco de dados público do Ministério da Saúde (MS) acessado em 09 de dezembro de 2021, de onde se encontravam disponibilizados dados referentes ao período de 2000 a 2019 (BRASIL, 2020). Quanto aos do ano de 2020, não disponíveis na data do referido acesso, as informações foram obtidas por e-mail com o Fala.Br/Ministério da Saúde, 2021, uma Plataforma Integrada de Ouvidoria e Acesso à Informação da Controladoria Geral da União do Governo do Brasil. Cabe ressaltar que este banco de dados é dinâmico, ou seja, submetido a atualizações pelo MS, com a ressalva deste mesmo órgão de que os dados do ano anterior ao vigente são preliminares e sujeitos a atualizações. Os unitermos pesquisados foram: contaminação de alimentos, doenças transmitidas por alimentos, frutas, hortaliças e surtos de doenças.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com dados do Ministério da Saúde, de 2000 a 2019 (BRASIL, 2020) e 2020 (Fala.Br/BRASIL, 2021), o número total de surtos de DTA foi de 14.033, sendo que 267 (1,9%) deles estavam relacionados ao consumo de hortaliças, frutas, produtos de frutas e similares.

Dados dos Estados Unidos, do Sistema Nacional de Notificação de Surtos (NORS), revelaram que no período de 2000 a 2020 foram notificados 22.069 surtos de DTA de origem hídrica e alimentar (CDC, 2022a), porém, o número de episódios relacionados a frutas e hortaliças disponibilizado pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) a partir de 2006, resultou em 58 surtos até o ano de 2020 (CDC, 2022b). Se compararmos o total de surtos alimentares notificados em ambos os países, nos Estados Unidos ocorreu uma quantidade superior em relação ao Brasil no período avaliado, contudo, o Brasil, apresentou entre 2006 a 2020 uma quantidade mais expressiva de surtos decorrentes da contaminação de frutas e hortaliças, ou seja, 162 surtos.

Levando em consideração que o consumo per-capita de frutas e hortaliças nos EUA pode variar em torno de 143 Kg/ano e no Brasil 56 Kg/ano (COSTA, 2016), o menor número de episódios relacionados a estes alimentos nos EUA no período avaliado poderia ser atribuído às práticas mais seguras na cadeia produtiva destes alimentos, desde o plantio até a mesa do consumidor, ressaltando que o CDC (2021a), de uma forma sucinta e explicativa, informa a população maneiras adequadas para manipulação dos alimentos, para que haja conhecimento sobre as consequências acarretadas referentes à má higienização das frutas e hortaliças. O CDC fornece um elo importante entre os produtores de alimentos e os sistemas de segurança alimentar de agências governamentais, com relação às DTA, trabalhando em parceria para a determinação das principais fontes de contaminação, atuando na investigação dos surtos em vários estados do país e adotando sistemas de prevenção dos surtos. Auxilia os departamentos de saúde no rastreamento e investigação das DTA por intermédio de sistemas de vigilância, como o PulseNet e FoodNet. (CDC, 2021b).

A distribuição anual dos surtos de DTA no Brasil, envolvendo alimentos de origem vegetal, está apresentada na Figura 1.

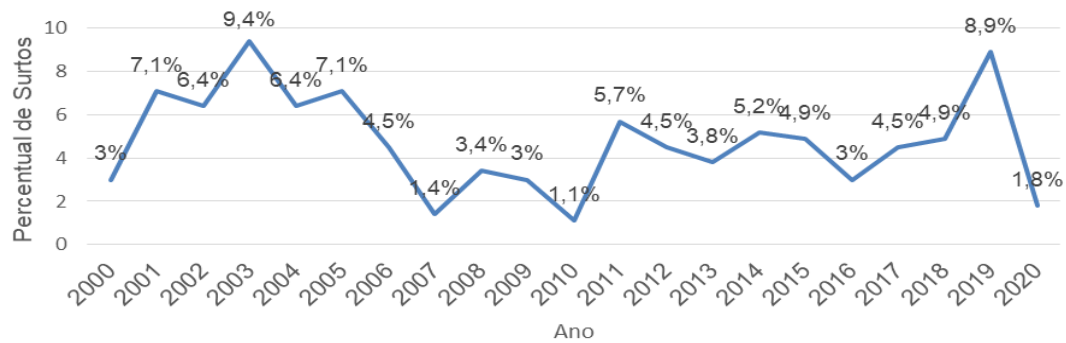


Figura 1 - Distribuição anual do percentual de surtos de DTA envolvendo alimentos de origem vegetal, Brasil, 2000 - 2020

Fonte: elaborada pelo autor, a partir dos dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2020; Fala.Br/BRASIL, 2021)

No Brasil, dos 267 surtos ocasionados pelo consumo de alimentos de origem vegetal no período avaliado, obteve-se, de 84,3 e 88% deles um total de 25.919 pessoas expostas e 5.422 doentes, respectivamente, distribuídas de acordo com a Figura 2. De 83,9% dos surtos houve o relato de três mortes, em 2003, 2013 e 2019. No entanto, vale ressaltar que em 16,1% dos surtos não houve informações sobre ocorrência de óbitos, em 12% sobre o número de doentes e em nenhum deles sobre o número de hospitalizados, revelando a necessidade de melhorias no processo de notificação, lembrando que os estudos epidemiológicos e a adoção de medidas em saúde pública adequadas dependem também da correta e completa informação de dados.

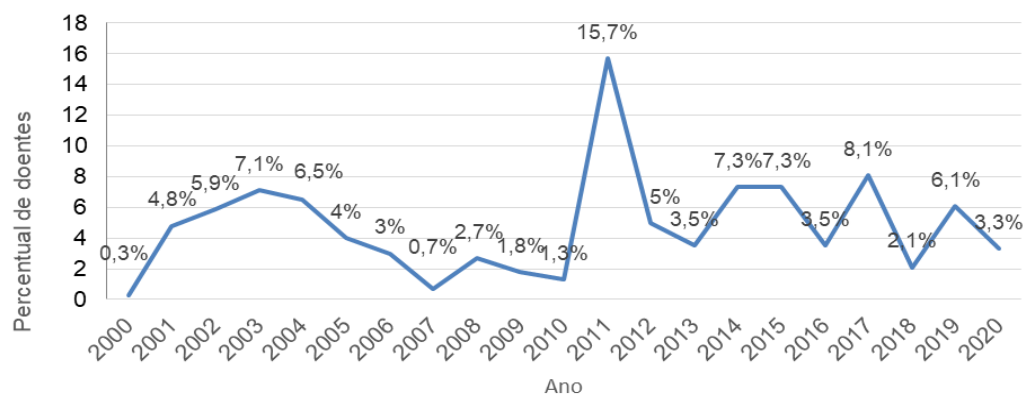


Figura 2 - Distribuição anual do percentual de doentes referentes aos surtos de DTA envolvendo alimentos de origem vegetal, Brasil, 2000-2020

Fonte: elaborada pelo autor, a partir dos dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2020; Fala.Br/BRASIL, 2021)

Apesar do número de surtos em 2011 ter sido próximo a média entre os anos no período avaliado, o número de pessoas doentes neste ano, pelo consumo deste tipo de alimento, foi expressivo (15,7% do total do período avaliado) (Figura 2), podendo ser justificado pelo fato de que 4 (26,7%) dos episódios de 2011 ter ocorrido em instituições como alojamentos e ambientes de trabalho, locais com número elevado de expostos.

Dentre os agentes etiológicos envolvidos nos surtos relacionados aos alimentos de origem vegetal (Figura 3) destaca-se o número de surtos sem identificação do agente (ignorados, inconclusivos e inconsistentes) (39,3%) e a detecção do *Trypanossoma cruzi*, agente etiológico raramente envolvido em surtos por outros tipos de alimentos.

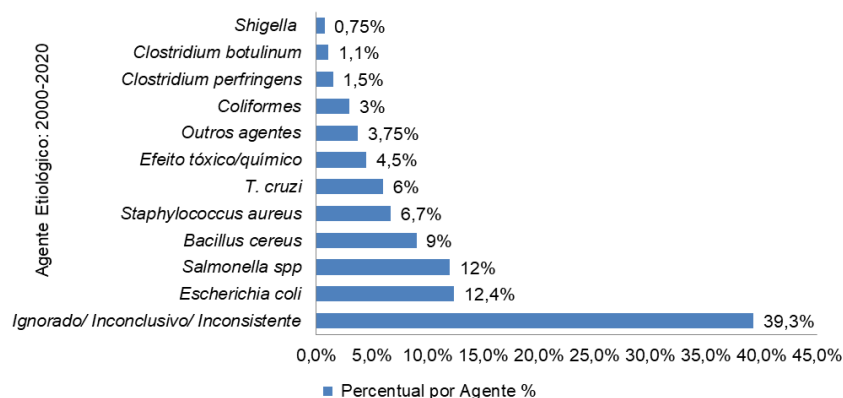


Figura 3 - Distribuição percentual, por agente etiológico, dos surtos de DTA envolvendo alimentos de origem vegetal, Brasil, 2000 – 2020

Fonte: elaborada pelo autor, a partir dos dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2020; Fala.Br/BRASIL, 2021)

No decorrer das duas décadas, observou-se que a partir de 2015 e até 2019, *T. cruzi* apresentou alterações significativas sofrendo aumento gradual no número de notificações como uma em 2015 (7,7%), uma em 2016 (12,5%), duas em 2017 (16,7%), três em 2018 (23,1%) e 9 surtos em 2019, representando neste último ano 37,5% dos surtos relatados. Quanto *E. coli* e *Salmonella*, os agentes mais isolados, apresentaram-se frequentes e com pequenas variações durante todo o período avaliado, ressaltando que em 87,9% dos episódios relacionados a *E. coli* não havia informações se pertencia ou não a alguma categoria diarreio gênica e 90,6% envolvendo *Salmonella* não foi informado o sorotipo. Os produtos frescos têm sido reconhecidos como uma fonte comum de *Salmonella*, tendo em vista que este patógeno tem a capacidade de se fixar e internalizar nestes alimentos, cuja contaminação pode ocorrer durante a produção, colheita, processamento e transporte (KILONZO-NTHENGE; MUKUNA, 2018).

Entre os alimentos incriminados nos surtos avaliados, as hortaliças apresentaram o maior número de envolvimento com 149 (56%) episódios e as frutas, produtos de frutas e similares, com 118 (44%).

A Figura 4 apresenta a distribuição dos surtos por local de ocorrência, ressaltando que a identificação daqueles mais frequentes gera subsídios aos órgãos de vigilância para a implantação/implementação de Programas de orientação da população e/ou manipuladores de alimentos sobre medidas preventivas/corretivas que minimizem tais episódios, com ênfase na adequada higienização e conservação dos alimentos.

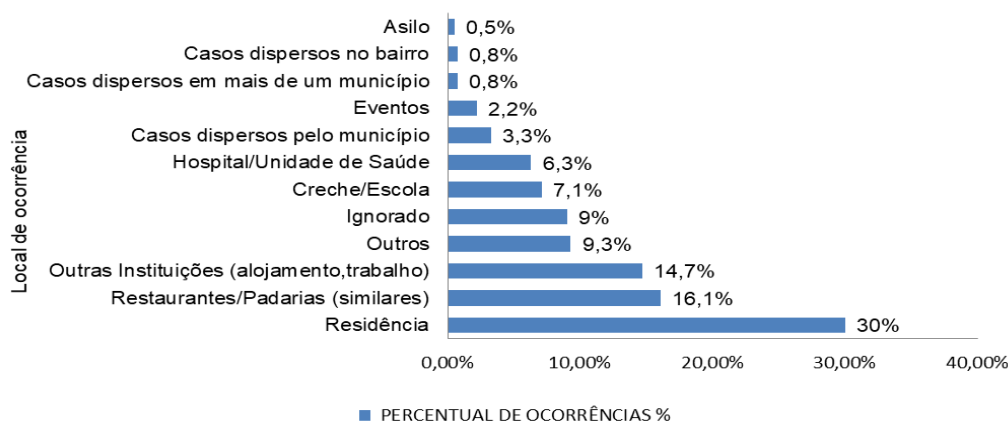


Figura 4 - Distribuição percentual, por local de ocorrência, dos surtos de DTA envolvendo alimentos de origem vegetal, Brasil, 2000 – 2020

Fonte: elaborada pelo autor, a partir dos dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2020; Fala.Br/BRASIL, 2021)

Quanto à ocorrência dos surtos por região geográfica, a Figura 5 apresenta a distribuição por estado.

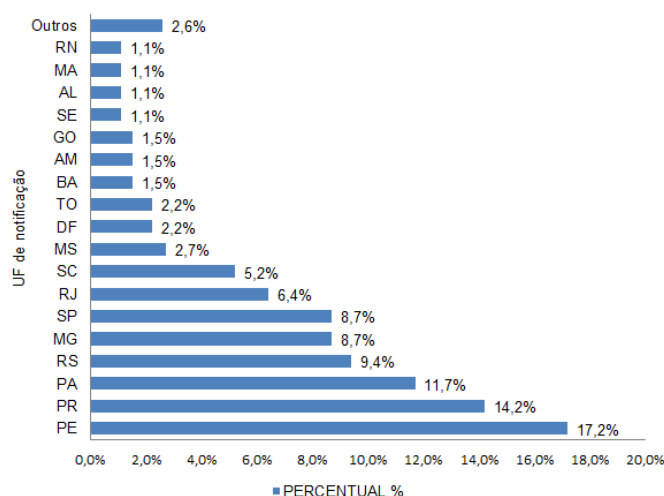


Figura 5 - Distribuição percentual, por estado, dos surtos de DTA envolvendo alimentos de origem vegetal, Brasil, 2000 – 2020

Fonte: elaborada pelo autor, a partir dos dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2020; Fala.Br/BRASIL, 2021)

Além da possibilidade de contaminação dos alimentos em todas as etapas da cadeia alimentar com consequente ocorrência de DTA, a maior notificação em alguns estados pode ser atribuída a outros fatores, como a um sistema de vigilância mais ativo. Nos anos de 2012 e 2013, por exemplo, realizou-se no estado de Pernambuco a formação permanente do Sistema de Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, o que possivelmente tenha contribuído para o aumento do número notificação em locais anteriormente silenciosos (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE, 2016). Por outro lado, segundo Silva et al. (2017), houve aumento considerável de surtos neste estado em alguns anos devido ao comércio de alimentos produzidos em ambiente doméstico.

Em relação ao critério de confirmação dos surtos (Figura 6), importante ressaltar que em 74,9% das ocorrências não houve confirmação pela análise dos alimentos, podendo a causa ser atribuída, entre outras, a indisponibilidade de alimentos suspeitos para a realização da análise bromatológica, a identificação incorreta da refeição suspeita e consequente coleta de alimentos não relacionados ao surto e ainda, dificuldades de órgãos de vigilância sanitária enfrentadas na coleta de amostras.

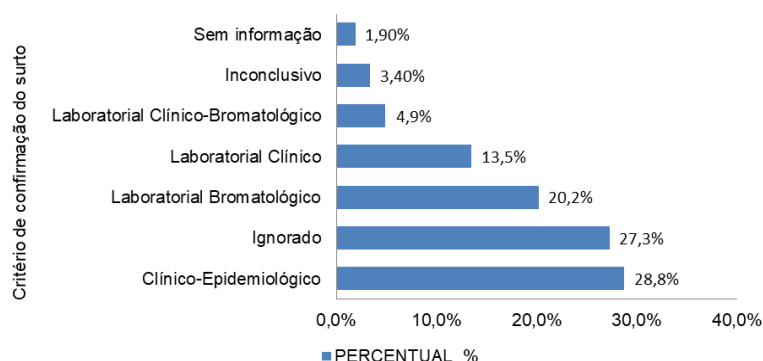


Figura 6 - Distribuição percentual, por critério de confirmação, dos surtos de DTA envolvendo alimentos de origem vegetal, Brasil, 2000 – 2020

Fonte: elaborada pelo autor, a partir dos dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2020; Fala.Br/BRASIL, 2021)

CONCLUSÃO

Diante do envolvimento dos alimentos de origem vegetal como veículos de diferentes patógenos nas DTA, no Brasil enfatiza-se a importância da implantação/implementação de programas de vigilância em toda a cadeia alimentar envolvendo estes produtos com melhoria do sistema de investigação e de notificação de surtos. Ressalta-se ainda, que a coleta de amostras de alimentos pertinentes e em tempo hábil permite a identificação da etiologia do surto, sua associação às diferentes classes de alimentos e, conseqüentemente, a adoção de medidas de controle e prevenção de novas ocorrências.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Saúde de A a Z. **Doenças transmitidas por alimentos**. Ministério da Saúde. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/doencas-transmitidas-por-alimentos>> . Acesso em: 09 dez. 2021.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Fresh Spinach (FINAL UPDATE). **2006. Available at:** <https://www.cdc.gov/ecoli/2006/spinach-10-2006.html>. Accessed: 13 dez. 2021.
- _____. (Centers for Disease Control and Prevention). **Four Steps to Food Safety**. 2021a. Available at: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/keep-food-safe.html>>. Accessed: 26 nov. 2021.
- _____. (Centers for Disease Control and Prevention). **CDC'S Role in Food Safety**. 2021b. Available at: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/cdc-and-food-safety.html>>. Accessed: 13 dez. 2021.
- _____. (Centers for Disease Control and Prevention). **National Outbreaks Reporting System (NORS)**. 2022a. Available at: <<https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>>. Accessed: 18 nov. 2021.
- _____. (Centers for Disease Control and Prevention). **List of Selected Multistate Foodborne Outbreak Investigations**. 2022b. Available at: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/outbreaks-list.html>>. Accessed: 11 out. 2021.
- COSTA, J. E. B. A relação direta entre alimentação saudável e o consumo de frutas, legumes e verduras. **CNA Brasil**. 2016. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/artigostecnicos/31-artigo_0.41514200%201514912074.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2021.
- ELIAS, S. O. de. **Avaliação quantitativa do risco de Salmonella spp. e de Escherichia coli O157:H7 em alface no Rio Grande do Sul**. 2018. 154f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). UFRGS, Porto Alegre, 2018. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/179388>>. Acesso em: 16 set. 2021.
- ELIAS, S.O.; DECOL, L.T.; TONDO, E.C. Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008 through 2014. **Food Quality and Safety**. 2018. Available at: <https://academic.oup.com/fqs/article/2/4/173/5144913>. Accessed: 09 dez. 2021.
- KILONZO-NTHENGE, A.; MUKUNA, W. *Salmonella* and Antimicrobial Resistance in Fresh Produce. In: Mascellino M.T. editor. *Salmonella – A Re-emerging Pathogen*, 2018. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/58719>>. Acesso em: 19 mai. 2022.
- SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. Diretoria Geral de Promoção, Monitoramento e Avaliação da Vigilância em Saúde. **Perfil Socioeconômico, Demográfico e Epidemiológico: Pernambuco 2016**. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/perfil_socioeconomico_demografico_e_epidemiologico_de_pernambuco_2016.pdf>. Acesso em: 01 dez. 2021.
- SILVA, J. C. G. da. et al. Incidência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no estado de Pernambuco, um acompanhamento dos dados epidemiológicos nos últimos anos. **Ciências Biológicas e de Saúde Unit. Facipe**, 2017. Disponível em: <<https://periodicos.set.edu.br/facipesaude/article/view/4180/2377>>. Acesso em: 30 nov. 2021.
- WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. **World Health Organization (WHO)**, 2015. Available at:

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Accessed: 15 fev. 2022.

COINFEÇÕES BACTERIANAS EM PACIENTES COM A COVID-19 – Revisão de Literatura

Laine Andreotti de Almeida¹; Stephanie Garcia Lima²;
Claudia Regina Delafiori³; Doroti de Oliveira Garcia⁴

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – Instituto Adolfo Lutz - laineandreotti.la@gmail.com

²Bolsista do Programa de Formação para Iniciação Científica (FEDIAL) - Núcleo de Ciências Biomédicas do Centro de Laboratório Regional de Marília

³ Agente Técnico de Assistência à Saúde (ATAS-biomédico) - Núcleo de Ciências Biomédicas do Centro de Laboratório Regional de Marília

⁴Pesquisador Científico VI – Diretor Técnico I do Núcleo de Ciências Biomédicas do Centro de Laboratório Regional de Marília

Resumo

Introdução: A COVID-19 consiste em uma doença caracterizada pela infecção respiratória aguda causada pelo coronavírus SARS-CoV-2. Concomitantemente à infecção pelo SARS-CoV-2, a coinfeção por outros microrganismos, em destaque o *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e a *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos tem despertado preocupação por ser um fator de agravamento do prognóstico clínico. **Objetivos:** Analisar as coinfeções bacterianas em destaque por patógenos multirresistentes, em pacientes com COVID-19. **Metodologia:** Revisão sistemática da literatura com ênfase nas coinfeções bacterianas multirresistentes em pacientes com COVID-19. **Resultados:** Observou-se um aumento das infecções, principalmente em UTIs, com microrganismos resistentes aos carbapenêmicos, tais como *Klebsiella* spp. produtora da carbapenemase KPC, *Pseudomonas aeruginosa* produtora de KPC, com destaque para a *Acinetobacter baumannii* produtor da carbapenemase OXA-23 durante os anos pandêmicos de 2020 e 2021. **Conclusão:** As infecções bacterianas constituem um importante problema para a Saúde Pública, e se destaca, entre outros fatores, o uso indiscriminado de antimicrobianos em pacientes com a COVID-19, favorecendo o surgimento de coinfeções de COVID-19 e microrganismos multirresistentes. Desta maneira, faz-se necessário o apoio a políticas de gerenciamento do uso de antimicrobianos e de diagnóstico rápido e com acurácia dos agentes envolvidos nas infecções bacterianas, possibilitando a prescrição adequada destes antimicrobianos, favorecendo o sucesso na terapia, menores danos aos pacientes e a redução da ocorrência de resistência microbiana.

Palavras-chave: Coinfeção; COVID-19; *Acinetobacter baumannii*; *Klebsiella* spp; *Pseudomonas aeruginosa*

INTRODUÇÃO

A COVID-19 consiste em uma doença caracterizada pela infecção respiratória aguda causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 (Ministério da Saúde; Secretária de Vigilância em Saúde, 2021). A doença é reconhecida como Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional, seja na forma de manifestação de Síndrome Gripal (SG) ou de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), sendo desta maneira de notificação imediata (Ministério da Saúde, 2020). Concomitantemente à infecção pelo SARS-CoV-2, a

coinfecção com outros microrganismos, tais como vírus, bactérias e fungos, constitui um fator de grande importância que maximiza as dificuldades no diagnóstico e tratamento do quadro clínico, agravando de maneira significativa o prognóstico dos pacientes (CHEN et al., 2020; HUGHES et al., 2020; SHEN et al., 2020).

A COVID-19 propiciou a ocorrência de coinfeções bacterianas, principalmente aquelas por MDR (*Multi Drug Resistance* / Microrganismos Multirresistentes), isto em decorrência da fisiopatogenia da doença e de seu contexto pandêmico. Quanto a fisiopatogenia da doença, o SARS-CoV-2 pode danificar os linfócitos B e T e células Natural Killer (NK), reduzindo significativamente a concentração destas células, de maneira a resultar no comprometimento da resposta imunológica durante o curso da doença (MAOMAO et al., 2020). Em relação à pandemia de COVID-19, houve um aumento do número e duração das hospitalizações principalmente de pacientes em estado grave que necessitam de procedimentos invasivos diagnósticos ou terapêuticos, principalmente quando mantidos em UTIs (Unidade de Terapia Intensiva), associados a sobrecarga de profissionais de saúde e insuficiência de insumos para proteção de profissionais de saúde e pacientes (ANVISA, 2021b; SUBRAMANYA et al., 2021).

A RM exhibe preocupação particular em bacilos gram-negativos, já que nestes há maior frequência de resistência a múltiplos antimicrobianos, limitando as opções terapêuticas (CDC, 2013). Ademais, a RM (Resistência Microbiana) possui causalidade multifatorial, associando-se principalmente ao uso indiscriminado e inadequado dos antimicrobianos possibilitando a seleção de cepas resistentes que favorece a ocorrência de RM. Evidencia-se que a ocorrência de IRAS (Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde) também pode favorecer a ocorrência de RM, uma vez que sua prevalência é alta nas unidades de saúde brasileiras, resultando em alto uso de antimicrobianos de diversas classes em proporções altas (ANVISA, 2017). A pandemia de COVID-19 em toda sua contextualização também gerou várias condições que propiciam a disseminação de MDR (ANVISA, 2021b).

Dentre os MDR destaca-se aqueles produtores de betalactamases que despertam grandes preocupações já que a maioria dos genes responsáveis pela produção destas enzimas estão localizados em elementos genéticos móveis (transferíveis) (SES-SP, 2016). Dentre as betalactamases destaca-se as carbapenemases que hidrolisam os antimicrobianos carbapenêmicos (Meropenem, Imipenem e Ertapenem), em que evidencia-se três grandes classes: carbapenemases tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carpenemase), metalo-beta-lactamases (MBL) incluindo as *New Delhi metallo-beta-lactamases* (NDM, SPM, IMP e VIM) e as OXA- carbapenemases (MAGALHÃES, SOARES, 2018). De modo geral, as carbapenemases mais frequentes são KPC, NDM e OXA-48 produzidas pela *Klebsiella* spp., SPM, VIM e IMP produzidas pela *Pseudomonas aeruginosa* e a OXA-23 produzida pelo *Acinetobacter baumannii*.

As coinfeções bacterianas por MDR em pacientes com COVID-19 geralmente estão associadas ao aumento dos índices de morbidade e mortalidade e prolongamento de internações, levando a redução das opções tecnológicas e farmacológicas na terapia de pacientes. Uma vez que a eficácia terapêutica dos antimicrobianos é perdida, há ausência de alternativas seguras e ágeis no tratamento de infecções bacterianas, piorando o prognóstico dos pacientes e elevando o risco de óbito (ANVISA, 2017). Uma pesquisa realizada pelo governo britânico em relação aos custos financeiros com infecções por microrganismos resistentes a antimicrobianos revela perspectivas impactantes caso ações profiláticas e de controle não sejam tomadas, estimando que até 2050 estas infecções

podem matar pelo menos 10 milhões de pessoas no mundo e com um custo de mais de 100 trilhões de dólares (GOV UK, 2015).

Diante da preocupante disseminação dos patógenos MDR a OMS tem classificado de acordo com a RM vários patógenos prioritários para estudos de desenvolvimento de novos antimicrobianos, dentre os elencados como prioridade 1 (crítica) cita-se a *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e os microrganismos pertencentes a ordem Enterobacterales com destaque para a *Klebsiella* spp., sendo estes resistentes aos antimicrobianos carbapenêmicos (OPAS, 2017).

Dados do Laboratório de Bacteriologia do CLR (Centro de Laboratório Regional) do Instituto Adolfo Lutz de Marília que coordena o Polo Regional de Monitoramento de Microrganismos Multirresistentes que atende as regiões abrangidas pelos CLR's de Araçatuba, Bauru, Marília, Presidente Prudente, Ribeirão Preto e São José do Rio Preto, referentes à identificação de MDR na rotina laboratorial durante os anos de 2019 (pré-pandemia), 2020 e 2021 (durante a pandemia) estão descritos no gráfico 1.

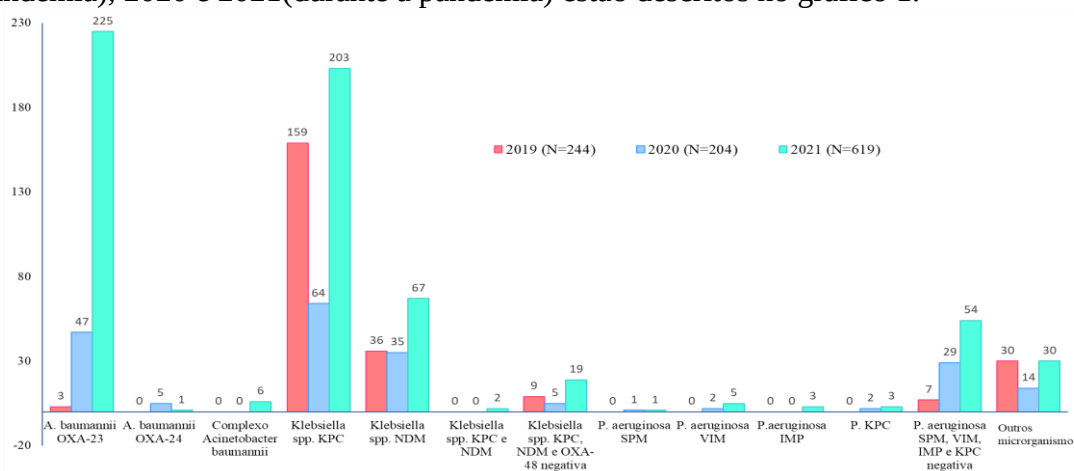


Gráfico 1. Identificação bacteriana e de genes de resistência no Laboratório de Bacteriologia do CLR Marília – Instituto Adolfo Lutz nos anos de 2019, 2020 e 2021.

O objetivo do presente trabalho é analisar as coinfeções bacterianas em pacientes com COVID-19, uma vez que as coinfeções bacterianas têm exercido papel de grande importância no agravamento dos quadros clínicos e piora dos prognósticos dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo constitui-se de uma revisão sistemática, dados do Laboratório de Bacteriologia do CLR- Marília do Instituto Adolfo Lutz usados para melhor elucidação da problemática abordada, foram aprovados pelo Conselho Técnico Científico do IAL, cadastro CTC-IAL 39-N/2021. Para a revisão sistemática foram utilizadas as seguintes bases de dados: PubMed, Biblioteca Eletrônica e Científica Online (SciELO, Scientific Electronic Library Online) e Google Acadêmico. Para a busca do material bibliográfico realizou-se buscas avançadas selecionando-se palavras-chave padronizadas e indicadas pelos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS/MeSH) do BVS/SES, sendo utilizado: somente “COVID-19”, ou “COVID-19” AND “Coinfection”, “COVID-19” AND “Bacterial” AND “Coinfection”, “COVID-19” AND “Tuberculosis” e “Bacterial” AND “Drug resistance” AND “COVID-19”. Com a finalidade de refinar a busca foram acrescentados entre as palavras chaves o operador booleano AND.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pandemia de COVID-19 permitiu condições capazes de favorecer coinfeções por MDR, em destaque as bactérias gram-negativas, neste aspecto evidencia-se o uso empírico de antimicrobianos nesta fase como um fator que favorece a resistência microbiana (RM). Embora a COVID-19 corresponda a uma enfermidade de etiologia viral, antimicrobianos são prescritos frequentemente para esta patologia infecciosa em decorrência de suspeitas de coinfeções bacterianas, podendo favorecer o aumento da pressão seletiva dos agentes bacterianos, propiciando a disseminação de MDR (ANVISA, 2021b; LANGFORD et al., 2021; SUBRAMANYA et al., 2021). A Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA nº05 de 2021 revela o uso excessivo e empírico de antimicrobianos de amplo espectro no tratamento secundário a coinfeções com a COVID-19 como uma das condições que favorecem a disseminação de MDR (ANVISA, 2021b).

Tem-se observado um aumento das preocupações com a elevação dos casos de *Acinetobacter baumannii*, principalmente aqueles produtores de carbapenemases e resistentes a polimixina, fato que aumenta a severidade dos quadros clínicos e a mortalidade (SCARELLA, SCARELLA, BERETTA, 2017). A nota técnica conjunta CGLAB, BrCAST e Anvisa: testes de sensibilidade para *Acinetobacter* spp. (2021), revela através de dados do GAL (Gerenciador de Ambiente Laboratorial) do Lacen-PR (Laboratório Central de Saúde Pública), de que no ano de 2021 foi observado um aumento de 90% dos isolados de MDR, sendo um aumento de 170% referente ao *A. baumannii* e destes um aumento de 99% de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos e 20% resistentes a polimixina (ANVISA, 2021a). Condizente ao exposto, dados do Laboratório de Bacteriologia do CLR – Marília do Instituto Adolfo Lutz (descritos no Gráfico 1), retratam um aumento significativo de infecções por *A. baumannii* produtores de carbapenemases OXA-23 nos anos de 2020 e 2021 (durante a pandemia), sendo mais pronunciado no ano de 2021, quando comparado com os dados de 2019 (pré-pandemia). Ademais, dados fornecidos pelo Laboratório de Bacteriologia do CLR-Marília revelam a ocorrência de oito surtos de *A. baumannii* OXA-23 (quatro em 2020 e quatro em 2021) através da técnica de tipagem molecular epidemiológica REP-PCR, permitindo a identificação de um clone idêntico entre os municípios de Araçatuba e Marília, indicando a disseminação inter-hospitalar, bem como a ocorrência de três surtos de *Klebsiella* sp. produtora de carbapenemases através da técnica de tipagem molecular epidemiológica ERIC-PCR, sendo dois surtos de *Klebsiella* sp. produtora de NDM nos municípios de Araraquara e Marília nos anos de 2020 e 2021 e um surto de *Klebsiella* sp. produtora de KPC no município de Marília no ano de 2021.

Algumas medidas podem ser aplicadas nas unidades de saúde como alternativas de controle e profilaxia da disseminação de MDR, principalmente durante a pandemia de COVID-19 em que há altos índices de hospitalização. Dentre as medidas indicadas destacam-se recursos humanos capacitados, insumos adequados para proteção dos profissionais e pacientes, prevenção e controle das infecções, política rigorosa de gerenciamento do uso de antimicrobianos e consequentemente o uso correto de antimicrobianos (ANVISA, 2021b).

É recomendado que os laboratórios hospitalares utilizem métodos rápidos e eficazes na detecção de microrganismos em coinfeções com SARS-CoV-2, principalmente de MDR, com atenção para a detecção de carbapenemases e pesquisa a resistência à polimixina, permitindo que os resultados sejam reportados rapidamente às equipes de assistência (ANVISA, 2021b). O diagnóstico adequado e preciso dos agentes envolvidos, com correta identificação e realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos, permite

uma terapia antimicrobiana apropriada, reduzindo assim as chances de insucessos no tratamento e reduzindo as chances de RM.

CONCLUSÃO

É visível que a pandemia de COVID-19 resultou em inúmeros impactos mundiais, englobando-se desde a saúde, economia, educação e a política, gerando várias mortes, principalmente em populações mais fragilizadas, resultando em perdas irreparáveis com a pandemia. Diante deste contexto, embora tenha-se conquistado grandes avanços na vacinação, não existem alternativas terapêuticas específicas para o tratamento da infecção por SARS-CoV-2, fator que favorece em muitos casos tratamentos empíricos.

Conforme relatado, casos de coinfeções bacterianas em pacientes com a COVID-19 estão se tornando cada vez mais frequentes, agravando os quadros clínicos, aumentando a necessidade de recursos específicos, do nível de assistência e dos gastos com hospitalizações e terapias e infelizmente aumentando a mortalidade da doença. Desta maneira, em muitos casos opta-se pelo uso empírico de antimicrobianos no tratamento da COVID-19 como uma tentativa de profilaxia ou tratamento de possíveis coinfeções bacterianas, fato que muitas vezes favorece a RM. A maior ocorrência de coinfeções por MDR durante a pandemia de COVID-19 tem resultado na elaboração e publicação de normas técnicas com alertas sobre o assunto. Em sincronia com a literatura consultada os dados fornecidos pelo Laboratório de Bacteriologia do CLR-Marília do Instituto Adolfo Lutz, demonstram um aumento significativo da ocorrência de *A. baumannii* produtores de OXA-23, bem como um aumento da ocorrência de *Klebsiella* spp. produtora de KPC e embora seja menos comum a ocorrência de *Klebsiella* spp. produtora de KPC e NDM simultaneamente, além da ocorrência de *P. aeruginosa* produtora de KPC durante os anos de 2020 e 2021 (pandêmicos).

Conclui-se que as coinfeções bacterianas constituem um importante problema para a Saúde Pública, principalmente quando envolve a RM e MDR, situação que possui causalidade multifatorial, em destaque o uso indiscriminado de antimicrobianos em pacientes com a COVID-19. Desta maneira, faz-se necessário o apoio a políticas de gerenciamento do uso de antimicrobianos e de diagnóstico rápido e com acurácia dos agentes envolvidos nas coinfeções bacterianas, possibilitando a prescrição adequada destes antimicrobianos, favorecendo o sucesso na terapia, menores danos aos pacientes e a redução da ocorrência de RM e MDR.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA^a. **Nota técnica conjunta CGLAB, BrCAST e ANVISA: testes de sensibilidade para *Acinetobacter* spp.** Brasília-DF, 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA^b. **Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA N°05/2021 - Orientações para prevenção e controle da disseminação de microrganismos multirresistentes em serviços de saúde no contexto da pandemia da COVID-19.** Brasília-DF, 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde.** Brasília-DF, 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.** United States Department of Health and Human

Services, 2013.

CHEN, X. et al. The microbial coinfection in COVID-19. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.I.], v.104, n.18, p.7777–7785, Aug. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32780290/>>. Acesso em: 19 de novembro de 2021.

GOV UK. Representantes do Governo Britânico querem discutir como combater riscos de infecções resistentes a medicamentos. Reino Unido, 2015. Disponível em: <<https://www.gov.uk/government/news/308737.pt>>. Acesso em: 24 de novembro de 2021.

HUGHES, S. Bacterial and fungal coinfection among hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study in a UK secondary-care setting. **Clinical microbiology and infection**, [S.I.], v.26, n.10, p.1395–1399, Oct. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32603803/>>. Acesso em: 19 de novembro de 2021.

LANGFORD, B. J. et al. Antimicrobial prescribing in patients with COVID-19: rapid review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, [S.I.], v.27, n.4, p.520–531, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7785281/>>. Acesso em: 21 de novembro de 2021.

MAGALHÃES, V.C.; SOARES, V.M. Análise dos mecanismos de resistência relacionados às enterobactérias com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos isoladas em um hospital de referência em doenças infecto-contagiosas. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.50, n.3, p.278–281, Dez. 2018. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-969517>>. Acesso em: 24 de novembro de 2021.

MAOMAO, W. et al. Case report: One case of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a patient co-infected by HIV with a normal CD4+T cell count. **International Journal of Infectious Diseases**, [S.I.], v.96, p.148–150, Jul. 2020. Disponível em: <[https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(20\)30276-9/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(20)30276-9/fulltext)>. Acesso em: 20 de novembro de 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo de Manejo Clínico Do Coronavírus (Covid-19) na Atenção Primária**. Brasília, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica : emergência de saúde pública de importância nacional pela doença pelo coronavírus 2019 – covid-19**. Brasília, 2021.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DE SAÚDE- OPAS. OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. OPAS, Distrito Federal-BR, 2017. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos>>. Acesso em: 24 de novembro de 2021.

SCARELLA, A.C.A.; SCARELLA, A.S.A.; BERETTA, A.L.R.Z. Infecção relacionada à assistência à saúde associada a *Acinetobacter baumannii*: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [S.I.], v.49, p.18–21, Jun. 2017. Disponível em: . Acesso em: 24 de novembro de 2021.

SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Orientação para o envio de cepas de enterobactérias, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, ao Instituto Adolfo Lutz**. [S.I.], Out. 2016.

SHEN, Z. et al. Genomic diversity of SARS-CoV-2 in COVID-19 patients. **Clinical infectious diseases**, Beijing, v.78, n.15, p.1–27, Jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32129843/>>. Acesso em: 19 de novembro de 2021.

SUBRAMANYA, S. H.; et al. The potential impact of the COVID-19 pandemic on

antimicrobial resistance and antibiotic stewardship. **Virus disease**, [S.I.], v.25, n.331-337, Apr./Jun. 2021. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34056051/>>. Acesso em:26 de novembro de 2021.

PREVALÊNCIA DE DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS EM PACIENTES COM INFECÇÃO POR SARS-COV-2 NO ESTADO DE SÃO PAULO, ENTRE JULHO DE 2020 E JULHO DE 2021.

Viviane Alves de Lima¹, Karen Miguita³ Leonardo José Tadeu de Araujo³, Eliane Margareth Pimenta Carneiro⁴, Ana Lúcia Olympo⁴, Jerenice Esdras Ferreira²

¹Estudante do Curso de Especialização em Patologia Clínica e Molecular - CPA- IAL;

²Docente/Pesquisador do Centro de Patologia - CPA - IAL; ³Pesquisador do Centro de Patologia - CPA - IAL; ⁴ Biologista do Centro de Patologia - CPA – IAL.

Resumo: O SARS-CoV-2 é um betacoronavirus responsável pela pandemia de COVID-19, que causa sintomas respiratórios nas vias áreas superiores e inferiores, ocasionando um quadro gripal, que pode evoluir para síndrome respiratória aguda grave (SARS). Os casos mais graves têm sido reportados em idosos e indivíduos com doenças crônicas não transmissíveis. O objetivo foi avaliar a prevalência de comorbidades, e suas associações, em pacientes com diagnóstico positivo para infecção por SARS-CoV-2. Esse estudo utilizou dados secundários dos casos recuperados e óbitos entre julho de 2020 a julho de 2021, do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Gripe (SIVEP-Gripe) do estado de São Paulo, foram analisados os parâmetros sexo, idade e comorbidades (cardiopatias, diabetes e obesidade). Foram incluídos no estudo 149.122 casos de ambos os sexos, sendo 93.888 (63%) recuperados e 55.224 (37%) óbitos. A prevalência de comorbidades nos recuperados foi de 29,0% (27.145) cardiopatias; 17,0% (15.980) cardiopatias/diabetes; 13,5% (12.710) diabetes; 7,8% (7.321) obesidade; 4,1% (3.852) cardiopatias/obesidade; 4,3% (4.096) cardiopatias/diabetes/obesidade; e 24,3% (22.784) sem comorbidades. E nos óbitos foi de 27,8% (15.332) cardiopatias; 22,0% (12.154) cardiopatias/diabetes; 13,0% (7.203) diabetes; 6,0% (3.305) obesidade; 4,6% (2.511) cardiopatias/obesidade; 6,4% (3.531) cardiopatias/obesidade/diabetes; e 1,8% (1.012) diabetes/obesidade e 18,4% (10.176) sem comorbidades. A presença isolada ou associada à diabetes, obesidade e cardiopatias exerceu uma relação negativa na evolução do quadro clínico. Este estudo poderá contribuir com informações úteis para a implantação de medidas epidemiológicas adequadas, e para a elaboração de políticas públicas no contexto de prevenção e monitoramento das doenças crônicas não transmissíveis.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; COVID-19; Doenças não Transmissíveis; Comorbidade; Prevalência.

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, o mundo foi surpreendido com a informação da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre casos de pneumonia de etiologia desconhecida na província de Hubei, na República popular da China (WHO, 2020). No ano seguinte foi identificado o agente etiológico, o SARS-CoV-2, iniciando a pandemia de COVID-19, desafiando a saúde pública mundial. Essa doença causa sintomas respiratórios, nas vias áreas superiores e inferiores, que pode evoluir para síndrome respiratória aguda grave (SARS) (BOLSONI-LOPES et al., 2021). O SARS-CoV-2, vírus RNA fita simples positivo, apresenta na superfície a proteína Spike que invade as células do coração,

pulmão, tecido adiposo e gastrointestinal, que possuem em sua membrana o receptor para a enzima conversora de angiotensina II (ECA2), causando intensa inflamação com liberação de citocinas, podendo desencadear uma resposta imunológica que pode contribuir para um prognóstico desfavorável (BOLSONI-LOPES et al., 2021). Os fatores de risco no agravamento por COVID-19 estão relacionados à idade avançada (acima de 60 anos), sexo masculino, presença de comorbidades, estado imunocomprometido, obesidade e estilo de vida não saudável (SILVA et al., 2020; PIETROBON, et al., 2020; GAO et al., 2021; SHAH et al., 2021). As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são um conjunto de doenças de causas múltiplas e prognóstico incerto, são as principais comorbidades dos pacientes com COVID-19, e responsáveis pelo agravamento da condição clínica, aumento no tempo de internação e nas taxas de mortalidade (MALTA et al., 2021; NUNES et al., 2021). Entre as DCNT podemos destacar a doença cardiovascular, pulmonar, diabetes e obesidade (BOLSONI-LOPES et al., 2021). A infecção pelo SARS-CoV-2 associada às comorbidades, ocasiona um aumento na prevalência de casos graves, devido ao comprometimento do sistema imune e da capacidade do hospedeiro de se defender de infecções causadas pelo vírus, contribuindo para um mau prognóstico e evolução na mortalidade por COVID-19 (GAO et al., 2021; SHAH et al., 2021; BRANDÃO et al., 2020; EJAZ et al., 2020; NG et al., 2021; FANG et al., 2020). Desta forma, a análise da inter-relação do potencial de agravamento nos pacientes com comorbidades e a infecção pela COVID-19, permite discutir o impacto causado pela pandemia na qualidade de vida de pacientes com DCNT, e como esses dados podem ser utilizados como medidas de auxílio e prevenção da saúde (GAO et al., 2021; SHAH et al., 2021). O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de comorbidades em pacientes do estado de São Paulo, com diagnóstico positivo para infecção por SARS-CoV-2, para compreender a progressão dos riscos associados à morbimortalidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo descritivo, retrospectivo, utilizando dados secundários do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica da Gripe (SIVEP-Gripe) do estado de São Paulo (SEADE, 2020). Os dados são de domínio público e não necessita de aprovação de Comissão de Ética em Pesquisa. Foram incluídos os casos de recuperados e óbitos entre Julho de 2020 e Julho de 2021. Foram analisados os parâmetros sexo, idade e comorbidades (cardiopatias, diabetes e obesidade). Foram excluídos casos com ausência de algum dado epidemiológico necessário para a execução deste trabalho, como idade, sexo e informação sobre comorbidade prévia. A análise estatística dos dados foi realizada pelo Excel versão 2010 e pelo Epi Info versão 3.5.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 149.112 casos, destes, 93.888 (63%) evoluíram para recuperação e 55.224 (37%) para óbito. Neste trabalho analisamos as comorbidades: cardiopatias, diabetes e obesidade e suas associações. A idade média dos recuperados foi de 55 anos para homens e 60 anos para mulheres. Nos óbitos a idade média foi de 60 anos para homens e 65 anos para mulheres (Figura 1). A idade acima de 60 anos foi considerada um fator de risco para a infecção, pois ocorre diminuição da resposta imunológica, e a presença de comorbidades eleva as chances de formação de trombose microvascular, aumentando a gravidade da doença (BATSCHAUER et al., 2020). O número de pacientes recuperados e óbitos com e sem associação entre comorbidades foi maior no sexo

masculino, sendo estatisticamente significativa ($p < 0.0000001$). O sexo masculino apresenta maior fator de risco para a infecção quando comparado ao sexo feminino, sugerindo uma diferença na resposta imune, pois a presença de hormônio androgênio, concentrações mais baixas de anticorpos anti-SARS-CoV-2, além da maior exposição e progressão da doença seriam caracterizadas como maior causa de mortalidade pela COVID-19 (MONTOPOLI et al., 2020) (Figura 2). A prevalência de comorbidades nos recuperados foi de 29,0% (27.145) cardiopatias; 17,0% (15.980) cardiopatias e diabetes; 13,5% (12.710) diabetes; 7,8% (7.321) obesidade; 4,1% (3.852) cardiopatias e obesidade; 4,3% (4.096) cardiopatias, diabetes e obesidade; e 24,3% (22.784) sem comorbidades (Figura 3A).

Nos recuperados a prevalência de cardiopatias isolada e associada foi maior em comparação com as demais comorbidades.



Figura 1. Distribuição das comorbidades de acordo com média de idade e sexo. A: casos recuperados; B: óbitos. Obs. A identificação da média de idade entre as comorbidades está delineada pela linha de tendência, em azul referente ao sexo masculino e vermelho para o feminino. Fonte: Autor, 2021.

Nos óbitos, a prevalência foi de 27,8% (15.332) cardiopatias; 22,0% (12.154) cardiopatias e diabetes; 13,0% (7.203) diabetes; 6,0% (3.305) obesidade; 4,6% (2.511) cardiopatias e obesidade; 6,4% (3.531) cardiopatias, obesidade e diabetes; e 1,8% (1.012) diabetes e obesidade e 18,4% (10.176) sem comorbidades (Figura 3 B). Esses dados mostraram que a prevalência de óbitos ocorreu no grupo de cardiopatia isolada e cardiopatia associada ao diabetes. O estudo não apresentou diferença significativa na prevalência entre os grupos de obesidade isolada e associada a outras comorbidades. O

monitoramento deficiente da glicemia pode levar a falhas no sistema imunológico e potencializar o aparecimento de mediadores pró-inflamatórios como proteína C reativa, glicoproteína ácida e o fibrinogênio, além de citocinas como fator de necrose tumoral e interleucinas, favorecendo danos celulares, e piora do estado do paciente com COVID-19 (CERIELLO et al., 2020; PICCIRILLO et al., 2004, GROSS et al., 2002). Os pacientes com diabetes do tipo 1 apresentam 3.5 vezes, e do tipo 2 têm 2.03 mais riscos de mortalidade pela COVID- 19, pois SARS-CoV-2 pode desencadear a autoimunidade das ilhotas de Langerhans, quando o vírus se liga aos receptores ECA2, possibilitando o desenvolvimento de diabetes (SINGH et al., 2020).

A obesidade está associada com a intensidade dos fatores de risco quando relacionadas a outras doenças crônicas, como diabetes e cardiopatias. Os resultados encontrados foram semelhantes ao estudo de Silva, et al., 2020, que apresentou prevalência obtida de 8% para obesidade.

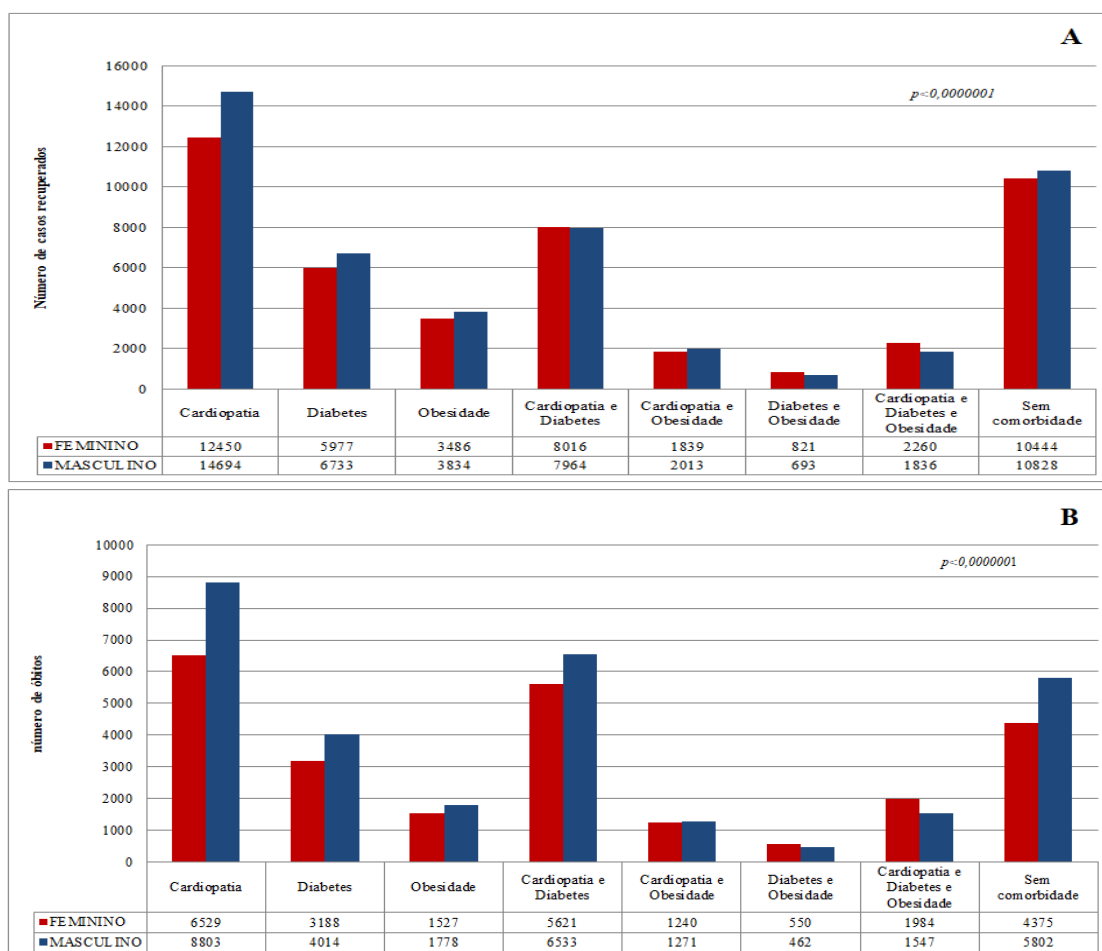


Figura 2. Distribuição das comorbidades, de acordo com o sexo, em pacientes recuperados (A) e óbitos (B). Teste t. Fonte: Autor, 2021.

Os indivíduos com sobrepeso podem desenvolver maior carga viral e demora na resolução do processo infeccioso, por apresentar uma redução da resposta imune, com menor ação de fagocitose por macrófago, prejudicando o processo de apresentação de antígeno e desenvolvimento de anticorpo, contribuindo para o desfecho grave da infecção, com a amplificação do estado inflamatório, danos ao sistema respiratório, cardiovascular e no metabolismo dos carboidratos e na formação de trombose (BOLSONI-LOPES et al., 2021; MARTELLETO et al., 2021). As cardiopatias estão associadas à gravidade da

doença e prognóstico desfavorável à COVID-19, devido ao processo inflamatório que aumenta a liberação de troponina causando lesões e espessamento do músculo cardíaco (SILVA et al., 2020). A introdução do SARS-CoV-2 em células miocárdicas reduz a expressão de ECA2, que possui propriedade anti-inflamatória e anti-trombótica, que permitem a liberação de mediadores pró-inflamatórios e apoptóticos, como fatores de necrose tumoral, que desestabiliza a placa aterosclerótica do epitélio dos vasos e liberando êmbolos nos pacientes com COVID-19. A cardiopatia está associada a tres vezes mais chances de infecção grave e 11 vezes a mortalidade (SHAH et al., 2021; SILVA et al., 2020).

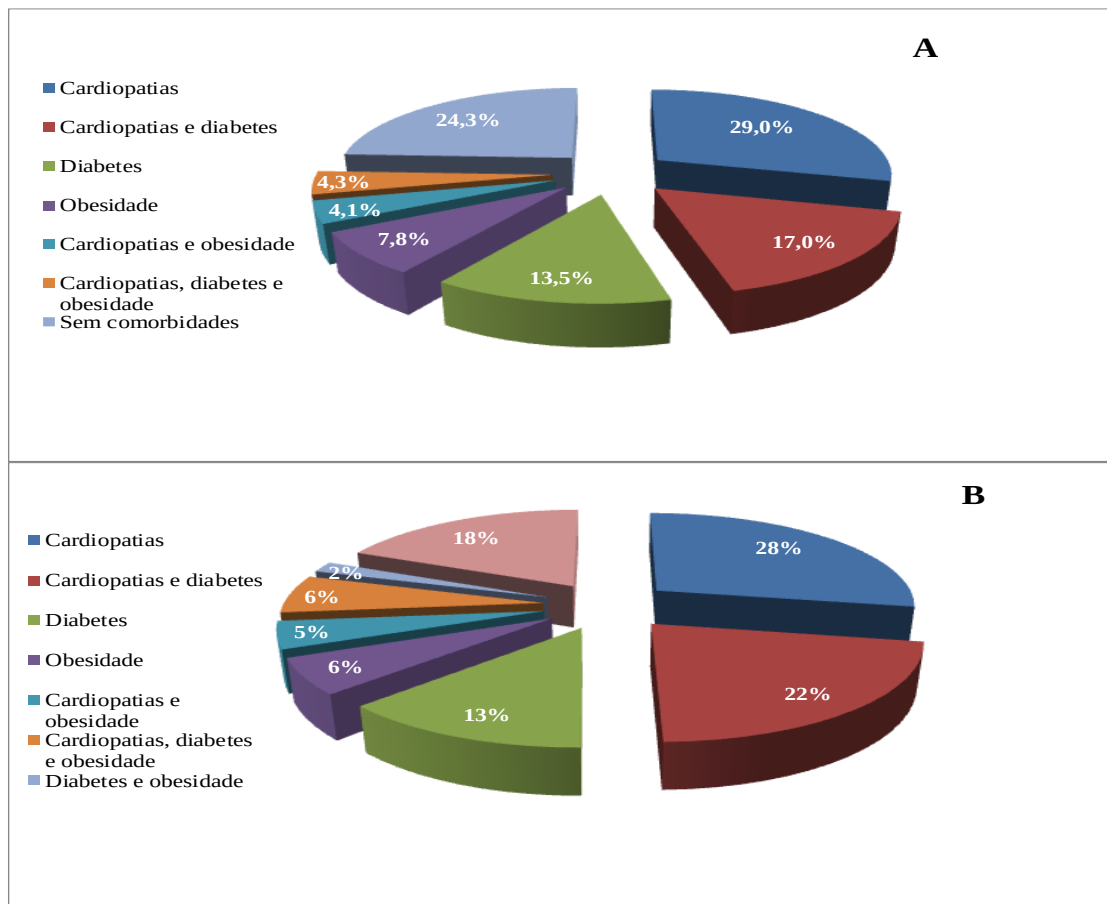


Figura 3 – Distribuição percentual de casos recuperados (A) e óbitos (B) por SARS-CoV-2.
Fonte: Autor, 2021.

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados sugerem que indivíduos com menos de 60 anos de idade tem uma maior probabilidade de recuperação da COVID-19.

Os pacientes do sexo masculino com COVID-19 apresentaram maior probabilidade para o estado grave da doença.

A cardiopatia demonstrou maior número de casos recuperados e óbitos, e apresentou resultado relevante quando associada à diabetes, embora a obesidade esteja mais comumente ligada a outras comorbidades.

A presença isolada ou associada à diabetes obesidade e cardiopatias exerceu uma relação negativa na evolução do quadro clínico do paciente. Este estudo poderá contribuir com informações úteis para a implantação de medidas epidemiológicas adequadas, e para a

elaboração de políticas públicas no contexto de prevenção e monitoramento das doenças crônicas não transmissíveis.

Referências

- BATSCHAUER, A.P.B; JOVITA, H.W. Hemostasia e COVID-19: fisiopatologia, exames laboratoriais e terapia anticoagulante. **Rev. bras. anal. Clin**; v.52:p.138-142, 2020.
- BOLSONI-LOPES, A; FURIERI, L.B.; ALONSO-VALE, M.I.C. Obesidade e a covid-19: uma reflexão sobre a relação entre as pandemias. **Rev. Gaúcha Enferm.** [cited 2022 May 16]; v.42, p. e20200216, 2021.
- BRANDÃO, S.C.S; GODOI, E.T.A.M; RAMOS, J.O.X; MELO, L.M.M.P; SARINHO, E.S.C. Severe COVID-19: understanding the role of immunity, endothelium, and coagulation in clinical practice. **J Vasc Bras**;v.19:p.e20200131, 2020.
- CERIELLO, A; DE NIGRIS, V; PRATTICHIZZO, F. Why is hyperglycaemia worsening COVID-19 and its prognosis? **Diabetes Obes Metab**; v.22(10): p.1951-1952, 2020.
- EJAZ, H; ALSRHANI, A; ZAFAR, A; JAVED, H; JUNAID, K; ABDALLA, A.E; et al. COVID-19 e comorbidades: Impacto deletério em pacientes infectados. **J Infectar a Saúde Pública**; v.13:p.1833-1839, 2020.
- FANG, X; LI, S; YU, H; WANG, P; ZHANG, Y; CHEN, Z; et al. Epidemiological, comorbidity factors with severity and prognosis of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Aging (Albany NY)**; v.12:p.12493-12503, 2020.
- GAO, Y; DING, M; DONG, X; ZHANG, J; KURSAT-AZKUR, A; AZKUR, D, et al. Risk factors for severe and critically ill COVID-19 patients: a review. **Allergy**; v.76:p.428-455, 2021.
- GROSS, J; SILVEIRO, S; CAMARGO, J; REICHELT, A; AZEVEDO, M. Dm: Diagnóstico E Avaliação Do Controle Glicêmico. In **Arq Bras Endocrinol Metab**; v.46, 2002.
- MALTA, D.C; GOMES, C.S; BARROS, M.B.A; LIMA, M.G; ALMEIDA, W.D.S; SÁ, A.C.M.G.N; et al. Noncommunicable diseases and changes in lifestyles during the COVID-19 pandemic in Brazil. **Rev Bras Epidemiol.**; v.24:p.e210009, 2021.
- MARTELLETO, G. K. S., ALBERTI, C. G., BONOW, N. E., GIACOMINI, G. M., NEVES, J. K., MIRANDA, E. C. A; et al. Principais Fatores De Risco Apresentados Por Pacientes Obesos Acometidos De Covid-19: Uma Breve Revisão / Main Risk Factors Presented By Obese Patients Affected With Covid-19: A Brief Review. **Brazilian Journal Of Development**; v.7: p. 13438–13458, 2021.
- MONTOPOLI, M; ZUMERLE, S; VETTOR, R; RUGGE, M; ZORZI, M; CATAPANO, C.V; et al. Androgen-deprivation therapies for prostate cancer and risk of infection by SARS-CoV-2: a population-based study (N = 4532). **Ann Oncol**; v.31: p.1040-1045,2020.
- NG, W.H; TIPIH, T; MAKOA, N.A; VERMEULEN, J.G; GOEDHALS, D; SEMPA, J.B; et al. Comorbidities in SARS-CoV-2 Patients: a Systematic Review and Meta-Analysis. **mBio**; v.12: p.e03647-20, 2021.
- NUNES, A.F.C; REZENDE, E.P; LIMA, J.O; PRESTA, M.C.F; BRANDÃO-JUNIOR, M.C. Purificação DMO. As doenças crônicas não transmissíveis no contexto da pandemia da Covid-19 no estado da Bahia. **Rev. baiana saúde pública**;v.45:p.33-45,2021.
- PICCIRILLO, J.L.; GONÇALVES, F.R.M.; CLEMENTE, C.L.E.; GOME, B.M.; Marcadores De Inflamação Em Pacientes Com Diabetes Mellitus Tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**; v.48:p. 2,2004.
- PIETROBON, A.J; TEIXEIRA, F.M.E; SATO, M.N. I mmunosenescence and Inflammaging: Risk Factors of Severe COVID-19 in Older People. **Front Immunol**;v.11:p.579220, 2020.
- SHAH, H; KHAN, M.S.H; DHURANDHAR, N.V; HEGDE, V. The triumvirate: why hypertension, obesity, and diabetes are risk factors for adverse effects in patients with COVID-19. **Acta Diabetol.**; v.58: p.831-843, 2021.

SILVA, M.S; PINHEIRO, F.S.G; HIGINO, K.L.S; SANTOS, A.P; SANTOS, R.L. Evidências científicas clínicas entre o novo Coronavírus e a hipertensão arterial: uma revisão integrativa. **J. nurs. health**; v.10:p.e20104035, 2020.

SINGH, A.K; SINGH, R. Does Poor Glucose Control Increase The Severity And Mortality In Patients With Diabetes And Covid-19? **Diabetes Metab Syndr**; v.14: p.725-7, 2020.

SP CONTRA O NOVO CORONAVÍRUS - **SEADE** - Boletim Epidemiológico. São Paulo. Disponível em: <https://www.seade.gov.br/coronavirus/>. Acesso em: 10 nov. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2020). Clinical management of COVID-19: interim guidance, 27 May 2020. **World Health Organization - WHO**. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332196>.

REVISÃO: CONCENTRAÇÃO DE IODO NO SAL REFINADO IODADO E NO SAL ROSA DO HIMALAIA COMERCIALIZADOS NO BRASIL

Nicole Assis Kubo¹; Bárbara Braga Ferreira Marta²

¹Estudante do curso de vigilância laboratorial em saúde pública – NCQB – IAL; E-mail:

nicole_assis@hotmail.com;

²Docente/pesquisador do Depto de ciências químicas bromatológicas – NCBQ -IAL.

Resumo

Introdução: O iodo é um micronutriente vital para o nosso organismo e sua falta pode levar aos Distúrbios por Deficiência de Iodo (DDI), responsável por gerar problemas no desenvolvimento, crescimento e funções do organismo. A Resolução RDC nº 604, de 10 de fevereiro de 2022 estabelece a concentração ideal de iodo entre 15mg/Kg a 45mg/Kg para o sal refinado iodado e sal rosa do Himalaia. **Objetivo:** Realizar um levantamento bibliográficos sobre a concentração de iodo presente no sal refinado iodado e no sal rosa do Himalaia distribuídos no Brasil durante um período de 10 anos. **Metodologia:** Trata-se de um referencial teórico cujos dados foram coletados através de artigos publicados nas bases de dados PubMed, BVS – Biblioteca Virtual em Saúde, SciELO – Scientific Eletronic Library Online, Google Acadêmico, CAPES/MEC do Ministério da Educação, além de informações providas do site da CVS – Centro de Vigilância Sanitária e da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Resultados:** De acordo com os programas de monitoramento (Pró-Iodo) e os estudos realizados no Brasil, o sal rosa do Himalaia apresentou maiores índices de resultados insatisfatórios, geralmente ultrapassando o VMP (Valor Máximo Permitido) da legislação. No que se refere ao sal refinado, destaca-se satisfatoriedade na maioria das amostras, porém foi observado um percentual importante de resultados insatisfatórios na região do Paraná, Minas Gerais e Rio Grande do Norte. **Conclusão:** Com isso, ressalta-se a importância de intensificar o monitoramento dessas análises dando prioridade aos municípios que estão em desacordo, a fim de garantir qualidade e segurança para a população.

Palavras-chave: deficiência de iodo; iodo; sal

INTRODUÇÃO

O iodo é um elemento necessário para a produção de hormônios pela glândula tireoide. A ingestão inadequada deste mineral pode promover um espectro de morbidades de crescimento, desenvolvimento e nas funções do organismo ao longo da vida, conhecidos como Distúrbios por Deficiência de Iodo (DDI)¹.

Em áreas com baixas taxas de iodo a população tem maior risco de apresentar DDI, que podem contribuir para graves impactos nos níveis de desenvolvimento social, humano e econômico². Essa deficiência atinge bilhões de pessoas no mundo causando alterações na tireoide como o bócio (aumento da glândula tireoide) e o cretinismo em crianças (retardo mental grave e irreversível). Os DDI também favorecem a elevação da mortalidade infantil, assim como problemas psicomotores e aborto^{3, 4, 5, 6}. Desta forma, a

fim de prevenir e controlar os DDI, a Iodização Universal do Sal (USI) é mundialmente aceita, sendo considerado um método seguro, sustentável e econômico^{4, 5}.

No Brasil a Resolução RDC nº 604, de 10 de fevereiro de 2022, estabelece a concentração ideal de iodo no sal para consumo humano, entre 15 a 45mg/Kg⁷. Assim, medidas para controlar o excesso e a deficiência de iodo são fundamentais, atuando de forma preventiva e permanente para assegurar que a iodação ocorra de maneira confiável^{8, 9}.

Com o intuito de monitorar os alimentos críticos para o consumo foi desenvolvido, em 1995, o Programa Paulista de Análise Fiscal de Alimentos (PP), pelo Centro de Vigilância Sanitária (CVS) e o Instituto Adolfo Lutz (IAL), da Coordenadoria de Controle de Doenças. O programa tem como finalidades: verificar a qualidade sanitária dos alimentos, aplicar a legislação sanitária a respeito de infrações em produtos alimentícios, e contatar setores comerciais para uma intervenção preventiva¹⁰. O Programa Nacional para a Prevenção e Controle dos Distúrbios por Deficiência de Iodo (Pró-Iodo) também foi criado a fim de monitorar a iodação do sal, sob coordenação do Ministério da Saúde¹¹.

Com isso, o objetivo deste estudo foi realizar uma revisão da literatura sobre a concentração de iodo presente no sal refinado iodado e no sal rosa do Himalaia distribuídos no Brasil durante um período de 10 anos.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um referencial teórico, cujos dados foram coletados através de artigos publicados nas bases de dados PubMed, BVS – Biblioteca Virtual em Saúde, SciELO – Scientific Electronic Library Online, Google Acadêmico, CAPES/MEC do Ministério da Educação, além de informações providas do site da CVS – Centro de Vigilância Sanitária e da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)

As palavras-chaves utilizadas foram: análise físico-química; iodo; iodação; sal; deficiência de iodo; iodine; salt; iodine deficiency.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras do programa de monitoramento do teor de iodo no sal (Pró-Iodo) são provenientes de todo Brasil. A coleta e execução das análises são responsabilidade dos órgãos de Vigilância Sanitária estaduais, distrital e/ou municipais, em articulação com os laboratórios oficiais de saúde¹³.

Além do programa de monitoramento, alguns estudos foram realizados com sal refinado e sal rosa em alguns estados do Brasil.

As análises do monitoramento do teor de iodo no sal em 2014 até o início de 2015 apresentou 92% de resultados satisfatórios. Neste período o estado com menor percentual de satisfatoriedade foi Tocantins com 58% das amostras analisadas¹².

Em 2016 foram coletadas 978 amostras de sal e o percentual de satisfatoriedade foi de 94% (920) e 6% de insatisfatoriedade (58). O estado de Sergipe se destacou por apresentar o menor percentual de amostras satisfatórias com 79%¹³.

No ano de 2017, 972 amostras de sal foram analisadas e 93,2% (906) revelaram satisfatórias e 7% (66) insatisfatórias¹³.

Durante o ano de 2018 o Programa Pró-Iodo analisou 732 amostras de sal com 93,99% (688) de satisfatoriedade e 6,01% (44) em desacordo com a legislação. A região com maior número de amostras insatisfatórias foi Mossoró, no Rio Grande do Norte com 19,1% (9)¹³. Bezerra et al. (2020) relata resultados semelhantes neste município onde 50% (3) das amostras apresentavam iodo acima do valor máximo permitido (VMP) na legislação¹⁴. Com relação ao sal rosa do Himalaia, 6 amostras em 2018 foram consideradas insatisfatórias, sendo 2 acima e 2 abaixo do limite exigido pela legislação e 2 não detectável¹³.

No ano de 2019 ocorreu uma redução no percentual de satisfatoriedade, das 742 amostras de sal coletadas em 17 estados brasileiros 88,3% (655) das amostras estavam dentro dos valores estabelecidos na Resolução RDC n. 604/2022 e 11,7% (87) foram consideradas insatisfatórias. O sal rosa do Himalaia foi responsável por 62,1% dos resultados insatisfatórios e o sal refinado apresentou apenas 3% de insatisfatoriedade. Deve-se salientar que o relatório de 2019 apresentou o pior resultado dos últimos 10 anos, indicando o sal rosa do Himalaia como uma das categorias de sal com piores perfis de adequação quanto ao teor de iodo no período¹³.

Resultados semelhantes foram observados na região Sudeste com o sal rosa do Himalaia. Em estudo realizado com amostras coletadas na cidade de Taubaté (São Paulo), 50% das amostras estavam em desacordo com a legislação, apresentando valores acima do limite estabelecido¹⁵. Esse trabalho corrobora com o encontrado nos municípios de Assis, Presidente Prudente e Marília, onde durante o período de 2017 a 2019, 46,2% apresentaram-se de acordo com a legislação e 53,8% em desacordo com a legislação.

Ainda nessa pesquisa, 3 amostras revelaram valores de iodo acima do VMP e em 4 amostras não foi detectado iodo¹⁶. Esses resultados indicam falhas no controle de qualidade do processamento do sal, demonstrando que, mesmo com toda fiscalização e monitoramento, ainda podem ser encontrados no mercado brasileiro sais impróprios para o consumo, devido à inadequação nos teores de iodo.

Em Ouro Preto (Minas Gerais), 92,5% das amostras de sal refinado estavam de acordo com a legislação e 7,5% em desacordo. Esses achados podem ter relação com o armazenamento desse alimento nos estabelecimentos e a coleta, o qual foi realizada em uma região de maior número de comércios desse produto e consequentemente houveram maior número de amostras⁸.

Em um estudo realizado em Monte Carlos (Minas Gerais), em 2018, com 5 amostras de sal iodado, 100% das amostras apresentaram iodo acima do limite estabelecido, variando de 123,2mg/Kg a 330,2mg/Kg. Esse valor não corresponde com o expresso nos rótulos, acarretando risco a população no consumo deste produto¹⁷. O oposto foi encontrado por Santos et al. (2021), no Rio de Janeiro (Rio de Janeiro), onde 33% das amostras apresentavam teor de iodo abaixo de 15mg/kg¹⁸.

Em uma escola localizada no município de Ribeirão Preto (São Paulo), foram analisadas 295 amostras de sal iodado no ano de 2015 e todas as amostras estavam em conformidade com a legislação RDC n° 604/2022, indicando sucesso na iodação¹⁹.

Na Bahia em 2020, em 665 amostras avaliadas, houve uma predominância de 79,6% com concentração de iodo em conformidade com a legislação, sendo o percentual de amostras que apresentou iodo abaixo do limite estabelecido de 17,6%²⁰. Resultados semelhantes de insatisfatoriedade foram observados em Teresina (Piauí) e em Campina

Grande (Paraíba), onde 67% e 8% de sal refinado apresentaram valores abaixo de 15mg, respectivamente^{21, 22}.

Na região Norte, em Santarém (Pará) 56% dos resultados foram insatisfatórios, onde 80% apresentavam valores acima do VMP²³. Diferente do encontrado em Lagarto (Sergipe) onde todas as amostras estavam em conformidade com a RDC nº 604/2022²⁴.

Na região Sul, no município de Umuarama (Paraná) 100% (9) das amostras de sal refinado iodado possuíam teor de iodo acima de 45mg/kg, variando de 55,99mg/Kg até 130,25mg/Kg. Verificou-se ainda que os rótulos das embalagens informavam a concentração correta de 25mg/Kg de iodo, porém não condiziam com o encontrado nos produtos e em uma embalagem não foi informado a concentração de iodo⁹.

Um estudo realizado no Rio Grande do Sul no ano de 2011, observou que 4% das amostras estavam em desacordo com a legislação, apresentando valores acima do limite permitido²⁵. No mesmo estado na cidade de Canoas, o percentual de inadequação foi maior, com 14% das amostras apresentando concentração menor que o exigido²⁶.

CONCLUSÕES

O programa Pró-Iodo, demonstrou um aumento de resultados insatisfatórios em 2019 em comparação aos anos anteriores. O que mais apresentou inconformidades foi o sal rosa do Himalaia no período de 2018 a 2021, mesmo com poucos estudos encontrados. O sal refinado apresentou altos percentuais de satisfatoriedade em relação à concentração de iodo, em todos os últimos 10 anos, porém, destaca-se um percentual importante de resultados insatisfatórios, principalmente no Paraná, Minas Gerais e Rio Grande do Norte, sendo o último estado, uma das regiões produtoras de sal no país. Os resultados insatisfatórios de sal refinado iodado e sal rosa do Himalaia abrange um problema na falha de controle de qualidade e insuficiência da fiscalização e monitoramento. Evidencia-se, portanto, intensificar o monitoramento dessas análises a fim de garantir a qualidade do produto e assegurar a saúde da população, se tratando de uma política de saúde pública importante no monitoramento de alimentos.

REFERÊNCIAS

1. Fan L, Su X, Shen H, Liu P, Meng F, Van J, et al. Iodized salt consumption and iodine deficiency status in China: a cross-sectional study. *Glob Health J*, 2017; v. 1, n. 2, p. 23-37.
2. Brasil. Ministério da saúde. Manual Técnico e Operacional do Pró-Iodo: Programa Nacional para a Prevenção e Controle dos Distúrbios por Deficiência de Iodo. Brasília: Ministério da Saúde; 2008. [Acesso 20 ago. 2021]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_operacional_proiodo.pdf.
3. Linares SL, Heer IM. Contenido de yodo en sal a nivel de puestos de venta provenientes de distintas localidades en tres regiones argentinas. *RAEM*, 2014; v. 51, n. 2, p. 59-65.
4. Santos JAR, Christoforou A, Trieu K, Mackenzie BL, Downs S, Billot L, et al. Iodine fortification of foods and condiments, other than salt, for preventing iodine deficiency disorders. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 2019.
5. Pandav CS. Iodized Salt Consumption. *The Indian Journal of Pediatrics*, 2019; v. 86, p. 218–219. <https://doi.org/10.1007/s12098-019-02893-9>.

6. Menyanu E, Corso B, Minicuci N, Rocco I, Zandberg L, Baumgartner J, et al. Salt-reduction strategies may compromise salt iodization programs: Learnings from South Africa and Ghana. *Nutrition*, 2021; v. 84, p. 1-7.
7. Brasil. Resolução RDC nº 604, de 10 de fevereiro de 2022, ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, dispõe sobre o enriquecimento obrigatório do sal com iodo e das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico destinados ao consumo humano. *Diário Oficial da União*, março, 2022.
8. Lage NN, Nimer M, Pereira RA, Silva ME, Silva CAM. Avaliação da adequação do teor de iodo em amostras de sal refinado e de sal grosso comercializado em ouro preto-mg, Brasil. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, 2015; v. 10, n. 1, p. 99-108.
9. Betineli LMS, Vieira SLV. Análise do teor de iodo em sais de consumo humano. *Arquivos do Mudi*, 2018; v. 22, n. 2, p. 11-20.
10. Cvs - Centro de Vigilância Sanitária. Programa Paulista de Alimentos. [Acesso: 10 ago. de 2021]. Disponível em: http://www.cvs.saude.sp.gov.br/prog_det.asp?te_codigo=1&pr_codigo=6.
11. Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Monitoramento da Iodação do Sal para Consumo Humano. [Acesso: 13 de ago. de 2021]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/programas-nacionais-de-monitoramento-de-alimentos/iodacao-do-sal-para-consumo-humano/programa-de-monitoramento-da-iodacao-do-sal-para-consumo-humano>.
12. Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Relatório Ano: 2014, Resultado do monitoramento do teor de iodo no sal para consumo humano, Brasília, 2014. [Acesso: 15 Dezembro 2021]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/alimentos/relatorio-pro-iodo-2014.pdf>.
13. Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Relatório Ano: 2016, 2017, 2018, 2019, Resultado do monitoramento do teor de iodo no sal para consumo humano, Brasília, 2016. [Acesso: 12 Dezembro 2021]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/fiscalizacao-e-monitoramento/programas-nacionais-de-monitoramento-de-alimentos/resultado-do-monitoramento-do-teor-de-iodo-no-sal-para-consumo-humano-2016.pdf>.
14. Bezerra ENS, Souza PA, Batista EM, Regis AA, Reges BM, Silva AGF, et al. Physical-chemical quality of salt marketed in the Municipality of Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil. *RSD*, 2020; v. 9, n. 8, p. 1-9.
15. Pires APM. Análise do teor de iodo em diferentes tipos de sal comercializados na cidade de Taubaté – São Paulo. *Journal of the Health Sciences Institute*, 2020; v. 38, n. 2, p. 127-130.
16. Silva RA, Santos RC, Ferreira LO. Avaliação do teor de iodo em sal do Himalaia para o consumo humano. *BEPa*, 2021; v. 18, n. 210, p. 1-12.
17. Santos HTL. Análise do teor de iodo em sal comercializado no município de Montes Claros – MG. *Revista Científica do ITPAC*, fev, 2018; v. 11, n. 1, p. 83-88.
18. Santos RP, Silva KA, Souza PS. Avaliação da conformidade de diferentes sais para consumo humano comercializados na cidade do Rio de Janeiro. *Vigilancia Sanitaria em Debate*, 2021; v. 9, n. 2, p. 152-161.
19. Alves MLD, Gabarra MHC, Navarro AM. Comparison of Iodine Concentrations in Kitchen Salt and Urine with the Thyroid Volume of Schoolchildren from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil: Warning of Worsening After 10 Years of Study. *Thyroid*, 2018; v. 28, n. 12, p. 1694-1701.

20. Campos RO, Lima SCR, Braga JS Filho, Jesus JS Anunciação SM, Martins GF, et al. Association of Salt Iodization and Urine Iodine Concentration in Schoolchildren from Public Schools in Northeast of Brazil. *Biological Trace Element Research*, 2021; v. 199, p. 4423-4429.
21. Lima MA, Teixeira LN, Sousa PB, Silva MJ, Carvalho LF. Quantificação dos Teores de Iodo e Cloreto de Sódio em Sal de Cozinha comercializado em Teresina-PI. Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação- VII CONNEPI, 2012. DOI:<https://prop.i.ifo.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/4289/3039>.
22. Silva LM, Muniz RFS, Dantas AGB, Alves ATV, Bandeira AAS. Análise de iodo na forma de iodato em amostras de sais para consumo humano comercializados no município de campina grande –PB. *Anais III CONBRACIS*. Campina Grande: Realize Editora, 2018. [Acesso: 29 novembro 2021]. Disponível em: <https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/40707>.
23. Saatkamp CJ, Martins AAO, Cardoso IS, Mota LSA, Liberal MA, Maestri CYO, et al. Avaliação do teor de iodo presente no sal de cozinha comercializado no município de Santarém-Pará. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 2014; v. 11, n. 1, p. 1-10.
24. Souza RO, Santos ABM, Soares FM, Santos FT, Cavalcante RCM, Nascimento BMS, et al. Concentration of iodine in iodized salt and estimation in school meals in a region of northeast Brazil. *Nutrition & Food Science*, 2021; v. 51, n. 3, p. 551-559.
25. Velho FAB, Hoernig BA, Marques RR. Monitoramento do teor de iodo do sal para consumo humano comercializado no Rio Grande Do Sul no período de 2009 a 2011. *Boletim Epidemiológico*, 2013; v. 15, n. 2, p. 6-8.
26. Markus PL, Hoernig BA. Análise de iodo sob a forma de iodato de potássio adicionado em sal para consumo humano comercializado no município de Canoas/RS. *Boletim Epidemiológico*, 2015; v. 17, n. 1/2, p. 8-11.

DOI: <https://doi.org/10.53934/101027-2>

ÁLCOOL GEL PARA COMBATE AO COVID-19: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE COM BASE NO ESTUDO DE ESTABILIDADE

Leticia Minervino da Silva¹; Ellen Gameiro Hilinski²; Fernanda Fernandes Farias³

¹Estudante do Curso de especialização Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - IAL;
e-mail: leticiaminervino1@outlook.com

²Docente/pesquisador científico do Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança. Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes. Instituto Adolfo Lutz
e-mail: ellen.hilinski@ial.sp.gov.br

³Docente e orientador/pesquisador científico do Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneantes. Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes. Instituto Adolfo Lutz
e-mail: fernanda.farias@ial.sp.gov.br

Resumo: O álcool gel destinado a higienização das mãos, classificado como cosmético, tem seu uso indicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no combate ao COVID-19. Devido à pandemia, as empresas de medicamentos, saneantes e cosméticos foram autorizadas a fabricar preparações antissépticas ou desinfetantes sem registro ou notificação na ANVISA, desde que atendidos determinados critérios, levando a necessidade de monitoramento do produto. Este trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade de uma amostra de álcool gel disponível comercialmente, utilizando como base os ensaios do estudo de estabilidade. Alíquotas de uma mesma amostra de álcool gel foram separadas e avaliadas mediante exposição a variações de temperatura e luz, frente a parâmetros organolépticos (cor, odor e aspecto), físico-químicos (teste de centrifuga, pH, viscosidade aparente, teor alcoólico e densidade) e microbiológicos (contagem de micro-organismos viáveis totais e pesquisa de micro-organismos patogênicos), em diferentes tempos de coleta. As alíquotas da amostra não apresentaram alteração para os resultados organolépticos bem como para os testes de centrifuga, teor, densidade, pH e ensaios microbiológicos; para o ensaio de viscosidade os resultados estavam em desacordo com a legislação. Conclui-se que, de modo geral, a amostra não sofreu alterações no estudo de estabilidade proposto. O monitoramento do mercado, assim como outros estudos são essenciais para garantir a dispensação de produtos em conformidade com as especificações.

Palavras-chave: álcool gel; COVID-19; estudo de estabilidade

INTRODUÇÃO

Segundo o Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira, géis são definidos como preparações semissólidas, geralmente viscosas e transparentes, que podem servir como veículo para um ou mais ativos; sendo frequentemente empregadas em formulações cosméticas. O álcool gel atua sobre bactérias, fungos e vírus, já que é capaz de desnaturar proteínas de vírus envelopados, como é o caso do Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave – Coronavírus - 2 (SARS-COV - 2, devido suas propriedades químicas, por meio do rompimento das ligações de hidrogênio. Desta forma gera um desequilíbrio estrutural das

proteínas virais, com consequente perda da atividade viral e ação patológica (BRASIL, 2012; CIÊNCIA ELEMENTAR, 2020).

Para que os produtos cosméticos estejam de acordo com as legislações vigentes, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) disponibiliza o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos, a fim de fornecer subsídios e diretrizes para a realização dos ensaios elencados no Controle de Qualidade (CQ). Entende-se por CQ o conjunto de práticas com o objetivo de garantir que avaliações indispensáveis sejam feitas para que o produto ofertado ao público seja dispensado com qualidade, atendendo as especificações determinadas pelos órgãos regulamentadores. Podemos dividir o CQ em três grupos: análises organolépticas, físico-químicas e microbiológicas. Por meio do estudo de estabilidade é possível obter informações sobre a qualidade de um produto (BRASIL, 2008).

O estudo de estabilidade oferece informações que garantem que o produto seja capaz de manter suas características físicas, químicas, microbiológicas e de segurança durante todo o prazo de validade. Para avaliar este fator, o produto precisa ser exposto a diferentes condições forçadas desde a fabricação até a validade final. A estabilidade de um produto pode ser modificada de acordo com tempo ao qual é exposto a fatores que aceleram ou retardam mudanças nas suas propriedades. Os resultados obtidos a partir do estudo de estabilidade fornecem informações que orientam o processo de desenvolvimento de um cosmético, auxiliando na formulação, na escolha de embalagens adequadas, condições ideais de armazenamento, estimativa do prazo de validade, além de apresentar dados sobre a segurança do produto (BRASIL, 2004).

Com a pandemia provocada pela (SARS – COV - 2) o uso de álcool gel formulação cosmética elevou-se, causando indisponibilidade do produto em supermercados e farmácias. Tal demanda fez com que a ANVISA autorizasse fabricantes de cosméticos, saneantes e medicamentos a realizar a produção e venda de produtos a base de álcool destinados à higienização das mãos sem prévia autorização, de acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 350 de 2020. Essa decisão foi tomada para incentivar a produção de antissépticos pelas empresas. Desta forma, as empresas passaram a ser dispensadas de disponibilizar informações sobre notificação prévia, mas deviam seguir critérios técnicos de qualidade, rotulagem e validade máxima de 180 dias (BRASIL, 2020a; BRASIL, 2021).

Entretanto, a ausência de notificação prévia pode ter facilitado a entrada de produtos no mercado, muitas vezes sem a devida qualidade necessária. Considerando a facilidade na produção, custo de formulação reduzido, e ainda a flexibilização da normativa, o mercado foi suprido com uma grande variedade de marcas de álcool gel. Devido a grande demanda, muitos produtos podem ter sido dispensados fora da especificação, o que leva a necessidade de estudos que avaliem a qualidade do álcool gel disponível no mercado (GRAEFF. et al., 2021). Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade de uma amostra de álcool gel disponível comercialmente, utilizando como base os ensaios do estudo de estabilidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma amostra de álcool gel 70° INPM, antisséptico para mãos, frasco de 4,3kg com validade de 24 meses a partir da sua data de fabricação, foi adquirida em comércio regular nacional. Foram feitas avaliações organolépticas, físico-químicas e microbiológicas, utilizando condições adaptadas do estudo de estabilidade, de acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004).

Inicialmente alíquotas do produto foram distribuídas em frascos de vidro estéreis, que posteriormente foram colocados na estufa ($45 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$), freezer ($-5 \pm 2,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$) ou sob incidência de luz solar em temperatura ambiente ($25 \pm 2,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$), onde permaneceram por até 45 dias. Uma amostra de álcool gel que não passou por nenhum tipo de exposição, chamada de amostra controle, foi também avaliada. Foram realizados ensaios organolépticos e físico-químicos (teste de centrifuga – QUIMIS/Q222RM, pH – Simpla/PH140, viscosidade aparente – Viscosímetro Brookfield®/RVT, determinação do teor alcoólico e densidade – Densímetro digital Rudolph/DDM 2911) nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias. Também foi realizado ensaio microbiológico (contagem de micro-organismos viáveis totais e pesquisa de micro-organismos patogênicos) com a amostra controle e com as alíquotas após 45 dias. Estes ensaios foram baseados procedimentos descritos na Farmacopeia Brasileira 6ª ed. (2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das avaliações físico-químicas da amostra de álcool gel podem ser observados na Tabela 1.

Com relação a avaliação das características organolépticas as alíquotas da amostra apresentaram aspecto, cor e odor normal, sem alterações significativas e se mostraram estáveis para este ensaio. Os parâmetros organolépticos de um cosmético são indispensáveis para o CQ, pois detectam através dos sentidos, possíveis mudanças em um cosmético, como: separação de fases, precipitação, turvação cor e odor inadequados. Tais modificações podem estar relacionadas com alterações químicas ou até mesmo contaminação microbiológica, sendo capaz de prejudicar a aceitabilidade do produto (BRASIL, 2008). No teste de centrifuga a amostra não apresentou instabilidades. A centrifugação é capaz de provocar estresse na amostra, antecipando possíveis instabilidades que podem ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto e coalescência, entre outras. Nenhuma das instabilidades citadas foram observadas (BRASIL, 2004; CRUZ et al., 2019).

Os valores de pH obtidos ficaram entre 8,46 e 8,80, levemente alcalino, não sofrendo alterações consideráveis durante o estudo de estabilidade. Os valores de pH devem estar dentro da faixa estipulada pelos fabricantes nos documentos enviados para a ANVISA. Geralmente, o pH de produto é estabelecido conforme o local de aplicação para garantir a proteção da barreira cutânea, no entanto, não foi encontrado no sistema da ANVISA o registro do produto analisado e por isso não se pode dizer que a análise foi satisfatória ou insatisfatória (BARZOTTO et al., 2021).

Os valores encontrados para viscosidade foram inferiores àqueles estabelecidos pela ANVISA na RDC nº 490 de 2021, onde o álcool gel com teores superiores ou igual a 68% deve apresentar viscosidade maior ou igual a 8000 cP, porém, a viscosidade da amostra pouco se alterou frente às exposições realizadas. Esse teste baseia-se em medir a resistência de um material ao fluxo por meio da fricção ou do tempo de escoamento, assim, quanto maior a viscosidade, maior será a resistência. Auxilia na avaliação da espalhabilidade e do escoamento do produto pela embalagem. A busca excessiva pelo espessante carbopol ocasionou a falta do produto no mercado e devido à falta de estoque alternativas foram utilizadas para suprir este agente espessante. No entanto, essas alternativas podem não ter sido tão eficientes (BRASIL, 2020a; SILVA; FERREIRA; QUEROBINO, 2021; CRUZ, 2021).

De acordo com a RDC nº 422 de 2020 é informado que as empresas fabricantes de cosméticos e saneantes têm permissão para comercializar o álcool em produto cosmético

desde que a variação da concentração não seja superior a 10% em relação à declarada na rotulagem do produto em °INPM p/p (BRASIL, 2020b).

A amostra apresentou resultados satisfatórios para o ensaio de teor durante todo o estudo proposto, frente a diferentes exposições e não foram encontrados valores superiores à variação de 10% em relação à concentração do álcool declarada que é de 70° INPM. O teor de álcool é um fator determinante que interfere diretamente na eficácia do produto e deve ser declarado em massa p/p. O teor e a densidade foram avaliados por meio de densímetro digital, o qual fundamenta-se no princípio de movimento de vibração, ou seja, através do período de oscilação obtém-se a medida por relação direta, expressa em teor de álcool etílico, de acordo com as tabelas correspondentes à porcentagem em massa ou °INPM da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019).

Em relação aos ensaios microbiológicos, foram obtidos valores inferiores a 10 UFC/g nas alíquotas avaliadas na contagem de micro-organismos viáveis totais. Não foi identificada a presença de coliformes totais e fecais, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na pesquisa de micro-organismos patogênicos (tempo zero e 45 dias), estando de acordo com o estabelecido na RDC nº 481 de 1999. Garantir a qualidade microbiana de um produto é extremamente importante, uma vez que confirma a segurança e aceitabilidade do mesmo, pois a presença de micro-organismos em quantidades elevadas pode implicar na deterioração do produto ou até mesmo riscos graves ao usuário (BRASIL, 1999; SILVA; FERREIRA; QUEROBINO, 2021).

	CT	5 ± 2 °C				45 ± 2 °C			25 ± 2 °C		
	0 D	15 D	30 D	45 D	15 D	30 D	45 D	15 D	30 D	45 D	
pH	8,80	8,46	8,54	8,70	8,65	8,52	8,80	8,77	8,54	8,70	
Viscosidade (cP)	3500	3750	3450	3250	3450	3300	3700	3100	1850	2550	
Densidade (g/cm³)	0,86972	0,86968	0,86947	0,86984	0,87000	0,86947	0,87007	0,86956	0,86957	0,86945	
Teor (% p/p)	69.11	69.13	69.88	69.06	68.99	69.88	68.96	69.18	69.84	69.23	

Tabela 1. Resultados das avaliações físico-químicas da amostra de álcool gel

Legenda: CT = Controle; D = Dias

CONCLUSÕES

A partir deste estudo foi possível concluir que a amostra se apresentou bastante estável frente as variações de temperatura e luz, demonstrando a importância de se realizar estudos de estabilidade. O único ensaio que apresentou resultados em desacordo com a legislação vigente foi o teste de viscosidade, com insatisfatoriedade desde a amostra controle. Em relação ao teor alcoólico a amostra se mostrou adequada, o que possivelmente implica na sua ação eficaz contra a COVID -19.

Muito embora a amostra analisada tenha apresentado estabilidade frente às variações impostas, o monitoramento do mercado, assim como outros estudos são essenciais para garantir a dispensação de produtos dentro das especificações; considerando ainda a relevância do produto analisado, como o álcool gel antisséptico para as mãos, frente a situação de emergência provocada pela pandemia.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6ª ed, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário nacional da farmacopeia brasileira**. 2. ed. Brasília: ANVISA, v. 2, 2012. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/ptbr/assuntos/farmacopeia/formularionacional/arquivos/8065json-file-1>>. Acesso em: 17 dez. 2021. BRASIL.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. 2ª ed., revista. Brasília: ANVISA, 2008. Disponível em: < <https://www.gov.br/anvisa/ptbr/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmticos/manuais-e-guias/guia-decontrole-de-qualidade-de-produtos-cosmeticos.pdf/view> >. Acesso em: 17 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. maio de 2004. Disponível em: <<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cosmeticos.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 490, de 8 de abril de 2021**. Altera a Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 46, de 20 de fevereiro de 2002. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-490-de-8-de-abril-de-2021-314037800>>. Acesso em: 17 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 350, de 19 de março de 2020**. Define os critérios e os procedimentos extraordinários e temporários para fabricação e comercialização de preparações antissépticas ou sanitizantes oficiais sem prévia autorização da ANVISA. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-350-de-19-de-marco-de-2020-249028045>>. Acesso em: 17 de dez. de 2021. 2020a

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 422, de 16 de setembro de 2020**. Altera a Resolução (...) Define os critérios e os procedimentos extraordinários e temporários para fabricação e comercialização de preparações antissépticas ou desinfetantes sem prévia autorização da ANVISA. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-de-diretoria-colegiada-rdc-n422-de-16-de-setembro-de-2020-277906952>>. Acesso em: 17 dez. 2021. 2020b

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 481, de 23 de setembro de 1999**. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/481_99.htm>. Acesso em: 17 dez. 2021.

CIÊNCIA ELEMENTAR: **O álcool contra a COVID-19**. [S. l.]: CASA DAS CIÊNCIAS, 2020-2020. DOI org/10.24927/rce2020.018. Disponível em: <https://rce.casadasciencias.org/rceapp/art/2020/018/>. Acesso em: 17 dez. 2021.

CRUZ, Camila Vieira Milo Bela. **Alternativas aos carbômeros para fabricação de álcool em gel**. 2021. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de

Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/19411/3/TCCG%20-%20Farm%C3%A1cia%20Camila%20Vieira%20Milo%20Bela%20Cruz%20-%202021.pdf>. Acesso em: 16 dez. 2021.

CRUZ, Rodrigues., et al. **Estudo de estabilidade e controle de qualidade de produtos cosméticos**: REVISÃO DE LITERATURA. Única Cadernos Acadêmicos, v. 2, n. 1, 10 maio 2019.

CIÊNCIAS DA SAÚDE: DESAFIOS, PERSPECTIVAS E POSSIBILIDADES - VOLUME 1. In: BARZOTTO, Ionete et al. **Avaliação da qualidade do álcool gel utilizado no comércio de Cascavel - PR**. 1. ed. Brasil: Científica digital, 2021. v. 1, cap. 11, p. 142 - 156. ISBN 978-65-89826-63-7. Disponível em: <https://www.editoracientifica.org/articles/code/210504553>. Acesso em: 16 dez. 2021.

SILVA, Laureane Monteiro; Ferreira, Ana Carolina; Querobino, Samyr Machado. **O risco da utilização de produtos cosméticos falsificados / The risk of using counterfeit cosmetic products**. Revista de psicologia, [S.l.], v. 15, n. 57, p. 407-420, out. 2021. ISSN 1981-1179. Disponível em: <<https://idonline.emnuvens.com.br/id/article/view/3212>>. Acesso em: 17 dez. 2021. doi:<https://doi.org/10.14295/idonline.v15i57.3212>.

DOI: <https://doi.org/10.53934/101029-2>

PERFIL DAS DOENÇAS DIARREICAS AGUDAS NA REGIÃO METROPOLITANA DA BAIXADA SANTISTA: ANÁLISE DOS DADOS DE NOTIFICAÇÃO

Fernanda Dias Barão¹; Tatiana Caldas Pereira²

¹Estudante do Curso de Vigilância em Laboratório de Saúde Pública – Instituto Adolfo Lutz – IAL; E-mail: fee.barao@gmail.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas do Centro de Laboratório Regional de Santos do Instituto Adolfo Lutz – IAL – E-mail: tatiana.pereira@ial.sp.gov.br

Resumo: A Doença Diarreica Aguda (DDA) é uma importante causa de morbimortalidade no Brasil relacionada com condições de vida e saúde precárias. A carência de saneamento básico, a falta de acesso à água tratada e à alimentos seguros estão entre as principais causas de DDA, que atinge principalmente indivíduos em situação de vulnerabilidade. Objetivo: avaliar os casos de DDA notificados no período de 2015 a 2019 na Região Metropolitana da Baixada Santista (RMBS). Metodologia: realizou-se um levantamento de dados secundários dos casos de DDA, a partir de planilhas do Programa de Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA) do Ministério da Saúde. Resultados: no período de 2015 a 2019 foram notificados 199.193 casos de DDA na RMBS e o número de casos tende a aumentar durante o verão, período com maior índice pluviométrico e com aumento sazonal da população na região. A faixa etária de ≥ 10 anos de idade foi a mais acometida no período e o plano de tratamento A foi o mais empregado. Conclusão: o fornecimento de água tratada e saneamento básico são medidas de prevenção imprescindíveis para a redução dos casos de DDA e contribuem para a redução dos gastos com saúde pública no tratamento desses pacientes. É necessário informar a população sobre a prevenção e tratamento dessas doenças, instruir os profissionais de saúde a identificar os casos de DDA, definir o manejo adequado do paciente e melhorar a notificação dos casos de DDA, a fim de obter dados fidedignos para guiar as ações de saúde.

Palavras-chave: Doenças Diarreicas Agudas, Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, Saneamento Básico, Segurança dos Alimentos

INTRODUÇÃO

A Doença Diarreica Aguda (DDA) é uma síndrome que pode ser causada por diferentes agentes etiológicos (bactérias, vírus e parasitas). Caracteriza-se pelo aumento do número de evacuações e/ou pela diminuição da consistência das fezes. Geralmente é acompanhada de vômitos, febre e dor abdominal. É uma doença autolimitada com tendência de cura espontânea, entretanto é uma importante causa de morbimortalidade no Brasil (BRASIL, 2021).

Quando os casos de DDA estão relacionados com o consumo de alimentos e/ou água contaminados são classificados como Doença de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA), com potencial para originar surtos. A DDA e DTHA mantêm estreita relação com condições de vida e saúde precárias, como a carência de saneamento básico, falta de acesso à água tratada e a alimentos seguros e desnutrição crônica, condições que ainda estão muito presentes no Brasil e que afetam de maneira desproporcional pessoas em

situação de vulnerabilidade e marginalização, destacando-se as crianças, idosos, imunodeprimidos, populações afetadas por conflitos e migrantes (BRASIL, 2010; ONU, 2021).

As DTHA são consideradas um problema de saúde pública global. Estima-se que anualmente no mundo ocorram 600 milhões de casos de DTHA (ONU, 2021). Anualmente na região das Américas 77 milhões de pessoas são acometidas por DTHA. No Brasil, de acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), são notificados por ano, em média, 700 surtos de DTHA e 4 milhões de casos e mais de 4 mil óbitos anualmente em decorrência das DDA (BRASIL, 2019).

A subnotificação dos casos de DTHA e DDA é um problema observado principalmente nos países em desenvolvimento. Geralmente, os patógenos envolvidos nessas doenças provocam sintomas leves e os indivíduos acometidos não procuram atendimento em unidades de saúde, dificultando a identificação de surtos. Além disso, ocorre a subnotificação por parte das unidades de saúde pública e da rede privada, os quais não reportam os casos de DDA ao sistema de vigilância municipal. As subnotificações acarretam a caracterização incorreta do cenário das doenças, dificultando o planejamento e execução de ações de prevenção e correção efetivas, restando a contenção do agravo de saúde (BRASIL, 2021; BÜHLER; BONILHA; OLIVEIRA JUNIOR, 2021).

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os casos de DDA notificados ao Ministério da Saúde no período de 2015 a 2019 na Região Metropolitana da Baixada Santista (RMBS).

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal e descritivo com abordagem quantitativa por meio de dados secundários dos casos de DDA na RMBS notificados no período de 2015 a 2019. Os dados de DDA da RMBS foram obtidos a partir de planilhas de dados abertos, oriundas do Programa de Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas (MDDA) do Núcleo de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar do Ministério da Saúde (MS). O MDDA é um programa da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e tem como objetivo monitorar os casos de DDA em todo o território nacional de acordo com as variáveis: número de casos por ano, município, faixa etária e plano de tratamento. Os dados do MDDA foram notificados ao Ministério da Saúde pelas Vigilâncias Sanitária/Epidemiológica Municipais e estão disponíveis no site da Secretaria de Estado da Saúde do Governo do Estado de São Paulo (www.saude.sp.gov.br). Os dados obtidos no site foram transferidos para planilhas com o auxílio do programa Microsoft Excel 2010®, tabulados e analisados por meio de estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 2015 a 2019 foram registrados 199.193 casos de DDA na RMBS como mostrado na Tabela 1. Dentre os nove municípios da RMBS, Guarujá apresentou o maior número de casos notificados de DDA no período, seguido de São Vicente e Cubatão. Por outro lado, o município de Mongaguá apresentou o menor número de casos notificados durante o período, seguido de Itanhaém e Peruíbe.

Tabela 1 – Total de casos por ano, por município da RMBS entre os anos de 2015 e 2019

Município	Nº de casos (%) / Ano					Total
	2015	2016	2017	2018	2019	
BERTIOGA	3.977 (16,55)	4.925 (20,5)	4.962 (20,65)	6.185 (25,74)	3.976 (16,55)	24.025 (12,1)
CUBATAO	3.975 (14,98)	6.024(22,7 1)	5.427 (20,46)	5.165 (19,47)	5.938 (22,38)	26.529 (13,3)
GUARUJA	5.357 (14,95)	3.806(10,6 2)	2.932 (8,18)	11.194(31,24)	12.546(35,01)	35.835 (18,0)
ITANHAEM	2.445 (16,99)	2.031(14,1 1)	2.194 (15,25)	1.226 (8,52)	6.494 (45,13)	14.390 (7,2)
MONGAGU A	1.942 (21,65)	1.609(17,9 3)	808 (9,01)	1.808 (20,15)	2.805 (31,26)	8.972 (4,5)
PERUIBE	3.996 (25,85)	981(6,35)	1.219 (7,89)	4.364 (28,23)	4.89 (31,68)	15.457 (7,8)
PRAIA GRANDE	5.395 (26,64)	3.744(18,4 8)	4.019 (19,84)	3.701 (18,27)	3.396 (16,77)	20.255 (10,2)
SANTOS	4.823 (24,61)	4.085(20,8 5)	2.249 (11,48)	4.467 (22,8)	3.972 (20,27)	19.596 (9,8)
SAO VICENTE	5.380 (15,76)	3.086 (9,04)	8.608 (25,22)	7.784 (22,8)	9.276 (27,18)	34.134 (17,1)
Total	37.29 (18,7)	30.291(15, 2)	32.418 (16,27)	45.894(23,04)	53.300(26,76)	199.193(10 0)

Fonte: SIVPE DDA, 2021.

O maior número de notificações de casos de DDA ocorreu em 2019, seguido de 2018, com 53.300 e 45.894 casos, respectivamente. Verificou-se que houve uma redução do número de casos de 2015 (37.290) para 2016 (30.291), com posterior aumento nos anos de 2017 (32.418 casos), 2018 (45.894) e 2019 (53.300), sendo que o total de casos em 2019 quase dobrou quando comparado ao ano de 2016.

A faixa etária ≥ 10 anos de idade apresentou maior concentração de número de casos, em todos os municípios e anos analisados, como mostra a Tabela 2, com exceção do município de Mongaguá no ano de 2015, no qual a faixa etária mais afetada foi de crianças de 1 a 4 anos de idade. A segunda faixa etária mais afetada foi a de 1 a 4 anos de idade, seguida das crianças de 5 a 9 anos de idade, e por último os menores de um ano de idade.

Um estudo desenvolvido por GALANTE (2013) descreveu o perfil de casos graves de diarreia em cinco dos nove municípios que compõem a RMBS (Bertioga, Cubatão, Guarujá, Santos e São Vicente) no período de 2000 e 2010 e constatou que as crianças até quatro anos de idade foram mais susceptíveis a DDA em todos os municípios. No presente estudo, foi verificada entre os anos de 2015 e 2019 na RMBS, conforme apresentado na Tabela 2, uma maior concentração do número de notificações de casos DDA na faixa etária de ≥ 10 anos de idade. Esta alteração do perfil da faixa etária pode ser resultado das medidas de prevenção e controle empregadas ao longo dos anos, como a vacina oral contra o Rotavírus, incluída no Calendário Nacional de Vacinação em 2006, contribuindo para proteção da saúde das crianças principalmente nos dois primeiros anos de vida (CARMO *et al.*, 2011; MENEGUESSI *et al.*, 2015).

Outras medidas de prevenção e controle são fundamentais para a redução do número de casos de DDA, principalmente em crianças, tais como: o fortalecimento das ações de vigilância e das medidas de controle, como os programas educativos concentrados nas mães, enfatizando a importância do aleitamento materno e do uso adequado e oportuno da reidratação oral; a ampliação da Estratégia Saúde da Família e do Programa de Agentes Comunitários de Saúde responsáveis por levar informação e assistência às famílias; melhoria do acesso e da qualidade dos serviços de saúde; aumento da cobertura da rede pública de abastecimento de água tratada e adequação dos sistemas de informações para o fornecimento de dados fidedignos que possam contribuir para o estabelecimento de ações em áreas prioritárias (CARMO *et al.*, 2011; BOCCOLINI *et al.*, 2012; RASELLA *et al.*, 2013 MENEGUESSI *et al.*, 2015).

Tabela 2 – Distribuição dos casos de DDA por faixa etária e por município no período de 2015 a 2019

Município	Nº de casos (%) por faixa etária					Total
	< 1	1 a 4	5 a 9	≥ 10	IGNORADO	
BERTIOGA	657 (2,7)	5.145 (21,4)	2.262 (9,4)	15.961 (66,4)	0 (0)	24.025 (12,1)
CUBATÃO	1.275 (4,8)	5.587 (21,1)	2.875 (10,8)	16.250 (61,3)	542 (2,0)	26.529 (13,3)
GUARUJÁ	659 (1,8)	3.441 (9,6)	2.416 (6,7)	29.300 (81,8)	19 (0,1)	35.835 (18,0)
ITANHAEM	536 (3,7)	1.633 (11,3)	2.920 (20,3)	8.751 (60,8)	550 (3,8)	14.390 (7,2)
MONGAGUÁ	465 (5,2)	1.734 (19,3)	1.685 (18,8)	5.053 (56,3)	35 (0,4)	8.972 (4,5)
PERUÍBE	506 (3,3)	1.875 (12,1)	1.810 (11,7)	11.266 (72,9)	0 (0)	15.457 (7,8)
PRAIA GRANDE	757 (3,7)	2.870 (14,2)	1.586 (7,8)	14.845 (73,3)	197 (1,0)	20.255 (10,2)
SANTOS	591 (3,0)	2.459 (12,5)	1.389 (7,1)	14.828 (75,7)	329 (1,7)	19.596 (9,8)
SÃO VICENTE	812 (2,4)	3.804 (11,1)	2.449 (7,2)	27.068 (79,3)	1(0)	34.134 (17,1)
Total	6.258 (3,1)	28.548(14,3)	19.392(9,7)	143.322(72)	1.673 (0,8)	199.193 (100)

Fonte: adaptado de SIVEP DDA, 2021.

O tratamento prevalente na RMBS no período de estudo foi o plano A, como apresentado na Tabela 3, o que caracteriza a prevalência de pacientes com sintomas mais brandos e sem desidratação, necessitando apenas de tratamento domiciliar com reposição de líquidos e manutenção da dieta (FAÇANHA E PINHEIRO, 2015). O plano de tratamento B, o segundo mais realizado na RMBS no período, é escolhido quando a diarreia é acompanhada de desidratação, sendo recomendado que o paciente faça terapia de reidratação oral e fique em observação na unidade de saúde. Quando a diarreia desencadeia desidratação grave, o paciente é tratado na unidade de saúde com hidratação venosa, caracterizando o plano de tratamento C, o menos indicado durante o período (BRASIL, 2010).

Tabela 3 – Distribuição dos casos de DDA por plano de tratamento e por município no período de 2015 a 2019

Município	Plano de Tratamento - Nº de casos (%)				Total
	A	B	C	IGNORADO	
BERTIOGA	24.022 (99,9)	0 (0)	3 (0,01)	0 (0)	24.025 (12,1)
CUBATAO	13.342 (50,29)	896 (3,38)	12.162 (45,84)	129 (0,49)	26..529 (13,3)
GUARUJA	11.721 (32,71)	8.849 (24,69)	13.013 (36,31)	22.52 (6,28)	35.835 (18,0)
ITANHAEM	12.687 (88,17)	1.012 (7,03)	117 (0,81)	574 (3,99)	14.390 (7,2)
MONGAGUA	4.892 (54,53)	3.522 (39,26)	558 (6,22)	0 (0)	8.972 (4,5)
PERUIBE	1.847 (11,95)	13.525 (87,50)	85 (0,55)	0 (0)	15.457 (7,8)
PRAIA GRANDE	7.968 (39,34)	10.181 (50,26)	2.106 (10,40)	0 (0)	20.255 (10,2)
SANTOS	5.177 (26,42)	1.304 (6,65)	11.002 (56,14)	2.113 (10,78)	19.596 (9,8)
SAO VICENTE	15.761 (46,17)	13.059 (38,26)	4.788 (14,03)	526 (1,54)	34.134 (17,1)
Total	97.417 (48,9)	52.348 (26,3)	43.834 (22,0)	5.594 (2,8)	199.193 (100)

Fonte: adaptado de SIVEP DDA, 2021.

De acordo com dados do IBGE (2021), estima-se que houve um crescimento populacional de 0,84% na RMBS em um ano, somando 1.897.551 habitantes nos nove municípios. A região tem o turismo como uma importante fonte de renda, e no verão, ocorre um aumento sazonal do número de pessoas e, consequentemente, uma desestabilização da infraestrutura das cidades e do saneamento básico (GALANTE, 2013). BRAGA *et al.* (2009), verificou uma maior interrupção do fornecimento de água tratada na RMBS durante o verão, fazendo com que seja exercida uma pressão negativa nos encanamentos, favorecendo a contaminação da água por agentes biológicos e químicos. Portanto, faz-se necessária a melhoria da infraestrutura dessas cidades para suportar esse aumento populacional sazonal e de novos moradores.

Analisando o número de casos notificados de DDA por semanas epidemiológicas entre 2015 e 2019, observa-se, em todos os anos, que houve um aumento sazonal do número de casos entre as últimas semanas do ano (novembro e dezembro) e as primeiras semanas (janeiro, fevereiro, março e abril), período correspondente ao verão (BRAGA *et al.*, 2009). Esse aumento pode estar relacionado com a maior precipitação nesse período do ano, o que contribui para a contaminação das águas não tratadas e tratadas e com o aumento do número de turistas na temporada de verão na RMBS (MENEGUESSI *et al.*, 2015; GALANTE, 2013).

De acordo com dados do Programa Regional de Identificação e Monitoramento de Áreas de Habitações Desconformes, da Agência Metropolitana da Baixada Santista (2011), os municípios da RMBS apresentam parte da infraestrutura urbana instalada, como acesso à água tratada e energia, mas ainda apresentam problemas relacionados à carência de infraestrutura de saneamento ambiental, como água tratada, coleta e tratamento de esgoto, habitação, drenagem e resíduos sólidos. Segundo dados do Relatório da Situação dos Recursos Hídricos da Baixada Santista (2020) 91% da população tem acesso à água tratada e cerca de 74,8% do esgoto é coletado, mas apenas 18,1% dos efluentes gerados passam por um tratamento antes de sua disposição final, causando a contaminação dos corpos d'água receptores e desencadeando diversos problemas ambientais.

CONCLUSÕES

Conclui-se que é imprescindível melhorar e ampliar a infraestrutura de fornecimento de água tratada e saneamento básico nos municípios da RMBS, pois são medidas de prevenção primária capazes de reduzir os casos de doenças de veiculação hídrica e melhorar a qualidade de vida da população, além de contribuírem para a redução dos gastos com saúde pública no tratamento desses pacientes. É necessário informar a população sobre a prevenção e tratamento dessas doenças, instruir os profissionais de saúde a identificar os casos de DDA, definir o manejo adequado do paciente e melhorar a notificação dos casos, a fim de obter dados fidedignos para guiar as ações de saúde.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA METROPOLITANA DA BAIXADA SANTISTA (AGEM). **Programa regional de identificação e monitoramento das áreas de habitação desconforme (PRIMAHD)**. 2011. Disponível em: < <http://www.agem.sp.gov.br/pdf/primadh.> > Acesso em 28 dez.2021

BOCOLLINI, C.S.; BOCOLLINI, P.M.M.; CARVALHO, M.L.; OLIVEIRA, M.I.C. Padrões de aleitamento materno exclusivo e internação por diarreia entre 1999 e 2008 em capitais brasileiras. **Ciência e Saúde Coletiva**. 2012 jul;17(7):1857-63. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/YcWDVPzXDDZL7kH9f6mv9SJ/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 12 nov. 2021.

BRAGA, A. L. F.; PEREIRA, L. A. A.; GERALDO, L. P. **Estudo Epidemiológico na População Residente na Baixada Santista – Estuário de Santos**: Avaliação de Indicadores de Efeito e de Exposição a Contaminantes Ambientais (2009). Disponível em: http://www.unisantos.br/upload/menu3niveis_1280350424329_relatorio_final_estuario_completo.pdf. Acesso em: 18 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Capacitação em monitorização das doenças diarreicas agudas – MDDA**: manual do monitor. Brasília. 2010. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/capacitacao_monitoramento_diarreicas_monitor.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**: doenças tropicais negligenciadas. Brasília. 2021. Disponível em: <https://bit.ly/3lB0Rrg>. Acesso em: 04 out. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos**: causas, sintomas, tratamento e prevenção. 2019. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>>. Acesso em: 05 out. 2021.

BÜHLER, B. F.; BONILHA, S. M. F.; OLIVEIRA JUNIOR, E. S. Notifications of acute diarrheal diseases in a municipality in the Pantanal. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. e57910515314, 2021. DOI: 10.33448/rsdv10i5.15314.

CARMO, G.M.I.; YEN, C.; CORTES, J.; SIQUEIRA, A.A.; OLIVEIRA, W.K.; CORTEZ-ESCALANTE, J.J. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **Plos Medicine**. 2011 Apr;8(4):e1001024. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1001024>. Acesso em: 18 nov. 2021.

COMITÊ DA BACIA HIDROGRÁFICA DA BAIXADA SANTISTA (CBH-BS). **Relatório de situação dos recursos hídricos da baixada santista 2020**. [S. L.], 2020. 73 p. Disponível em: <https://sigrh.sp.gov.br/public/uploads/deliberation//CBH-BS/19515/rs-2020-ano-base-2019.pdf>. Acesso em: 29 dez. 2021.

FAÇANHA, M.C.; PINHEIRO, A.C. Comportamento das doenças diarreicas agudas em serviços de saúde de Fortaleza, Ceará, Brasil, entre 1996 e 2001. **Cadernos de Saúde Pública**. 21(1):49-54, jan-fev, 2005.

GALANTE, C. S. **Análise da distribuição temporal dos casos graves de doenças diarreicas agudas em municípios do Estuário de Santos e São Vicente entre 2000 e 2010**. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Saúde Coletiva, Universidade Católica de Santos, Santos, 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estimativas da População**. 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9103-estimativas-de-populacao.html?=&t=o-que-e>. Acesso em: 18 nov. 2021.

MENEGUESSI, G.M.; MOSSRI, R.M.; SEGATTO, T.C.V.; REIS, P.O. Morbimortalidade por doenças diarreicas agudas em crianças menores de 10 anos no Distrito Federal, Brasil, 2003 a 2012. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 721-730, out. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742015000400014>.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Dia Mundial da Segurança dos Alimentos chama atenção para riscos doenças transmitidas por alimentos**. 2021. Disponível em: <https://bit.ly/3LJF2jZ>. Acesso em: 04 out. 2021.

RASELLA, D.; AQUINO, R.; SANTOS, C.A.; PAES-SOUSA, R.; BARRETO, M.L. Effect of a conditional cash transfer programme on childhood mortality: a nationwide analysis of Brazilian municipalities. **Lancet**. 2013 Jul 6;382(9886):57-64. doi: 10.1016/S01406736(13)60715-1. Epub 2013 May 15. PMID: 23683599. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(13\)60715-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(13)60715-1/fulltext). Acesso em: 18 nov. 2021.

SÃO PAULO. CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Secretaria de Estado da Saúde. **MDDA - Monitorização das Doenças Diarreicas Agudas**. 2021. Disponível em: saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar/dados-estatisticos/mdda-monitorizacao-das-doencas-diarreicas-agudas/. Acesso em: 18 nov. 2021.

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DE INTERVALOS DE CALIBRAÇÃO – ESTUDO DE CASO APLICADO A TERMÔMETRO DIGITAL

Kelly de Souza Silva¹; Carmen Silvia Kira²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – DG-NQ-IAL; E-mail: kellysouza_1@hotmail.com

²Docente/Pesquisador do Núcleo de Química, Física e Sensorial – NQSA – IAL

Resumo: A calibração é um requisito amplamente abordado em normas de qualidade e essencial para conhecer os erros e incertezas associados aos equipamentos, tornando-o assim um fator indispensável do gerenciamento metrológico. Nesse contexto, é necessário estabelecer o intervalo adequado de calibração que deve ser estruturado em função de diversos atributos do processo do sistema de medição com base em quesitos técnicos e não somente de forma subjetiva. Na literatura existem diversos métodos que podem ser aplicados para o estabelecimento e ajuste do intervalo de calibração, porém cada organização deve definir qual método adotar. Dessa forma faz-se necessário compreender os mecanismos envolvidos na escolha de um método eficaz para estabelecer intervalos de calibração otimizados, de tal forma que promova um equilíbrio entre a maximização da periodicidade de calibração dos equipamentos e a minimização dos custos com a calibração e com a queda de produtividade, devido à indisponibilidade do equipamento durante sua calibração. Este trabalho teve o objetivo de analisar a aplicabilidade dos métodos A1, A2, A3, Schumacher e RP-1 para o ajuste do intervalo de calibração, apresentando um estudo de caso aplicado a um termômetro digital. O método escolhido deve atender os objetivos da empresa, tipo e quantidade de equipamentos, análise de risco e recursos disponíveis (expertise técnica, capacidade de processamento, disponibilização de dados e orçamento).

Palavras-chave: calibração; gerenciamento metrológico; intervalo de calibração; métodos de ajuste do intervalo de calibração; periodicidade de calibração

INTRODUÇÃO

Com a crescente concorrência e competitividade entre as organizações, estas buscam cada vez mais a melhoria contínua da qualidade dos serviços realizados, de forma a aumentar sua produtividade, lucro, redução de custos e por fim, o aumento da satisfação dos clientes (PORTELLA, 2003).

Desta forma, objetivando destaque no mercado, muitas dessas organizações buscam implantar Sistemas de Gestão da Qualidade seguindo normas de aceitação internacional, tais como a ABNT NBR ISO/IEC 17025, a ABNT NBR ISO 9001, dentre outras. Essas normas enfocam, dentre os vários requisitos, a questão do gerenciamento metrológico como elemento para assegurar a qualidade dos processos de medição. Com isso, preconizam que todos os equipamentos que impactam diretamente na qualidade de produtos e/ou serviços prestados necessitam ser verificados e calibrados a intervalos especificados. Do contrário, torna-se impossível garantir o controle sobre os processos, o que pode se tornar um risco para a organização (SILVA; CAMPOS, 2001; ABNT NBR ISO 9001:2015 e ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017).

A definição do intervalo de calibração envolve num primeiro momento o estabelecimento de um intervalo inicial de calibração, no qual ainda não se tem disponíveis dados históricos de calibração ou informações sobre o comportamento do equipamento e, num segundo momento o estabelecimento de um novo intervalo de calibração definido a partir do ajuste do intervalo inicial.

Uma boa prática a ser adotada para definir o intervalo inicial de calibração consiste em considerar as recomendações do fabricante ou experiência com equipamentos similares; recomendações de normas ou regulamentos técnicos; frequência de uso do equipamento; influência sobre a medida (exposição à radiação ou às altas temperaturas, etc.); incerteza necessária; precisão requerida e erro máximo permitido (ILAC; OIML, 2007).

Na literatura podemos encontrar diferentes métodos para o ajuste do intervalo de calibração, porém cabe à organização definir qual método adotar. Os métodos mais amplamente reportados na literatura: A1, A2, A3, Schumacher e RP-1, estão detalhados a seguir.

- **Método A1:** O ajuste do intervalo de calibração é estabelecido de acordo com a conformidade do equipamento na calibração atual. Se o equipamento apresentar desvios dentro da tolerância, o intervalo deve ser estendido em 10% e, quando os desvios estiverem fora da tolerância, o intervalo deve ser reduzido entre 45% (PORTELLA, 2003; FREITAS et al., 2017) e 55% (DRYER, 2014).

- **Método A2:** Neste método a conformidade do equipamento é analisada, mas o ajuste depende também da amplitude dos desvios em relação à tolerância estabelecida pelo processo. Se o equipamento apresentar desvios dentro da tolerância, o intervalo deve ser estendido em 1,81%; se o desvio estiver fora da tolerância, o intervalo deve ser reduzido em 12,94% e se o desvio encontrado estiver duas vezes acima do limite tolerado, o intervalo deve ser reduzido em 20,63% (DUNHAM; MACHADO, 2008).

- **Método A3:** Neste método é analisada a condição de conformidade do equipamento nos três últimos ciclos de calibração. Dependendo do resultado da análise, o intervalo pode ser mantido, estendido, reduzido ou reduzido drasticamente (PORTELLA, 2003). Os percentuais de ajuste sugeridos para um intervalo inicial de calibração anual são: aumento de 50%, redução de 10% e redução drástica de 50% (NAVARRO, 2018).

- **Método Schumacher:** O ajuste do intervalo é baseado no histórico de conformidade do equipamento levando em consideração a calibração atual e duas ou três calibrações anteriores à atual (TRINDADE et al., 2016). O instrumento é classificado em avariado, conforme ou não conforme. No caso do equipamento apresentar uma sequência de conformidade, o intervalo pode ser estendido, enquanto que se apresentar uma sequência de não conformidade ou estar avariado, o intervalo pode ser mantido inalterado, reduzido ou reduzido drasticamente. Os percentuais de ajuste do intervalo de calibração sugeridos pelo método Schumacher são: aumento de 20%, diminuição de 10% e redução drástica de 35% (FREITAS et al., 2017).

- **Método RP-1:** Neste método o novo intervalo de calibração é calculado a partir da ponderação entre o período e a condição de conformidade do equipamento na calibração, conforme a equação: $NI = CI \cdot (W1 \cdot X + W2 \cdot Y + W3 \cdot Z)$, onde: NI (novo intervalo de calibração); CI (intervalo de calibração atual); W1 (peso dado ao resultado da última calibração = 0,8); W2 (peso dado ao resultado da penúltima calibração = 0,3); W3 (peso dado ao resultado da antepenúltima calibração = 0,2); X, Y e Z (multiplicadores referentes ao resultado da última calibração, da penúltima calibração e da antepenúltima calibração, respectivamente). Os valores atribuídos de X, Y e Z quando o resultado da calibração estiver dentro da tolerância é 1; 0,8 se o desvio não exceder 1 vez a tolerância; 0,6 se o

desvio não exceder 2 vezes a tolerância; 0,4 se o desvio não exceder 4 vezes a tolerância, e 0,3 se o desvio exceder 4 vezes a tolerância (BARE, 2006).

Este trabalho teve o objetivo de analisar a aplicabilidade dos métodos para o ajuste do intervalo de calibração, apresentando um estudo de caso aplicado a um termômetro digital.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia da pesquisa utilizada neste trabalho pode ser classificada como descritiva, quantitativa e aplicada. Para o estudo de caso foram utilizados dados das três últimas calibrações de um termômetro digital do Instituto Adolfo Lutz, para aplicação nos métodos A1, A2, A3, Schumacher e RP-1.

O termômetro digital utilizado no estudo possui as seguintes características: faixa de indicação de -50°C a 200°C e resolução de $0,1^{\circ}\text{C}$. O erro máximo admissível definido pelo laboratório para o uso desse equipamento (tolerância do processo) foi de $0,4^{\circ}\text{C}$ e o intervalo inicial de calibração foi definido como anual (365 dias).

Para a análise dos certificados de calibração e avaliação da conformidade do equipamento, após sua calibração, foi utilizado o critério baseado na comparação da tolerância do processo em relação ao erro máximo admissível do equipamento, obtido pela somatória do valor do erro de indicação e da incerteza, que estão declarados no certificado de calibração. Assim, no caso de o erro máximo do equipamento ser menor ou igual à tolerância do processo, o equipamento é considerado conforme, portanto, adequado para uso. Caso contrário, o equipamento é considerado não conforme.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 são apresentados os dados e a análise das três últimas calibrações para o termômetro estudado, sendo a calibração “1” a calibração menos recente e a calibração “3” a mais recente. Considerando que a tolerância do processo foi definida em $0,4^{\circ}\text{C}$, pode-se verificar que o equipamento foi reprovado para uso apenas na calibração “1”, no qual o valor do erro máximo admissível do equipamento foi superior ao valor estabelecido para a tolerância do processo.

Tabela 4 – Dados e análise dos certificados de calibração do termômetro digital

Calibração	Valor de referência ($^{\circ}\text{C}$)	Média das medidas ($^{\circ}\text{C}$)	Erro de indicação - EI ($^{\circ}\text{C}$)	U ($\pm^{\circ}\text{C}$)	EMI ($^{\circ}\text{C}$)	Análise do certificado
1	35,12	34,80	-0,32	0,40	0,72	Reprovado
2	35,03	34,80	-0,23	0,15	0,38	Aprovado
3	34,99	34,80	-0,19	0,15	0,34	Aprovado

U: incerteza de medição expandida com nível de confiança de aproximadamente 95%;
EMI: Erro máximo admissível do instrumento, dado pela somatória de $|EI| + U$

A tabela 2 apresenta um resumo dos ajustes aplicados no intervalo de calibração do termômetro digital, segundo os métodos A1, A2, A3, Schumacher e RP-1, levando em consideração os três ciclos de calibração realizados no equipamento.

Tabela 5 – Resumo dos intervalos de calibração estabelecidos para o termômetro digital, com a aplicação dos métodos A1, A2, A3, Schumacher e RP-1, após três ciclos de calibração

Intervalo de calibração (dias)	
Método	Termômetro digital
A1	243 (redução de 33%)
A2	330 (redução de 9,6%)
A3	365 (inalterado)
Schumacher	365 (inalterado)
RP-1	445 (aumento de 22%)

Aplicando-se os métodos A1 e A2 para o termômetro digital, que apresentou uma condição de não conformidade na primeira calibração, o intervalo de calibração definido inicialmente como anual, passou para 201 dias (redução de 45%) e 318 dias (redução de 12,94%), respectivamente. No segundo ciclo de calibração, este termômetro apresentou-se conforme e, assim o intervalo pôde ser estendido em 10%, segundo o método A1, passando para 221 dias e, segundo o método A2, sendo ajustado em 1,81% passando para 324 dias. Na terceira calibração o equipamento continuou conforme, possibilitando assim um novo aumento no intervalo de calibração, que passou para 243 dias e 330 dias, respectivamente segundo os métodos A1 e A2.

Pela tabela 2 podemos observar que os menores intervalos de calibração foram obtidos com os métodos A1 e A2, o que poderia levar a uma maior confiabilidade nas medições devido à maior frequência de calibração. No entanto, o ajuste do intervalo para esses métodos é baseado em um único resultado de calibração, ou seja, um evento randômico. Os métodos A3, Schumacher analisam o histórico de calibração do equipamento. Esses métodos são muito semelhantes e o ajuste do intervalo depende da análise de uma sequência de classificações atribuídas ao equipamento. Os percentuais de ajuste (aumento ou diminuição) para ambos os métodos podem ser variados de acordo com os critérios de custo e confiabilidade desejada. O método RP-1 também analisa o histórico de calibração do equipamento, porém utiliza uma ponderação atribuindo um peso maior para a calibração mais recente e, neste caso como o termômetro se apresentou conforme, o intervalo inicial pôde ser aumentado. Cabe frisar que esse aumento não ultrapassou 50% do intervalo inicial, o que está de acordo com a recomendação estabelecida no documento IECEE OD-5011. Deve-se frisar que todos os métodos anteriormente citados não possibilitam a previsibilidade de ocorrência de situações não conformes e isto é uma condição relevante na seleção do método de ajuste do intervalo de calibração para algumas organizações (PORTELLA, 2003).

É preciso ter em mente que a escolha do método de ajuste do intervalo de calibração deve ser função do estabelecimento de um intervalo de calibração que maximize a periodicidade, minimize os custos com a calibração e perdas por interrupção do serviço, sem afetar a confiabilidade do produto ou do processo.

Com relação à facilidade de aplicação, entre os métodos estudados, o método A1 é o que oferece a menor dificuldade operacional, pois o ajuste a ser aplicado depende da realização de uma única etapa, que consiste na avaliação de apenas um ciclo de calibração do equipamento. Dessa forma, a aplicação desse método não exige um treinamento intensivo. Quanto aos demais métodos estudados, a sua aplicação está baseada em uma sequência de etapas, começando pela avaliação de um ciclo de calibração (para o método A2) e avaliação de no mínimo três ciclos de calibração (para os métodos A3, Schumacher e RP-1), passando posteriormente para a etapa de definição de uma ação específica (como

por exemplo, manter o intervalo de calibração inalterado, aumentar, reduzir ou até mesmo reduzir drasticamente o intervalo), para então ser estabelecido o ajuste a ser aplicado. Nesses casos recomenda-se que a equipe técnica seja treinada nos referidos métodos (NCSLI, 2010).

Pode-se afirmar que uma das vantagens no uso dos métodos A1 e A2 é que estes permitem o ajuste do intervalo desde o primeiro ciclo de calibração do equipamento, ao contrário dos demais métodos estudados. No entanto, como os ajustes dos intervalos são função de resultados de calibração isolados, isto pode ser uma condição insuficiente para a tomada de decisão assertiva sobre a alteração dos intervalos de calibração (NCSLI, 2010).

Independentemente do método selecionado, a aplicação de qualquer um dos métodos de ajuste do intervalo de calibração requer a avaliação correta dos dados do certificado de calibração em relação às tolerâncias estabelecidas para o processo. Destaca-se assim a necessidade de os técnicos envolvidos na análise do ajuste do intervalo de calibração possuir conhecimento básico na área de metrologia, sem o qual não é possível ter dados exatos e confiáveis que possam embasar futuras decisões no estabelecimento dos intervalos de calibração.

Outro ponto fundamental para a aplicação de qualquer um dos métodos de ajuste do intervalo de calibração refere-se à capacidade de disponibilização e processamento dos dados de calibração, os quais devem englobar tanto registros históricos de calibração como também os novos registros, com as respectivas análises críticas do certificado de calibração, de forma que não haja comprometimento da capacidade de resposta sobre a necessidade de ajuste no intervalo de calibração já existente.

Pelo exposto pode-se verificar que os métodos para o estabelecimento e ajuste dos intervalos de calibração englobam abordagens variadas. A metodologia a ser escolhida pela organização deve levar em consideração: o parque tecnológico de equipamentos, objetivos da organização, custos, expertise técnica, análise de risco, disponibilidade e capacidade de processamento de dados.

CONCLUSÕES

Para o estudo de caso foram realizadas simulações com os métodos descritos na literatura para indicar o novo intervalo de calibração para o termômetro digital, de acordo com a análise crítica dos certificados de calibração disponíveis no momento do estudo. Como exposto no trabalho, não existe um método de ajuste do intervalo de calibração mais adequado, uma vez que depende de vários fatores para a escolha do método, dentre os quais podemos citar: os objetivos da organização, análise de risco, tipo e quantidade de equipamento e recursos disponíveis (expertise técnica, capacidade de processamento, disponibilização de dados e orçamento).

REFERÊNCIAS

1. PORTELLA, W. Ajuste da frequência de calibração de instrumentos de processo — Foco na indústria farmacêutica. **Metrologia para a Vida**. Recife: 2003. Disponível em: <http://www.mantenimentomundial.com/notas/Foco.pdf>. Acesso em: 03 ago 2021.
2. ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO/IEC 17025 “Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração”**, 2017.

3. ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 9001 “Sistemas de gestão da qualidade — Requisitos”**, 2008.
4. DA SILVA, E. A.; DE CAMPOS, R. **A importância da metrologia na gestão empresarial e na alternativa do país**. 2001. Disponível em: <https://docplayer.com.br/11332508-A-importancia-da-metrologia-na-gestao-empresarial-e-na-competitividade-do-pais.html>. Acesso em: 05 ago 2021.
5. ILAC – International Laboratory Accreditation Cooperation. ILAC-G24 OIML D10: **Guidelines for the determination of calibration intervals of measuring instruments**. ed. 2007. 11 p.
6. FREITAS, M. M. S. *et al.* **Aplicação dos métodos A1, A2 e Schumacher no ajuste do intervalo de calibração de célula de torque**. 2017. Disponível em: <http://otzsrvbom.otimize.com:8080/jspui/handle/2050011876/770>. Acesso em: 04 ago 2021.
7. DRYER, F. J. **Análise de intervalo de calibração de instrumentos de medição: estudo de caso entre empresas de Panambi**. 2014. Disponível em: <http://bibliodigital.unijui.edu.br:8080/xmlui/handle/123456789/2515>. Acesso em: 12 ago 2021.
8. DUNHAM, P. C. C.; MACHADO, M. Método de alteração de intervalos entre calibrações. Enqualab, 2008. **Congresso da Qualidade em Metrologia**. Rede Metrológica do Estado de São Paulo – REMESP. Junho 2008. Disponível em: <https://auna.com.br/portalmetrologia/?mdocs-file=1510>. Acesso em: 03 ago 2021.
9. NAVARRO, R. B. A. **Avaliação de método para periodicidade de calibração de instrumento de medição: um estudo de caso em uma indústria farmacêutica**. 2018. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/54887>. Acesso em: 05 ago 2021.
10. TRINDADE, C.; SANTOS, C. M. A.; CHAVES, A. S. Análise dos métodos tradicionais para escolha da periodicidade na calibração de instrumentos: estudo de caso. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 680-680, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18066/revistaunivap.v22i40.1396>. Acesso em: 03 ago 2021.
11. BARE, A. Simplified calibration interval analysis. **NCSL International Workshop and Symposium**, 2006. Disponível em: <https://www.osti.gov/servlets/purl/882695>. Acesso em: 10 set 2021.
12. IECEE Operational Document IEC System of Conformity Assessment Schemes for Electrotechnical Equipment and Components (IECEE System). Committee of Testing Laboratories (CTL). **Requirements for Traceability of Calibrations and Calibration Intervals International Electrotechnical Commission**. IECEE OD-5011 Ed 1.3. 2021. 10 p.

13. NCSLI – International Conference of Standards Laboratories. **Recommended Practice – 1 - RP-1:** Establishment and Adjustment of Calibration Intervals. Colorado, 2010.

A AVALIAÇÃO DE COLORAÇÕES HISTOQUÍMICAS NA PESQUISA HISTOPATOLÓGICA DE *Helicobacter pylori*

Fernanda Alencar Rodrigues¹; Thaís de Souza Lima²; Tomás Zecchini Barrese²; Cinthya dos Santos Cirqueira²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – Programa de Imuno-histoquímica - CPA/NAP – IAL; E-mail: f.alencar.rodrigues@gmail.com

²Docente/pesquisador do Depto de Anatomia Patológica – NAP – IAL.

Resumo: Estima-se que metade da população mundial apresente a mucosa gástrica colonizada por *Helicobacter pylori*, resultando em maiores riscos para o desenvolvimento de gastrite crônica, úlceras peptídicas, adenocarcinoma gástrico etc. A determinação histológica em lesões suspeitas constitui-se como uma importante ferramenta de diagnóstico de doenças crônicas gástricas de etiologia infecciosa. O objetivo do estudo consistiu em avaliar o desempenho das colorações histoquímicas Giemsa modificado e Warthin-Starry em biópsias gástricas, fixadas em formalina e incluídas em parafina, com detecção imuno-histoquímica positiva para *Helicobacter pylori*. A pesquisa para a presença da bactéria foi feita nas glândulas e foveolas da mucosa gástrica, em todos os campos das lâminas e classificadas em abundantes ou escassas. Foram realizados cortes histológicos em 16 amostras de 14 pacientes para nova pesquisa imuno-histoquímica e coloração de Giemsa modificado e Warthin-Starry. Entre as 16 amostras coradas por imuno-histoquímica, foi possível observar a presença de partículas antigênicas em 15 (93,8%), sendo 9 (60%) consideradas abundantes e 6 (40%) escassas. Através da coloração de Giemsa modificada foi observada a presença de espiroquetas, também, em 15 (93,8%) das 16 amostras analisadas. Por meio da coloração de Warthin-Starry a presença da espiroqueta foi observada em 4 (80%) das 5 amostras avaliadas. As colorações de Giemsa modificado e Warthin-Starry, permitiram a identificação histológica bem sucedida e, podem se tornar ferramentas auxiliares promissoras, juntamente com a imuno-histoquímica, no diagnóstico histopatológico das lesões gástricas encaminhadas ao Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

Palavras-chave: Corante de Giemsa; *Helicobacter pylori*; Impregnação com prata; Imuno-histoquímica

INTRODUÇÃO

A infecção por *H. pylori* apresenta um grande impacto na saúde pública, sendo principalmente observada nos países em desenvolvimento. Estima-se que, metade da população mundial tenha a mucosa gástrica colonizada por *H. pylori*, resultando em maiores riscos para o desenvolvimento de gastrite crônica, úlceras peptídicas, linfoma de tecido linfóide associado à mucosa e adenocarcinoma gástrico (RODRIGUES *et al.*, 2003; MARQUES *et al.*, 2006; ATHERTON; BLASER, 2018).

Esta infecção é considerada como principal fator de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico (SOUSA *et al.*, 2021). Estimam-se que 65% a 80% dos cânceres gástricos estejam associados à sua presença (KARIMI *et al.*, 2014). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, em 2020 foram diagnosticados 21.230 novos casos no

Brasil, sendo 13.360 homens e 7.870 mulheres. Observa-se maior incidência de casos em países em desenvolvimento, onde 80% da população está colonizada, em contrapartida aos países desenvolvidos, onde a taxa de novos casos é de aproximadamente 50% (SOUSA *et al.*, 2021).

Em relação ao diagnóstico, a pesquisa de *H. pylori* pode ser realizada por testes invasivos e não invasivos e a decisão de qual exame será realizado depende da individualidade de cada paciente, entretanto as duas ferramentas diagnósticas mais utilizadas são testes invasivos, como o teste de urease e a análise histopatológica (CAMIÑA *et al.*, 2017).

A análise histológica é feita em material proveniente de biópsias realizadas durante a endoscopia em regiões do antro e do corpo da mucosa do estômago, para aumentar a probabilidade de um diagnóstico mais conclusivo (KATELARIS *et al.*, 2021).

O exame anatomo-patológico é fixado em formalina e incluído em parafina (FFIP) e trata-se de uma ferramenta diagnóstica efetiva, que inclui entre diversas técnicas complementares a coloração base Hematoxilina-Eosina (H&E), as colorações histoquímicas e a imuno-histoquímica (IHQ).

As colorações histoquímicas evidenciam os componentes teciduais através das ligações químicas, permitindo importantes contribuições para a análise histológica na rotina de laboratórios de anatomia patológica (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Além disso, tendem a ser menos dispendiosas e geralmente realizadas em menor tempo, em relação à imunocoloração (KIERNAN, 2002).

Por sua vez, a técnica de IHQ é utilizada para a pesquisa de agentes patológicos e de processos neoplásicos, através da visualização cromogênica da ligação antígeno-anticorpo no local da lesão. Sua grande vantagem é a alta especificidade, já que o anticorpo estabelece ligações somente com o antígeno alvo (FERRO, 2014). Embora as espiroquetas possam ser identificadas através da coloração de H&E, as colorações histoquímicas (como por exemplo, GM e WS) tornam essas bactérias mais evidentes, garantindo melhor a visualização de sua morfologia, enquanto a IHQ permite a identificação do patógeno (BARLETT, 2008; BARBOSA *et al.*, 2013). Assim, estas colorações se tornaram efetivas como ferramentas diagnósticas, sendo apropriadas para a investigação de espiroquetas (LAINE *et al.*, 1997) em lesões suspeitas.

Buscar a ampliação das metodologias histopatológicas que contribuam com o diagnóstico das lesões gástricas, constitui-se de grande importância para o tratamento e redução dos óbitos ocasionados por neoplasias, que são atualmente, uma das doenças mais prevalentes e custosas para o sistema de saúde do estado de São Paulo (BRASIL, 2020). Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o desempenho das colorações histoquímicas Giemsa modificado (GM) e Warthin-Starry (WS) em cortes histológicos parafinados de biópsias gástricas em relação à pesquisa IHQ para o *H. pylori*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de caráter retrospectivo, transversal, descritivo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEP-IAL 4.487.151) e pelo Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz (CTC-IAL 05-M/2020).

Foram incluídas neste estudo, amostras de biópsias gástricas, do período de 2015 a 2020, com detecção imuno-histoquímica positiva para *H. pylori* na avaliação diagnóstica, cujo material, após o diagnóstico anatomo-patológico, ainda estava armazenado sob a guarda do Núcleo de Anatomia Patológica do Centro de Patologia no Instituto Adolfo Lutz (NAP/CPA/IAL).

Para cada amostra selecionada foi feita a microtomia de cortes histológicos parafinados sequenciais para a realização das colorações de H&E, GM, WS e IHQ. A espessura dos cortes foi de 6µm para WS e 3µm para as demais.

As colorações de H&E e de IHQ para *H. pylori* foram realizadas novamente com a finalidade de comprovar a permanência da lesão e do agente infeccioso nas amostras após os fragmentos de biópsias terem sido explorados para o diagnóstico anátomo-patológico.

A coloração de H&E foi realizada conforme procedimento operacional padrão (POP) do Laboratório de Histopatologia do NAP/CPA/IAL.

A reação de IHQ foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do NAP/CPA/IAL, e os aspectos principais e críticos da reação IHQ para a pesquisa de *H. pylori* estão sumarizados no Quadro 1. Para todas as colorações, foi utilizado como controle, uma amostra de biópsia gástrica com presença confirmada de *H. pylori*.

Quadro 1 - Parâmetros da reação IHQ para pesquisa de *H. pylori*.

Anticorpo	Título	Recuperação antigênica	Kit de Detecção e Revelação
Anti- <i>H. pylori</i> (Policlonal-coelho; Cell Marque (Ca, USA)	1:1.000	Calor úmido Ácido cítrico (10mM pH 6.0; Merck,Da,GER)	Reveal Polyvalent HRP Detection System, Spring Bioscience (Ca,USA)

As colorações de GM e de WS foram realizadas conforme protocolo citado por Morris e colaboradores (2018). Todas as amostras foram coradas por GM e, para WS foram escolhidas 5 amostras baseadas na quantidade (abundantes e escassas) de bactérias visualizadas na coloração de IHQ.

A leitura e avaliação das colorações foram orientadas por um médico patologista e realizada para todas as lâminas de uma mesma coloração, por vez. A pesquisa das bactérias foi feita na mucosa gástrica, precisamente nas glândulas e fovéolas, em todos os campos das lâminas, seguida da classificação em relação à detecção (presença ou ausência) nas três colorações (GM, WS, IHQ) e quantidade (abundante/escassa) através da IHQ.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 16 amostras FFIP provenientes de 14 casos positivos ao exame imuno-histoquímico para *H. pylori* foi possível observar a presença de partículas antigênicas referentes à espiroqueta em 15 (93,8%) delas. Em relação à avaliação da quantidade do patógeno, 9/15 (60%) foram consideradas abundantes e seis 6/15 (40%) escassas.

Em 1 (6,2%) dos casos foi observada a discordância com o resultado da avaliação diagnóstica, já que não foi visualizada a presença de *H. pylori* nas novas colorações IHQ e histoquímicas. Tal desenlace justifica-se, possivelmente, pelo esgotamento da área de representatividade da lesão após o desbaste do bloco.

Os resultados obtidos através da coloração de GM foram considerados satisfatórios, pois foi observada a presença de espiroquetas em 93,8% (15/16) das amostras analisadas, de forma semelhante aos verificados para a coloração de IHQ. Entretanto, houve dificuldade de visualização nítida do agente patogênico em algumas amostras.

Estas ponderações são concordantes com o trabalho de Wabinga (2002) que recomenda as duas colorações (GM e IHQ) para o uso em rotina nos laboratórios de anatomia patológica africanos, mas contrapõem com os apontamentos de Loffeld e sua

equipe (1991) sobre a dificuldade em identificar as espiroquetas na coloração de GM, ocasionada pelo contraste insuficiente entre a bactéria e o tecido.

Em relação à coloração de WS, foi possível observar a presença de *H. pylori* em 80% (4/5) das amostras avaliadas. Houve relativa facilidade na identificação das espiroquetas, favorecida pelo forte contraste que a coloração de WS tipicamente oferece. Resultado bastante semelhante ao encontrado por Sandhika (2019) que, compararam as colorações GM e WS para a identificação de *H. pylori* e, observaram que a bactéria pode ser facilmente evidenciada por WS, tanto em casos com baixa densidade ou com alta densidade.

Em nosso estudo, o desempenho encontrado para colorações histoquímicas em relação à imuno-histoquímica foi semelhante quanto à detecção das espiroquetas (Figuras 1 e 2), assim como relatado por Kocsámar e colaboradores (2017) que avaliaram 2.896 pacientes e obtiveram desempenho semelhante entre as técnicas empregadas. Entretanto, são necessárias novas pesquisas visando investigar, em um maior número de casos, a associação da atividade inflamatória à quantidade de patógenos observados em cada coloração. Para que estas colorações possam ser utilizadas como técnicas de triagem, destinando para o exame imuno-histoquímico, que é uma técnica mais sensível e específica, apenas os casos que necessitem de confirmação diagnóstica da etiologia ou da avaliação mais refinada de lesões gástricas com escassas quantidades deste patógeno.

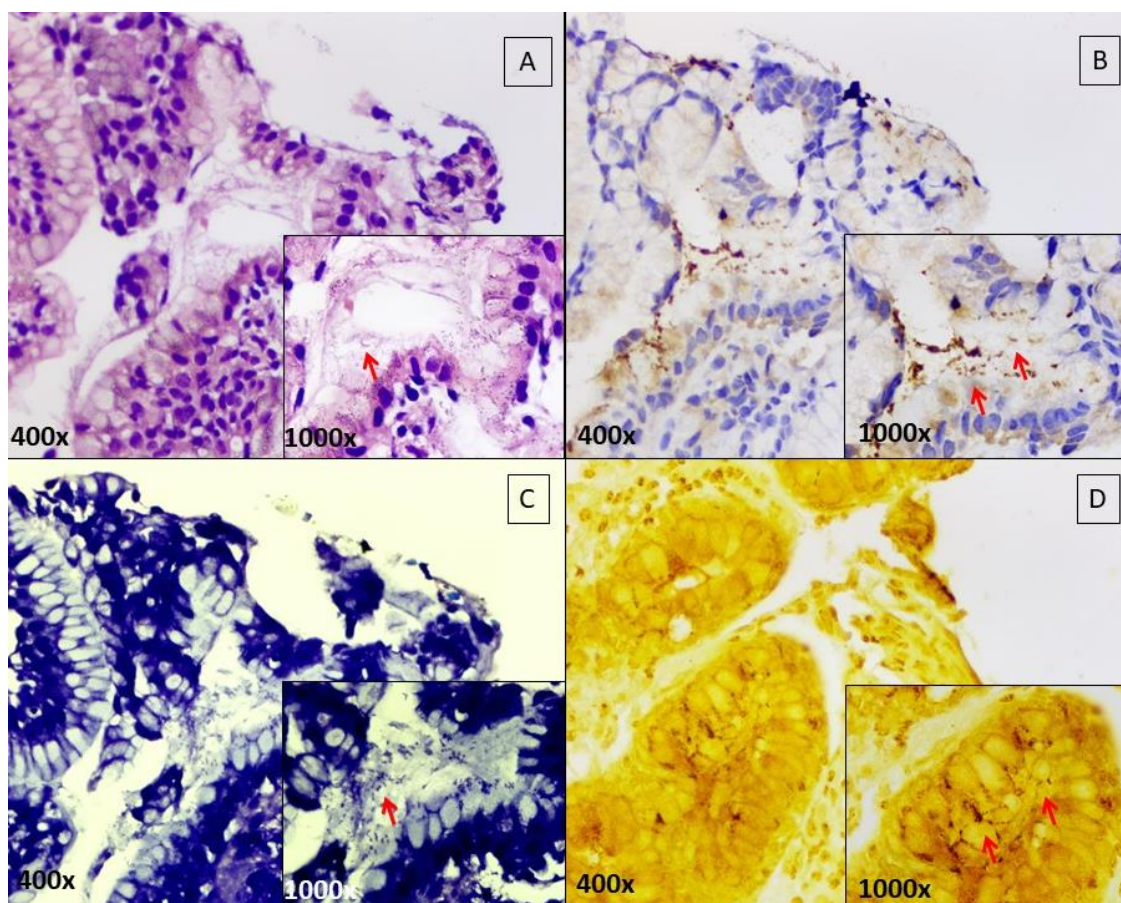


Figura 1 - Coloração de H&E, IHQ, GM, WS positivas na pesquisa de *H. pylori* em cortes histológicos de biópsias gástricas com presença abundante de espiroqueta *H. pylori* (seta) visualizado por H&E (A), IHQ (B), GM (C) e WS (D).

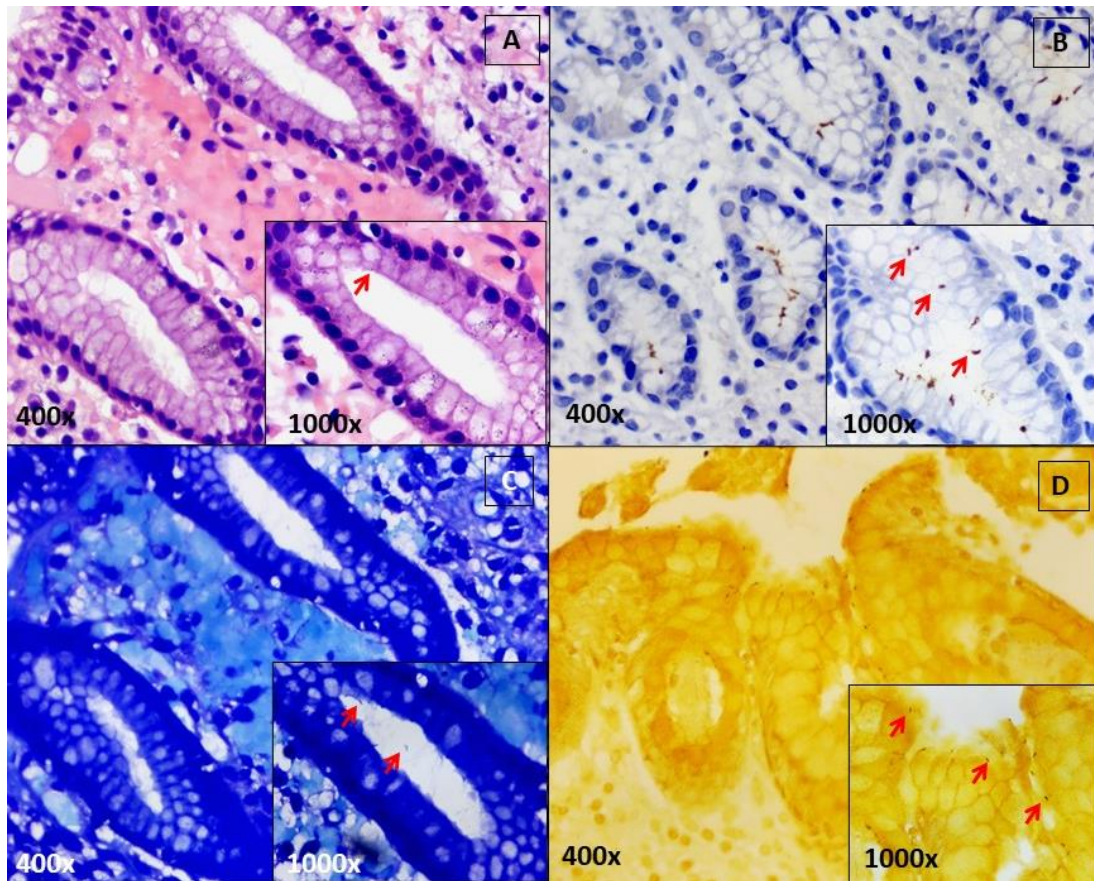


Figura 2 - Coloração de H&E, IHQ, GM, WS positivas na pesquisa de *H. pylori* em cortes histológicos de biópsias gástricas com presença escassa de espiroqueta *H. pylori* (seta) visualizado por H&E (A), IHQ (B), GM (C) e WS (D).

CONCLUSÕES

As colorações histoquímicas de GM e WS apresentaram desempenho satisfatório e, possibilitaram a identificação histológica bem-sucedida de *H. pylori*, podendo se tornar ferramentas auxiliares promissoras, juntamente com a IHQ, no diagnóstico histopatológico das lesões gástricas, encaminhadas ao NAP/CPA/IAL.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos do Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz por todo suporte para realização desse trabalho.

REFERÊNCIAS

1. RODRIGUES, O. et al. Sensibilidade e especificidade das alterações histopatológicas de mucosa gástrica antral para o diagnóstico da infecção pelo *Helicobacter pylori*. Rio Grande: **Vittale**, v. 15, n. 1, p. 89-99, 2003.
2. MARQUES, T. REIS, C. A. NOGUEIRA, A. M. M. F. O papel das mucinas gástricas na infecção por *Helicobacter pylori*. Minas Gerais: **Rev Med Minas Gerais**, v. 16, n. 1, p. 38-42, 2006.
3. ATHERTON, J. C.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori*. In: JAMESON, J. L. et al. **Harrison's principles of internal medicine**. Nova York: McGrall-Hill, 2018.

4. SOUSA, D. H. A. A. et al. *Helicobacter pylori* como principal fator de risco para adenocarcinoma gástrico. Curitiba: **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 2, p. 4149-4158, 2021.
5. KARIMI, P. et al. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. Estados Unidos: **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 23, n. 5, p. 700-713, 2014.
6. Estatísticas de câncer. Instituto Nacional do Câncer, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 30/11/2021.
7. CAMIÑA, R. H. et al. Comparação entre teste de urease e histopatologia na identificação do *Helicobacter pylori*. Paraná: **Gastroenterol. Endosc. Dig.**, v. 36, n.1, p. 1-6, 2017.
8. KATELARIS, P. et al. **World Gastroenterology Organization Global Guidelines: Helicobacter pylori**. 33 p., 2021.
9. CAPUTO, L. F. G. GITIRANA, L. B. MANSO, P. P. A. Técnicas Histológicas. In: MOLINARO, E. M. CAPUTO, L. F. G. AMENDOEIRA, M. R. R. (Org). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, Cap. 3, 2010.
10. KIERNAN, J. A. Silver Staining for Spirochetes in tissues: rationale, difficulties, and troubleshooting. Canada: **Laboratory Medicine**, v. 33, n. 9, p. 705-708, 2002.
11. FERRO, A. B. **Imuno-histoquímica**. Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. 138 p. 2014.
12. BARLETT, J. H. Microorganisms, 2008. In: BANCROFT, J. D. Theory and Practice of Histological Techniques. Elsevier, 6 ed., cap. 17, p. 317-326.
13. BARBOSA, A. J. A. RODRIGUES, M. A. M. Tubo digestivo. In: FILHO, G. B. Bogliolo Patologia. 8 ed. Cap. 20, p.703-766, 2013.
14. LAINE, L.; LEWIN, D. N.; NARITOKU, W.; COHEN, H. Prospective comparison of H&E, Giemsa, and Genta stains for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. Los Angeles: **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 45, n. 6, p. 463-467, 1997.
15. BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Plano Nacional de Saúde 2020-2023**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, fev. 2020.
16. MORRIS, G. B. RIDGWAY, E. J. SUVARNA, S. K. Traditional stains and modern techniques for demonstrating microorganisms in histology. In: **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**. [S.l.], p. 254–279, 2018
17. WABINGA, H. R. Comparison of immunohistochemical and modified Giemsa stains for demonstration of *Helicobacter pylori* infection an African population. Uganda: **African Health Sciences**, v. 2, n. 2. p. 52-55, 2002.
18. LOFFELD, R. J. L. F. et al. *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. Comparison of culture, modified giemsa stain, and immunohistochemistry. A retrospective study. Netherlands: **Journal of Pathology**, v. 165, p. 69-73, 1991.
19. SANDHIKA, W. Detection of *Helicobacter pylori* infection in chronic gastritis biopsy specimen using warthin-starry and modified giemsa stain in Dr Soetomo Hospital Surubaya. Indonesia: **Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease**, v. 7, n. 6, 2019.
20. KOCSMÁR, E. et al. Sensitivity of *Helicobacter pylori* detection by Giemsa staining is poor in comparison with immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization and strongly depends on inflammatory activity. Hungary: **Wiley Online Library**, v. 22, n. 4, p. 12387, 2017.

CARGA VIRAL E PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIRRETROVIRAIS EM UMA POPULAÇÃO PEDIÁTRICA DO ESTADO DE SÃO PAULO EXPOSTA OU INFECTADA COM HIV-1

Andressa Coelho Sichi¹; Cintia Mayumi Ahagon²; Valeria Oliveira Silva²; Luis Fernando de Macedo Brigido²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - NDSS – IAL; E-mail: andressasichi1@gmail.com

²Membros do Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais – Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz

³Docente/pesquisador do Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais – Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz

Resumo: A eliminação da transmissão vertical do HIV é uma das seis prioridades do Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis (DCCI) do Ministério da Saúde, que ainda não foi alcançada. O teste padrão-ouro para diagnóstico do HIV-1 em crianças com menos de 18 meses de vida é a Carga Viral (CV), devido à permanência de anticorpos maternos. Para a identificação de resistência genotípica a região *pol* é a mais sequenciada por abranger as Classes de Antirretrovirais (ARVs) mais utilizadas: Inibidores de Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeos (ITRN), Inibidores de Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeos (ITRNN) e Inibidores de Protease (IP). A população deste estudo foi selecionada entre pacientes menores de 12 anos cujas amostras foram encaminhadas para o laboratório de Carga Viral no Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo), entre 2018 à 2021. Para quantificação viral plasmática do HIV-1 foi utilizado o Abbott RealTime HIV-1 (Abbott, USA), para genotipagem foi feito o sequenciamento genético (Sanger). No estudo, foi considerado Transmissão Vertical (TV) 1.3% dos casos. Entre aqueles que estão sob Terapia Antirretroviral (TARV) à mais de 6 meses, 16/37% (43%) estão suprimidas virologicamente considerando <200 cópias/mL. Na genotipagem, 48% das sequências apresentaram ao menos uma mutação para ITRN, ITRNN ou IP. As mutações mais observadas foram M184V (16%) e K103N (16%); os ARVs com menor índice de susceptibilidade foram Nevirapina e Efavirenz. Programas que garantam o monitoramento da carga viral plasmática juntamente ao acompanhamento clínico devem ser instituídos ou aprimorados para promover a erradicação da transmissão vertical e obter o sucesso terapêutico à todas as crianças vivendo com HIV-1 à fim de alcançar a supressão viral.

Palavras-chave: carga viral; HIV-1; Terapia Antirretroviral de Alta Atividade; transmissão vertical de doenças infecciosas; técnicas de genotipagem

INTRODUÇÃO

Em 2020, estimava-se 1,7 milhão de crianças com idade entre 0 à 14 anos vivendo com HIV no mundo todo, onde 54% tiveram acesso à terapia antirretroviral (TARV). Cerca de 1,4 milhão de mulheres com HIV engravidam no mundo, se elas não receberem o tratamento adequado, a chance do vírus ser transmitido para o bebê varia de 15 a 45%. (UNAIDS, 2020; OMS, 2021). Contudo, esse índice cai para aproximadamente 1% caso a mãe e o bebê recebam a profilaxia com antirretrovirais no tempo e de forma adequada. A

eliminação da transmissão vertical do HIV é uma das seis prioridades do DCCI e do Ministério da Saúde do Brasil. Ainda que essa prioridade apresente estatísticas otimistas ao decorrer dos anos, a meta ainda não foi alcançada. (BRASIL, 2019; Teshome et al., 2020)

Em 2008 a Organização Mundial da Saúde (OMS) revisou suas diretrizes e passou a recomendar início imediato da TARV após diagnóstico. Entretanto, a implementação do tratamento precoce requer o diagnóstico precoce, que pode ser inacessível em determinados ambientes devido ao custo mais elevado comparativamente aos testes convencionais, por exemplo os testes rápidos. Os testes de anticorpos comumente usados para adultos não podem ser utilizados devido à presença de anticorpos maternos que podem permanecer até os 18 meses de idade. O teste considerado padrão-ouro para crianças abaixo dessa faixa etária é a amplificação de ácido nucleico (Carga Viral Plasmática). (PENAZZATO et al., 2014)

Um dos principais fatores que leva às mutações é a baixa adesão à TARV, onde os pacientes não fazem o tratamento de forma adequada ocasionando a diminuição de ARVs circulantes na corrente sanguínea, consequentemente os níveis de fármaco não conseguem impedir a replicação do vírus. (VELOSO et al, 2010; BRASIL, 2019) A variabilidade genômica do HIV decorre principalmente da transcrição reversa do genoma do HIV, cujo evento é sujeito a erros. Durante a replicação do HIV, ocorre aproximadamente um erro a cada 10.000 nucleotídeos incorporados, e considerando que o genoma do HIV contém aproximadamente 10.000 nucleotídeos, estima-se que uma nova mutação é gerada a cada novo vírion produzido no organismo. (TAKEUCHI et al., 1991)

O gene *pol* é um dos genes estruturais do HIV, que contém 2.841 pares de base e 947 aminoácidos, e é responsável pela codificação das enzimas virais que atuam na replicação do vírus, sendo elas a Protease (PT), Transcriptase Reversa (RT) e Integrase (INT). A maioria dos sequenciamentos genéticos do HIV-1 são realizados para avaliação de testes de resistência genotípica, a *pol* é a região mais sequenciada para este fim, já que a maioria das classes de ARVs agem sobre estas enzimas. (RHEE, 2018)

Esse estudo tem como objetivos avaliar a taxa de viremia entre as crianças expostas ou infectadas com HIV-1 cujas amostras foram encaminhadas para o IAL entre 2018 à 2021 e avaliar os índices de mutações que conferem resistência às classes de ARVs dos ITRN, ITRNN e IP.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto faz parte da pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz sob os seguintes protocolos: CTC-73D/2011 e CAAE: 02298012.6.0000.0059.

A população deste estudo foram os pacientes menores de 12 anos cujas amostras foram encaminhadas para diagnóstico ou monitoramento do HIV-1 ao Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais (NDSS) do Centro de Virologia - Instituto Adolfo Lutz Central (IAL), com solicitação do teste de Carga Viral e/ou Genotipagem no período de 2018 à 2021.

Para a Quantificação de RNA viral plasmático a extração foi realizada de forma automatizada pelo equipamento m2000sp (Abbott Molecular, EUA). Para a amplificação através do RT-PCR foi utilizado o produto final da extração no equipamento m2000rt (Abbott Molecular, EUA).

Para as extrações manuais de RNA foram utilizados os kits comerciais “QIAmp Viral RNA Mini Kit” (Qiagen, Alemanha) seguindo as especificações do fabricante. Após a extração foi realizada a amplificação da região Polimerase, dos genes da protease (PT) e transcriptase reversa (RT). O procedimento utiliza o método *in-house* pelo *One-Step* RT-PCR, combinando a retrotranscrição e amplificação, respectivamente. A etapa seguinte foi a amplificação de uma região interna do primeiro amplificado envolvendo a PT e RT (Nested PCR). O protocolo utilizado *in-house* foi previamente descrito em trabalhos anteriores (SOLDI, 2019). Para confirmação da amplificação da região alvo foi realizada a eletroforese em gel de agarose à 1%.

Após a amplificação foi realizado o sequenciamento genético pelo método de Sanger, para revelar a composição nucleotídica. Foi adicionado o mix com nucleotídeos marcados com corante fluóforo e a placa foi levada ao termociclador. Após a reação de sequenciamento, foi levada ao sequenciador automático *ABI Prism 3500XL Genetic Analyzer* (Life Technologies, EUA) por 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 min.

A avaliação do grau de susceptibilidade aos ARVs foi feita por meio do algoritmo da plataforma de *Stanford University HIV Drug Resistance Database – HIVdb* (<https://hivdb.stanford.edu/>). Para isso, um *score* é revelado, sendo: alto nível de resistência, resistência intermediária, baixo nível de resistência, nível potencialmente baixo de resistência ou nenhum nível de resistência. (Stanford HIVdb, 2021)

As informações sobre quantificação de viremia plasmática (Carga Viral), quantificação de linfócitos T-CD4+ e tratamento foram obtidas através dos Sistemas de Informações do Ministério da Saúde: SISCEL (Sistema de Controle de Exames Laboratoriais) e SICLOM (Sistema de Controle Logístico de Medicamentos).

As variáveis utilizadas para análise foram qualitativas nominais e quantitativas (discretas e contínuas). Foram usados a mediana e Interquartil (IQR 25-75). Todas as estatísticas foram analisadas pelo software STATA version 14 (StataCorp LP, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 494 crianças analisadas, 447/494 (90%) foram encaminhadas para diagnóstico devido à exposição ao HIV-1. Dessas, 435/447 (97%) apresentaram CV Não Detectado (CV ND) no teste do IAL e apenas 14% têm dois testes de CV ND, seguindo o protocolo do Ministério da Saúde. (BRASIL, 2018)

Foi considerado Transmissão Vertical (TV) quando o teste do IAL foi a primeiro teste com quantificação superior à 200 cópias/mL e menos de 18 meses de vida, resultando em 6/447 (1.3%) de casos, taxa que reflete os levantamentos dos Boletins Epidemiológicos de 2019 e 2020, em que o Estado de São Paulo apresenta índices inferiores à 2%. É importante ressaltar que o índice ideal é a erradicação da TV do HIV-1 através de práticas voltadas à prevenção e profilaxia.

Para monitoramento da infecção do HIV-1 foram encaminhados 47/494 (10%) amostras; dessas, 13/47 (28%) têm resultado ND no teste do IAL porém apresentam viremia prévia e/ou histórico de tratamento. Existem 34/47 (72%) pacientes com coletas anteriores quantificáveis e que apresentam viremia no teste do IAL.

Diretrizes do Ministério da Saúde recomendam que a TARV deve ser iniciada o mais rápido possível após o diagnóstico. No estudo, 37 crianças fazem uso da TARV à no

mínimo 6 meses, tempo suficiente para alcançar a supressão virológica. No critério proposto pelo CDC (2020) no qual é considerado supressão viral quando CV é inferior à 200 cópias/mL, temos 16/37 (43%) de crianças suprimidas. Esse índice indica falha na introdução e/ou adesão à TARV e no monitoramento, uma vez que a UNAIDS tenha proposto a meta 90-90-90. (UNAIDS, 2015)

Dezenove amostras foram parcialmente sequenciadas na região da *pol* (RNA). A mediana de idade em meses foi de 20 (4-77); a maior frequência foi do sexo feminino (79%) e 95% fazem uso de TARV.

Em relação às mutações, 9/19 (48%) mostraram ao menos uma mutação para ARVs da classe de ITRN, ITRNN ou IP. Foi identificada a mutação V32L em 1/19 (5%), conferindo resistência Lopinavir e Darunavir. Para a classe ITRN, 26% apresentaram mutações de resistência, sendo a M184V (3/19; 16%) e T215S (1/19; 5%) as mais observadas desta classe. A mutação M184V, que também foi a mais observada no estudo de Mossoro-Kpinde (2017), confere resistência ou redução da susceptibilidade à Lamivudina e pode promover resistência de baixo nível ao Abacavir. Na classe dos ITRNNs, 42% apresentaram alguma mutação, a mais prevalente foi K103N (3/19; 16%), seguido da V108I (2/19; 10%). As características laboratoriais e demográficas dos pacientes que apresentaram mutações estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1: Características demográficas e laboratoriais dos pacientes que apresentaram mutações de resistência.

Dados demográficos			Informações Clínicas					Polimerase (Parcial)			
ID	Idade (meses)	Sexo	LTCD4 ¹	CV ²	Esquema TARV ³	Tempo em TARV	Exposição ARVs	IP ⁴	ITRN ⁵	ITRNN ⁶	Resistência
23819	100	F	768	2.08	RAL + LPV/r	>6 meses	LPV; RTV; 3TC; AZT; NVP	-	-	K103N/ E138A	RPV; ETR; EFV; NVP
46421	133	F	554	2.87	AZT + 3TC + NVP	>6 meses	AZT; 3TC; NVP	-	-	K103N/ V108VI	DOR; EFV; NVP
57121	106	F	610	3.19	AZT + 3TC + RAL	>6 meses	AZT; 3TC; RAL; NVP	-	M184V	V108VI	ABC; DOR; NVP; EFV; FTC; 3TC
29521	56	F	893	3.97	AZT + 3TC + EFV	>6 meses	AZT; 3TC; EFV; RAL	-	M184V	K103N	CAB; EVG; ABC; RAL; FTC; 3TC; EFV; NVP
6820	11	F	245	6.42	-	-	-	-	-	V179D	EFV; ETR; NVP; RPV
6021	22	M	1261	4.5	AZT + 3TC + NVP	<6 meses	AZT; 3TC; NVP	-	M184V	Y181C	ABC; DOR; EFV; ETR; RPV; FTC; 3TC; NVP
421	5	F	1705	6.71	-	-	-	-	-	V106I	-
7721	10	F	1374	5.81	AZT + 3TC + LPV/r	<6 meses	AZT; 3TC; LPV; RTV	-	T215S	-	AZT
2420	9	F	3725	1.30	AZT + 3TC + NVP	>6 meses	AZT; 3TC; NVP	V32L	-	K101E/ G190A/ K238T	DOR; ETR; EFV; NVP; RPV

Legenda: ¹Contagem de Linfócitos TCD4+ (mm³/mL); ²Carga Viral analisada no IAL (log₁₀); ³Esquema de TARV anterior à coleta; ⁴Mutação para Classe dos IP; ⁵Mutação para Classe dos ITRN; ⁶Mutação para Classe dos ITRNN.

A K103N é uma mutação não-polimórfica e reduz a susceptibilidade à Nevirapina e Efavirenz, que foram os dois ARVs com os menores índices de susceptibilidade, como podemos ver na Tabela 1. (Stanford HIVdb, 2021)

Tabela 1: Nível de susceptibilidade aos antirretrovirais quanto às mutações associadas.

Antirretroviral	Alta Resistência (%)	Intermediária Resistência (%)	Baixa Resistência (%)	Suscetível (%)
ITRN¹				
Abacavir	0	0	16	84
Lamivudina	16	0	0	84
Emtricitabina	16	0	0	84
Zidovudina	0	0	5	95
ITRNN²				
Doravirina	0	0	21	79
Efavirenz	21	5	11	63
Etravirina	0	11	11	78
Nevirapina	26	0	11	63
Rilpivirina	5	5	11	79

¹Inibidores de Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeos; ²Inibidores de Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeos.

Poucos estudos foram realizados a fim de avaliar a CV e as mutações de resistência em crianças. Houveram desafios envolvendo dados cadastrais e informações laboratoriais que de certa forma limitaram nosso estudo. Além disso, o número de amostragens nesse estudo foi pequeno, não sendo um referencial. As unidades de serviço parceiras do IAL pertencem à determinados municípios e apesar da demanda espontânea, esse trabalho pode não condizer com o cenário atual de todo o Estado de São Paulo.

CONCLUSÕES

Programas que garantam o monitoramento da carga viral plasmática juntamente ao acompanhamento clínico devem ser instituídos ou aprimorados para promover a erradicação da transmissão vertical e garantir o sucesso terapêutico à todas as crianças vivendo com HIV-1 com o intuito de alcançar a supressão viral. As taxas de transmissão vertical e supressão virológica, ainda que pareçam otimistas, não são ideais.

A observação de mutações de resistência e a diminuição na susceptibilidade aos antirretrovirais demonstra que a realização do teste de genotipagem pré-tratamento é fundamental para determinar a melhor escolha nos esquemas terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics – Fact sheet. UNAIDS, **UNAIDS 2021 epidemiological estimates**. 2021. Disponível em: <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>. Acesso em: 20 jan. 2022.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Técnico para Avaliação de Exames de Genotipagem do HIV**. Brasília, 2019a
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em crianças e adolescentes**. Brasília, 2018
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Prevenção da Transmissão Vertical de HIV, Sífilis e Hepatites Virais**. Brasília, 2019b
- MOSSORO-KPINDE, C.D. et al. Escalating and sustained immunovirological dissociation among antiretroviral drug-experienced perinatally human immunodeficiency virus-1-infected children and adolescents living in the Central African Republic: A STROBE-compliant study. **Medicine (Baltimore)**. Hagerstown, 22 Mai 2020
- RHEE S.Y. SHAFER R.W. Geographically-stratified HIV-1 group M pol subtype and circulating recombinant form sequences. **Scientific Data**. 31 Jul 2018
- SOLDI, G. F. R. Avaliação da resistência aos inibidores da protease em pacientes vivendo com HIV em falha terapêutica. Dissertação (Mestrado em Ciências) - **Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças**. São Paulo, 2019.
- TAKEUCHI Y. et al. Low fidelity of cell-free DNA synthesis by reverse transcriptase of human immunodeficiency virus. **Molecular Diversity Preservation International Multidisciplinary Digital Publishing Institute**. Baltimore, 1988
- TESHOME G.S.; MODIBA L.M. Strategies to Eliminate Mother-to-Child Transmission of HIV in Addis Ababa, Ethiopia (Qualitative Study). HIV/AIDS: research and palliative care. Auckland, 2 Dez 2020
- VELOSO A.C.R. et al. Resistência genotípica do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 aos antirretrovirais. *Com. Ciências Saúde*. Brasília, 21(1):49-60. 03 Ago 2010
- World Health Organization. Global Health Observatory data. **Estimated antiretroviral therapy coverage among children**. 10 nov. de 2021. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-percentage-of-pregnant-women-living-with-hiv-who-received-antiretrovirals-for-preventing-mother-to-child-transmission>. Acesso em: 20 jan. 2021.
- World Health Organization. Global Health Observatory data. **Estimated percentage of pregnant women living with HIV who received antiretrovirals for preventing mother-to-child transmission**. 10 nov. de 2021. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/estimated-percentage-of-pregnant-women-living-with-hiv-who-received-antiretrovirals-for-preventing-mother-to-child-transmission>. Acesso em: 20 jan. 2021

MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA TRANSMITIDA EM PACIENTES RECÉM-DIAGNOSTICADOS E NÃO EXPOSTOS AO TRATAMENTO ANTIRRETROVIRAL AO HIV-1 (2020-2021)

Marianne Alves dos Santos¹; Valéria Silva Oliveira¹; Cintia Mayumi Ahagon¹; Luís Fernando de Macedo Brígido²

¹Membros do Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais – NDSS – IAL Central

²Docente/ pesquisador do Depto NDSS – Prof. Dr. Luís Fernando de Macedo Brígido – IAL Central

Resumo

O diagnóstico da infecção causada pelo HIV-1 na fase inicial e a rápida introdução do tratamento antirretroviral podem impedir transmissão viral e contribuir para o controle da epidemia. Têm sido observados em pessoas com infecção recente, ainda em fase pré-tratamento, perfis de resistência aos antirretrovirais que podem ser transmitidos para a população. O objetivo desse estudo foi analisar a presença de mutações associadas à resistência aos antirretrovirais em uma população recém-diagnosticada com HIV-1 (2020-2021). Foram selecionadas 223 amostras de PVHIV, das quais foram realizadas análises demográficas, avaliados grau de susceptibilidade aos antirretrovirais e determinação dos subtipos. A casuística apresentou maior frequência de indivíduos do sexo masculino (n=80%) com uma mediana de idade de 31 anos (IQR = 25-38). Na análise das sequências genômicas da região parcial da Polimerase (n=80/223) foram observadas mutações associadas a resistência em 25% dos indivíduos. Todas as amostras sequenciadas apresentaram mutações de resistência para ARVs-NNRTI, sendo as mais frequentes: E138A, K103N e V106I. Estas mutações estão associadas a alta resistência aos medicamentos Efavirenz, Nevirapina e Doravirina. Quanto aos subtipos virais identificados nesta população, o subtipo B foi o mais frequente (n= 66%), mantendo-se como o subtipo de maior importância para a região metropolitana de São Paulo. Assim, foi observada uma taxa elevada de mutações, porém associadas a padrões de resistência que não comprometem o esquema de primeira linha de tratamento estabelecido no País, porém com importante impacto em regimes baseados em uso de Inibidores ARVs-NNRTI, fazendo-se necessário o uso da genotipagem antes de serem iniciadas as terapias medicamentosas que envolvam o uso de medicamentos desta classe.

Palavras-Chave: antirretrovirais; HIV-1; mutações de resistência.

Introdução

A AIDS, Síndrome da Imunodeficiência Humana é uma doença causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) que pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, e apresenta alta variabilidade genética (AVERT et al; 1986-2016).

A incapacidade do sistema imune em produzir anticorpos neutralizantes no início da infecção contribui para que os tecidos linfóides atuem como propagadores de infecção pelo HIV1 (AVERT.; 1986-2016). De acordo com a sequência de aparecimento dos marcadores virais e imunológicos podem ser observados seis estágios (Fiebig) durante os eventos iniciais pela infecção pelo HIV-1. As infecções agudas e recentes merecem atenção quanto a continuidade da epidemia do HIV, pois o advento da breve viremia de alto título durante a fase de infecção aguda está associada a um risco aumentado de transmissão do HIV

(Suthar AB, et al; 2015). A detecção de infecção recente vem provando ser útil, para observação do perfil de resistências primárias que estão sendo transmitidas para a população.

Devido à alta taxa de morbi-mortalidade conferidas pelo HIV, na década de 1980 surgiram os primeiros medicamentos antirretrovirais (ARV) visando o combate contra a infecção. No Brasil, em 1996, foi declarada a lei federal 9.313, que conferiu a população acesso à terapia antirretroviral por meio do Sistema Único de Saúde (SUS). Atualmente estão disponíveis seis classes farmacológicas distintas para uso, sendo elas: análogos nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa (NRTI) e não análogos nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa (NNRTI), Inibidores da Protease (IP); inibidores da integrase (INI); inibidor de fusão (IF); e inibidor de CCR5. A implementação do tratamento como prevenção (TasP) com o uso das terapias antirretrovirais vem sendo reconhecida como uma das mais importantes medidas de saúde pública para o controle da transmissão do HIV (Montaner, J. S. G. et al; 2010).

Objetivo

Analisar a presença de mutações associadas à resistência aos antirretrovirais em uma população recém-diagnosticada com HIV-1 (2020-2021).

Material e Métodos

Foram incluídas amostras de pessoas adultas vivendo com HIV/Aids (PVHIVA) recém diagnosticadas e não expostas a tratamento antirretroviral (TARV) do Estado de São Paulo, e do Projeto TransODARA das quais foram coletadas amostras em 5 capitais brasileiras (São Paulo, Manaus, Campo Grande, Salvador e Porto Alegre). Estas foram encaminhadas para o Laboratório de Retrovírus do Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais (NDSS) do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz Central, durante o período de janeiro de 2020 a novembro de 2021. Informações dos pacientes foram consultadas nas bases de dados: i. Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (SISCEL) da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral do HIV-1, ii. Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (SICLOM), iii. Pedido médico. Foram excluídos pacientes < 18 anos de idade; expostos a TARV ou em TARV > 7 dias; Carga Viral Indetectável ou abaixo do limite de detecção no pedido ou no resultado ($\text{Log} \leq 1,3$); Informações incompletas no BPA que não permitam a identificação do paciente nos sistemas de monitoramento.

A quantificação da Carga Viral foi obtida através de ensaio de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa in vitro em plasma sanguíneo, seguindo as orientações do fabricante (Abbott M2000 RealTime HIV-1, ABBOT) para amplificação de parte da região da Polimerase via técnica de PCR *in house* por etapas combinadas de retrotranscrição e amplificação *One Step* RT-PCR descrito anteriormente por Soldi et al (2019), e de Integrase por Cavalcanti et al (2016). A confirmação da amplificação dos produtos ocorreu via técnica de eletroforese em gel de agarose 1%. Os produtos da PCR foram utilizados na reação de sequenciamento por técnica de Sanger em equipamento automático (ABI Prism 3130XL Genetic Analyzer, Life Technologies). Os cromatogramas obtidos foram posteriormente editados pelos Softwares Sequencher 4.7 (GeneCodes) e/ou RECall beta v3.05 e então, alinhadas no software BioEdit. A avaliação do grau de susceptibilidade aos antirretrovirais (GSS-ARV) foi realizada por meio do algoritmo de *Stanford University HIV Drug Resistance Database* – HIVdb (*Stanford HIVdb* -

<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/bymutations/>). Os subtipos do HIV-1 foram identificados através das ferramentas automatizadas: REGA HIV-1 *Subtyping Tool* v3.0 (Stanford University, USA) *Context-based Modeling For Expeditious Typing* (COMET, Luxembourg Institute of Health, LU), *Subtype Classification Using Evolutionary Algorithms* (SCUEAL, University of California San Diego, USA). Subtipos recombinantes foram confirmados pelo *Jumping Profile Hidden Markov Model* (jpHMM, GeorgAugust-Universitat, DE). Por fim, as análises estatísticas foram realizadas utilizando variáveis contínuas descritas como a mediana e intervalo interquartil 25- 75 (IQR), com a diferença entre os grupos avaliados com testes de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis*, foram usados quando necessário. O χ^2 de *Pearson* (ou teste exato de *Fischer*, bicaudal) para variáveis categóricas e o coeficiente de correlação de *Spearman* para duas variáveis contínuas foram testados com o STATA 14 (Stata Corp).

Resultados e Discussão

De acordo com o presente trabalho, entre as amostras analisadas no período de um ano e onze meses observou-se maior frequência de diagnóstico recente entre pessoas de sexo biológico masculino. Estes resultados são semelhantes aos reportados no Boletim Epidemiológico da Prefeitura de São Paulo, que avaliou esta população durante dez anos. Houve uma discreta mudança com relação a idade, pois o Boletim Epidemiológico do Município de São Paulo publicado no ano de 2021 definiu um IQR de 25-29 anos, enquanto neste estudo foi definido um IQR de 25-38 anos, apesar da população deste estudo não ser significativamente representativa em termos de comparação. As análises relacionadas a raça/etnia autorreferida, segundo o boletim epidemiológico da Prefeitura de São Paulo de 2020 detectou uma frequência maior de 50,7% (n= 342.459) entre os pretos, enquanto neste estudo a maior frequência foi entre pardos e brancos.

Com relação as análises dos linfócitos T-CD4⁺ existem diversas evidências de que a infecção por HIV é um indicativo da incompatibilidade entre a deficiência imunológica, fortemente demonstrada pela AIDS e a hiperativação imunológica. Níveis aumentados de ativação imune sistêmica e inflamação não apenas promovem a replicação viral e a apoptose das células T-CD4⁺, mas também desencadeiam um declínio mais rápido da função e da competência imune, consequentemente levando a um fenômeno de *imunossensibilidade* associado ao envelhecimento celular, a chamada *imunossenescência* (Sokoya, Steel, Nieuwoudt & Rossouw, 2017). Tal fato pôde ser observado dentre as populações analisadas tanto pela Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo no ano de 2020, tanto por este estudo, pois em ambos houve uma frequência considerável de contagem de linfócitos T-CD4⁺ abaixo de 350 células/mm³.

Quanto aos subtipos, no Brasil, estudos indicam que o subtipo B é o mais prevalente na maioria das regiões geográficas (BRINDEIRO RM et al; 2003). Os estudos realizados por Bokharaei-Salim. et al; 2020 e Coelho. et al; 2018, também destacam o subtipo B como um importante responsável pela infecção de novos pacientes pelo HIV-1. No presente estudo, dentre as amostras analisadas quanto a subtipos, obtivemos uma frequência de infecção pelo vírus HIV-1 para o subtipo B em 66% (53/80) das análises.

Quanto a detecção de resistência primária e secundária à TARV, segundo Naziri H. et al; 2014, estas fornecem informações importantes e críticas para determinação dos regimes. Para os pacientes que iniciaram tratamento antirretroviral no Brasil, desde janeiro de 2017, foi incorporado Dolutegravir como esquema preferencial de primeira linha em conjunto

com Tenofovir e Lamivudina (Coelho et al, 2018). Ambos os NRTIs recomendados pelo Ministério da Saúde mantêm-se totalmente ativos contra as mutações analisadas nos participantes deste estudo. Sabe-se que as mutações de resistência medicamentosa mais prevalentes globalmente são aquelas que conferem resistência aos NRTIs e NNRTIs, enquanto a resistência aos IPs é universalmente menos frequente (Jahanbakhsh F et al, 2013). Neste estudo, todas as amostras analisadas (n=80, 25%) apresentaram mutação(ões) de resistência à classe de ARVs-NNRTI, sendo as mais frequentes: E138A, K103N e V106I, corroborando-se com os dados de Coelho et al, 2018. Estas mutações levam a uma maior frequência de alta resistência (score=0) aos medicamentos Efavirenz, Nevirapina e Doravirina. Apesar de estes não fazerem parte do esquema medicamentoso de primeira linha implementado no país, este estudo reforça a importância quanto a realização de testes de genotipagem entre a população de novos infectados.

Conclusão

A epidemia de HIV é uma preocupação constante entre as autoridades sanitárias, devido a altas taxas de manutenção para novas infecções, apesar de diferentes medidas epidemiológicas e farmacológicas que incluem a profilaxia medicamentosa. As taxas de transmissão do HIV-1 com padrão de mutações associadas a resistência observadas dentre os pacientes deste estudo, mantiveram-se estáveis na região, não havendo até o momento uma preocupação quanto ao esquema terapêutico de primeira linha introduzidos pelo Ministério da Saúde em 2017. Porém, quanto as resistências identificadas para Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa pode haver o comprometimento em regimes baseados nesta classe. Reforçando-se a necessidade dos testes de genotipagem antes do início das terapias antirretrovirais. Com relação ao subtipo B do vírus HIV-1, como esperado, este foi o tipo viral mais prevalente na população analisada, mantendo-se como o subtipo de maior importância para a região metropolitana de São Paulo.

Referências Bibliográficas

1. Avert. The Science of HIV and Aids - Overview.UK, 1986-2016. Disponível em: <https://www.avert.org/professionals/hiv-science/overview> Acesso em: 25 de outubro de 2021.
2. Fiebig, E. W. et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *Aids*, v. 17, n. 13, p. 1871-1879, 2003. Disponível em: https://journals.lww.com/aidsonline/Fulltext/2003/09050/Dynamics_of_HIV_viremia_and_antibody.5.aspx. Acesso em: 10 nov 2021.
3. Suthar AB, Granich RB, Kato M, Nsanzimana S, Montaner JSG, Williams BG. Programmatic Implications of Acute and Early HIV Infection. *J Infect Dis*. 2015;212(9):1951–1360.
4. Montaner, J. S. G.; Lima, V. D.; Barrios, R.; Yip, B.; Wood, E.; Kerr, T. Association of highly active antiretroviral therapy coverage, population viral load, and yearly new HIV diagnoses in British Columbia, Canada: a population- based study. *Lancet Infect. Dis.*, [S.l.], v. 376, p. 532-39, 2010.
5. Montaner, J. S. G.; Lima, V. D.; Barrios, R.; Yip, B.; Wood, E.; Kerr, T. Association of highly active antiretroviral therapy coverage, population viral load, and yearly new HIV diagnoses in British Columbia, Canada: a population- based study. *Lancet Infect. Dis.*, [S.l.], v. 376, p. 532-39, 2010.
6. Soldi, G. F.R., Ribeiro, I. C., Brígido, L. F. M. et al. Major drug resistance mutations for HIV-1 Protease Inhibitors (PI) Among Patients exposed to the PI class who did not get therapy antiretroviral in the State of São Paulo, Brazil; 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0223210>. Acesso em: 24 nov 2021.
7. Coelho, L. P. O., Matsuda, E. M., Brígido, L. F. M. et al. Prevalence of HIV-1 transmitted drug resistance and viral suppression among newly diagnosed adults in São Paulo, Brazil; 2018 Dez. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30569276/>. Acesso em: 24 nov 2021.
8. Cavalcanti, J. S., Brígido, L. F. M. et al. Resistência Genotípica para inibidores da integrase do HIV-1; p: 48, 2016. Tese. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2016/ses-36048/ses-36048-6538.pdf>
9. Boletim Epidemiológico de HIV/AIDS da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo; Versão Preliminar; 2021. Disponível em: <https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/istaids/boletimepidemiologicodez2021.pdf>. Acesso em: 7 dez 2021
10. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis – Boletim Epidemiológico 2020 - Ministério da Saúde (Brasil). Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/boletim-epidemiologicohivaida-2020> Acesso em: 26 out 2021.
11. Sokoya, T., Steel, H. C., Nieuwoudt, M., & Rossouw, T. M. (2017). HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. *Mediators of inflammation*, 2017, 6825493. <https://doi.org/10.1155/2017/6825493>
12. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003;17(7):1063-9.
13. Bokharaei-Salim F, Esghaei M, Khanaliha K, Kalantari S, Marjani A, Fakhim A, Keyvani H. HIV-1 reverse transcriptase and protease mutations for drug-resistance

detection among treatment-experienced and naïve HIV-infected individuals. PLOS ONE. 2020 Mar 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229275>

14. Naziri H, Baesi K, Moradi A, Aghasadeghi MR, Tabarraei A, McFarland W, et al. Mutações de resistência a medicamentos antirretrovirais em pacientes ingênuos e experientes em Shiraz, Irã, 2014. Arch Virol. 2016; 161 (9): 2503– 9. pmid: 27368990.

15. Jahanbakhsh F, Hattori J, Matsuda M, Ibe S, Monavari SH, Memarnejadian A, et al. Prevalência de resistência ao HIV transmitida aos medicamentos no Irã entre 2010 e 2011. PLoS One. 2013; 8 (4): e61864. pmid: 23626742.

ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES *rpoB*, *katG* e *inhA* EM *Mycobacterium tuberculosis* NO TESTE GENOTYPE MTBDRplus-LPA

Assucena Marques Rodrigues Xavier¹; Andrea Gobetti Coelho Bombonatte²; Ana Carolina Chiou Nascimento³

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Epidemiológica em Laboratório de Saúde Pública – CLR IX – IAL; e-mail: assucenarxx@gmail.com

² Diretora do Núcleo de Biologia Médica – CLR IX – IAL;

³ Pesquisadora do departamento laboratório de micobactérias – CLR IX – IAL;

Resumo: A Tuberculose é uma doença infectocontagiosa, sendo um grave problema de saúde pública, associado a condições de pobreza, desigualdade social, má distribuição de renda e urbanização acelerada, e o Relatório Global de Tuberculose 2021 mostra que o Brasil é o país, com maior incidência de casos pelas Américas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a detecção de Tuberculose Multidrogas resistente (TBMDR) pelo teste molecular GenoType MTBDRplus, a partir de amostras clínicas de pacientes submetidas a detecção de TB pulmonar. Foram avaliadas 162 amostras no período de janeiro a junho de 2021, submetidas ao diagnóstico da TB na região metropolitana da Baixada Santista, realizado no Instituto Adolfo Lutz (IAL) de Santos. Entre as 162 amostras, 130 (80,2%) foram amostras com resistência a rifampicina (RIF) e isoniazida (INH) não detectadas; 8 (4,9%) resistência a RIF detectada; 3 (1,8%) resistência a INH detectada; 2 (1,2%) resistência a RIF e INH detectada e 19 (11,7%) inconclusivas. A maioria das amostras (75,0%) com resistência à RIF detectada apresentaram, a ausência de hibridação na sonda WT7, e em casos de resistência a RIF e INH detectadas, apresentaram as mutações *rpoB* MUT3 e *katG* MUT1. O ensaio MTBDRplus é um teste excelente na detecção de resistência ao complexo *Mycobacterium Tuberculosis* (MTBC) para RIF, INH e multirresistentes. O teste tem como suas vantagens e impacto, a redução do tempo para o diagnóstico, a fácil execução em ambientes laboratoriais com boa infraestrutura e treinamento técnico, além da informação genotípica.

Palavras-chaves: Tuberculose resistente; *Mycobacterium tuberculosis*; GenoType MTBDRplus; Técnicas de diagnóstico molecular.

INTRODUÇÃO

A espécie *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) pertence ao gênero *Mycobacterium* e à família Mycobacteriaceae, e é o agente causador da doença Tuberculose, e desde então, vem sendo uma doença global considerada um problema de Saúde Pública (BRASIL, 2008). A tuberculose (TB) está ligada indiretamente a pobreza, desigualdade social, má distribuição de renda e urbanização acelerada (HIJJAR, et al., 2001).

No Brasil, no ano de 2020 foram registrados 66.819 novos casos, com taxa de incidência de 31,6 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2021). Por essa razão, não será possível alcançar a meta da Estratégia “FIM da TB”. A estratégia foi elaborada pela Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da TB (PNCT) e tem como principal objetivo a redução da taxa de incidência para 10 casos a cada 100.000 habitantes e menos de um óbito para cada 100.000 habitantes até o ano de 2035 (MACIEL et al., 2020). Outro agravante no descumprimento da meta é o abandono do tratamento, negligenciando o processo de cura e consequentemente levando ao surgimento da tuberculose multirresistente (TB-MDR). Em relação ao abandono dos tratamentos dos casos de TB sensível aos medicamentos, nos anos de 2018 e 2019, 12,0% dos casos novos pulmonares abandonou o tratamento no Brasil, uma proporção superior ao recomendado pela OMS (5,0%) (BRASIL, 2021).

É possível detectar de uma forma rápida e precoce a TBMDR pelo teste molecular de *line probe assay* GenoType MTBDR*plus*, um teste *in vitro* qualitativo que tem como objetivo detectar o complexo *M. tuberculosis* e a resistência a rifampicina (RIF) e isoniazida (INH). Para a identificação da resistência à RIF é realizada a detecção das mutações associadas ao gene *rpoB*; e para a identificação da resistência à INH é analisado o gene *katG* e a região promotora do gene *inhA* (HAIN, 2015).

Com o avanço nos últimos anos da Tuberculose resistente a RIF e TB-MDR, é imprescindível a agilidade de diagnóstico, e o GenoType é um teste molecular promissor, que reduzirá o tempo de resultado, comparado aos atuais como o teste de suscetibilidade a medicamento (TSM), além de dar informações genotípicas referente a sensibilidade e assim, induzir o médico a adotar o melhor esquema de tratamento para o paciente (BRANDÃO et al., 2019).

O objetivo deste estudo foi avaliar o diagnóstico da TB-MDR pelo teste molecular GenoType MTBDR*plus*, a partir de amostras clínicas submetidas a detecção de TB pulmonar, caracterizando o perfil epidemiológico dos pacientes.

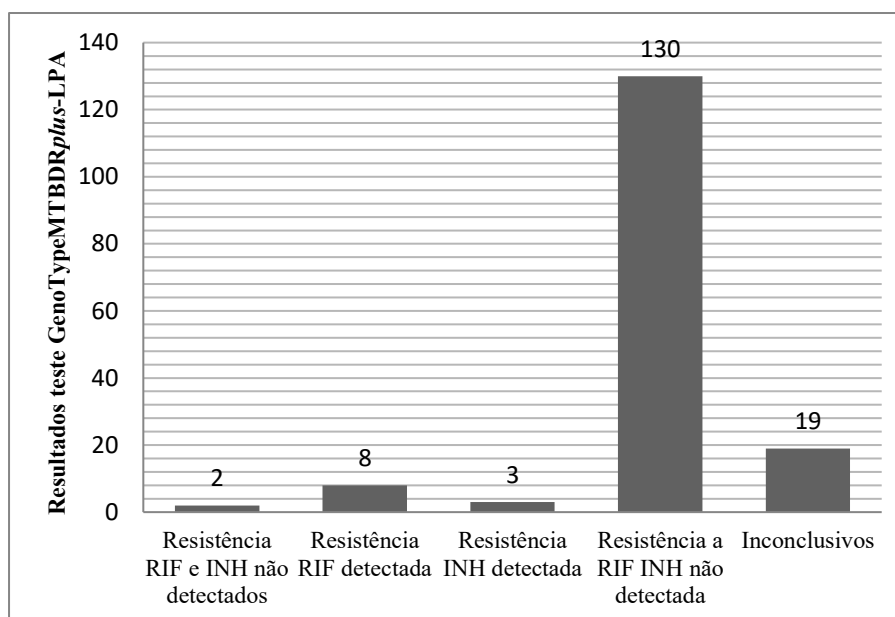
MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Instituto Adolfo Lutz (IAL) CLR IX Santos, no período de janeiro a junho de 2021 e avaliou amostras submetidas ao diagnóstico da MTB na região metropolitana da Baixada Santista. Foram incluídas amostras de escarro submetidas ao TRM Xpert MTB/RIF com resultado positivo para o complexo MTB somente de casos de diagnóstico, ou seja, casos novos. Foram excluídos quaisquer casos que não eram TB ou casos de pacientes que já estão em tratamento e são considerados controle. Os dados demográficos foram coletados do Sistema de Controle de Pacientes com Tuberculose (TBWEB) e os dados clínicos pelo Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL). As variáveis estudadas foram: gênero, etnia, faixa etária, escolaridade e tipo de ocupação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas 162 amostras no presente estudo. O gráfico 1 abaixo mostra que 130 (80,2%) foram amostras de resistência a RIF e INH não detectadas; 8 (4,9%) resistência a RIF detectada; 3 (1,8%) resistência a INH detectada; 2 (1,2%) resistência a RIF e INH detectadas e 19 (11,7%) inconclusivas.

Gráfico 1 - Distribuição de resultados do teste GenoTypeMTBDR*plus*



Fonte: Autora, 2021

Estes resultados estão de acordo com os reportados por BRANDÃO et al. (2019), onde foi apresentado ausência de mutações em RIF e INH em 92% das amostras analisadas no IAL de São Paulo (BRANDÃO, et al., 2019). Uma porcentagem inferior ao trabalho citado acima devido à alta demanda de análises comparado ao do presente estudo.

Com relação aos resultados do GenoType MTBDRplus, foram observadas ausências de bandas do tipo selvagem e detectadas as seguintes bandas de mutações nos genes *rpoB*, *katG* e *inhA* (Tabela 1).

Tabela1- Frequência de mutações e ausências de bandas WT determinadas pelo teste *GenoTypeMTBDRplus-LPA* em amostras resistentes a drogas antituberculosas de primeira linha.

Perfil de Resistência (n=13)

Nº Isolados	Resultado
RIF (<i>rpoB</i>) (n=8)	
1 (12,5%) MUT3	RIF ^R
1 (12,5%) MUT2B/ ΔWT7 + WT8	RIF ^R
4 (50,0%) Δ WT7	RIF ^R
1 (12,5%) Δ WT5	RIF ^R
1 (12,5%) Δ WT7 + WT8	RIF ^R
INH (<i>katG</i>) (n=1)	
1 (100,0%) MUT1	INH ^R
INH (<i>inhA</i>) (n=2)	
1 (50,0%) MUT1	INH ^R
1 (50,0%) MUT1 / Δ WT1	INH ^R
RIF + INH / MDR (n=2)	
MUT3 / Δ WT8	
(<i>rpoB</i>)	
2 (100%) MUT1 / ΔWT (<i>katG</i>)	RIF ^R INH ^R

Δ Ausência de banda selvagem na DNA-STRIP;.
Fonte: Autora, 2021

Em grande parte dos resultados, podemos observar que a resistência à RIF (75,0%) é devido a ausência de hibridação na sonda selvagem, principalmente WT7 e WT8 no gene *rpoB*, assim como foi encontrado, em Ribeirão Preto (FELICIANO et al.). Também se pode observar que em casos de multirresistência (n=2), os perfis encontrados foram a ausência de hibridação do tipo *rpoB* WT8 e *katG* WT (n=2,100%), e as mutações apresentadas foram *rpoB* MUT3 e *katG* MUT1 (n=2,100%). Nos casos de resistência à INH foi encontrada a mutação *inhA* MUT1(n=2,100%) e apresentada a mutação MUT1(n=1,100%) em isolados pelo *katG*.

Com o objetivo de caracterizar o perfil epidemiológico dos pacientes com TB, na tabela pode-se observar que ocorre uma predominância no sexo masculino (n=115, 71,0%) de etnia parda (n=60, 52,2%) em média de 30 a 39 anos de idade (n=36, 31,3%). No sexo feminino também se percebe que a cor parda predomina (n=26, 55,3%). Em questão de escolaridade apenas 3 (1,9%) pacientes possuíam mais de 15 anos de estudos, e 67 (41,4%) possuíam apenas o ensino fundamental. Também podemos dizer que de acordo com o tipo de ocupação 45 (27,7%) pacientes estavam desempregados, 4 (2,4%) eram detentos e 92 (57,7%) “outras”.

Tabela 2- Características sociodemográficas de paciente com tuberculose.

Características	Sexo		Total
	Feminino (n=47) (29,1%)	Masculino (n=115) (71%)	
Etnia			
Pardo	26 (55,3%)	60 (52,2%)	86 (53,0%)
Branco	11 (23,4%)	32 (27,8%)	43 (26,5%)
Preto	8 (17,0%)	15 (13,1%)	23 (14,2%)
Ignorado	2 (4,6%)	6 (5,2%)	8 (4,9%)
Amarelo	-	2 (1,7%)	2 (1,2%)
Faixa etária			
10 - 14 anos	1 (2,1%)	-	1 (0,6%)
15 - 19 anos	7 (14,9%)	10 (8,7%)	17 (10,5%)
20 - 29 anos	10 (21,3%)	-	10 (6,2%)
30 - 39 anos	11 (23,4%)	36 (31,3%)	47 (29,0%)
40 - 49 anos	6 (12,8%)	33 (28,7%)	39 (24,1%)
50 - 59 anos	7 (14,9%)	16 (13,9%)	23 (14,2%)
60 - 69 anos	4 (8,5%)	14 (12,2%)	18 (11,1%)
70 - 79 anos	1 (2,1%)	6 (5,2%)	7 (4,3%)
Escolaridade			
De 1 a 3 anos	1 (2,1%)	5 (4,3%)	6 (3,7%)
De 4 a 7 anos	20 (42,6*%)	47 (40,9%)	67 (41,4%)
De 8 a 11 anos	13 (27,6%)	30 (26,1%)	43 (26,6%)
De 12 a 14 anos	3 (6,4*%)	17 (14,8%)	20 (12,4%)
15 anos e mais	2 (4,3%)	1 (0,9%)	3 (1,9%)
Ignorado	8 (17,0%)	14 (12,1%)	22 (13,5%)

Nenhuma	-	1 (0,9%)	1 (0,6%)
Tipo de Ocupação			
Aposentado	2 (4,3%)	7 (6,1%)	9 (5,5%)
Desempregado	13 (27,7%)	32 (27,8%)	45 (27,7%)
Detento	1 (2,1%)	3 (2,6%)	4 (2,4%)
Dona de Casa	12 (25,5%)		12 (7,4%)
Outras	19 (40,4%)	73 (63,5%)	92 (57,7%)

Fonte: Autora, 2021.

Podemos comparar nossos resultados com um estudo realizado também na cidade de Santos, Baixada Santista, que mostrou 69% dos casos de TB em pacientes do gênero masculino e 69,7% em seus 20-49 anos de idade (COELHO et al., 2009). Um outro estudo feito em Pernambuco, também afirma que 65% dos casos eram do sexo masculino e 45,3% tinham entre 20-39 anos. Supõe-se que grandes partes dos homens procuram atendimento médico tardiamente e a doença atinge pessoas entre 20-49 anos por ser uma faixa etária economicamente ativa (SOARES et al., 2017).

CONCLUSÃO

O ensaio GenoTypeMTBDRplus-LPA é um teste excelente na detecção de resistência ao MTBC para RIF, INH e multirresistentes, onde no presente estudo 80,2% foram resistência a RIF e INH não detectadas, 4,9% resistência a RIF detectada, 1,8% resistência a INH detectada e 1,2% resistência a RIF e INH detectadas. O teste tem como suas vantagens e impacto, a redução do tempo para o diagnóstico, a fácil execução em laboratórios com boa infraestrutura e treinamento técnico, além da informação genotípica onde grande parte de nossos resultados, da resistência a RIF, foi identificada pela ausência de hibridação *rpoB* do tipo WT7 e WT8 e em casos de multiresistência, a ausência do *rpoB* WT8 e *katG* WT, e apresentação das mutações nos genes *rpoB* MUT3 e *katG* MUT1.

REFERÊNCIAS

1. BRANDÃO, A. P. ET AL. **AGILIZANDO O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE MULTIRRESISTENTE EM UMA REGIÃO ENDÊMICA COM O USO DE UM TESTE COMERCIAL DE SONDAS EM LINHA**. J BRAS PNEUMOL. SÃO PAULO. 45 (2);2019.
2. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DE TUBERCULOSE**. [S.I] 2021.
3. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE . **MANUAL NACIONAL DE VIGILÂNCIA LABORATORIAL DA TUBERCULOSE E OUTRAS MICOBACTÉRIAS**. BRASÍLIA;2008.
4. COELHO A.G.V. ET AL. **CARACTERÍSTICAS DA TUBERCULOSE PULMONAR EM ÁREA HIPERENDÊMICA- MUNICÍPIO DE SANTOS (SP)**. J BRAS PNEUMOL. 2009;35(10):998-1007
5. FELICIANO, C.S. ET AL. **ROLE OF A GENOTYPE MTBDRPLUS LINE PROBE ASSAY IN EARLY DETECTION OF MULTIDRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS AT A BRAZILIAN REFERENCE CENTER**.
6. HAIN. **GENOTYPE MTBDRPLUS INSTRUÇÕES**. [S.I] 2015

7. HIJJAR, M. A.; OLIVEIRA, M. J. P. R. ; TEIXEIRA, G. M. A
TUBERCULOSE NO BRASIL E NO MUNDO. BOL. PNEUMOL. SANIT.,
RIO DE JANEIRO , V. 9, N. 2, P. 9-16, DEZ. 2001
8. MACIEL, E. L. N.; JÚNIOR, E. G.; DALCOMO, M. M. P. **TUBERCULOSE
E CORONAVÍRUS: O QUE SABEMOS?.** EPIDEMIOL. SERV.SAÚDE.
[S.I] 29 (2). 2020
9. SOARES, M.L.M. ET AL. **ASPECTOS SOCIODEMOGRÁFICOS E
CLÍNICOEPIDEMIOLÓGICOS DO ABANDONO DO TRATAMENTO
DE TUBERCULOSE EM PERNAMBUCO, BRASIL,2001-2014.**
EPIDEMIOL.SERV.SAÚDE; [S.I] 26 (2); APR-JUN 2017.

AVALIAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE RT-qPCR, RT-snPCR E ISOLAMENTO DE ENTEROVIRUS EM CULTURA CELULAR EM CASOS SUSPEITOS DE DOENÇA DE MÃO-PÉ-BOCA NO ESTADO DE SÃO PAULO

Gabriel Henriques Ferreira^{*1}, Bráulio Caetano Machado¹, Rita de Cássia Compagnoli Carmona¹

^{*}Aluno do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública; ¹Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Luz; E-mail: gabrielhfsf@gmail.com; bcmachado@protonmail.com; rita.carmona@ial.sp.gov.br

RESUMO

A doença de mão-pé -boca (DMPB) é causada por vírus do gênero *Enterovirus* (EV), dentre eles destacam-se os sorotipos: coxsackievirus, echovirus, enterovirus A71. A doença acomete majoritariamente crianças de até 5 anos e os principais sintomas são: febre, erupção cutânea em mãos, pés e vesículas na boca. Geralmente a doença é autolimitada, mas pode evoluir para casos graves com tropismo ao sistema nervoso. Os EV possuem prevalência no mundo todo, e a DMPB é endêmica em países asiáticos e oeste do pacífico. No Brasil somente os surtos são de notificação compulsória. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi comparar as metodologias utilizadas para o diagnóstico dos EV, *reverse transcription quantitative* PCR (RT-qPCR), isolamento viral em sistema de cultura celular e a *reverse transcription semi-nested* PCR (RT-snPCR) utilizando amostras clínicas de suspeitas de DMPB obtidas entre maio e outubro de 2021 no Estado de São Paulo. Os resultados mostraram boa concordância entre RT-qPCR e isolamento viral, assim como entre os dois ensaios de biologia molecular, em detrimento da concordância regular entre isolamento viral e RT-snPCR. Destacam-se maiores sensibilidade da RT-qPCR (92,3; 85,1%) e cultura celular (88,4%; 87,1%). Especificidade da RT-snPCR (84,3%; 91,6%), RT-qPCR (70,2%; 81,2%) e cultura celular (76,4%; 57,4%). Valor preditivo positivo da RT-snPCR (92,3%; 87,1%) cultura celular (72,0%; 88,4%) e RT-qPCR (85,1%; 62,9%). Os resultados corroboram aos relatos da literatura, sugerindo o ensaio de RT-qPCR para detecção de rotina de EV, mas expressa a importância do isolamento viral e da RT-snPCR para melhorar estratégias de vigilância epidemiológica, reconhecendo o isolamento de enterovirus em cultura celular como poderosa ferramenta.

Palavras-chave: Doença de Mão, Pé, Boca; Epidemiologia; PCR em tempo real; Enterovírus

INTRODUÇÃO

A doença de mão-pé-boca (DMPB) é causada por enterovírus humanos não-pólio, com sorotipos importantes como coxsackievirus, echovirus, enterovirus A71 (EVA71). O EV apresenta 15 espécies, sendo 7 descritas em humanos, apresentando mais de 100 sorotipos (TAPPAREL *et al.*, 2013, COMPAGNOLI CARMONA *et al.*, 2020). Não possuem envelope viral e seu genoma dispõe de fita única de RNA senso positivo (ssRNA+) (WELLS e CONEY, 2019). A DMPB acomete frequentemente crianças

menores de 5 anos, causando manifestações clínicas leves e evolução autolimitada. Os EV da DMPB se replicam nas tonsilas palatinas, mucosa da orofaringe e substancialmente no intestino delgado. Os principais sintomas são febre, erupção cutânea em mãos e pés e vesículas na boca (MORTARI *et al.*, 2018). Casos clínicos mais graves podem ocorrer incluindo meningite asséptica, encefalite e paralisia flácida aguda (TAPPAREL *et al.*, 2013). A transmissão pode ocorrer por muco e saliva, mas primariamente pela via fecal-oral (WELLS e CONEY, 2019). Na China, Du e colaboradores (2017) relatam altíssimas taxas de infecções, R0 de até 30, ou seja, 1 pessoa pode transmitir para outras 30, considerando somente população suscetível, as crianças. Logo, as creches possuem altos índices de transmissão.

Isolamento viral em sistema de cultura celular, *reverse transcription quantitative* PCR (RT-qPCR) e a *reverse transcription semi-nested* PCR (RT-snPCR) estão entre os ensaios de identificação dos EV da DMPB. O ensaio RT-qPCR é recomendado por Harvala e colaboradores (2018) para uso na rotina de diagnóstico, por ser mais rápido e mais sensível e simples. Mas o isolamento viral em cultura celular é importante para laboratórios de referência permitindo o emprego junto a outros testes de identificação, como a RT-PCR convencional e o sequenciamento genômico (MORTARI *et al.*, 2018). O ensaio RT-snPCR também é empregado para identificação de EV através de detecção da região da VP1. A proteína estrutural VP1 do capsídeo está localizada na região mais exterior ao vírus e é um antígeno de grande importância. O sequenciamento parcial do gene VP1 é empregado para busca de sorotipos, e o sequenciamento completo para identificação de novos sorotipos em trabalhos de vigilância epidemiológica (HARVALA *et al.*, 2018). Já a RT-qPCR contribui de forma significativa para diagnóstico rápido de EV em saúde pública, diminuindo os custos sobre o uso indiscriminado de antibiótico e hospitalizações e melhorando a assistência ao paciente (MACHADO *et al.*, 2016).

Os métodos de biologia molecular trouxeram inúmeras vantagens para a detecção dos EV, tanto para diagnóstico como para vigilância epidemiológica. Entretanto, observam-se algumas divergências, como resultados falsos negativos na RT-qPCR que são detectados no método de isolamento viral em cultura de células, levantando discussões sobretudo quanto à vigilância epidemiológica em elaboração de fluxogramas de trabalho. Com isso, o objetivo do trabalho foi comparar as metodologias de RT-qPCR, RT-snPCR e Isolamento viral em cultura de célula, sob perspectiva de detecção de EV em amostra clínica provenientes de surtos de DMPB ocorridos no Estado de São Paulo entre maio e outubro de 2021. Para isso foram calculados o índice *Kappa*, sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo e negativo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 86 amostras clínicas, dentre elas 24 SOF (swab de orofaringe), 56 de fezes e 6 SNF (swab de nasofaringe). O uso destas amostras foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, CAAE: 28405120.2.0000.0059, cadastro: CTC 60-L/ 2019. As amostras de fezes passaram por clarificação antes de todos os ensaios, para obter somente o material líquido, de acordo com a metodologia descrita em Polio Laboratory Manual 2004 (WHO). Para proceder aos ensaios de biologia molecular os materiais clínicos passaram por extração de RNA por coluna de sílica, realizado com o kit comercial Bio Gene® de extração de DNA/RNA (Bioclin®, Belo Horizonte, Brasil) e adicionado inibidor de RNase (RNA out) ao produto extraído.

O ensaio de RT-qPCR foi executado com sondas Taqman® e *primers* ambos desenhados para detecção universal de EV (HEV) por meio da região alvo 5' NCR (Non-Coding Region) do genoma. Foi utilizada a reação em *one step* RT-qPCR, conforme

descrito por MACHADO e colaboradores (2016). Para avaliar a qualidade das amostras processadas com relação à recuperação do RNA extraído e à presença de possíveis inibidores da PCR, foi realizada um controle interno endógeno cujo alvo foi a Rnase P humana seguindo o protocolo recomendado pelo CDC para detecção do vírus Influenza (CDC, 2009; SHU et al., 2011). Foram utilizados *primer* Senso CCCTGAATGCGGCTAATCC, *primer* anti-senso ATTGTCACCATAAGCAGCCA; sonda 6-FAM-AAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC-BHQ1; RnaseP senso AGATTTGGACCTGCGAGCG; RnaseP anti-senso GAGCGGCTGTCTCCACAAGT; RnaseP sonda 6-FAM d(TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG) BHQ-1.

Utilizou-se para a reação as concentrações dos reagentes da reação para detecção de EVs: 300 nM (*primer* senso), 900 nM (*primer* anti-senso), 150 nM (*probe*), 1× kit “SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit” (Invitrogen™) e 5 µL do RNA viral extraído, resultando no volume total de 25 µL. O controle interno endógeno: primers na concentração de 40 nM e a sonda, 10 nM. A reação foi realizada no equipamento 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). A transcrição reversa foi realizada a 50°C por 15 minutos, seguida de 1 ciclo a 95 °C por 2 minutos, e 45 ciclos das temperaturas de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Foram colocados 1 controle de reagentes e de ambiente (NTC1 – no *template control*) e 1 controle positivo em duplicata (PTC – positive template control). Foram consideradas positivas as amplificações em até 40 Ct (*Cycle Threshold*). Conforme predefinição laboratorial, Cts tardios (40+4) em contexto de surto foram considerados positivos.

A RT-snPCR utilizou como alvo a região VP1 do genoma dos EV e o ensaio foi realizado com reagentes do kit Invitrogen™. A primeira amplificação foi realizada em um ensaio de RT-PCR de tubo único contendo 1,25 mM de cada desoxinucleotídeos; Ditiotretol 0,1 M; Tampão 1 × 5 × (Tris-HCl 300 mM, pH 9,0 e 62,5 mM NH₄, 2SO₄); Tampão 0,5 × 10 × (Tris-HCl 100 mM, pH 9,0, KCl 500 mM e Triton X-100 1%); MgCl₂ 1,25 mM; 20 µM de pool de primers 224-222 (SO 224, GCIATGYTIGGIACICAYRT do Gene VP3; SO 222, CICCIGGIGGIAYRWACAT do gene VP1); SuperScript III Reverse Transcriptase; 2 U de Platinum Taq DNA Polymerase 19; e RNAsin. Foram utilizados 5 µL de ssRNA extraídos. As reações foram incubadas a 42°C durante 50 minutos, seguidas de 94 °C durante 5 minutos. A termociclagem: 35 ciclos de 94 °C, 1 minuto; 50 °C, 2 minutos; 72 °C, 1 minuto; e uma incubação a 72 °C, 5 minutos; em um termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A 2ª reação de PCR, foram empregados 40 picomol de cada um dos primers AN89 (CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG do gene VP1) e AN88 (TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT do gene VP1), 200 µM de dNTP, 5 µL de 10X tampão de PCR, MgCl₂ e 2,5 U de Platinum®Taq DNA polimerase. Um microlitro da 1ª PCR (dsDNA) foi adicionado a reação de 2ª PCR, com volume final de 50 µL e submetida a termociclagem de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 20 segundos, 72 °C por 15 segundos.

O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% diluída em 100mL de tampão TBE 1x (pH 8,0), acrescido de 5 µL de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Inc., CA, EUA). Um volume de 7 µL do produto amplificado foi misturado com tampão de aplicação (azul de bromofenol 1% e sacarose proporção 1:1). Foi utilizado marcador de peso molecular de 100pb (DNA Ladder, Invitrogen™). O sistema de corrida foi submetido a uma corrente elétrica constante de 100 Volts por 60 minutos.

No isolamento de EV em Cultura de Células foram utilizadas células de RD (rabdomiossarcoma humano, CCIAL 039, linhagem pertencente à Coleção de Cultura de

Células do Instituto Adolfo Lutz, registrado na *World Federation Culture Collection*). Primeiramente os tubos de cultura de células foram submetidos à lavagem com solução salina tamponada e posterior troca do meio de crescimento (Eagle + L15 + SFB 15%) para 1 mL meio de manutenção (Eagle sem SFB + L15 + Hepes + penicil./estreptom.). Sequencialmente foram feitas 3 passagens com as amostras clínicas em duplicata. 1ª passagem: para SOF e NSF realizou-se a adsorção: desprezou-se o meio de manutenção e aplicando amostra clínica, deixando em estufa a 37 °C por 30 minutos. Depois foi aplicado 1mL de meio de manutenção. As amostras foram deixadas em estufa a 37 °C por 7 dias realizando leituras diárias em microscópio invertido para investigação de efeito citopático. 2ª e 3ª passagens: após congelamento e descongelamento por 3 vezes, as amostras foram submetidas a novas passagens. 0,2 mL de passagens anteriores foram colocados em novos tubos de cultura de células em meio de manutenção (COMPAGNOLI CARMONA *et al.*, 2020). Controles com meio de manutenção: lavou-se em solução salina e trocou-se para meio de manutenção. O controle com meio de crescimento: a cultura de células com o meio de crescimento foi colocada diretamente em estufa. Amostras foram consideradas positivas somente se visualizado o efeito citopático em pelo menos 1 das duplicatas durante as 3 passagens.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Analisando os dados, o ensaio RT-qPCR manteve uma boa concordância com os dois outros métodos (**Tabela 1**, índice *Kappa* 0,65 e 0,61), mostrando ser mais adequado para comparar os resultados de biologia molecular e o isolamento viral em cultura celular. Já a relação entre RT-snPCR e cultura de célula obteve concordância regular (índice *Kappa* entre 0,43) diminuindo a confiabilidade dos dados.

Tabela 1. Perfil dos dados de detecção de enterovírus.

	Referência RT-qPCR		Referência Isolamento		Referência RT-snPCR	
	Isolamento	RT-snPCR	RT-qPCR	RT-snPCR	RT-qPCR	Isolamento
Sensibilidade	88,4%	72,0%	85,1%	62,9%	92,3%	87,1%
Especificidade	76,4%	91,6%	81,2%	84,3%	70,2%	57,4%
VPP	85,1%	92,3%	88,4%	87,1%	72,0%	62,9%
VPN	81,2%	70,2%	76,4%	57,4%	91,6%	84,3%
Acurácia	83,7%	80,2%	83,7%	70,9%	80,2%	70,9%
Índice <i>Kappa</i>	0,65	0,61	0,65	0,43	0,61	0,43

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

Ao colocar a RT-qPCR como referência observou maior sensibilidade da cultura de célula (88,4%) comparado ao RT-snPCR (72,0%). Isto sugere que os sorotipos isolados (**Figura 1**) correlacionaram com a detecção em rotina de diagnóstico, porém 6 amostras não foram cultiváveis, sendo 5 em SOF e 1 em fezes. No trabalho de Vijayaraghavan *et al.* (2012) relatou-se que durante um surto de DMPB na Índia o material de *swab* de faringe (material respiratório) alcançou uma das melhores taxas de detecção de EV em cultura de célula, mas trabalhou-se conjuntamente com células RD e Vero. Isto se alinha à recomendações sobre a utilização de mais de um tipo de linhagem celular para aumentar a sensibilidade na detecção de EV, porém é de pleno conhecimento que isto eleva os custos e tempo de trabalho substancialmente.

A maior sensibilidade do trabalho alcançado pela RT-qPCR (92,3%), sob referência da RT-snPCR, sugere que a detecção da região 5'NCR pela PCR em tempo real está de acordo com a detecção da região VP1 do ensaio de semi-nested. Porém o inverso não alcançou nível semelhante (sensibilidade 72,0% da RT-snPCR tendo a RT-qPCR como referência). Isto demonstra que os ensaios em tempo real com detecção Taqman são mais eficientes devido ao tamanho do fragmento alvo de amplificação ser menor (por volta de 100 pb). Já no RT-snPCR, 750 pb (1ª PCR) e 360 pb (2ª PCR) (OBERSTE *et al.*, 2010).

Os casos positivos da PCR em tempo real com Cts tardios (40+4) somaram-se 9 casos e somente 1 destes não foi detectado no isolamento viral em cultura de célula nem em RT-snPCR. Desta forma, os Cts tardios podem ter a relação com a qualidade da extração de RNA ou a qualidade da amostra no momento da coleta. O Kit de extração Biogene utilizado no trabalho é também empregado para extração do vírus SARS-CoV-2 obtendo bons resultados, com Cts positivos ≤ 40 (CAMPOS *et al.*, 2021). Porém isto não foi observado em EV no presente trabalho. Portanto, foi predefinido que Cts tardios inseridos em contexto de surto de DMPB estariam classificados como “detectado”

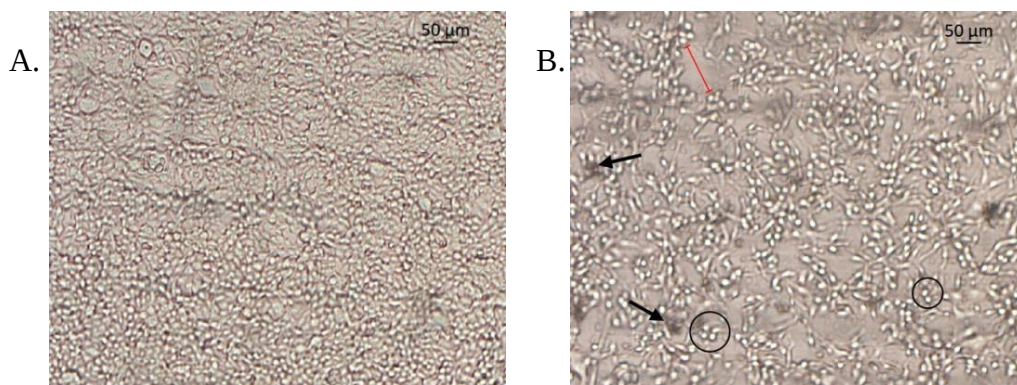


Figura 1: **A.** Controle de cultura de células RD (CCIAL 039) não infectada. **B.** Efeito citopático causado pela replicação de EV em células RD (CCIAL 039) após a infecção. Os **círculos** indicam arredondamentos das células, com espessamento da membrana plasmática e citoplasma brilhante. Espaçamento entre as células por todo o campo da figura indicado pela **barra vermelha**. As **setas** indicam grumos de células soltas no meio de cultura. Observação em microscópio óptico invertido 50X (ZEISS, AXIO VERT A1). Fonte: Projeto CTC 60L/19 – Coordenação Rita de Cássia Compagnoli Carmona (Apoio FESIMA CAF n.º: 107/2020 e FAPESP 2017/05350-0).

Os dados apresentados se aproximam da recomendação de Harvala *et al.* (2018) na qual a RT-qPCR é indicado para rotina de diagnóstico por ser rápido, simples e sensível. Com o mesmo pensamento, o trabalho de Kabuga e *et al.* (2021) também sugerem a aplicação do ensaio em tempo real para diagnóstico dos EV, mesmo o método de isolamento superando-o em sensibilidade. Mas isto demonstra, assim como o presente trabalho, a poderosa ferramenta de detecção que é o isolamento viral, sendo importante para estudos de vigilância, sobretudo para aumentar a carga viral em amostras positivas na RT-qPCR para caracterização posterior por sequenciamento genômico. Da mesma forma, a RT-snPCR, confere informações importantes para posteriores caracterizações moleculares.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a RT-qPCR e a metodologia de isolamento viral em cultura celular obtiveram boa confiabilidade com altos níveis de sensibilidade na detecção de EV para a DMPB, em detrimento de menor confiabilidade entre RT-snPCR e isolamento em cultura celular. Desta forma sugere-se o ensaio de RT-qPCR como referência para detecção de rotina de EVs, enquanto que para trabalhos de vigilância

epidemiológica, a cultura de célula e a RT-snPCR. Reconhecendo o isolamento em cultura de células como poderosa ferramenta na pesquisa dos EVs.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colegas Adriana Jorge, Amanda Dias, Fabricio Caldeiras, Lucas Leme, Daniele de Moraes, Isabella Monteiro, Antônio Junior e Dra. Audrey C. Chirelli do Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz (IAL) pelo apoio técnico e oportunidade de desenvolver o trabalho e ao Núcleo de Cultura de Células (IAL) também pelo apoio técnico. Apoio: Fundo Especial de Saúde para Imunização em Massa e Controle de Doenças (Fesima). Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo (CAF n.º: 107/2020) e FAPESP (2017/05350-0).

REFERÊNCIAS

CAMPOS, K. R. *et al.* COVID-19 laboratory diagnosis: comparative analysis of different RNAextraction methods for SARS-CoV-2 detection by two amplification protocols. **Rev. Inst. Med. trop.** v. 63, ed. 52. 2021.

CDC. **Protocol of realtime RTPCR for swine influenza A(H1N1).** CDC Atlanta, EUA. p. 8. 2009.

COMPAGNOLI CARMONA, R.C. *et al.* Distribution of species enterovirus B in patients with central nervous system infections in São Paulo State, Brazil. **J Med Virol.** 2020.

DU, Z. *et al.* Estimating the basic reproduction rate of HFMD using the time series SIR model in Guangdong, China. **PloS one.** v. 12, ed. 0179623. 2017.

HARVALA, H. *et al.* Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. **J Clin Virol.** v. 101, p. 11-17. 2018.

KABUGA, A. I, *et al.* Cell culture demonstrates superior sensitivity over one step real time RT PCR and nested VP1 amplification for Enteroviruses. **Journal of Virological Methods.** v. 287, 2021.

MACHADO, B.C.; ALVES, M.R.M.; CARMONA, R.C.C. Avaliação do desempenho da PCR em Tempo Real para o diagnóstico de meningite por enterovírus. **Rev Inst Adolfo Lutz.** v. 75, n. 1695, p.6. 2016.

MORTARI, N. *et al.* Hand-Foot-Mouth Disease: guidelines and outbreaks management. **BEPA, Boletim Epidemiológico Paulista** (Impresso), v. 15, n.173, p. 11-28, 2018.

OBERSTE, M. S. *et al.* Comparative evaluation of Taqman real-time PCR and semi-nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens. **Journal of Clinical Virology.** v. 49, issue 1, p. 73-74. 2010.

SHU, B. Design and Performance of the CDC Real-Time Reverse Transcriptase PCR Swine Flu Panel for Detection of 2009 A (H1N1) Pandemic Influenza Virus. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 49, n. 7, p. 2614-2619. 2011.

VIJAYARAGHAVAN, P. M., *et al.* Virological investigation of hand, foot, and mouth disease in a tertiary care center in South India. **Journal of global infectious diseases**, v. 4, n. 3, p. 153–161, 2012.

WELLS, AI; COYNE, CB. Enteroviruses: A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion. **Viruses**. v.11, n.5, p. 460. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Polio laboratory manual 4th edition**. Geneva 27, Switzerland: Department of Immunization, Vaccines and Biologicals CH-1211, World Health Organization; p. 1–167. 2004.

DOI: <https://doi.org/10.53934/101036-2>

LEISHMANIOSE: IDENTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA UTILIZANDO MÉTODOS HISTOQUÍMICOS E IMUNO- HISTOQUÍMICOS

Aline Rodrigues da Silva¹; Cinthya dos Santos Cirqueira²; Tomás Zecchini Barrese²
Thaís de Souza Lima²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – Programa de Imuno-histoquímica - CPA/NAP – IAL; E-mail: bio.aline.med@gmail.com

²Docente/pesquisador do Depto de Anatomia Patológica – NAP – IAL.

Resumo: A leishmaniose é uma doença causada pelo protozoário *Leishmania spp.*, que provoca lesões cutâneas e viscerais em animais e humanos, despertando grande preocupação epidemiológica. Desse modo, surge a necessidade de métodos diagnósticos complementares para auxiliar a vigilância da doença. O objetivo deste trabalho é avaliar a contribuição da coloração histoquímica de Giemsa Modificado e da coloração imuno-histoquímica para CD1a em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, com positividade para leishmaniose. Trata-se de um estudo de caráter retrospectivo, transversal e descritivo, em que foram utilizadas 12 amostras de pele humana, 3 de vísceras humanas e 3 de vísceras animais. Essas amostras foram submetidas à coloração de Giemsa Modificado e imuno-histoquímica para CD1a e comparadas com imunorreações para *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infatum*. A coloração por Giemsa Modificado permitiu a identificação de *Leishmania spp.* em 2 amostras de pele humana e em 1 amostra de baço e fígado animal. A reação imuno-histoquímica para CD1a permitiu a identificação de *Leishmania spp.* em todas as amostras de vísceras de animais; o mesmo anticorpo imunorreagiu com as células dendríticas de todas as amostras de pele humana em sítios do tecido que continham formações granulomatosas, indicativas de lesão. Todas as amostras de pele humana imunorreagiram com o anticorpo de *Leishmania braziliensis*, assim como todas as amostras de vísceras de animais e de humanos, imunorreagiram com anticorpo de *Leishmania infatum*. Todos os resultados obtidos neste trabalho ressaltam a importância do método imuno-histoquímico no diagnóstico da leishmaniose e reforçam a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novos marcadores.

Palavras-chave: Corantes de Giemsa; Imuno-histoquímica; *Leishmania*

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa e não contagiosa que afeta animais e humanos (BRASIL, 2019) e suscita grande preocupação epidemiológica. É causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* pertencente à família *Trypanosomatidae*, que parasita células do sistema fagocítico mononuclear (BRASIL, 2017), e causa lesões cutâneas, mucosas e viscerais, a depender da espécie do parasita e das condições imunológicas do hospedeiro (NEVES, 2005). No Novo Mundo o parasita é transmitido através da picada de um inseto flebotômíneo do gênero *Lutzomyia* (NEVES, 2005).

A transmissão do protozoário ocorre quando a fêmea do flebotômíneo inocula no hospedeiro as formas promastigotas, que são fagocitadas por macrófagos e se transformam em amastigotas (BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Contudo, o interior dos

macrófagos é um meio hostil aos corpos fagocitados devido às substâncias liberadas pelos lisossomos e mesmo assim, as formas amastigotas de leishmania são capazes de subsistir nesse ambiente e de proliferar (SILVEIRA, 2008). Desse modo, elas preenchem todo o citoplasma do macrófago que, ao se romper, libera o protozoário que é fagocitado por outros macrófagos, dando continuidade à infecção (CAMARGO; BARCINSK, 2003).

Há espécies de leishmania que têm tropismo pela pele e mucosas e outras, por órgãos como baço, fígado e medula óssea. Desse modo, a infecção é classificada, de forma geral, em leishmaniose tegumentar (LT) e em leishmaniose visceral (LV), respectivamente (GALVIS-OVALLOS *et al.*, 2020).

Isto posto, ressalta-se a necessidade de métodos diagnósticos precisos e complementares para a vigilância de casos de leishmaniose, por meio da investigação da imunorreatividade de proteínas relacionadas ao processo infeccioso da doença, como o anticorpo CD1a (glicoproteína transmembrana relacionada ao complexo principal de histocompatibilidade de classe II, expressa por células dendríticas) (GADELHA *et al.*, 2019), e de anticorpos específicos contra *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, em fragmentos de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (FFIP) .

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de caráter retrospectivo, transversal, descritivo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, sob o protocolo CEPAL: 4.487.151 e CTC: 05-M/2020.

Inicialmente, foi realizado um levantamento de casos no período de 2015 a 2016, a partir de registros do Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz (NAP-IAL), cujo critério de inclusão foi o diagnóstico de leishmaniose confirmado por exames de PCR, pesquisa direta, sorologia e imuno-histoquímica. Assim, foram eleitos 18 casos positivos de leishmaniose, sendo 12 casos referentes à LT e 6 casos, à LV. Todas as amostras de LT pertenciam a humanos, enquanto 3 amostras de LV eram oriundas de humanos e 3 de animais, no caso, de cães.

As amostras FFIP foram submetidas à microtomia em micrótomo manual, retirando-se cortes de 3µm que foram aderidos a lâminas silanizadas. De cada bloco, foram obtidas 4 lâminas, destinadas às colorações histoquímicas de H&E (coloração de rotina) e Giemsa Modificado, e às marcações imuno-histoquímicas com os anticorpos CD1a, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*.

Após a microtomia, as lâminas passaram por pré-tratamento de desparafinização e hidratação. Após esse processo, as lâminas seguiram para as colorações histoquímicas e imuno-histoquímicas. A coloração de H&E foi executada conforme o protocolo estabelecido no Procedimento Operacional Padrão (POP do laboratório de imuno-histoquímica do NAP-IAL), e a coloração de Giemsa Modificado foi realizada de acordo com o protocolo preconizado por Morris e colaboradores, 2018.

A reação de imuno-histoquímica foi executada conforme o protocolo estabelecido no POP do Laboratório de imuno-histoquímica do NAP-IAL, segundo a descrição a seguir: Inicialmente foi necessário o tratamento dos tecidos fixados nas lâminas antes da aplicação dos anticorpos, que consistiu de recuperação antigênica induzida pelo calor, bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio de proteínas inespecíficas. Após essa etapa foram aplicados os anticorpos primários de CD1a, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* (quadro 1), que ficaram incubados por, aproximadamente, 12 horas. No dia seguinte, foram aplicados os anticorpos do sistema de detecção conjugados a enzima peroxidase, conforme orientação do fabricante. Em seguida, as lâminas foram reveladas

com cromógeno diaminobenzidina e contracoradas com Hematoxilina de Harris. Os cortes histológicos foram analisados, sob orientação do médico patologista, para a identificação de formas amastigotas e descrição das características teciduais da lesão provocada por *Leishmania spp.*, assim como os perfis de cada tipo de coloração.

Quadro 1 - Características dos anticorpos utilizados

ANTICORPOS	FABRICANTE (CLONE)	TÍTULO	MÉTODO DE RECUPERAÇÃO	SISTEMA DE DETECÇÃO
CD1a	Cell-Marque Corporation, CA, USA (Monoclonal - MTB1 de camundongo)	1:100	calor úmido; pH6 (ácido cítrico); 10mM	(REVEAL Polyvalent HRP Detection System. Spring Bioscience, CA, USA)
<i>Leishmania braziliensis</i>	FIOCRUZ – RJ (Policlonal de coelho, cepa: MHOM/BR/1974/PP75)	1:35.000	calor úmido; pH6 (ácido cítrico); 10mM	(REVEAL Polyvalent HRP Detection System. Spring Bioscience, CA, USA)
<i>Leishmania infantum</i>	Instituto de Medicina Tropical-USP (Policlonal de camundongo, cepa: MHOM/TN/1993/LV10)	1:20.000	calor úmido; pH6 (ácido cítrico); 10mM	(REVEAL Polyvalent HRP Detection System. Spring Bioscience, CA, USA)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

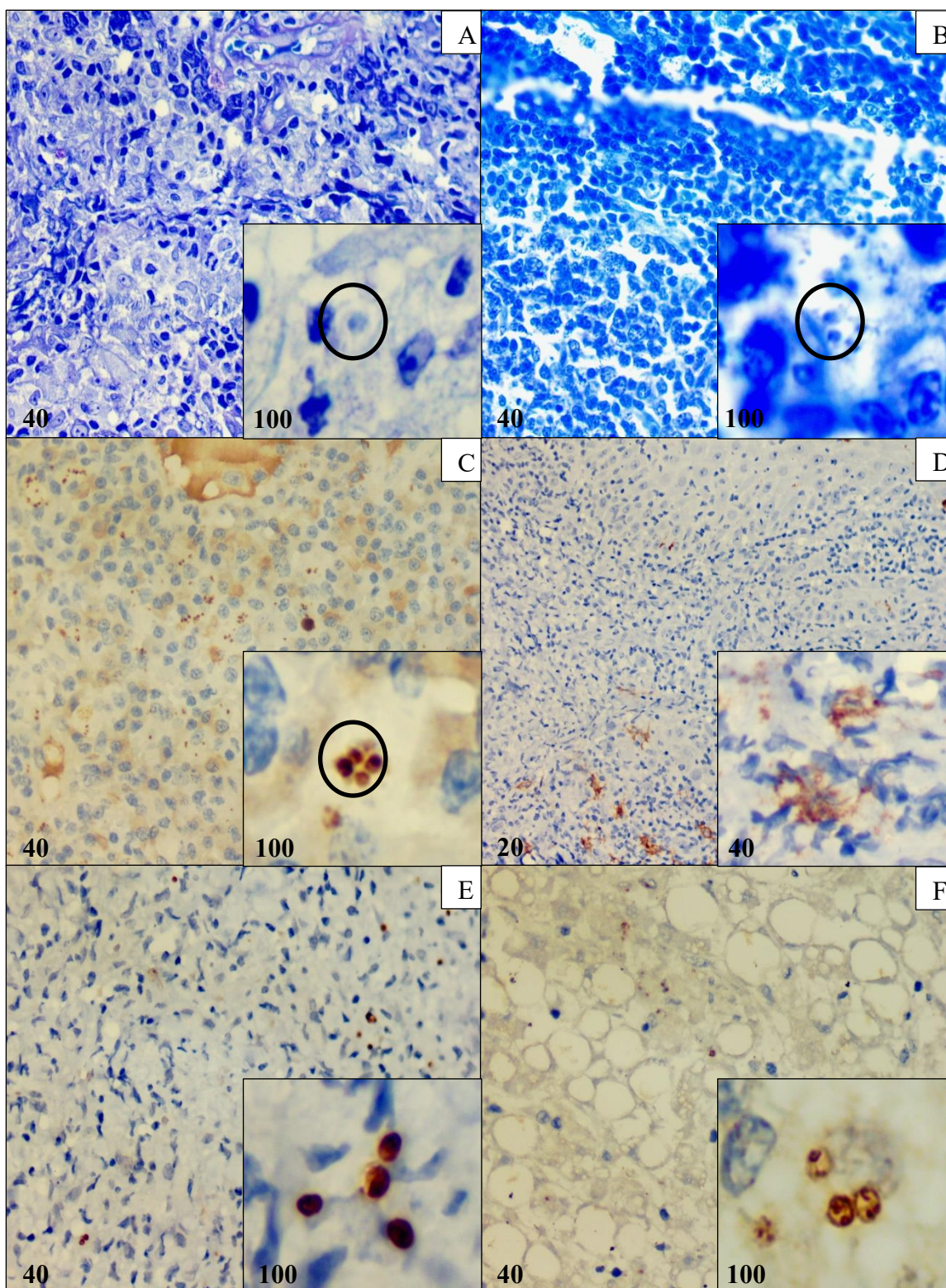
As 18 amostras selecionadas para a execução deste trabalho possuíam diagnóstico confirmado para leishmaniose, sendo que 12 eram de LT e 6 de LV. As amostras de LT consistiam de pele e pertenciam a humanos; e entre as amostras de LV, todas consistiam de vísceras como baço e fígado, sendo que 3 pertenciam a animais e 3 a humanos.

Neste trabalho, 3 amostras de pele e 5 amostras de vísceras foram coradas por Giemsa Modificado. Em 2 amostras de pele humana e em 1 amostra de víscera animal foi possível a identificação de amastigotas sob o aumento de 1000x.

Todas as amostras de vísceras animais, apresentaram imunorreatividade para o anti-CD1a, com marcação das amastigotas. Por outro lado, nenhuma amostra de vísceras humanas exibiu marcações correspondentes a formas amastigotas de leishmania. Não foi observada imunorreatividade utilizando-se o anticorpo CD1a nas amostras de pele humana, contudo, foi visualizada marcação de células dendríticas em áreas do tecido que continham formações granulomatosas.

Todas as amostras de pele humana demonstraram imunorreatividade para o anticorpo de *Leishmania braziliensis*, e todas as amostras de vísceras de animais e de humanos, também demonstraram imunorreatividade para o anticorpo de *Leishmania infantum*. As colorações histoquímicas e imuno-histoquímicas são exibidas na figura 1.

Figura 1. Colorações histoquímica e imuno-histoquímicas



Giemsa Modificado - pele humana (A) e baço animal (B); Anticorpo CD1a - baço animal (C) e pele humana (D); anticorpo *Leishmania braziliensis* - pele humana (E); anticorpo *Leishmania infantum* - fígado humano (F). Fonte: elaborado pela autora, 2021

Sundharkrishnan e North (2017), afirmaram que a coloração de Giemsa Modificado pode ser pouco útil para a identificação de amastigotas nos tecidos, quando se tem escassez de parasitas e um examinador pouco experiente. No presente trabalho, além de confirmar a dificuldade em se identificar amastigotas quando essas são escassas na amostra, verificou-se também que a coloração de Giemsa Modificado não apresenta contraste significativo que permita, facilmente, a identificação de formas amastigotas de *Leishmania* spp.

Em relação aos resultados obtidos a partir da imunorreação com o anti-CD1a, Sundharkrishnan e North (2017) relatam em seu estudo que a maioria dos casos estudados mostrou positividade de alta intensidade para o clone MTB1 de anti-CD1a, e tais casos eram referentes à LT do Velho Mundo. Quanto à detecção de espécies de LT do Novo Mundo, Ferrufino-Schmidt *et al.* (2019) relatam em seu estudo casos de LT com amastigotas visíveis na coloração de H&E e PCR positiva para *Leishmania* spp. Dentre os casos analisados, somente 25% foram positivos na coloração H&E e imuno-histoquímica para CD1a e, 75% positivos somente na coloração de H&E. Esses resultados reforçam que esse anticorpo pode ser espécie-dependente, não sendo útil para a detecção de leishmaniose na América do Sul.

No entanto, segundo o que foi observado no presente estudo, a presença de amastigotas de *Leishmania braziliensis* na pele poderia ser inferida a partir da presença de células dendríticas em sítios do tecido referente à pele, que não fosse a zona de transição epidérmica, uma vez que essas células foram notadas próximas a regiões de formação granulomatosa, indicativas de lesão. Sustentando esse achado, Meymand *et al.* (2014) relatam que a resposta inflamatória na infecção por *Leishmania* spp. induz as células dendríticas a cruzarem a junção dermo-epidérmica, no intuito de permitir a fagocitose das amastigotas presentes na derme. Fernandez-Flores e Rodriguez-Peralto (2016) também descrevem a marcação do anti-CD1a, clone MTB1, em casos de LT. Como esperado, o anticorpo reagiu com as células dendríticas.

Salinas *et al.* (1989) analisaram a imunomarcação de amastigotas de Leishmanias do Novo Mundo, e demonstraram que a identificação das amastigotas nos tecidos é melhor e mais fácil, devido ao destaque do formato esférico e ao contraste entre a cor acastanhada do parasita e o fundo claro do tecido, além de permitir a identificação do parasita sem a necessidade da objetiva de imersão. Essa característica da coloração imuno-histoquímica oferece vantagem sobre as colorações histoquímicas de Giemsa Modificado e H&E, quando se considera um observador pouco experiente.

CONCLUSÕES

As avaliações das colorações realizadas no presente estudo contribuíram no diagnóstico de leishmaniose. A coloração de Giemsa Modificado tem a vantagem de ser de baixo custo, porém requer experiência do observador, devido ao pouco contraste que a coloração oferece.

Na imunorreação empregando anti-CD1a, foi observada afinidade do marcador pela espécie *Leishmania infantum* em amostras de vísceras de animais. Em relação à *Leishmania braziliensis*, não foi observada marcação das formas amastigotas, entretanto, foi detectada a interação de células dendríticas próximas a regiões de formação granulomatosa, indicativas de lesão.

Por fim, os resultados obtidos neste trabalho ressaltam a relevância da participação da imuno-histoquímica no diagnóstico de leishmaniose e reforçam a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novos marcadores.

AGRADECIMENTOS

A equipe do Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz que colaborou na realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de vigilância em Saúde: volume único**. 3. ed., Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2019.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 2. ed., Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2017.
3. NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
4. GALVIS-OVALLOS, F. et al. Leishmanioses no Brasil: aspectos epidemiológicos, desafios e perspectivas. In: **Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários**. São Paulo: Stricto Sensu, p. 227-255, 2020.
5. SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v 40, p. 139-149, 2004.
6. SILVEIRA, F. T. et al. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania* (V.) *braziliensis* e *Leishmania* (L.) *amazonensis*. Belém. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 9-20, 2008.
7. CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. São Paulo. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.
8. GADELHA, S. A. C. et al. Evaluation of the diagnostic potential of CD1a immunohistochemistry for visceral leishmaniasis. São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, 2019.
9. MORRIS, G.B. RIDGWAY E.J. SUVARNA, S.K. Colorações tradicionais e técnicas modernas para demonstração de microrganismos em histologia. In: **Teoria e Prática de Técnicas Histológicas de Bancroft**. [SI]: pág. 254–279, 2018.
10. SUNDHARKRISHNAN, L.; NORTH, J. P. Histopathologic features of cutaneous leishmaniasis and use of CD1a staining for amastigotes in Old World and New World leishmaniasis. San Francisco. **Journal of cutaneous pathology**, v. 44, n. 12, p. 1005-1011, 2017.
11. FERRUFINO-SCHMIDT, M. C. et al. Is CD1a useful for leishmaniasis diagnosis in the New World? Lima. **Journal of cutaneous pathology**, v. 46, n. 1, p. 90-92, 2019.
12. MEYMANDI, Simin et al. A quantitative study of epidermal Langerhans cells in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. Vancouver. **International journal of dermatology**, v. 43, n. 11, p. 819-823, 2004.
13. FERNANDEZ-FLORES, A.; RODRIGUEZ-PERALTO, J. L. Morphological and immunohistochemical clues for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis and the interpretation of CD1a status. Poferrada. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 3, p. 536-543, 2016.
14. SALINAS, G. et al. "Detección de amastigotas en leishmaniasis cutanea y mucocutanea por el metodo de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas con metodos convencionales de diagnostico. Rio de Janeiro." **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.84, n.1, p. 53-60, 1989.

DOI: <https://doi.org/10.53934/101037-2>

AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO DA NEUROANGIOSTRONGILÍASE: DOS TESTES INTRADÉRMICOS AO SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E PESQUISAS COM MIRNA

Felipe Corrêa Rezende de Souza¹; Amanda de Oliveira Baccin²; Leyva Cecília Vieira de Melo³

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - CPM/IAL - CEFOR; E-mail: felipe5395@gmail.com

²Mestranda do Programa de Pós-graduação em Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública - CCD/SP - CPM/IAL; E-mail: amanda.baccin@hotmail.com

³Prof^a Dr^a do Núcleo de Enteroparasitas - CPM/IAL. E-mail: leyvacecilia@gmail.com

Resumo: O nematóide *Angiostrongylus cantonensis* é o principal agente causador da meningite eosinofílica no mundo. Em humanos, a infecção ocorre pela ingestão acidental ou habitual de hospedeiros intermediários ou paratênicos infectados pelo metastrongilídeo. Entretanto, para fechar um quadro de neuroangiostrongilíase é necessário associar os sintomas clínicos, dados epidemiológicos, presença de eosinofilia e/ou eosinorraquia e encontro de larvas do parasito no LCR, PCR positiva ou exames imunológicos reagentes. Contudo, cada método de diagnóstico apresenta limitações importantes, tratando-se de uma patologia de difícil identificação. Assim, torna-se fundamental a realização de pesquisas que busquem métodos mais efetivos para a execução do diagnóstico laboratorial da patologia. Neste contexto, este trabalho levantou a evolução das técnicas de diagnóstico da neuroangiostrongilíase, reunindo informações que possam auxiliar na introdução desta parasitose no rol de possíveis causas de meningite eosinofílica no Brasil. Além disso, busca também respaldar investigações epidemiológicas, laboratoriais e proporcionar conhecimento aos profissionais da saúde.

Palavras-chave: *Angiostrongylus cantonensis*, angiostrongilíase meningoencefálica, diagnóstico, meningite eosinofílica, neuroangiostrongilíase.

INTRODUÇÃO

Angiostrongylus cantonensis (Figura 1), popularmente conhecido como “verme do pulmão do rato”, é um nematódeo heteroxeno da família Metastrongilidae de importância médica, sendo o agente etiológico da neuroangiostrongilíase humana e a principal causa de meningite eosinofílica no mundo (WANG et al., 2008; DE-SIMONE et al., 2022). Em seu ciclo de vida, seres humanos entram como hospedeiros acidentais após ingerirem de forma proposital, ou acidental, hospedeiros intermediários (caracóis, lesmas e caramujos) ou paratênicos (como crustáceos e planárias).

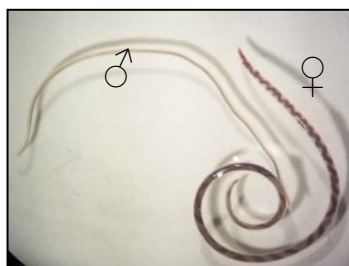


Figura 1 - *A. cantonensis* (fêmea e macho).

Fonte: Autores.

Devido a fatores biológicos, em especial a resposta imune do hospedeiro acidental, ocorre a morte das larvas ao chegarem ao sistema nervoso central, iniciando o quadro de meningite ou meningoencefalite, com acentuada presença de eosinófilos (ALICATA, 1965).

Trata-se de doença de difícil diagnóstico, pois além de seus sintomas serem facilmente confundidos com outras etiologias, a ocorrência de reações cruzadas com outras helmintíases, em testes imunológicos, representa fator limitante na conclusão dos casos (EAMSOBHANA e YONG, 2009).

Outro agravante é o fato de que o conhecimento a respeito da doença e seu diagnóstico estão pulverizados, pois as pesquisas sobre o assunto vêm sendo executadas por grupos isolados, distribuídos pelo mundo. Assim, muitos profissionais da saúde têm pouco acesso às informações, sendo que a maioria sequer conhece a patologia. Neste contexto, este trabalho busca levantar dados sobre a evolução das técnicas de diagnóstico, reunindo informações que possam auxiliar na introdução da neuroangiostrongilíase no rol de hipóteses diagnósticas em casos de meningite eosinofílica; respaldar investigações epidemiológicas e pesquisas laboratoriais; e proporcionar conhecimento aos profissionais da saúde.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão de literatura, em nível mundial, efetuada nas bases de dados PubMed, Scielo, Embase, Google Acadêmico, sites oficiais de jornais científicos (que disponibilizam suas edições online) e bibliotecas digitais de livre acesso, independente da data de publicação. Para tanto, foram utilizadas as palavras-chave em português e suas traduções em inglês: “*Angiostrongylus cantonensis*”, “diagnóstico”, “neuroangiostrongilíase”, “meningite eosinofílica” e “angiostrongilíase meningoencefálica”, aplicando-se os filtros “review”, “case reports”, “publication date” e “descending order”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos artigos encontrados nas bases de dados acessadas, foi possível estabelecer a linha do tempo sobre a evolução do diagnóstico da neuroangiostrongilíase (Figura 2). Os artigos apresentaram de forma clara ou subentendida as limitações de cada técnica, sendo estas relacionadas com sensibilidade, especificidade, custo, necessidade de profissionais capacitados, entre outras.

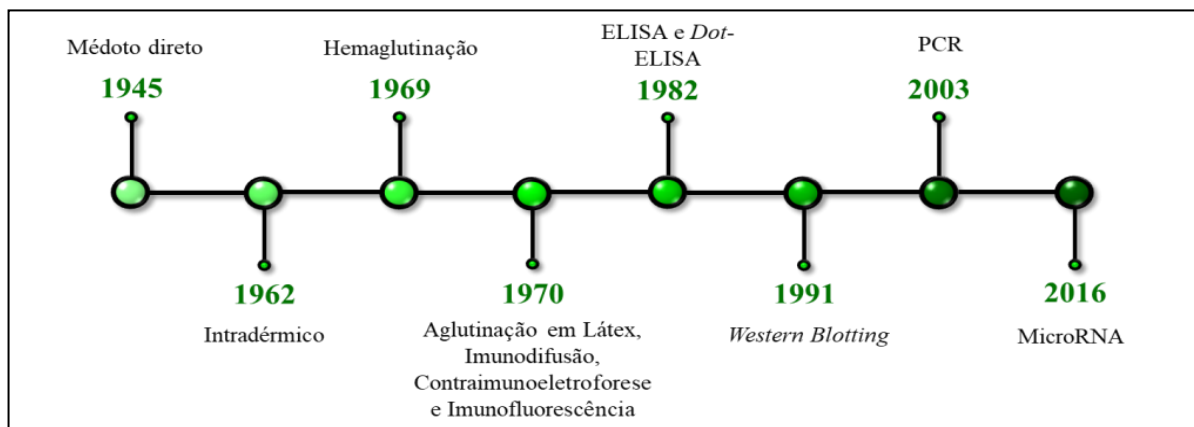


Figura 2 - Linha do tempo do diagnóstico de neuroangiostrongilíase.

Fonte: Elaborada pelos autores, 2022.

Além disso, foi possível entender que, embora as técnicas tenham sido aprimoradas ao longo do tempo, os critérios para fechamento de casos ainda permanecem os mesmos: sintomas clínicos compatíveis com meningite ou meningoencefalite, presença de eosinofilia e/ou eosinorraquia, contato com hospedeiros intermediários e resultados de exames imunológicos compatíveis com a doença. Foi percebido também que, para aprimorar o diagnóstico da neuroangiostrongilíase é necessário analisar e compreender a utilidade de cada método, conforme citado a seguir:

Método direto: este foi utilizado no primeiro caso de neuroangiostrongilíase em 1945, por Nomura e Lin, com o achado de larvas no LCR de pacientes com sintomatologia de meningite. Depois deste, poucos casos foram diagnosticados com essa técnica, como por exemplo, no trabalho publicado por Chen et al. (1979), que recuperaram larvas no LCR de 25/259 pacientes e os testes de Punyagupta (1969), que encontraram larvas em 19/454 pacientes, ambos na Ásia (VITTA, 2012). Apesar de ser considerado o diagnóstico definitivo, a recuperação de formas imaturas do parasito no LCR ou nos olhos é rara, necessitando de embasamento em características clínicas e resultados laboratoriais (EAMSOBHANA, YONG, 2009).

Teste intradérmico (TID): direcionado para confirmar ou excluir a hipersensibilidade a antígenos de extratos biológicos e químicos que desencadeiam processos de defesa na derme. Consiste na injeção de pequenas frações de antígenos, atravessando a camada superficial e avascular da pele para provocar respostas celulares e humorais de IgE e/ou IgG. Assim, a reação positiva é observada pela formação de eritema e pápula na região de aplicação. Em relação à neuroangiostrongilíase, o TID foi adaptado por Alicata e Brown (1962) para diagnosticar a infecção humana a partir da metodologia de Egashira (1951), utilizando extratos pulverizados de vermes adultos de *A. cantonensis*. Assim, o objetivo deste experimento foi encontrar um método mais eficiente do que a pesquisa direta de larvas no LCR, devido à sua baixa sensibilidade. Entretanto, logo nos testes iniciais ficou evidente a quantidade de reações cruzadas que esta técnica apresenta, tendo reações positivas frequentemente desencadeadas em indivíduos assintomáticos ou pacientes com outras parasitoses, não sendo indicada para o diagnóstico da neuroangiostrongilíase.

Testes de aglutinação: o ensaio de hemaglutinação é um dos métodos indiretos mais comuns para identificar partículas antigênicas em suspensão ao envolver o fenômeno de agregação de glóbulos vermelhos na presença de partículas hemaglutinantes. Além disso, hemácias podem ser substituídas por partículas de látex, sendo outro teste que utiliza o mesmo princípio, com a diferença da sensibilização do látex com anticorpos específicos. No que se refere ao diagnóstico da neuroangiostrongilíase, em 1969 Kamiya e colaboradores utilizaram a hemaglutinação indireta para testar a detecção de infecções por *A. cantonensis* em amostras de soro de 40 ratos albinos experimentalmente infectados pelo nematódeo, obtendo títulos de 1:32 até 1:16.384, no período em que os animais iniciaram a eliminação de larvas nas fezes. Entretanto, em seres humanos, os testes de hemaglutinação mostram que os anticorpos podem aumentar rapidamente em um mês e diminuir de seis a 12 meses após a infecção. Posteriormente, Mishra et al. (1970) utilizaram aglutinação em látex para determinar reações sorológicas em roedores experimentalmente infectados por *A. cantonensis* na França. Como resultado, os autores detectaram as primeiras reações positivas a partir do quinto dia após a ingestão das larvas. Em humanos foi utilizado por Uga et al., 1996, para excluir casos suspeitos com toxoplasmose, porém, na literatura, não há dados relatados sobre a sensibilidade e especificidade do teste de látex para *A. cantonensis*.

Imunodifusão e contraimuno eletroforese: as técnicas foram aplicadas no diagnóstico da neuroangiostrongilíase por Mishra e Bénex em 1970 e Bouthemy et al. em 1972, utilizando extratos de vermes de *A. cantonensis* e soros de ratos infectados, em ciclo experimental, para detectar os anticorpos e comprovar a reação imunológica dos animais frente ao parasito. Porém, em seres humanos, como ocorre em outras técnicas já citadas, foram constatadas reações cruzadas com outras helmintíases. Desta forma, a imunodifusão e a contraimuno eletroforese foram utilizadas apenas para confirmar outros métodos sorológicos e/ou moleculares aplicados em um caso suspeito (BARRATT et al., 2016).

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI): tem como base a ligação imunohistoquímica para detectar a reação antígeno-anticorpo padrão, onde anticorpos específicos reconhecem e se unem ao antígeno, emitindo fótons sobre luz ultravioleta. Assim como na imunodifusão, a imunofluorescência com *A. cantonensis* teve seu primeiro registro no mesmo experimento de Mishra e Bénex (1970), que se basearam na metodologia de Ambroise-Thomas (1969), para obter uma fluorescência verde-amarelada das larvas, após a utilização de soros de modelo murino com infecção patente, em extratos antigênicos de *A. cantonensis*. É importante ressaltar que a imunofluorescência indireta, apesar da sua sensibilidade mais elevada do que a reação direta para o diagnóstico de *A. cantonensis*, é comumente utilizada apenas como critério de inclusão e suspeita de caso, devido seus resultados cruzados com outras helmintíases (DARD et al., 2020).

Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) e Dot-ELISA: o método de ELISA para o diagnóstico da neuroangiostrongilíase tem seu primeiro relato datado de 1982, em Taiwan, quando foram examinados os soros de crianças com meningite eosinofílica. Para tal, os pesquisadores usaram extratos brutos de *A. cantonensis* preparados a partir de larvas de quarto estágio (recuperadas de cérebros de ratos experimentalmente infectados). Devido à baixa especificidade, em 1991, Yen e Chen adaptaram a técnica usando extratos parcialmente purificados do parasita, porém os experimentos também apresentaram reações cruzadas com outras parasitoses, o que levou os pesquisadores a buscarem alternativas em estudos com imunoblot. Assim, atualmente o diagnóstico imunológico da patologia é realizado por testes de detecção de anticorpos anti-*A. cantonensis*, tendo ELISA ou Dot-ELISA como métodos de triagem e *Western blot* como confirmatório (COGNATO et al. 2020).

Western blotting: procedimento de imunodetecção de proteínas, que envolve a transferência de padrões proteicos de um gel para uma membrana microporosa. Foi utilizado no diagnóstico da neuroangiostrongilíase com base em antígenos de 29kDa e 31kDa, de extrato bruto de vermes adultos, purificados por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Esses antígenos foram reativos apenas com o soro de pacientes com angiostrongilíase. A técnica foi aplicada em 1991 e, ainda hoje, é utilizada como teste confirmatório para o diagnóstico da doença. Entretanto, conforme apontado em outros estudos, a técnica não apresenta 100% de precisão, levantando a necessidade de aprofundamento nos estudos sobre a fonte de antígenos usada no diagnóstico (EAMSOBHANA e YONG, 2009; BARRATT et al., 2016).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): trata-se de uma técnica amplamente utilizada na pesquisa e para o diagnóstico de doenças, clonagem e sequenciamento de genes. Dentre suas múltiplas vantagens, podemos citar sua simplicidade, fácil execução e o fato de ser altamente sensível e específica. Além disso, a PCR em tempo real (qPCR) ainda detém a capacidade de quantificar o produto sintetizado. Na história da neuroangiostrongilíase, a técnica molecular só foi utilizada para o diagnóstico em 2003, após a descrição de análises filogenéticas de metastrongilídeos por Carrero e Nadler e, em 2007, por meio de um ensaio de PCR convencional, criado pelo CDC (Centers for Disease

Control and Prevention), amplificou um fragmento de 1134 pares de base do gene 18S de RNA ribossomal (rRNA) (MORASSUTTI et al., 2014). Somente após 2010 testes de qPCR foram desenvolvidos para identificar larvas L3 em invertebrados, com a finalidade de diagnósticos ambientais. Recentemente, diretrizes atualizadas para o diagnóstico e tratamento da neuroangiostrongilíase indicam que seja feito o diagnóstico presuntivo, a partir de sinais e sintomas característicos de meningite, presença de eosinofilia e/ou eusinoartria e histórico de contato com moluscos ou hospedeiros paratênicos. Além disso, alguns países, como o Brasil, utilizam também exames imunológicos para ajudar na interpretação dos casos. Entretanto, a confirmação do quadro só é dada a partir de resultados positivos da qPCR, caso haja disponibilidade, ou encontro de larvas no exame direto. É importante salientar que a qPCR pode ser negativa no início da infecção, indicando a repetição do exame após 5 a 10 dias se a suspeita de angiostrongilíase meningoencefálica persistir (ANSDELL et al., 2021).

Sequenciamento genômico e MicroRNA (miRNA): estudos com sequenciamento genético vêm sendo aprimorados e mais de 800 sequências de nucleotídeos, 699 sequências de proteínas e 43 genes de *Angiostrongylus* foram depositados no GenBank. Além disso, abordagens de sequenciamento de última geração têm permitido uma análise mais rápida, com a anotação de uma grande quantidade de genomas de organismos variados. Assim, estratégias que permitam fechar as lacunas na identificação de potenciais alvos de diagnóstico estão sendo estudadas (MORASSUTTI et al., 2013). Dentre elas, a possibilidade de encontrar microRNAs com especificidade elevada de *A. cantonensis* tem demonstrado potencial diagnóstico. Porém, estudos com a utilização destas técnicas para o diagnóstico da neuroangiostrongilíase, embora sejam promissores, parecem estar em uma fase silenciosa, onde não são encontrados trabalhos mais recentes, mostrando que ainda está longe de se ter testes disponíveis desta natureza para uso em laboratórios clínicos (BARRATT et al., 2016).

CONCLUSÕES

De acordo com os dados levantados, foi possível compreender que a evolução do diagnóstico laboratorial da neuroangiostrongilíase tem sido marcado pela tentativa de melhoria da especificidade dos testes, sendo que os testes mais específicos (pesquisa de larva no LCR e qPCR) possuem sensibilidades associadas à elevada carga parasitária e fase aguda da doença. Outras técnicas moleculares parecem ser promissoras, mas ainda não existe previsão de sua aplicabilidade em diagnóstico.

Diante do exposto, este estudo sugere que é possível conciliar as vantagens e desvantagens dos testes já desenvolvidos para a elaboração de um fluxo diagnóstico de forma a integrar resultados laboratoriais, opiniões de médicos e cientistas, além das ações das vigilâncias epidemiológica e sanitária para o correto fechamento de casos.

REFERÊNCIAS

- ALICATA, J. E. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. **Advances in parasitology**, Londres, v. 3, p. 223-248, Set 1965.
- ALICATA J. E., BROWN R.W. Preliminary observations on the use of an intradermal test for the diagnosis of eosinophilic meningoencephalitis in man caused by *Angiostrongylus cantonensis*. **Canadian Journal of Zoology**, Canadá, v. 40, p. 119-124, 1962.

- ANSDELL V, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of neuroangiostrongyliasis: updated recommendations. **Parasitology**, Londres, v. 148, n. 2, p. 227-233, Fev 2021.
- BARRATT et al. *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. **Parasitology**, Austrália, v. 143, p. 1087–1118, Dez 2016.
- BOUTHEMY F. et al. Structure antigénique du Nématode *Angiostrongylus cantonensis*: Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. **Annales de Parasitologie**, Paris, v. 47, n. 4, p. 531-550, 1972.
- COGNATO BB et al. Identification of cross-reactive markers to strengthen the development of immunodiagnostic methods for angiostrongyliasis and other parasitic infections. **Exp Parasitol.**, Orlando, v. 218:107999, p. 1-9, Nov 2020.
- DARD C et al. Premiers cas d'angiostrongylose à *Angiostrongylus cantonensis* à la Martinique, de 2002 à 2017. **Parasite**, Paris, v. 27, n. 31, p. 1-7, Mai 2020.
- DE-SIMONE, Salvatore G. et al. *Angiostrongylus cantonensis* an Atypical Presenilin: epitope mapping, characterization, and development of an ELISA peptide assay for specific diagnostic of Angiostrongyliasis. **Membranes**, Suíça, v. 12, n. 2, p. 1-15, Jan 2022.
- EAMSOBHANA P., YONG HS. Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). **Int J Infect Dis.**, Canadá, v. 13, n.4, p. 425-31. Jul 2009.
- KAMIYA M, et al. Change of indirect hemagglutination reactions in serum after the transfer of adult *Angiostrongylus cantonensis* to the abdominal cavity of rats. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, Tailândia, v. 3, n. 1, p. 119-123, 1969.
- MISHRA P.G.S., GUILHON J., BENEX M.J. Le test au latex dans le diagnostic sérologique de l'angiostrongylo semurine. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, França, 636, p. 709-716, 1970.
- MORASSUTTI, A. L. et al. Characterization of *Angiostrongylus cantonensis* excretory-secretory proteins as potential diagnostic targets. **Experimental Parasitology**, Nova Iorque, v. 130, n. 1, p. 26–31, Jan 2012.
- MORASSUTTI A. L. et al. High through put sequencing of the *Angiostrongylus cantonensis* genome: a parasite spreading worldwide. **Parasitology**, Londres, v. 140, n. 10, p. 1304-1309, Set 2013.
- UGA S. et al. Seroepidemiology of five major zoonotic parasite infections in habitants of Sidoarjo, East Java, Indonesia. **Zoonotic Infections in East Java**, Java, v. 27, n. 3, p. 556-561, Set 1996.
- VITTA, Apichat. Diagnosis of human angiostrongyliasis. **Asian Biomedicine**, Tailândia, 6(2), p. 141-150, April 2012.
- WANG, Q. P. et al. Human angiostrongyliasis. **The Lancet. Infectious diseases**, Nova York, v. 8, n. 10, p. 621-630, Out 2008.

ISBN 978-650047531-9

