



ESPECIALIZAÇÃO
VIGILÂNCIA LABORATORIAL EM SAÚDE PÚBLICA

**LIVRO DA IV MOSTRA DOS TRABALHOS DE
CONCLUSÃO DE CURSO DA ESPECIALIZAÇÃO
EM VIGILÂNCIA LABORATORIAL EM SAÚDE
PÚBLICA**

ORGANIZADORES:

CRISTIANE BONALDI CANO

ELAINE LOPES DE OLIVEIRA

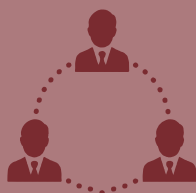
JACKSON ANDSON DE MEDEIROS



Venda proibida



Open access



Revisado por pares

EDITOR CHEFE

Jackson Andson de Medeiros

CORPO EDITORIAL

Jaelyson Max Pereira de Medeiros
Jalmir de Medeiros Pereira

REVISÃO FINAL

Cristiane Bonaldi Cano
Elaine Lopes de Oliveira

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 (4. : 2023 : Jardim do Seridó, RN)
Livro da IV mostra dos trabalhos de conclusão
de curso da especialização em vigilância
laboratorial em saúde pública [livro eletrônico] /
organização Cristiane Bonaldi Cano, Elaine Lopes
de Oliveira , Jackson Andson de Medeiros. --
1. ed. -- Jardim do Seridó, RN : Agron Science,
2023.

PDF

Vários autores.
Outros organizadores: Elaine Lopes de Oliveira,
Jackson Andson de Medeiros, Carolina Madazio Niro.
Bibliografia.
ISBN 978-65-999658-2-1

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

23-160442

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 LUCHS
ADRIANA PARISE COMPRI
ADRIANA PARISE COMPRI
ADRIANO ABBUD
AMANDA I. PORTILHO
AMANDA SCHIERSNER CAODAGLIO
ANDREA GOBETTI VIEIRA COELHO
ANDREIA MOREIRA DOS SANTOS CARMO
AUDREY CILLI
BRIGIDA HELENA DA SILVA MENEGHELLO
CAMILA REIS SANTOS GUERMANDI
CESAR CILENTO PONCE
CESAR CILENTO PONCE
CLEUSA APARECIDA DE SOUSA
CYRO BRITO
DANIEL FERREIRA LIMA NETO
DANIELA BERNARDES BORGES DA SILVA
DENISE MARIA BUSSONI BERTOLLO
DOROTI DE OLIVEIRA GARCIA
ELIANA DELLA COLETTA YUDICE
ELIANA DELLA COLETYA YUDICE
ELIZABETH HARUMMY TAKAGI
ELLEN GAMEIRO HILINSKI
ERICA CHIMARA SILVA
ERICA V. DE CASTRO LEVATTI
ERIKA KUSHIKAWA SAEKI
FABIANA C PEREIRA DOS SANTOS
FABIANA CRISTINA PEREIRA DOS SANTOS
FABIANA MARTINS SOARES DE SOUZA
FABIANA MARTINS SOARES DE SOUZA
FERNANDA FERNANDES FARIAS
FERNANDA MODESTO TOLENTINO BINHARDI
GABRIELA BASTOS CABRAL
GABRIELA MOTOIE
GISELLE IBETTE SILVA LÓPEZ LOPES
GLEIZE VILLELA
HELENA HILOMI TANIGUCHI
HELENA YANO
ISAURA AKEMI OKADA
IVANA BARROS DE CAMPOS
JACQUELINE TANURY MACRUZ PERESI
JAIR PEREIRA DA CUNHA JUNIOR
JAQUELINE CALÇA ASSIS
JERENICE ESDRAS FERREIRA
JULIANA MARIA WANTANABE PINHATA
JULIANA MARIOTTI GUERRA
KAROLINE RODRIGUES CAMPOS
KATIE CRISTINA TAKEUTI RICILUCA
LAINE ANDREOTTI DE ALMEIDA
LAÍS ANVERSA
LEONARDO ARAÚJO
LOURDES APARECIDA ZAMPIERI D'ANDREA
LUCAS MONTEIRO SANTA CRUZ
LUCAS XAVIER BONFIETTI
LUCIA DE FÁTIMA HENRIQUES
LUCIANA DA SILVA RUIZ MENEZES
LUCILE TIEMI ABE MATSUMOTO
LUIS FERNANDO DOS SANTOS
LUIS FILIPE MUCCI
MAHYARA MARKIEVICZ MANCIO KUS YAMASHITA
MÁRCIA MARIA DA COSTA NUNES SOARES
MARCILIO FIGUEIREDO LEMOS
MARIA DE LOURDES BURINI ARINE
MARIA GISELE GONÇALVES
MARIA ISABEL ANDREKOWISK FIORAVANTI
MARIA ISABEL DE OLIVEIRA
MARIANA SEQUETIN CUNHA
MARINA VON ATZINGEN
MARINA VON ATZINGEN DOS REIS
MARISA AILIN HONG
MARISTELA SATOU MARTINS
MARTA INÊS CAZENTINI MEDEIROS
MIRELLA FONTANA BATISTA BINHARDI
NOEMI NOSOMI TANIWAKI

COMISSÃO AVALIADORA

PAULO DA SILVA

PRISCILA FERNANDA PORTO SCAFF PINTO

PRISCILA FERNANDA PORTO SCAFF PINTO

RITA DE CássIA CAMPAGNOLI CARMONA

ROGÉRIO GIUFFRIDA

ROSANGELA AGUILAR SILVA

ROSANGELA SIQUEIRA DE OLIVEIRA

SERGIO DOVIDAUSKAS

SILVIA D'ANDRETTA IGLEZIAS

SIMONE BALDINI LUCHEIS

TAMIRES SANTOS DE ARRUDA

TÂNIA SUELI DE ANDRADE

TATIANE FERREIRA PETRONI

TOMAS ZECCHINI BARRESE

TOMAS ZECCHINI BARRESE

VANESSA NIERI ZANELATTO

VERA LUCIA PEREIRA CHIOCCOLA

SUMÁRIO

Capítulo 01	
Doi.org/10.53934/9786599965821-01	7
GENÓTIPOS DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO DE BAIXO RISCO ONCOGÊNICO EM MULHERES COM DIAGNÓSTICO DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS DO COLO UTERINO	7
Capítulo 02	
Doi.org/10.53934/9786599965821-02	13
OTIMIZAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIBLIOTECA DE ANTÍGENOS DE CORONAVÍRUS EXPRESSOS EM FAGOS (CORONASCAN)	13
Capítulo 03	
Doi.org/10.53934/9786599965821-03	20
ESTUDO DAS VARIANTES DO NOVO CORONAVIRUS E SEUS IMPACTOS NA EPIDEMIOLOGIA	20
Capítulo 04	
Doi.org/10.53934/9786599965821-04	27
DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR: UM PROBLEMA GLOBAL DE SAÚDE PÚBLICA	27
Capítulo 05	
Doi.org/10.53934/9786599965821-05	34
VIGILÂNCIA LABORATORIAL DOS ENTEROVÍRUS JUNTO AOS REFUGIADOS/REPATRIADOS ADVINDOS DE ÁREAS DE CIRCULAÇÃO DE POLIOVÍRUS – 2022	34
Capítulo 06	
Doi.org/10.53934/9786599965821-06	42
ESTUDO DESCRITIVO DA FEBRE DE CHIKUNGUNYA NO BRASIL (2017 – 2022) COM RECORTE PARA O ESTADO DE SÃO PAULO (2015 – 2022)	42
Capítulo 07	
Doi.org/10.53934/9786599965821-07	50
ESTUDO DA REDUÇÃO DOS AÇÚCARES NOS REFRIGERANTES	50
Capítulo 08	
Doi.org/10.53934/9786599965821-08	57
IMPORTÂNCIA DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMA	57

Capítulo 09	
Doi.org/10.53934/9786599965821-09	63
TENDÊNCIAS EM PESQUISA NO REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL: USO DE SIMILITUDE ASSOCIADA À BIBLIOMETRIA	63
Capítulo 10	
Doi.org/10.53934/9786599965821-10	70
MÉTODOS DE DETECÇÃO DO COMPLEXO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>: EVOLUÇÃO HISTÓRICA	70
Capítulo 11	
Doi.org/10.53934/9786599965821-11	76
ANÁLISE DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA HEPATITE B REALIZADO PELO INSTITUTO ADOLFO LUTZ CENTRAL ENTRE JANEIRO E JULHO DE 2022	76
Capítulo 12	
Doi.org/10.53934/9786599965821-12	82
A SÍNDROME PÓS-COVID-19	82
Capítulo 13	
Doi.org/10.53934/9786599965821-13	88
HEMODIÁLISE: UM BREVE HISTÓRICO DE SUA EVOLUÇÃO E LEGISLAÇÕES	88
Capítulo 14	
Doi.org/10.53934/9786599965821-14	93
INVESTIGAÇÃO DE ARBOVIROSES EM CASOS SUSPEITOS DE DENGUE E LEPTOSPIROSE NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP	93
Capítulo 15	
Doi.org/10.53934/9786599965821-15	98
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE DETERGENTES ENZIMÁTICOS	98
Capítulo 16	
Doi.org/10.53934/9786599965821-16	104
AVALIAÇÃO DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE MENINGITE EM TRÊS PRINCIPAIS REGIÕES METROPOLITANAS DA MACROMETRÓPOLE PAULISTA – SÃO PAULO, BAIXADA SANTISTA E CAMPINAS, 2017 A 2021	104
Capítulo 17	
Doi.org/10.53934/9786599965821-17	111
INVESTIGAÇÃO DE COINFEÇÕES HTLV-HIV EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS NO NOROESTE PAULISTA	111

Capítulo 18	
Doi.org/10.53934/9786599965821-18	118
AVALIAÇÃO DA ROTINA DE DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO DA HEPATITE C REALIZADA PELO INSTITUTO ADOLFO LUTZ CENTRAL ENTRE OS MESES DE JANEIRO A JULHO DE 2022	
	118
Capítulo 19	
Doi.org/10.53934/9786599965821-19	125
AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DA APLICAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE CONVENCIONAL EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE CÃES EM TRATAMENTO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE BAURU – SP.	
	125
Capítulo 20	
Doi.org/10.53934/9786599965821-20	131
ARMAZENAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS POR MÉTODOS MORFOLÓGICOS E POR BIOLOGIA MOLECULAR	
	131
Capítulo 21	
Doi.org/10.53934/9786599965821-21	137
ORTHOBUHAVIRUS: VIGILÂNCIA DE INFECÇÕES EM PÁSSAROS DA REGIÃO DO VALE DO RIBEIRA, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.	
	137
Capítulo 22	
Doi.org/10.53934/9786599965821-22	143
PRESERVAÇÃO E AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS GRAM-NEGATIVAS DO ACERVO DO NÚCLEO DE COLEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ	
	143
Capítulo 23	
Doi.org/10.53934/9786599965821-23	149
CARACTERIZAÇÃO E AUTENTICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS ARMAZENADAS NO NÚCLEO DE COLEÇÕES DE MICRO-ORGANISMOS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ	
	149
Capítulo 24	
Doi.org/10.53934/9786599965821-24	156
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE FUSIONADA (RBD + N) DO SARS-COV-2 EM E. COLI	
	156
Capítulo 25	
Doi.org/10.53934/9786599965821-25	164
PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA COQUELUCHE NO BRASIL, 1998 a 2022.	
	164

Capítulo 26	
Doi.org/10.53934/9786599965821-26	171
MPOX: CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA	171
Capítulo 27	
Doi.org/10.53934/9786599965821-27	177
A INCIDÊNCIA DE DENGUE NO PERÍODO DE 2018 A 2021 NA REGIÃO DO VALE DO PARAÍBA LITORAL NORTE.	177
Capítulo 28	
Doi.org/10.53934/9786599965821-28	183
RESPOSTA SOROLÓGICA EM PVHIV E INDIVÍDUOS SEM HIV VACINADOS CONTRA O SARS-CoV-2	183
Capítulo 29	
Doi.org/10.53934/9786599965821-29	189
COMPARAÇÃO DA DETECÇÃO DO SARS-COV-2 EM AMOSTRAS DE GARGAREJO COM E SEM EXTRAÇÃO DE RNA E COM A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA GENEXPERT	189
Capítulo 30	
Doi.org/10.53934/9786599965821-30	195
DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS E NOROVÍRUS EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS COM GASTROENTERITE AGUDA NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2022	195
Capítulo 31	
Doi.org/10.53934/9786599965821-31	203
IMPACTO DA PANDEMIA DA COVID-19 NA OCORRÊNCIA DE TUBERCULOSE NA REGIÃO DO VALE DO PARAÍBA E LITORAL NORTE DO ESTADO DE SÃO PAULO	203
Capítulo 32	
Doi.org/10.53934/9786599965821-32	209
PERFIL GENOTÍPICO DO HIV-1 NO CONTEXTO DA PROFILAXIA PRÉ-EXPOSIÇÃO (PREP) OU PROFILAXIA PÓS-EXPOSIÇÃO (PEP)	209
Capítulo 33	
Doi.org/10.53934/9786599965821-33	217
DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HIV: UM HISTÓRICO DA TÉCNICA E SUA IMPORTÂNCIA E APLICAÇÕES NO SISTEMA DE VIGILÂNCIA E MONITORAMENTO DA AIDS	217

Capítulo 34	
Doi.org/10.53934/9786599965821-34	224
PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA E FATORES DE VIRULÊNCIA DE Escherichia coli ISOLADOS DE ÁGUAS PARA CONSUMO HUMANO	224
Capítulo 35	
Doi.org/10.53934/9786599965821-35	231
DETERMINAÇÃO DE EDULCORANTES EM REFRIGERANTES DIETÉTICOS	231
Capítulo 36	
Doi.org/10.53934/9786599965821-36	238
QUALIDADE DO MEL EM RELAÇÃO À DETERMINAÇÃO DE	238
Capítulo 37	
Doi.org/10.53934/9786599965821-37	244
A IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DE NITRATO EM ÁGUAS DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO	244
Capítulo 38	
Doi.org/10.53934/9786599965821-38	250
PREVALÊNCIA E PERFIL DOS ISOLADOS BACTERIANOS PROVENIENTES DE CASOS DE MENINGITE BACTERIANA NOTIFICADOS NA ÁREA DE ABRANGÊNCIA DO DRS DE ARAÇATUBA NO PERÍODO DE 2017 A 2021	250
Capítulo 39	
Doi.org/10.53934/9786599965821-39	257
SARS-CoV-2 e COVID-19: Revisão sobre as vacinas disponíveis no Brasil	257
Capítulo 40	
Doi.org/10.53934/9786599965821-40	263
FREQUÊNCIA DE LESÕES INTRAEPITELIAIS ESCAMOSAS POR REGIÃO DO BRASIL ENTRE JULHO DE 2021 E JUNHO DE 2022	263
Capítulo 41	
Doi.org/10.53934/9786599965821-41	269
MÉTODOS INDIRETOS PARA DETECÇÃO DE MICOPLASMAS EM LINHAGENS CELULARES	269
Capítulo 42	
Doi.org/10.53934/9786599965821-42	275
O IMPACTO DA PANDEMIA DE COVID-19 NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR: PERSPECTIVAS E DESAFIOS	275

Capítulo 43	
Doi.org/10.53934/9786599965821-43	281
GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM Escherichia coli ISOLADAS DE ÁGUAS DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO	281
Capítulo 44	
Doi.org/10.53934/9786599965821-44	288
POLIOMIELITE NO BRASIL: POSSÍVEL REINTRODUÇÃO?	288
Capítulo 45	
Doi.org/10.53934/9786599965821-45	295
CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA DE PACIENTES VIVENDO COM HIV-1 COM VIREMIA BAIXA PERSISTENTE	295
Capítulo 46	
Doi.org/10.53934/9786599965821-46	302
ANÁLISE ESPAÇO TEMPORAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E CANINA EM MUNICÍPIOS PRIORITÁRIOS DO OESTE PAULISTA	302

GENÓTIPOS DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO DE BAIXO RISCO ONCOGÊNICO EM MULHERES COM DIAGNÓSTICO DE LESÕES PRÉ-NEOPLÁSICAS E NEOPLÁSICAS DO COLO UTERINO

Julia de Jesus Brito¹; Sandra Lorente²;

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública | Programa de Citologia Oncótica – NAP – Instituto Adolfo Lutz; E-mail: juliabrito0319@outlook.com

²Docente/Pesquisador do Depto de Citologia Oncótica – NAP – Instituto Adolfo Lutz

Resumo: O Papilomavírus Humano (HPV) representa um grupo de diversos tipos de vírus que infectam células epiteliais mucosas e cutâneas. Com base na probabilidade de desencadear o desenvolvimento de câncer, os HPVs que infectam as mucosas são classificados em alto ou baixo risco oncogênico. Os genótipos de baixo risco abrangem a maior parte dos 200 tipos conhecidos e estão mais associados a lesões hiperproliferativas benignas, entretanto, lesões pré-malignas, condilomas, papilomatoses e queratoses podem estar associadas a estes tipos de genótipos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação dos vírus HPV de baixo risco oncogênico com lesões precursoras do colo uterino por meio de dados sobre a prevalência dos diferentes tipos de HPV de baixo risco em anormalidades citológicas. O estudo foi uma revisão de literatura do tipo narrativa, em que foram utilizados os dados obtidos do HPV Centre para análise da prevalência. Embora alguns genótipos de HPV de baixo risco estejam associados a lesões precursoras, este vírus parece não estar associado ao desenvolvimento do câncer de colo uterino. Através dos levantamentos realizados, concluiu-se que os HPVs de baixo-risco não são a principal causa de lesões, no entanto, pode estar associado em lesões de alto e baixo grau, além de aparecer como principal agente causador em outras patologias.

Palavras-chave: Câncer de Colo de Útero; Papilomavírus Humano; Genótipos.

INTRODUÇÃO

O papilomavírus humano (HPV) faz parte de um grupo de diversos vírus que pertencem à família *Papillomaviridae*, considerada a mais bem sucedida família de vírus que infectam vertebrados, uma vez que infectam células que ainda possuem a capacidade de divisão celular, como as células basais e células metaplásicas imaturas do colo uterino, localizadas na junção escamocolunar (JEC), onde se instalam através de micro traumas no epitélio; os HPVs podem permanecer por um longo período na forma episomal com um baixo número de cópias, não comprometendo a morfologia celular nesta fase. Existem cinco gêneros principais de HPV: alfa-papilomavirus, beta-papilomavirus, gama-papilomavirus, mu-papilomavirus e nu-papilomavírus; sendo que a infecção das células epiteliais da mucosa genital ocorre principalmente pelos 000 do tipo alfa (COHEN et al., 2019; EGAWA; DOORBAR, 2017).

O genoma dos HPVs é constituído por DNA circular de dupla fita, com tamanhos próximos a 8.000 pares de bases, caracterizado por genes que codificam as proteínas

precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e dois genes que codificam as proteínas tardias (L1 e L2) (BZHALAVA et al., 2013; VAN DOORSLAER, 2013). Com base na probabilidade de desencadear o desenvolvimento do câncer de colo do útero, os HPVs são classificados em alto ou baixo risco oncogênico. A associação de tipos de HPV de alto risco com o câncer do colo do útero já está estabelecida, e forneceu uma justificativa para a introdução do teste DNA-HPV na triagem desta neoplasia, bem como o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra o HPV 16 e 18, que são os principais tipos responsáveis pela doença. Outros tipos de HPV de alto risco são 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82. Os HPVs de baixo risco abrangem a maior parte dos mais de 200 papilomavírus conhecidos, podem causar lesões hiperproliferativas benignas e frequentemente não causam carcinoma maligno. Os tipos 6 e 11 estão relacionados a aproximadamente 90% das verrugas genitais, e as vacinas quadrivalente e nonavalentes protegem contra a infecção por estes dois tipos. Outros tipos importantes de HPV de baixo risco são 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 (EGAWA; DOORBAR, 2017; LIU et al., 2021) Em populações susceptíveis os HPV de baixo risco podem ser refratários e causar doenças como Papilomatose Respiratória Recorrente (RRP) e Epidermodisplasia Verruciforme (EV), condições que podem se tornar fatores de risco para o desenvolvimento de câncer (EKSTRÖM et al., 2013; SCHIFFMAN et al., 2016).

As comparações funcionais dos tipos de HPV de baixo e alto risco estão longe de estarem completas, no entanto, suas principais diferenças até o momento concentram-se predominantemente nas funções exercidas pelos genes E6 e E7 codificadas por tipos de HPV de baixo risco, que têm um efeito limitado sobre os alvos celulares e as vias envolvidas no desenvolvimento de lesões e cânceres. Os HPVs tipo alfa de baixo risco não induzem a desregulação completa dos genes e mecanismos da célula hospedeira. Desta maneira, o transcrito do gene E6 de HPVs de baixo risco liga-se fracamente a proteína supressora de tumor p53, que tem uma fraca inibição da resposta imunológica através de interferon, e não ativa telomerase e nem induz instabilidade genômica no hospedeiro através da proteína E7, como ocorre nos HPVs de alto risco (EGAWA; DOORBAR, 2017; SCHIFFMAN et al., 2016; THOMSEN et al., 2014).

Segundo a nomenclatura brasileira baseada no Sistema Bethesda, as anormalidades citológicas em células escamosas devem ser classificadas em atípicas de células escamosas de significado indeterminado (ASC-US), lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), atípicas de células escamosas não se pode excluir lesão de alto grau (ASC-H), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma de células escamosas. Como o Papilomavírus Humano também atinge as células glandulares que se encontram mais profundamente no canal endocervical, as anormalidades citológicas detectadas nestas células, são classificadas pelo Sistema Bethesda em células glandulares atípicas (AGC), subdividida em atipia de células glandulares endocervicais sem outras especificações (AGC-SOE) e atípicas glandulares endocervicais favorecendo neoplasias (AGC-FN) (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, [s.d.]; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA); MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; NAYAR; WILBUR, 2015).

Desta forma, para melhor compreensão do papel de genótipos de HPVs de baixo risco oncogênico no desenvolvimento de lesões precursoras do câncer do colo uterino, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação dos vírus HPV de baixo risco oncogênico com lesões precursoras do colo uterino por meio de dados sobre a prevalência dos diferentes tipos de HPV de baixo risco em anormalidades citológicas

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi uma revisão de literatura do tipo narrativa, em que foram utilizadas as seguintes plataformas de pesquisa: PubMed, Biblioteca Virtual de Saúde (BVS), Scielo, Lilacs e MedLine usando como descritores “Câncer de Colo de Útero”, “Condiloma”, “HPV” e suas associações na língua portuguesa e inglesa. Além disso foram realizadas pesquisas no HPV Online (<https://hpvonline.com.br/>), Global Cancer Observatory (<https://gco.iarc.fr/>), um livro e dois manuais. Na pesquisa foram obtidos 57 artigos e destes, 23 foram selecionados para a elaboração do manuscrito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

HPVs de baixo risco são vírus que no geral não estão envolvidos na carcinogênese do colo uterino, entretanto dados da literatura mostram lesões precursoras de câncer associadas a estes tipos de HPVs. A prevalência de HPV de baixo risco é consideravelmente menor na população feminina quando comparada ao HPV de alto risco em casos com anormalidades citológicas. No entanto, estes tipos também são detectados em lesões precursoras do câncer do colo uterino.

De acordo com os dados globais coletados através do site de domínio internacional HPV Information Centre, os resultados de prevalência mostram que os principais genótipos de HPV de baixo risco foram os tipos 6, 11, 42, 44, 62, 81 e 84 em mulheres com LSIL; 6 11, 42, 44, 54, 61, 81 e 89 em mulheres com HSIL; e os tipos 42 e 44 estavam presentes em casos de carcinoma e adenocarcinoma (HPV CENTRE, [s.d.]).

Um estudo da Dinamarca detectou a prevalência de 6,9% de HPV de baixo risco (6, 11, 42, 43 ou 44) pelo método de captura-híbrida (teste DNA-HPV) em 40.000 amostras de citologia em meio líquido. Sendo que a prevalência dos tipos HPV de baixo risco em mulheres com citologia normal foi de 6,3%, enquanto que, em mulheres com citologia classificada como ASCUS, LSIL ou HSIL teve prevalência de 33,1% 19,6% e 12,7%, respectivamente (NIELSEN et al., 2012). Martora et al (2019), na Itália, estudaram 1265 raspados pelo método de genotipagem de HPV, em mulheres entre 16 a 63 anos, que apresentaram anormalidades citológicas, e observaram uma prevalência de 12,4% de HPV 53; 9,9% de HPV 62; 9,4% de HPV 42; 8,2% de HPV 73; e 7,1% de HPV 54 (MARTORA et al., 2019). Apesar do HPV de baixo risco estar presente em muitos casos de mulheres com anormalidades citológicas, Thomsen et al (2014) observou que o risco de neoplasia intraepitelial cervical 3, num período de 8 anos, foi de 1,7% em mulheres com HPV de baixo risco sem HPV de alto risco concomitante. Este estudo aponta que o HPV de baixo risco não prediz lesão de alto grau (THOMSEN et al., 2014).

A maior importância dos HPVs de baixo risco se dá por sua presença em verrugas anogenitais (condiloma), causadas pelo HPV dos tipos 6 e 11. Como o HPV de baixo risco possui tendência a regredir sozinho, esses condilomas, quando tratados com medicamentos tópicos, retirados cirurgicamente ou são cauterizados, costumam ressurgir até que o próprio sistema imune seja capaz de eliminar o vírus, em casos raros a possibilidade de que um condiloma evolua para uma lesão significativa deve ser considerada (COHEN et al., 2019).

Alguns relatos descritos por Pujari et al. demonstraram sua presença, em específico o HPV 42, em lesão do tipo queratose seborreica no colo do útero, uma condição extremamente rara, pois trata-se de uma lesão cutânea benigna, é semelhante a um tumor comumente observado em pacientes idosos em áreas que ficam expostas ao sol. De 7 relatos sobre a queratose seborreica no colo uterino, 3 eram positivos para o HPV de baixo risco tipo 42 como principal agente, e em outros estudos, apareceu associado a queratoses seborreicas vulvares (18 de 25 casos) (PUJARI et al., 2021).

A Papilomatose Respiratória Recorrente (RRP), uma manifestação rara, porém grave do HPV que se encontra alojado na laringe. Uma pesquisa publicada por OUDA et al. sugere que a infecção possui três picos de idade específicos para um maior potencial de atuação, 7, 35 e 64 anos, o tumor apresenta grande morbidade em caráter de suas lesões serem confluentes e promoverem disфонia e dispneia, os tipos mais detectados são os baixo risco 6 e 11, no entanto, em alguns casos raros, os tipos alto risco 16 e 18 podem ser encontrados em crianças, associando-se a um maior poder de malignização (NETO; CAMPOS; BASTOS, 2002; OUDA et al., 2021).

A Epidermodisplasia Verruciforme, outra doença de grandes consequências associada ao HPV de baixo risco dos tipos 5 e 8, os quais se instalam nos queratinócitos, foi descrita pela primeira vez em 1922 por Lewandowsky e Lutz, trata-se de uma condição dermatológica genética onde os pacientes apresentam uma diminuição da capacidade do sistema imune em se defender e erradicar os HPVs, o que leva a uma infecção persistente e ao aumento da possibilidade de malignidade durante o desenvolvimento dessa displasia cutânea, um fato interessante é que portadores de EV não apresentam capacidade de defesa reduzida contra outros tipos de patógenos (ASZODI et al., 2020; MYERS; KWAN; FILLMAN, 2022).

Além desses aspectos, existe uma diferença em sua composição molecular, visto que, mesmo possuindo as mesmas proteínas que o HPV de alto risco, o baixo risco não possui o mesmo potencial lesivo (BZHALAVA et al., 2013; THOMSEN et al., 2014). As proteínas virais, não atingem os principais mecanismos da célula hospedeira que auxilia na sua replicação, como exemplo as proteínas E6 e E7 do HPV baixo risco, que não influenciam diretamente na divisão das células basais, mas essas proteínas podem modular a densidade celular da camada basal ou funcionar transitoriamente em estágios específicos do ciclo de vida do HPV, como durante a formação da lesão, por consequência da diferente regulação transcricional desses genes (CHEN et al., 2019). Em um momento de reentrada do vírus no ciclo celular, as proteínas E6 e E7 proporcionam um ambiente favorável à sua replicação, porém não induz a divisão celular, resultando em uma ação tardia do promotor, em que E1 e E2 aumentam, permitindo que os produtos gênicos virais e celulares amplifiquem epissomas nucleares do HPV. Como regra geral, para os dois tipos de HPV, baixo e alto risco, pode-se dizer que eles trabalham de forma similar, mas não necessariamente exercem funções idênticas durante o ciclo de vida viral, afetando sua virulência (MARTORA et al., 2019; WENTZENSEN et al., 2016).

CONCLUSÕES

O papilomavírus humano do tipo alfa de baixo risco está presente principalmente em verrugas genitais, todavia demonstram um poder carcinogênico fraco por suas particularidades genômicas, exercendo uma influência limitada sobre os mecanismos da célula hospedeira que irá ajudá-lo a se replicar. Muitos tipos de HPV baixo risco estão presentes em mulheres que possuem citologia normal e geralmente não irão se manifestar, porém algumas vezes podem se associar a outros tipos de HPV de alto risco e serem encontrados em lesões intraepiteliais.

HPVs de baixo risco são vírus que no geral não estão envolvidos na carcinogênese do colo uterino, entretanto dados da literatura mostram lesões precursoras de câncer associadas a estes tipos de HPVs. A prevalência de HPV de baixo risco é consideravelmente menor quando comparada ao HPV de alto risco em casos com anormalidades citológicas, no entanto, estes tipos também são detectados em lesões precursoras do câncer do colo uterino.

REFERÊNCIAS

- ASZODI, N. et al. **Epidermodysplasia verruciformis**. *Hautarzt* Springer Medizin, , 1 jul. 2020.
- BZHALAVA, D. et al. A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology*, v. 445, n. 1–2, p. 224–231, out. 2013.
- CHEN, Z. et al. Characteristics of human papillomaviruses distribution in Guizhou Province, China. *Virology Journal*, v. 16, n. 1, p. 1–5, 2019.
- COHEN, P. A. et al. **Cervical cancer**. *The Lancet* Lancet Publishing Group, , 12 jan. 2019.
- EGAWA, N.; DOORBAR, J. **The low-risk papillomaviruses**. *Virus Research* Elsevier B.V., , 2 mar. 2017.
- EKSTRÖM, J. et al. Diversity of human papillomaviruses in skin lesions. *Virology*, v. 447, n. 1–2, p. 300–311, dez. 2013.
- GLOBAL CANCER OBSERVATORY. [...]. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 17 nov. 2022.
- HPV CENTRE. [...]. Disponível em: <<https://hpvcentre.net/>>. Acesso em: 14 out. 2022.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA); MINISTÉRIO DA SAÚDE. **MINISTÉRIO DA SAÚDE SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE**. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <www.saude.gov.br/sas>.
- LIU, F. et al. Association of human papillomavirus genotype distribution and cervical cytology: A Cross-sectional Study. *Epidemiology and Infection*, 2021.
- MARTORA, F. et al. Seven years prevalence and distribution of high and low risk HPV genotypes in women living in the metropolitan area of Naples. *Cancer Epidemiology*, v. 63, 1 dez. 2019.
- MYERS, D. J.; KWAN, E.; FILLMAN, E. P. **Epidermodysplasia Verruciformis Continuing Education Activity**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534198/?report=printable>>.
- NAYAR, R.; WILBUR, D. C. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology Definitions, Criteria, and Explanatory Notes Third Edition**. [s.l: s.n.].
- NETO, C. A. DE A.; CAMPOS, R. M. C.; BASTOS, M. DE L. S. **Papilomatose Respiratória Recorrente com Disseminação Pulmonar - Relato de Dois Casos Radiol Bras**. [s.l: s.n.].
- NIELSEN, A. et al. The importance of low-risk HPV infection for the risk of abnormal cervical cytology/histology in more than 40 000 Danish women. *Sexually Transmitted Infections*, v. 88, n. 8, p. 627–632, dez. 2012.
- OUDA, A. M. et al. **Hpv and recurrent respiratory papillomatosis: A brief review**. *LifeMDPI*, , 1 nov. 2021.
- PUJARI, R. et al. Seborrheic keratosis-like lesion of the cervix: First report of the cytological features of a low-risk HPV 42-Associated Lesion. *Acta Cytologica*, v. 65, n. 5, p. 448–452, 1 set. 2021.

SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 1 dez. 2016.

THOMSEN, L. T. et al. High-risk and low-risk human papillomavirus and the absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia or cancer. **Obstetrics and Gynecology**, v. 123, n. 1, p. 57–64, 2014.

VAN DOORSLAER, K. Evolution of the Papillomaviridae. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 11–20, out. 2013.

WENTZENSEN, N. et al. **Triage of HPV positive women in cervical cancer screening.** **Journal of Clinical Virology** Elsevier B.V., , 1 mar. 2016.

OTIMIZAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIBLIOTECA DE ANTÍGENOS DE CORONAVÍRUS EXPRESSOS EM FAGOS (CORONASCAN)

Gustavo Carvalho Amorim¹; Carlos Roberto Prudêncio²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – Centro de Imunologia – Instituto Adolfo Lutz; E-mail: guca.m@hotmail.com ²Docente/pesquisador do Centro de Imunologia – Instituto Adolfo Lutz.

Resumo: A pandemia da COVID-19 trouxe inúmeros desafios para a sua mitigação ao redor do globo. A tecnologia de imunoprecipitação de fagos seguida pelo sequenciamento de alto rendimento (PhIP-Seq) propõe analisar o histórico imunológico individual e estudar interações antígeno-anticorpo por meio de fagos que expressam proteínas e peptídeos de interesse. Esse trabalho tem por objetivo otimizar e padronizar a técnica de titulação e expansão de uma biblioteca de antígenos de coronavírus expressos em fagos T7 (CoronaScan), bem como a quantificação de imunoglobulinas IgG (IgG) de amostras em soro humano por ELISA, que, combinadas, permitirão o aprimoramento de análises e estudos imunológicos e epidemiológicos. A cepa *E. coli* BLT5403 foi usada como hospedeira nos ensaios de titulação e expansão da biblioteca CoronaScan em placas ágar LB. Para a quantificação de IgG, uma curva padrão foi construída a partir de uma solução de IgG purificada e com concentração conhecida, juntamente a determinação de IgG de uma amostra de soro, que deverá ser utilizado como controle nos futuros ensaios. Após a expansão, biblioteca CoronaScan ($1,5 \times 10^5 \pm 0,7$ pfu/mL) passou a ter a titulação de $1,5 \times 10^{10} \pm 2,12$ pfu/mL, enquanto a concentração de IgG adequado para o método se encontrou na diluição de 1/1.000.000. Apesar da otimização e a da padronização de tais técnicas terem sido realizadas, novos ensaios de quantificação de IgG pelo método de ELISA serão necessários para assegurar a reprodutibilidade. Além disso, recomenda-se a realização do controle da qualidade da biblioteca CoronaScan a fim de analisar a sua diversidade de peptídeos.

Palavras-chave: coronavírus; PhIP-Seq; T7; vigilância epidemiológica

INTRODUÇÃO

A pandemia da COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*), doença causada pelo vírus SARS-CoV-2 (do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), requereu um grande esforço mundial para o controle de sua disseminação. Em dezembro de 2022, dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) confirmaram um pouco mais de 630 milhões de casos e 6,6 milhões de mortes ocasionados pela doença, que foi identificada pela primeira vez na cidade de Wuhan, na China (Herstein *et al.*, 2021; Peng *et al.*, 2021; Rahman *et al.*, 2021).

Mutações aleatórias nas proteínas estruturais *spike* e do nucleocapsídeo podem não somente dificultar o diagnóstico como também abalar as estratégias da vigilância epidemiológica já instauradas. A tecnologia de imunoprecipitação de fagos seguida pelo sequenciamento de alto rendimento (NGS) (PhIP-Seq, do inglês *Phage Immunoprecipitation Sequencing*) é uma ferramenta poderosa capaz de investigar respostas do sistema imune provocadas por infecções virais, doenças imunes e infecciosas que podem comprometer o sistema imunológico. A técnica, ao ser combinada com a biblioteca de fagos T7 coronavírus VirScan (CoronaScan) - que representa os peptídeos dos coronavírus humanos endêmicos (HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 e HCoVHKU1), SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 e MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*), além dos peptídeos de coronavírus encontrados em morcegos (BatCoV-Rp3, BatCov-HKU3 e BatCov-279) -, permite a identificação de peptídeos reconhecidos por imunoglobulinas IgG (IgG) por meio da imunoprecipitação mediada por esferas magnéticas sensibilizadas com proteínas A e G, com posterior amplificação das sequências codificantes por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de nova geração (NGS) (Mohan *et al.*, 2018; Morgenlander *et al.*, 2021; Wiegand *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2015).

A biblioteca de fagos tem como base o *phage display* desenvolvido a partir de fagos T7, que apresenta vantagens frente ao fago M13, como maior estabilidade na presença de inserto, alta taxa de replicação em *Escherichia coli*, resistência a condições extremas e entre outras. (Deng *et al.*, 2018; Krumpke & Mori, 2014; Tan *et al.*, 2016; Yue *et al.*, 2022).

Portanto, este trabalho tem como objetivo a otimização e padronização a titulação e expansão da biblioteca de fagos CoronaScan, e a padronização do ensaio de ELISA para a quantificação de IgG presentes no soro dos pacientes que serão utilizados nos experimentos de imunoprecipitação com a biblioteca.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos descritos no Manual *T7Select® System* da Novagen (2011) e por Mohan e colaboradores (2018). Os resultados foram expressos como média e desvio-padrão (\pm) de pelo menos dois ensaios independentes.

A titulação requereu *E. coli* BLT5403 com OD₆₀₀ = 1,0 u.a. cultivada em meio M9LB (NOVAGEN, 2011). As bactérias foram crescidas neste meio suplementado com x (concentração) ampicilina a 37° C sob agitação constante de 200 RPM. As células hospedeiras foram incubadas por 8 min com 100 μ L da biblioteca CoronaScan previamente diluída em meio LB nas diluições de 10² a 10⁹. Em seguida, 3 mL de meio top agarose (20 g de meio LB e 0,6 de agarose *low melting* em volume final de 1 L) foi adicionado para cada diluição, sendo essa mistura plaqueada sob uma camada de LB ágar com ampicilina a 50 μ g/mL em uma superfície plana e incubada *overnight* a temperatura ambiente (TA). A titulação (pfu/mL) foi determinada por meio da contagem das unidades formadoras de placas (pfu) na placa LB contendo a maior diluição em que as placas de fagos puderam ser contadas de modo isolado. A estimativa da concentração da biblioteca foi auxiliada por meio da seguinte fórmula: Titulação (pfu/mL) = PFU \times Fator de diluição \times 10.

Para a realização da expansão da biblioteca CoronaScan, foi necessitado uma concentração de 1×10^6 de fagos para cada 10 mL das células hospedeiras com OD₆₀₀ = 0,6 a 1,0 u.a. Foi separado, em diferentes tubos, 1 mL da mistura fagos/hospedeiro e adicionado 10 mL de meio top agarose aquecido a 45° C, sendo plaqueada em placas de Petri contendo

uma camada de ágar LB com ampicilina a 50 µg/mL, seguido pela incubação em TA em uma superfície plana *overnight*. Após a conferência da quase confluência da placa, 10 mL do tampão de extração (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl e 6 mM MgSO₄) foi adicionado e as placas foram incubadas a 4° C em uma superfície plana *overnight*. Assim, o tampão de extração foi transferido para um único tubo estéril e 500 µL de clorofórmio foi adicionado para uma centrifugação de 3000 g por 5 minutos, sendo a nova titulação conferida após o término. A biblioteca foi alíquotada e armazenada a -80° C em DMSO 10% (vol/vol).

A quantificação de IgG foi realizada por um ELISA sanduíche, onde uma placa de 96 poços foi adsorvida com 2 µg/mL da porção Fab de anti-IgG humana (SouthernBiotech®, Birmingham, Alabama, EUA), produzido em cabra, diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9.5) em volume final de 50 µL/poço. A placa foi selada e incubada *overnight* a 4°C e, então, o anticorpo de captura não adsorvido foi descartado. Logo, a placa foi lavada com tampão de lavagem (PBS 0,05% Tween-20) e bloqueada com solução de bloqueio (PBS 5% leite desnatado Molico®, Vevey, Suíça) por 1 hora a 37° C. A placa foi lavada novamente e 50 µL/poço da solução padrão de IgG (Human IgG Normal, Invitrogen®, Waltham, Massachusetts, EUA) diluída em solução de bloqueio foi adicionada em duplicata nas concentrações de 200, 100, 33.33, 11.11, 3.7, 1.23 e 0.41 ng/mL. Concomitantemente, um soro pertencente ao banco de soros do Laboratório de Imunobiocnologia do Instituto Adolfo Lutz (autorizada, sob o n° 32264120.5.2001.0061, no Comitê de Ética do Instituto de Infectologia Emílio Ribas) foi diluído em solução bloqueio nas razões de 1/10.000, 1/100.000, 1/400.000, 1/800.000, 1/1.000.000, 1/2.000.000, 1/4.000.000 e 1/8.000.000 e adicionada à placa em duplicata em volume de 50 µL/poço, sendo a placa selada e incubada por 1 hora a 37° C. Em seguida, a placa foi lavada 5x para remoção do material não ligado. Posteriormente, foi feita a incubação com 50 µL/poço de uma solução de anticorpo anti-human IgG -HRP (1:5000) em TA por 30 min. Após a lavagem, 50 µL/poço do substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foi adicionado em TA e a placa foi coberta em papel alumínio, sendo a intensidade de coloração monitorada a cada 2 minutos. A solução de (0,2 N de H₂SO₄) foi adicionada seguindo a ordem de adição de TMB (50 µL/poço). Por fim, a absorbância da placa foi lida no comprimento de onda (λ) de 450 nm. Os dados obtidos foram analisados no *software* GraphPrism versão 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia EUA). A concentração da amostra de soro foi determinada pela interpolação dos valores de absorbância obtidos na diluição 1/1.000.000 com a curva padrão pelo modelo “*sigmoidal, 4 PL and X is logX (concentration)*”, sendo a curva padrão da amostra de soro construída por meio da análise de regressão não-linear pelo modelo “*one-site binding model*”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a biblioteca CoronaScan, que já se encontrava em posse do Laboratório de Imunobiocnologia do IAL, obteve uma média de titulação (realizada em duplicata) de $1,5 \times 10^5 (\pm 0,7)$ pfu/mL, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 – Titulação da biblioteca CoronaScan pré-expansão

	1	2
Diluições	pfu	
10 ⁻²	63	68

10 ⁻³	6	7
10 ⁻⁴	1	2
10 ⁻⁵	0	0
$\bar{X} = 1,5 \times 10^5 (\pm 0,7) \text{ pfu/mL}$		

O processo morfogênico do fago T7 garante a expressão de uma maior diversidade de aminoácidos quando comparado ao fago M13, acarretando um maior número de peptídeos funcionais, a depender do quanto a nova molécula pode interferir na instabilidade da partícula viral bem como impedir a replicação do mesmo (Krumpe *et al.*, 2007).

O método de escolha para a amplificação da biblioteca foi por ensaio de lise em placa, uma vez que o total de recombinantes primários era inferior a 5×10^6 pfu/mL, como demanda o protocolo da Novagen *T7Select® System Manual* (NOVAGEN, 2011). Após a expansão, foi possível observar pela grande confluência das placas utilizadas no procedimento que a titulação havia aumentado. Após a realização de uma nova titulação, determinou-se que a biblioteca foi aumentada cerca de 100.000 vezes, estando estimada em um título de $1,5 \times 10^{10}$ ($\pm 2,12$) pfu/mL, conforme observado na tabela 2.

Tabela 2 – Titulação da biblioteca CoronaScan pós-expansão

Diluições	1	2
	pfu	
10 ⁻²	Confluente	Confluente
10 ⁻³	Confluente	Confluente
10 ⁻⁴	Confluente	Confluente
10 ⁻⁵	Confluente	Confluente
10 ⁻⁶	Indeterminado	Indeterminado
10 ⁻⁷	Indeterminado	Indeterminado
10 ⁻⁸	22	7
10 ⁻⁹	3	0
$\bar{X} = 1,5 \times 10^{10} (\pm 2,12) \text{ pfu/mL}$		

Embora o título da biblioteca tenha aumentado consideravelmente, é preocupante a qualidade da biblioteca, no que se diz a respeito à diversidade viral em que ela representa. O sequenciamento de Sanger e o NGS são duas alternativas que podem auxiliar na análise representativa dos fagos ali presentes. O sequenciamento de Sanger possibilita a investigação acerca da capacidade de síntese de oligonucleotídeos dos fagos, sendo limitado a 10³ sequências, enquanto o NGS permite identificar a distribuição da frequência clonal da biblioteca e de sua integridade em uma janela de 10⁶ a 10⁸ ligantes, o que minimiza a subestimação da população de fagos e, conseqüentemente, na qualidade geral da biblioteca. Além disso, mutações e proteínas truncadas são características conhecidas por alterar a cinética de crescimento dos fagos que as apresentam, levando à proliferação vantajosa frente aos demais (Matochko & Derda, 2015; Mohan *et al.*, 2018).

O PhIP-Seq exige, ao menos, 1 µL de soro por paciente, uma vez que apenas 2 µg de IgG para a técnica de imunoprecipitação é requisitado. Jolliff e colaboradores (1982) observaram por nefelometria que os valores de referência de IgG em adultos permeiam entre 6,39 a 13,49 g/L, em uma média de 9,94 g/L. A curva padrão foi construída com os valores da concentração de IgG padrão conhecida e transformados em valores de logaritmo na base

10. A interpolação das amostras à curva padrão se mostrou ter um ajuste adequado para a curva ($R^2=0,99$) de acordo com o *software* GraphPad. Assim sendo, a diluição do soro na razão de 1/1.000.000 recomendada por Mohan *et al.* (2018) foi adequada para a obtenção de 9 mg/mL de IgG a partir da amostra de soro, ambas as curvas podem ser observadas na figura 3.

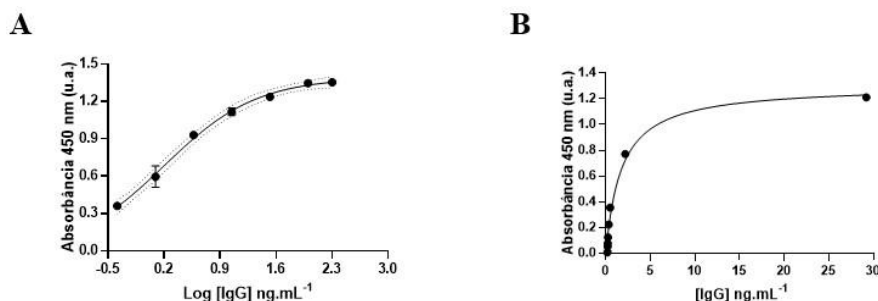


Figura 3 – Curva padrão da dosagem de IgG purificado e de concentração conhecida e curva da amostra de soro interpolada na curva padrão.

Em A, encontra-se a curva padrão da dosagem do padrão de IgG. As barras representam o desvio padrão do valor da absorbância dos poços em duplicata ($R^2=0,99$). Em B, a curva obtida após a regressão não-linear dos valores de absorbância da amostra de soro ($R^2=0,97$).

Ao utilizarem a biblioteca VirScan, uma biblioteca similar que engloba todo o viroma humano, Xu *et al.* (2015) constataram uma sensibilidade e especificidade de 95% quando testada e comparada para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e vírus da hepatite C (HCV) e seus respectivos ensaios de ELISA, assim como em teste sorológico para Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2), possibilitando a avaliação desses parâmetros para os vírus dos mais diversos tamanhos. Shrock e colaboradores e (2020) com a mesma técnica, descreveram uma sensibilidade de 99% e especificidade de 98% para um modelo computacional capaz de identificar a exposição contra o SARS-CoV2. Chen e colaboradores (2022) descreveram um modelo computacional, BEER, capaz de aumentar a sensibilidade de peptídeos fracamente reativos para o uso do PhiP-Seq.

Os mecanismos que desencadeiam sequelas pós-agudas do SARS-CoV-2 (PASC, do inglês *Post-Acute Sequelae of SARS-CoV-2*) ainda não estão muito bem esclarecidos. Uma saída para elucidar os biomarcadores que conduzem a essa condição é o uso da tecnologia PhiP-Seq, que pode ser relevante para a obtenção de respostas e questionamentos científicos, principalmente dentro do âmbito de estudos epidemiológicos de soroprevalência (Mantovani *et al.*, 2022).

CONCLUSÕES

Com a otimização da titulação e da expansão da biblioteca CoronaScan, a manutenção, isso é, a constante renovação da biblioteca, poderá ser feita ao longo do tempo a medida em que os ensaios de PhiP-Seq forem sendo realizados, se tornando uma fonte inesgotável de reagente. No entanto, a quantificação de IgG pelo método de ELISA ainda precisa ser aprimorada para assegurar a reprodutibilidade em amostras de soro de pacientes de diferentes quadros clínicos. Sobretudo, recomenda-se a realização do controle de qualidade de biblioteca, devido ao fato da mesma ter sido expandida a partir de um estoque cuja titulação era abaixo do valor esperado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas de laboratório de Imunobiotecnologia, que contribuíram imensamente para a construção desse trabalho e para a minha formação e a coordenadoria e professores do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública do Instituto Adolfo Lutz, com os quais tornaram esse projeto possível.

REFERÊNCIAS

- CHEN, Athena et al. Detecting and quantifying antibody reactivity in PhIP-Seq data with BEER. **Bioinformatics**, v. 38, n. 19, p. 4647-4649, 2022.
- DENG, Xiangying et al. Advances in the T7 phage display system. **Molecular medicine reports**, v. 17, n. 1, p. 714-720, 2018.
- HERSTEIN, Jocelyn J. et al. Emergency preparedness: What is the future?. **Antimicrobial Stewardship & Healthcare Epidemiology**, v. 1, n. 1, p. e29, 2021.
- JOLLIFT, C. R. et al. Reference intervals for serum IgG, IgA, IgM, C3, and C4 as determined by rate nephelometry. **Clinical chemistry**, v. 28, n. 1, p. 126-128, 1982. KRUMPE, L. R. H.; MORI, T. T7 lytic phage-displayed peptide libraries: Construction and diversity characterization. **Methods in Molecular Biology**, v. 1088, p. 51-66, 2014.
- KRUMPE, Lauren RH et al. Trinucleotide cassettes increase diversity of T7 phagedisplayed peptide library. **BMC biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2007.
- MANTOVANI, Alberto et al. Long Covid: where we stand and challenges ahead. **Cell Death & Differentiation**, v. 29, n. 10, p. 1891-1900, 2022.
- MATOCHKO, Wadim L.; DERDA, Ratmir. Next-generation sequencing of phagedisplayed peptide libraries. **Peptide Libraries**, p. 249-266, 2015.
- MOHAN, Divya et al. PhIP-Seq characterization of serum antibodies using oligonucleotide-encoded peptidomes. **Nature protocols**, v. 13, n. 9, p. 1958-1978, 2018.
- MORGENLANDER, William R. et al. Antibody responses to endemic coronaviruses modulate COVID-19 convalescent plasma functionality. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 7, 2021.
- NOVAGEN. **T7Select® System Manual**. Disponível em: <www.merck4biosciences.com>.
- PENG, Xue-Liang et al. Advances in the design and development of SARS-CoV-2 vaccines. **Military Medical Research**, v. 8, n. 1, p. 1-31, 2021.
- RAHMAN, Sayeeda et al. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 14, n. 5, p. 601-621, 2021.
- SHROCK, Ellen et al. Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals crossreactivity and correlates of severity. **Science**, v. 370, n. 6520, p. eabd4250, 2020. TAN, Yuyu et al. Advance in phage display technology for bioanalysis. **Biotechnology journal**, v. 11, n. 6, p. 732-745, 2016.
- WHO COVID-19 Dashboard. Geneva: **World Health Organization**, 2020. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acessado em: 01/12/2022.
- WIEGAND, Tanner et al. The Rise and Fall of SARS-CoV-2 Variants and Ongoing Diversification of Omicron. **Viruses**, v. 14, n. 9, p. 2009, 2022.

XU, George J. et al. Comprehensive serological profiling of human populations using a synthetic human virome. **Science**, v. 348, n. 6239, p. aaa0698, 2015.

YUE, Hui et al. T7 Phage as an Emerging Nanobiomaterial with Genetically Tunable Target Specificity. **Advanced Science**, v. 9, n. 4, p. 2103645, 2022.

ESTUDO DAS VARIANTES DO NOVO CORONAVIRUS E SEUS IMPACTOS NA EPIDEMIOLOGIA

Wellington Rudnei Athanazio¹, Marina von Atzingen²

¹Estudante do Curso de Especialização Vigilância Laboratorial em Saúde Pública –SUS/SP – IAL; E-mail: wrariopreto@icloud.com

²Docente/Pesquisadora Científica do Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto VI - Instituto Adolfo Lutz (IAL-CLR-VI-RP).

RESUMO

Mutações são acidentes ou erros que acontecem ocasionalmente em um organismo que possui material genético, sejam eles DNA ou RNA. Acompanhar essas variações nos vírus tem tornado possível ao ser humano entender sua disseminação, transmissibilidade e virulência. Em 2019, emergiu um coronavírus da família Coronaviridae, o SARS-CoV-2, causando nos seres humanos infecções abruptas, doença essa chamada de COVID-19. Ele sofreu diversas mutações ao longo do período pandêmico, mas elas não pararam. Suas mutações formaram variantes virais capazes de mudar até mesmo a sintomatologia da doença. Este trabalho tem como objetivo, realizar uma revisão bibliográfica, com o auxílio de bancos de dados governamentais mundiais e repositórios como Scielo, Pubmed, Organização Mundial da Saúde, Ministério da Saúde e demais espalhados pelos continentes, a fim de explorar sua origem, mutações, linhagens, variantes e cepas, deste vírus que circula desde novembro de 2019 entre os seres humanos; sua patogenicidade e características fenotípicas. Com isso, compreender as perspectivas atuais e entender como se desenvolverá este vírus ao longo do tempo, em um período pós-vacinal, tem sido um desafio para os pesquisadores que trabalham arduamente para compreender como frear a infecção que este vírus provoca e tentar definir se uma cepa única circulará sobre a população do mundo, ou se novas variantes mais poderosas poderão surgir ao longo dos anos.

Palavras-chave: Epidemias; Infecções por coronavírus; SARS-CoV-2; Vigilância;; Vírus RNA

INTRODUÇÃO

O novo coronavírus, SARS-CoV-2, foi responsável pela morte de mais de seis milhões de pessoas em todo mundo e até o presente momento observa-se casos de óbito. Em menos de três meses de seu aparecimento na China, a COVID-19 tornou-se pandêmica causando mortes, crise econômica e o colapso de sistema de saúde de vários países (MENEZES, 2020).

Depois de sua emergência em Wuhan, outras cidades foram identificadas como epicentro da doença. À medida que o vírus se espalhava pelos continentes, cidades de outros países, se destacavam como epicentro pandêmico, como foi o caso da Itália, França, Espanha,

Inglaterra, EUA. Para se ter ideia da velocidade da contaminação e da gravidade deste patógeno, em 31 de março de 2020 havia 760.040 casos confirmados e 40.842 mortos. Em um período de aproximadamente 6 meses, após estes casos, houve um salto para 32.925.668 de casos confirmados e 995.352 mortes (SOUZA et al., 2021).

Este vírus pertence a uma classe de vírus zoonóticos, compostos por RNA que acometem uma variedade de animais, incluindo aves e mamíferos. Destes, apenas sete são reconhecidos como patogênicos para humanos. Nos últimos 20 anos, três deles foram responsáveis por grandes epidemias virulentas de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), sendo elas: a epidemia de SARS de Hong Kong (China) em 2003, a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS), que emergiu na Arábia Saudita em 2012 e atualmente o SARS-CoV-2 (da sigla em inglês coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave) que em 31 de dezembro de 2019 emergiu em Wuhan, na China (CORMAN et al., 2018; LI et al., 2020).

Explorar essas variantes, como elas surgem e de que maneira se desenvolvem é o propósito desta revisão bibliográfica, abordando suas variantes de preocupação, de interesse e de alta consequência, pois estudos como este podem auxiliar no monitoramento de possíveis futuras epidemias, bem como presumir o surgimento do que chamam de “novas onda” (quando novos surtos de determinada doença ressurgem), na produção de uma vacina eficaz e até mesmo compreender quais estruturas virais podem estar mais relacionadas às suas mutações. Descrever as mutações, linhagens, variantes e cepas diferentes deste vírus que circula há quase três anos no mundo, desde seu primeiro caso de transmissão na cidade de Wuhan, na China; entender as origens e rearranjos moleculares que o SARS-Cov-2 tem sofrido ao longo do tempo, para assim, compreender as perspectivas atuais e observar como este vírus se desenvolverá ao longo do tempo, de um período pré ao pós-vacinal.

MATERIAL E MÉTODOS

A elaboração deste trabalho teve como premissa, realizar uma revisão bibliográfica, com o auxílio de bancos de dados governamentais mundiais e repositórios como Scielo, Pubmed, Organização Mundial da Saúde, Ministério da Saúde e demais espalhados pelos continentes. Os artigos foram selecionados e reunidos a partir das palavras-chave: “SARSCoV-2”, “Infecções por coronavírus”, “Vigilância”, “Epidemias”, “Vírus RNA”, a fim de facilitar a busca por artigos que contribuam para elaboração deste trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O SARS-CoV-2, ou novo coronavírus, é um vírus da família Coronaviridae, envelopado, aproximadamente esférico, que possui genoma de RNA positivo não segmentado de fita simples, codificando quatro proteínas principais: glicoproteína S (Spike), proteína do envelope (E), glicoproteína da membrana (M), e proteína nucleocapsídeo (N) (KHALIL & KHALIL, 2020). Foi isolado pela primeira vez em 1937, mas somente em 1965 foi nomeado de corona quando sua morfologia, em aspecto de coroa, foi observada a partir de uma análise microscópica das proteínas de sua superfície (LIMA, 2020; STEPHENS et al, 2010). Possui menos de 30.000 nucleotídeos em seu genoma, formados por moléculas de ribose, um ácido fosfórico e uma base nitrogenada. A identificação de cerca de 29 proteínas

virais diferentes facilitou a compreensão das estruturas que compõem suas características (UZUNIAN, 2020)

A transmissão se dá a partir da inalação de gotículas e/ou aerossóis, de uma pessoa contaminada, projetados em forma de espirros, tosses ou em procedimentos hospitalares. Depois de inalada, a partícula viral do SARS-CoV-2 se conecta com receptor da célula humana através da proteína Spike que possui afinidade com um receptor proteico humano, chamado ACE2 (Enzima Conversora de Angiotensina 2). Os sintomas clínicos da infecção pelo novo coronavírus também pode variar desde uma Síndrome Gripal (SG), com sinais e sintomas considerados leves como tosse, congestão nasal e fadiga, até uma SRAG, com sintomas adicionais como, saturação de $O_2 \leq 93\%$, frequência respiratória ≥ 30 rpm, pressão arterial de oxigênio (PaO_2) /fração inspirada de oxigênio (FIO_2) < 300 , linfopenia e edema alveolar; 80% de casos leves e assintomáticos. Aproximadamente 49% dos casos críticos desenvolvem insuficiência respiratória, choque séptico chegando a óbito (REINHARDT, 2022; LI et al., 2020; UZUNIAN, 2020; VALVERDE, 2021; BAGGIO et al., 2021; ISER et al., 2020).

À medida que os vírus infectam um indivíduo, circulam livremente em uma população, podem sofrer modificações em suas estruturas durante a multiplicação, gerando novas cepas, linhagens ou ainda variantes virais. As mutações são características que definem a taxa de sobrevivência de vírus compostos por RNA, acumulando-as por cada ciclo de cópia, podendo ocorrer em horas, criando em um único hospedeiro, vários vírus diferentes (GRUBAUGH et al, 2020). Isto pode ser vantajoso do ponto de vista de a variante modificada, originar uma linhagem viral com pouca força ou capacidade de virulência aumentando sua disseminação, ou seja, quanto menos virulento mais transmissível é o vírus, porque é mais fácil transmitir um vírus através de indivíduos assintomáticos, que se sentem bem clinicamente (SOARES, 2020).

Assim sendo, quando uma variante obtém sucesso em suas mutações, ao se difundir para outros países ou continentes, se espalhando para uma grande quantidade de pessoas ela se torna uma linhagem. Todavia, uma linhagem é uma variante, mas nem toda variante se torna uma linhagem, isso porque mesmo que haja mutações, se a linhagem não for capaz de se propagar com eficiência ela desaparece. Variantes muito semelhantes às linhagens de onde se ramificaram o que acaba sendo expresso em sua nomenclatura, são classificadas sublinhagens, sendo acrescentado “.1” ou “.2” para indicar que é da mesma estirpe. Como é o caso das sublinhagens da variante ômicron que recebem o nome BA.1 => BA.1.1; BA.1.2 e assim por diante (BUTANTAN, 2022a).

Já quando é alterado ao menos uma das características observáveis ou fenotípicas de um vírus, são denominadas cepas. Para uma melhor compreensão, é quando uma porção viral desenvolve uma capacidade de transmissão, resposta imunológica ou produz sintomas em um indivíduo que difere dos observados concebidos por seu ascendente (VALVERDE, 2021). Para amparar a compreensão das mutações, as variantes foram classificadas conforme sua importância facilitando a organização das ações no combate às pandemias. A Organização Mundial da Saúde e equipes de especialistas do mundo todo, monitoram as mudanças que ocorrem no vírus, para que se mutações significativas forem identificadas, os países possam ser notificados para adotarem medidas de contenção, para evitarem a propagação de uma nova linhagem (OPAS, 2021).

Conforme descrito por Varela (2022), variantes de interesse têm por definição os vírus que, ao sofrer mutação, desenvolvem uma capacidade maior de transmissão. Ou seja,

segundo a OPAS (2021), é considerada uma variante de interesse, se ao ser comparada à sua variante original, o seu genoma tiver informações capazes de modificar o fenótipo do vírus, se tiver sido causadora de transmissão comunitária, se de outra forma, for avaliada pela OMS como tal, em consonância com grupos de pesquisa sobre a evolução do SARSCoV-2.

Há também as variantes de preocupação. As que foram mais destacadas no mundo todo foram: Alfa, Beta, Gama, Delta e Ômicron. Existe a preocupação de que mutações relacionadas a essas variantes possam provocar um escape do sistema imunológico, doenças mais graves e aumento na transmissibilidade; por isso a importância em se classificar e estudar estas variantes (FOX, 2021a). E por fim, as variantes de alta consequência são as que respondem menos aos imunizantes, causam infecções mais graves e hospitalizações. Até o momento não foram identificadas nenhuma deste gênero (BUTANTAN, 2021b).

A OPAS criou uma rede entre laboratórios de vários países com capacidade de sequenciamento interno e externo com treinamentos e ações de suporte para geração de sequenciamento genômico do SARS-CoV-2. O compartilhamento destas informações na plataforma GISAIID (do inglês, Global Initiative on Sharing All Influenza Data) também é incentivado (OPAS, 2020).

GISAIID é uma plataforma científica iniciada em 2008 após eventos da pandemia da gripe aviária (H5N1) de 2006. A plataforma realiza o compartilhamento de dados entre os Centros Colaboradores da OMS e os Centros Nacionais de Influenza disponibilizando atualizações e recomendações semestrais do vírus da vacina contra a gripe pelo Sistema Global de Vigilância e Resposta à Gripe da OMS (GISRS) e de patógenos correlacionados. Este compartilhamento viabilizou a troca de informações entre os órgãos governamentais e a GISAIID por onde foi possível, por exemplo, o compartilhamento de 125 mil sequências genômicas virais do novo coronavírus (FERREIRA, 2021).

CONCLUSÕES

A capacidade de transmissão do novo coronavírus é inquestionável. Sua virulência e letalidade variam muito dependendo do indivíduo que acomete, entretanto cerca de 20% da população pode desenvolver algumas das formas moderadas, graves ou críticas. Em 2019, o uso de máscaras, o isolamento social e as mudanças na questão de higienização das mãos, tiveram como intuito evitar a disseminação descontrolada do vírus, o que poderia facilitar suas mutações e causar um colapso global nos sistemas de saúde, como foi o caso de alguns países.

O fato de a maioria das mutações acontecerem na estrutura da proteína spike facilitou a criação de uma vacina eficaz no combate a infecção, através de métodos já conhecidos para confecção de vacinas. Com a chegada da vacina em 2021, algumas medidas profiláticas foram sendo desobrigadas. Pensava-se que a vacina poderia impedir, de maneira generalizada a disseminação do vírus. No entanto, mesmo com a facilidade da vacina atualmente, ainda pouco mais de 51% da população brasileira tomaram suas doses reforço para novo coronavírus. Isto pode favorecer o aparecimento de novas variantes, capazes de fugirem da resposta imunológica de um indivíduo vacinado. Uma pessoa não vacinada pode ser um anfitrião caloroso para este tipo de vírus.

A facilidade de serem compiladas cópias mutantes, dentro de uma pessoa, é imensurável e isso pode possibilitar o aparecimento de linhagens mais agressivas. A variante ômicron demonstrou que veio pra ficar, pois a maioria de suas linhagens tende a sofrer

mutações com muita facilidade. Sempre haverá uma forma de os vírus evoluírem, e o SARS-CoV-2 não é tão diferente. Pode ser protelada, mas nunca contida, podendo ou não ser irrelevante.

A ideia de convergência evolutiva deixa claro que existe uma tendência nas mutações de elas surgirem e serem parecidas, mesmo em locais distintos do globo terrestre, sem nunca terem estado próximas. Com isso, é fundamental manter a vigilância genômica, pois pode favorecer a identificação das mutações de forma bem mais rápida e até facilitar a produção de vacinas adaptadas a fim de alcançarem uma imunização mais completa da população.

REFERÊNCIAS

BAGGIO, J. A. O. et al.; Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) Causada por COVID-19: um fator regional. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, Arapiraca, v. 117, n. 5, p. 976-977, 22 nov. 2021. Sociedade Brasileira de Cardiologia. <http://dx.doi.org/10.36660/abc.20210803>.

BUTANTAN, Instituto. A velocidade com que foi criada a vacina da Covid-19 é motivo de preocupação? Especialista do Butantan responde. 2021a. Portal do Butantan. Disponível em: <https://butantan.gov.br/covid/butantan-tira-duvida/tira-duvida-noticias/a-velocidade-com-quefoi-criada-a-vacina-da-covid-19-e-motivo-de-preocupacao-especialista-do-butantan-responde>. Acesso em: 30 nov. 2022.

BUTANTAN, Instituto. Como surgem as variantes da Covid-19: entenda a diferença entre linhagens, sublinhagens e recombinantes. 2022a. Portal do Butantan. Disponível em: <https://butantan.gov.br/covid/butantan-tira-duvida/tiraduvida-noticias/como-surgem-asvariantes-da-covid-19-entenda-a-diferenca-entrelinhagens-sublinhagens-e-recombinantes>. Acesso em: 18 nov. 2022

BUTANTAN, Instituto. Por que acontecem mutações do SARS-CoV-2 e quais as diferenças entre cada uma das variantes. 2021b. Portal do Butantan. Disponível em: <https://butantan.gov.br/noticias/por-que-acontecem-mutacoes-do-sars-cov-2-equais-asdiferencas-entre-cada-uma-das-variantes>. Acesso em: 22 nov. 2022.

BUTANTAN, Instituto. Vacinação está impedindo avanço das variantes da Covid-19 no Brasil, explicam cientistas do Butantan. 2022b. Portal do Butantan. Disponível em: <https://butantan.gov.br/noticias/vacinacao-esta-impedindo-avanco-das-variantes-da-covid-19no-brasil-explicam-cientistas-do-butantan>. Acesso em: 23 nov. 2022.

CORMAN, V. M. et al. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Advances in Virus Research*, New York, v. 100, p. 163-188, 2018. DOI: 10.1016/bs.aivir.2018.01.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065352718300010?via%3Dihub>. Acesso em: 16 nov 2022.

FERREIRA, V. Fiocruz integra plataforma de dados genômicos sobre influenza e novo coronavírus. 2021. Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz. Disponível em:

<https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-integra-plataforma-de-dados-genomicos-sobreinfluenza-e-novo-coronavirus>. Acesso em: 01 dez. 2022.

FOX, Maggie. Ómicron, mu, delta, lambda y otras: una por una, todas las variantes del coronavirus identificadas hasta el momento. 2021a. Cable News Network – CNN Espanha. Disponível em: <https://cnnespanol.cnn.com/2021/11/29/variantes-coronavirus-omicronidentificadas-trax/#0>. Acesso em: 22 nov. 2022.

GRUBAUGH, Nathan D.; PETRONE, Mary E.; HOLMES, Edward C. We shouldn't worry when a virus mutates during disease outbreaks. *Nature*, [S. l.], ano 2020, n. 5, p. 529-530, 18 fev. 2020. DOI <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0690-4>.

ISER, B. P. M.; et al. Definição de caso suspeito da COVID-19: uma revisão narrativa dos sinais e sintomas mais frequentes entre os casos confirmados. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Tubarão, v. 29, n. 3, p. 1-11, abr. 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742020000300018>.

KHALIL, O. A. K.; KHALIL, S. da S. SARS-CoV-2: taxonomia, origem e constituição. *Revista de Medicina*, [S. l.], v. 99, n. 5, p. 473-479, 2020. DOI: 10.11606/issn.1679-9836.v99i5p473-479. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/169595>. Acesso em: 4 nov. 2022.

LI, X. et al. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal Of Pharmaceutical Analysis*, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 102-108, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>.

LIMA, C. M. A. de O. Information about the new coronavirus disease (COVID-19). *Radiologia Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 53, n. 2, p. 5-6, abr. 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-3984.2020.53.2e1>.

MENESES, A. S. de. COVID-19 NATURAL HISTORY AND ITS THERAPEUTIC RELATIONSHIPS. *SciELO Preprints*, 2020. DOI: 10.1590/SciELOPreprints.733. Disponível em: <https://preprints.scielo.org/index.php/scielo/preprint/view/733>. Acesso em: 1 nov. 2022.

OPAS, Organização Pan Americana de Saude -. OMS anuncia nomenclaturas simples e fáceis de pronunciar para variantes de interesse e de preocupação do SARS-CoV-2. 2021. OPAS. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/1-6-2021-oms-anuncia-nomenclaturas-simples-e-faceis-pronunciar-para-variantes-interesse-e>. Acesso em: 18 nov. 2022.

OPAS, Organização Pan Americana de Saude -. Rede Regional de Vigilância Genômica de COVID-19. 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/node/4951/rede-regional-vigilanciagenomica-covid-19>. Acesso em: 23 nov. 2022.

REINHARDT, É. L. Transmissão da COVID-19: um breve reexame das vias de transmissão por gotículas e aerossóis. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, São Paulo, v. 47, p. 1-9, 06 abr. 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2317-6369000000221>.

SOARES, F. COVID-19: É possível matar o que não está vivo? *Ciencia Viva*, 26/07/2020. Disponível em: <https://cidadeverde.com/cienciaviva/109838/covid-19-e-possivel-matar-o-que-naoesta-vivo>. Acesso em: 29 out. 2022.

SOUZA, A. S. R. et al. General aspects of the COVID-19 pandemic. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, Recife, v. 21, n. 1, p. 29-45, fev. 2021. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9304202100s100003>.

STEPHENS, P. R. S. et al. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *Conceitos e Metodos para Formação de Profissionais em Laboratorios de Saúde*. Rio de Janeiro: [s. n.], 2010. v. 4, cap. Virologia, p. 185-186.

UZUNIAN, Armênio. Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, São Paulo, p. 1-4, 25 set. 2020. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/1676-2444.20200053>.

VALVERDE, R. O que são mutações, linhagens, cepas e variantes? Agência Fiocruz de Notícias, Rio de Janeiro, 29, jun. 2021. Disponível em: 36 <https://portal.fiocruz.br/noticia/o-quesao-mutacoes-linhagens-cepas-e-variantes-1>. Acesso em: 01 out 2022.

VARELLA, Drauzio. COVID-19: CONHEÇA OS PRINCIPAIS SINTOMAS DE CADA VARIANTE. 2022. Portal Drauzio Varella - Informação sobre saúde para todos. Disponível em: <https://drauziovarella.uol.com.br/coronavirus/covid-19-conheca-osprincipais-sintomas-de-cadavariante/>. Acesso em: 22 nov. 2022.

DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR: UM PROBLEMA GLOBAL DE SAÚDE PÚBLICA

Maria Marciana Pereira Silva¹; Tatiana Caldas Pereira²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - IAL;
E-mail: mariamarcianapereira47@gmail.com

²Docente/Pesquisadora 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 As Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) ocorre pelo consumo de água e/ ou alimentos contaminados por microrganismos patogênicos ou substâncias químicas. De acordo com o Ministério da Saúde existem mais de 250 tipos de DTHA que podem ser causadas pelo consumo de água e alimentos contaminados por bactérias, vírus e protozoários. A incidência de surtos de DTHA vem aumentando em diversos países, impactando em morbidade, mortalidade e custos econômicos. O Centers For Disease Control Prevention (CDC) dos Estados Unidos (EUA) estimou que os patógenos conhecidos de origem alimentar são responsáveis por 9,4 milhões de casos de DTHA todos os anos nos EUA, entre eles, o norovírus e a *Salmonella* spp. Na União Europeia (UE) o norovírus também é o principal agente etiológico envolvido em surtos de DTHA, assim como no Japão. Diferente dos EUA, UE e Japão, no Brasil e na Coreia, a bactéria *E. coli* é responsável pelo o maior número de surtos de DTHA. Conclui-se que os principais agentes etiológicos envolvidos em surtos de DTHA em diferentes regiões do mundo são norovírus, *Salmonella* spp, *E. coli*, *Campylobacter* spp, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Palavras Chave: Doenças Transmitidas por Alimentos; intoxicação alimentar; zoonoses; segurança alimentar; saúde pública.

INTRODUÇÃO

As Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) ocorrem pelo consumo de água e/ ou alimentos contaminados por microrganismos patogênicos ou substâncias químicas. De acordo com o Ministério da Saúde existem mais de 250 tipos de DTHA que podem ser causadas pelo consumo de alimentos contaminados por bactérias, vírus e protozoários (BRASIL, 2022).

A incidência de surtos de DTHA vem aumentando em diversos países, impactando em morbidade, mortalidade e custos econômicos. Considera-se um surto de DTHA quando duas ou mais pessoas apresentam doença ou sintomas semelhantes após ingerir alimentos contaminados. Para agravos como Cólera, Botulismo e Febre Tifoide a confirmação de apenas um caso já é considerado surto (NYACHUBA, 2010; BRASIL,2022).

Com base no relatório publicado em 2015 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 600 milhões de casos de DTHA foram registrados no ano de 2010 em todo o mundo, e cerca de 350 milhões das notificações estavam relacionadas a ingestão de alimentos e água contaminados por bactérias patogênicas (WHO, 2015).

Vários fatores contribuem para o aumento de surtos de DTHA, entre os quais, se destacam o aumento da população em geral, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, o aumento da urbanização desordenada, a necessidade de produção de alimentos em larga escala, a globalização e o comercialização de produtos alimentícios entre países (ANTUNES *et al.*, 2020).

Os surtos epidemiológicos associados às DTHA são um problema de Saúde Pública que atinge tanto os países desenvolvidos como os países em desenvolvimento. Cada país possui legislações específicas para o monitoramento e controle das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Apesar dos esforços para conter as DTHA, o número de surtos vem crescendo nos últimos anos, afetando diretamente a saúde da população, sobrecarregando os sistemas públicos de saúde, gerando altos custos e impactando diretamente na economia (WHO, 2015). Desta forma, o presente estudo teve como objetivo verificar os principais agentes etiológicos envolvidos em casos e surtos de DTHA em diferentes regiões do mundo.

METODOLOGIA

Trata-se de um estudo de revisão bibliográfica relacionada a surtos de DTHA no Brasil e em diferentes regiões do mundo. Foram consultados artigos científicos nas bases de dados Scielo e Pubmed publicados no período de 2009 a 2022.

Para a busca dos artigos, foram utilizados os descritores: Doenças Transmitidas por Alimentos, intoxicação alimentar, zoonoses, segurança alimentar e saúde pública.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estados Unidos (EUA)

Nos Estados Unidos, o Centers For Disease Control Prevention (CDC) usou dados da vigilância ativa e passiva e outras fontes para estimar que patógenos conhecidos de origem alimentar são responsáveis por 9,4 milhões de casos de DTHA todos os anos no país (DEWEY-MATTIA *et al.*, 2018).

O norovírus é o agente etiológico responsável pelo maior número de casos de DTHA nos EUA, apesar de apresentar baixa letalidade, no período de 2009 a 2015, foram registrados 1.130 surtos, 27.623 doentes e sete mortes. A *Salmonella* spp, é o segundo agente etiológico mais incriminado em surtos de DTHA no país. No período de 2009 a 2015, foram notificados 896 surtos, com 23.662 doentes, e de três a quatro mortes todos os anos (DEWEY-MATTIA *et al.*, 2018).

Nos EUA no período de 2009 a 2015, foram notificados 191 surtos de DTHA relacionados à contaminação por *E.coli*. Dentre estes, 2.387 indivíduos ficaram doentes, ocorreram 672 hospitalizações e 12 mortes (DEWEY-MATTIA *et al.*, 2018).

O número de surtos causados por *Listeria monocytogenes* no período de 2009 a 2015 nos EUA foi baixo quando comparado com os outros patógenos envolvidos em surtos de DTHA no mesmo período. Entretanto, a taxa de mortalidade foi mais alta, com 74 mortes (DEWEY-MATTIA *et al.*, 2018).

C. jejuni casou 140 surtos, 2.095 doentes e uma morte no período 2009 a 2015 nos EUA. *Clostridium perfringens* causou 108 surtos, 5.510 doentes, 16 hospitalizações e quatro mortes, nesse mesmo período. O vírus da hepatite A foi o segundo agente viral com maior número de surtos de DTHA nos EUA, foram notificados 15 surtos, 260 indivíduos doentes e 170 hospitalizações. Dos agentes parasitários, o *Cryptosporidium* spp foi o parasita que

mais casou surtos no país, foram notificados 10 surtos, com 160 doentes e seis hospitalizações (DEWEY-MATTIA *et al.*, 2018).

União Europeia (UE)

O norovírus é uma das principais causas de doenças alimentares na UE, chegando a 15 milhões de casos todos os anos, juntamente com *Campylobacter jejuni* com mais de 5.000 milhões de casos. Relatórios do Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) da UE, apontam que *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* spp são os patógenos bacterianos que mais causam surtos de DTHA na União Europeia. No período de 2012 a 2020, os casos de *C. jejuni* pelo consumo de carne de frango permaneceu alto entre os países europeus. Somente em 2020, percebe-se uma redução do número de casos. Os casos de *Salmonella* spp também aumentaram no período 2014 a 2016 na UE, em 2014 foram 88.715, em 2018 são 91.857 casos registrados e 2020 os números reduziram para 52.702 (ECDC, 2014; ECDC, 2016; ECDC, 2018; ECDC, 2020).

A *E. coli* produtora da toxina shiga (STEC) e a *Yersinia enterocolitica* foram a terceira causa mais frequente de infecções bacterianas de origem alimentar na UE. No período de 2014 a 2020, os casos de DTHA por *E. coli* e *Y. enterocolitica* se mantiveram estáveis na Europa (ECDC, 2014; ECDC, 2016; ECDC, 2018; ECDC, 2020).

A *Listeria monocytogenes* é responsável pelos casos mais graves de DTHA na UE, listeriose é a doença de origem alimentar associada ao maior número de mortes, no período de 2014 a 2020, foram relatadas 853 mortes pela bactéria, seguido de *Salmonella* spp com cerca de 334 mortes (ECDC, 2014; ECDC, 2016; ECDC, 2018; ECDC, 2020).

Com relação as doenças parasitárias, *Trichinella spiralis* é o agente parasitário com maior número de notificações no período verificado, com um total de 603 indivíduos doentes, 205 hospitalizações e duas mortes em 2014 na UE (ECDC, 2014; ECDC, 2016; ECDC, 2018; ECDC, 2020)

Japão

No Japão, no período de 2014 a 2018 foram notificados 1.132 surtos de DTHA com 19.214 doentes. A maioria dos surtos de DTHA no Japão (40%) são originados por alimentos contaminados por bactérias. Os patógenos *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Clostridium botulinum* e *Vibrio parahaemolyticus* são os principais microrganismos envolvidos em casos de DTHA no Japão. Um estudo feito no período de 2000 a 2018 mostra que o número de casos de DTHA com o envolvimento de *Salmonella* spp, *S. aureus* e *E. coli* diminuiu no país. O norovírus e *Campylobacter* spp foram os agentes com o maior número de casos de DTHA no Japão no período de 2000 a 2018. *Clostridium perfringens*, diferente dos outros países apresenta um número relativamente alto de casos no Japão (LEE *et al.*, 2021).

Coréia

Diferente dos outros países, na Coréia a *Escherichia coli* no período de 2016 a 2022, foi o patógeno responsável pelo maior número de surtos de DTHA com um total de 6.265 casos. O norovírus no mesmo período foi o patógeno viral mais envolvido em surtos de origem alimentar no país, com 3.573 notificações. Em 2018, os casos de DTHA relacionados com *Salmonella* spp aumentaram 10 vezes quando comparado aos casos notificados em 2016. *Staphylococcus aureus*, embora apresente um aumento no número de casos, em 2016 foram notificados quatro surtos e em 2022 foram registrados 111 casos, ainda assim, é o

patógeno bacteriano com menor número de casos de DTHA na Coreia. Todos os dados podem ser observados na Tabela 3 (COREA, 2022).

Brasil

No Brasil, a vigilância de surtos de DTHA teve início em 1999. Os surtos de DTHA constituem eventos de saúde pública que representa uma ameaça à saúde da população. A Resolução RDC de nº724 de 01 de julho de 2022 dispõe sobre os padrões microbiológicos para os alimentos e suas aplicações e a Instrução Normativa IN de nº161 de 01 de julho de 2022 estabelece os padrões microbiológicos para os alimentos (BRASIL, 2022).

No período de 2012 a 2021 foram notificados no Brasil, 6.347 surtos de DTHA com 610.684 indivíduos expostos, 104.843 doentes, 13.446 hospitalizações e 89 mortes. Destes, somente em 1.559 foi possível realizar a identificação do agente etiológico envolvido. *Escherichia coli* foi responsável pelo maior número de surtos correspondendo a 29,6% dos casos, seguido dos patógenos *Staphylococcus aureus* 12,9%, *Salmonella* spp 11,2% e *Bacillus cereus* 7,2%. Os demais agentes etiológicos registrados nesse período foram norovírus 5,2%, rotavírus 4,4%, *Clostridium perfringens* 3,0%, *E. coli* Enteropatogênica (EPEC) 2,8%, *T. cruzi* 2,0%, *Shigella sonnei* 1,7%, vírus da hepatite 1,5% e outros 13,7% (BRASIL, 2022).

Diferente do Brasil e da Coreia em que a *E. coli* é a principal causa de surtos de DTHA, nos Estados Unidos, o norovírus lidera o número de casos de DTHA. No período de 2009 a 2015 foram 1.130 surtos, 27.623 doentes e sete mortes pelo vírus nos EUA. O mesmo cenário pode ser observado na União Europeia, o número de casos de DTHA por norovírus chega a 15 milhões todos os anos. No Japão o norovírus é o agente viral associado ao maior número de casos de DTHA. O número de surtos por norovírus no Brasil, de 2012 a 2021 corresponde a 89 (5,2%) de casos. Na Coreia o norovírus é a segunda maior causa de surtos de DTHA, de 2016 a 2022 foram notificados 3.705 casos (BRASIL, 2022; COREIA, 2022; DEWEY-MATTIA *et al.*, 2018; ECDC, 2015; LEE *et al.*, 2021).

O número de mortes relatadas no Brasil causadas por DTHA no período de 2012 a 2021 consistiu em 89 mortes. A maioria dos óbitos, 15, foram causados por *E.coli*, seguido de *Salmonella* spp com quatro mortes e *Salmonella* Enteritidis com uma morte, *S. aureus* três mortes, *Shigella flexneri* uma morte e uma morte relatada por *Shigella* spp. *Listeria monocytogenes* causou quatro mortes em 2021 e *Clostridium botulinum* três mortes. Em 2018 o consumo de água contaminada acarretou um surto de hepatite A com sete indivíduos doentes e sete mortes na região Sudeste do Brasil. Uma morte foi relatada em 2019 por *Trypanosoma cruzi*. Entretanto, o agente etiológico na maioria das notificações de óbitos no período de 2012 a 2021 no Brasil não foram identificados, dos 89 óbitos relatados, em 49 o agente etiológico não foi identificado (BRASIL, 2022).

Apesar da comprovada relação das várias doenças pela ingestão de alimentos e água contaminados no Brasil com número de surtos e doentes apresentados, pouco se conhece a real dimensão do problema, devido à falta de dados. O número de notificações de surtos de DTHA no Brasil é muito menor quando comparado a outras partes do mundo como União Europeia e Estados Unidos, porém, não significa que o número de casos seja expressivamente maior nesses países, mas que possivelmente a vigilância epidemiológica seja mais estruturada e que essa diferença seja referente as subnotificações da doença (BRASIL, 2022).

A investigação de surtos de DTHA no Brasil ocorre com base na confirmação dos critérios clínico epidemiológico para o esclarecimento do caso, no entanto, a partir de 2012 nota-se uma pequena redução desse critério na conclusão de investigações de surto de DTHA (28%) e, conseqüentemente o aumento de casos inconclusivos (40%). O critério laboratorial

clínico bromatológico ideal para identificação dos agentes etiológicos envolvidos nos surtos, se manteve estável nesse período, porém baixo (5%), sendo possível observar que a maior parte dos surtos o agente etiológico não foi possível ser identificado (BRASIL, 2022).

Ainda que a investigação dos surtos de DTHA pelo o critério clínico epidemiológico permita uma alta identificação do número de casos, o critério laboratorial é extremamente importante para o encerramento dos surtos, porque possibilita traçar um perfil epidemiológico dos agentes etiológicos circulantes, com maior prevalência em surtos de DTHA, possibilitando melhores ações de diagnóstico, prevenção e controle (BRASIL, 2022).

CONCLUSÃO

Com base nas informações obtidas nesse estudo, conclui-se que os principais agentes etiológicos envolvidos em surtos de DTHA em diferentes regiões do mundo são norovírus, *Salmonella* spp, *E. coli*, *Campylobacter* spp, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Os principais patógenos envolvidos em surtos de DTHA em países desenvolvidos são norovírus, *Campylobacter jejuni*, e *Salmonella* spp. Com relação a países em desenvolvimento, a *E. coli* e *Salmonella* spp são as causas mais frequentes de surtos. A *Salmonella* spp e *E. coli* são uma preocupação de saúde pública em países de alta e baixa renda. Os patógenos responsáveis pelo o maior número de mortes de DTHA no Brasil no período de 2012 a 2021 são *E. coli* e *Salmonella* spp.

Considerando o índice de casos de DTHA em diferentes regiões do mundo, e o impacto que essas doenças podem causar principalmente em países em desenvolvimento, com maior situação de vulnerabilidade, destaca-se a importância dos estudos sobre as DTHA para ações e medidas de controle sejam adotadas por Autoridades Sanitárias.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, P.; NOVAIS, C.; PEIXE, L. Food-to-Humans Bacterial Transmission. **Microbiology Spectrum**, v. 8, n. 1, p. 8.1.1, 16 jan. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. DTHA**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/dtha>>. Acesso em: 28 fev. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução – RDC N° 724, de 1° de julho de 2022. Dispõe sobre os padrões microbiológicos e suas aplicações. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 jul. 2022. Disponível em < <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-724-de-1-de-julho-de-2022-413364812> > Acesso em: 20 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Instrução Normativa – IN N° 161, de 1° de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 06 jul.2022. Disponível em > <https://in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880> >Acessado em: 20 nov. 2022

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar informe 2022**. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis Coordenação-Geral de Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes>> Acesso em: 26 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Banco de Dados de Surtos de DTHA-2000 a 2021**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/dtha>>. Acesso em: 12 out. 2022.

CORÉIA. **Estatísticas de intoxicação alimentar: país de segurança alimentar**. Disponível em: <https://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/healthyfoodlife/foodPoisoningStat.do?menu_no=3724&menu_grp=MENU_NEW02>. Acesso em: 29. 2022.

DEWEY-MATTIA, Daniel; MANIKONDA, Karunya; HALL, Aron J.; *et al.* Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks — United States, 2009–2015. **MMWR Surveillance Summaries**, v. 67, n. 10, p. 1–11, 2018.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. **EFSA Journal**, v. 13, n. 12, p. 4329, 2015. Disponível em: <<https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2015.4329>> Acesso em: 20 nov. 2022.

ECDC. European Centre For Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal**, v. 15, n. 12, p. e05077, 2017. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2017.5077> > Acesso em: 20 nov. 2022.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-union-one-health-2018-zoonoses-report>>. Acesso em: 7 dez. 2022.

ECDC. European Centre For Disease Prevention and Control. European Food Safety Authority. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 19, n. 12, 2021. Disponível em: <<https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2021.6971>>. Acesso em: 7 dez. 2022.

LEE, H.; YOON, Y. Etiological Agents Implicated in Foodborne Illness World Wide. **Food Science of Animal Resources**, v. 41, n. 1, p. 1–7, jan. 2021.

NYACHUBA, D. G. Foodborne illness: is it on the rise?: Nutrition Reviews, Vol. 68, No. 5. **Nutrition Reviews**, v. 68, n. 5, p. 257–269, 28 abr. 2010.

SWITAJ, T. L.; WINTER, K. J.; CHRISTENSEN, S. R. Diagnosis and Management of Foodborne Illness. **American Family Physician**, v. 92, n. 5, p. 358–365, 1 set. 2015.

WHO. World Health Organization. **Estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. Geneva, p 72. 2015. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>>. Acesso em: 16 out. 2022.

VIGILÂNCIA LABORATORIAL DOS ENTEROVÍRUS JUNTO AOS REFUGIADOS/REPATRIADOS ADVINDOS DE ÁREAS DE CIRCULAÇÃO DE POLIOVÍRUS – 2022

Kelly Eduarda da Silva Sanches¹; Bráulio Caetano Machado²; Rita de Cássia Compagnoli Carmona²

¹Estudante do Curso de Especialização Adolfo Lutz – Núcleo de Doenças Entéricas/Centro de Virologia – Instituto Adolfo Lutz (NDE/CV-IAL); kellyeduarda.98.ke@gmail.com

²Docente/pesquisador do NDE/CV – IAL; rita.carmona@ial.sp.gov.br

Resumo: A paralisia flácida aguda (PFA) é a apresentação clínica mais comum da infecção ocasionada pelo poliovírus 1, 2 e 3 (poliomielite). Em 1994 o Brasil recebeu da Organização Mundial de Saúde (OMS)/Organização Panamericana de Saúde (OPAS), a Certificação de área livre de circulação do Poliovírus Selvagem do seu território. À baixa taxa da cobertura vacinal e com a chegada de refugiados/repatriados de áreas com circulação do vírus, o Brasil corre risco de reintrodução do poliovírus. O objetivo deste estudo foi descrever os sorotipos de enterovírus não pólio (EVNP) a partir da vigilância dos poliovírus, fazendo a caracterização genotípica dos materiais de fezes de todo refugiado/repatriado positivo para EVNP, a fim de aumentar a sensibilidade da rede no Estado de São Paulo. As amostras de fezes foram sujeitas ao rastreamento de poliovírus pelo laboratório Instituto Oswaldo Cruz (IOC) - FIOCRUZ, a partir deste resultado, as amostras que deram positivas para ENVP foram submetidas à genotipagem pelo Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz (NDE/CV/IAL) utilizando os métodos de purificação e suspensão fecal, transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase convencional (RT-snpPCR) para detecção do EVNP e reação de sequenciamento plataforma Sanger para determinação dos genótipos de EVNP. Foram recebidas pelo NDE/CV/IAL 340 amostras de fezes, os EVNP foram detectados em 5,3% (n=18/340) das amostras analisadas, destas 55,5% (N=10/18) foram detectadas e genotipadas, correspondendo ao CVA8 o tipo mais identificado, seguidos por E14, CVA19, E21 e EV-B84. Os dados obtidos contribuem para o conhecimento de quais EVNP estão circulando entre refugiados/repatriados durante janeiro a outubro de 2022 no Estado de São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: enterovírus; enterovírus não pólio; paralisia flácida aguda; poliomielite; poliovírus

INTRODUÇÃO

Paralisia Flácida Aguda (PFA) é a manifestação clínica mais comum das infecções causadas pelo poliovírus 1, 2 e 3 (PV) conhecida como poliomielite. O vírus pertence ao gênero *Enterovirus* (EV), família *Picornaviridae*, ordem *Picornavirales*. A família

atualmente consiste em 158 espécies agrupadas em 68 gêneros. O gênero *Enterovirus* consiste em 15 espécies. Os EVs que infectam humanos são classificados em quatro espécies (*EV-A*, *EV-B*, *EV-C* e *EV-D*) (Tabela 1). Os sorotipos do poliovírus se encontram na espécie C. Espécie *EV-B* tem sido descrito como principais agentes causadores de infecções do sistema nervoso (SNC) e meningite asséptica (MA). Entre esses tipos, os mais comuns são coxsackievirus B (CVB); coxsackievirus A9 (CVA9); echovirus (E) 4, 6, 9, 11, 13, 18, e 30 (CARMONA, R. de C.C, *et al.*, 2020; HARVALA, H. *et al.*, 2018; ICTV, 2020; RACANIELLO, V. R., 2006).

Após o controle dos PV os EVNP emergiram, causando surtos com manifestações clínicas muito similares à PFA, por isso o conhecimento desses vírus contribui para um diagnóstico diferencial, além de detectar e dar respostas a surtos.

OBJETIVO

O objetivo do trabalho é rastrear os enterovírus não pólio a partir da vigilância dos poliovírus, fazendo a caracterização genotípica dos materiais de fezes de todo refugiado/repatriado positivo para EVNP a fim de aumentar a sensibilidade da rede no Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi realizado com 340 amostras fecais coletadas de refugiados/repatriados menores de 21 anos de idade, advindos de áreas de circulação de poliovírus, no período de janeiro a outubro de 2022.

A demanda de amostras foi estabelecida pela Nota Técnica Conjunta Nº 3/2022 (SES-SP/CCD/CVE/DDTHA/DVIMUNI/DVRESP/CIEVS-SP, 2022). As amostras fecais foram recebidas pelo Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz (NDE/CV/IAL), Laboratório de Referência para os Enterovírus no estado de São Paulo e ponto focal da vigilância da PFA/Poliomielite, em seguida encaminhadas ao Laboratório de Referência Nacional das PFA/Poliomielite, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro-RJ, para realização do diagnóstico laboratorial de poliovírus, conforme algoritmo preconizado pela OMS. Foram identificadas 18 amostras de fezes caracterizadas previamente como EVNP pelo IOC-FIOCRUZ, destas, 10 foram tipadas por caracterização molecular de genótipos de enterovírus pelo NDE/CV/IAL.

As amostras fecais estocadas a temperatura de -20°C foram preparadas de acordo com a metodologia descrita em *Polio Laboratory Manual 2004* (WHO, 2004). Aproximadamente dois gramas de fezes foram adicionados a 10mL de uma solução tampão fosfato estéril, pH 7,4. As amostras foram agitadas e submetidas ao processo de centrifugação durante 60 minutos a 10.000xg em centrífuga refrigerada a 4°C. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e tratados com solução de penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100ug/mL) por 30 minutos. Após este período os sobrenadantes foram estocados a baixas temperaturas -70° C até a realização dos testes.

O ssRNA dos EVNP foi extraído diretamente da suspensão fecal purificada,

utilizando extrator automático Loccus, Kit – Extracta Fast 96 ou extração manual feita com o Kit Bio Gene ou Kit Qiamp viral RNA mini, de acordo com instruções do fabricante. A reação da transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase convencional (RT-snPCR) foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Nix, Oberste e Pallansch, (2006); WHO, (2015). A visualização dos produtos amplificados foi obtida por eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com corante de ácido nucleico (*Gel Red® Nucleic Acid Stain - Biotium, INC., CA, USA*). 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. Após eletroforese os produtos amplificados foram observados em transiluminador de luminescência ultravioleta e o resultado captado pelo sistema de fotodocumentação digital UV Transilluminator, UVP Laboratory Products. A imagem salva foi impressa, analisada e arquivada.

Os produtos da RT-snPCR foram submetidos à reação de sequenciamento genômico pelo método de dideoxinucleotídeo, SANGER, F.; NICKLEN, S; COULSON, A.R. (1977), utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems®), com termociclagem de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Foram utilizados os mesmos *primers* da reação de RT-snPCR. O produto de sequenciamento foi precipitado utilizando o método de acetato e etanol. Os produtos precipitados foram ressuspensos em 10µL de formamida Hi-Di® (Applied Biosystems®, Inc., USA) foram analisados no sequenciador automático modelo Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), utilizando o polímero POP-7® (Applied Biosystems®, Inc., USA).

As sequências dos genes obtidas foram editadas manualmente utilizando o programa Sequencher 4.7 (Gene Codes Corporation, Michigan, USA), para obtenção de sequências consensos. A ferramenta *Enterovirus Genotyping Tool version 0.1* disponível no site <http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool> foi utilizada para confirmação dos genótipos de EVNP (Kroneman *et al.*, 2011).

O TCC faz parte do Projeto de Pesquisa sob coordenação da Pesquisadora Científica Dra. Rita de Cássia Compagnoli Carmona, com aprovação quanto aos aspectos éticos pelo Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e aprovação quanto ao mérito científico pelo Conselho Técnico Científico (CTC) do IAL - cadastro CTC 35-I /2016.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os resultados positivos para EVNP disponibilizados pelo laboratório IOC-FIOCRUZ, 55,5% (n=10/18) foram caracterizados por sequenciamento genômico pelo NDE/CV/IAL (Tabela 1).

Os EVNP foram detectados em 5,3% (n=18/340) das amostras analisadas. 93,5% (n=318/340) negativas, n=4/340 (1,2%) poliovírus vacinal tipo 1 e 3, conforme representado no gráfico 1.

Dentre 5,3% (n=18/340) dos EVNP detectados, 55,5% (n=10/18) são genótipos caracterizados pelo NDE/CV/IAL. Cinco tipos distintos de EVNP foram identificados. CVA8 espécie *EV-A*, foi o tipo mais comumente identificado (60%, n=6/10) seguido por

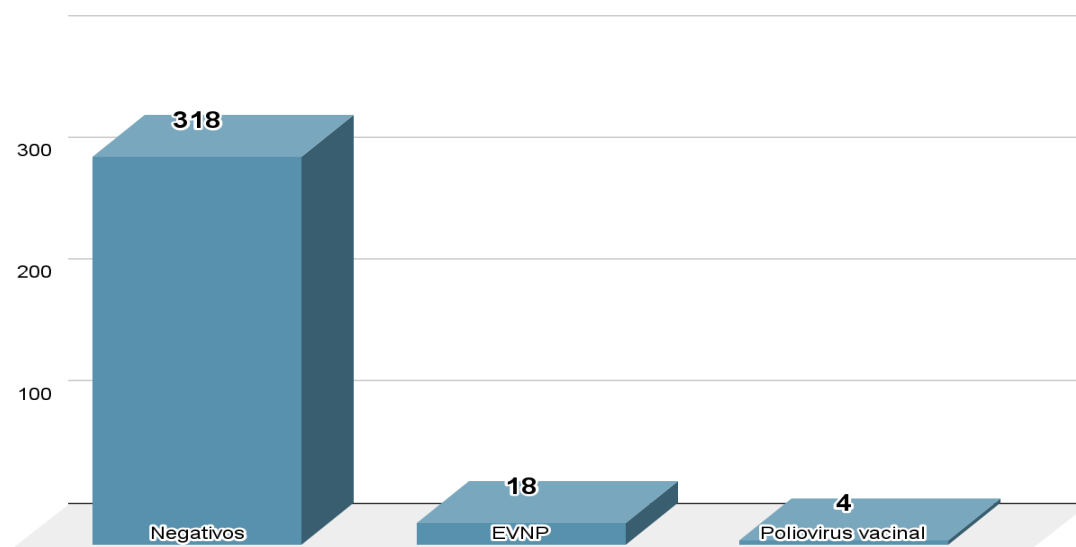
E14 espécie *EV-B*, CVA19 espécie *EV-C*, E21 espécie *EV-B*, e EV-B84 espécie *EV-B*, cada um (10%, n=1/10) de acordo com o gráfico 2.

Tabela 1. Amostras com identificação do genótipo pelo laboratório NDE/CV/IAL

Amostras	Resultado FIOCRUZ	Genotipagem NDE/IAL	Idade	em	Sexo
1	EVNP	CVA8	6	Anos	F
2	EVNP	CVA8	4	Anos	M
3	EVNP	CVA8	3	Anos	M
4	EVNP	CVA8	6	Anos	M
5	EVNP	CVA8	1	Ano	M
6	EVNP	CVA8	1	Ano	F
7	EVNP	CVA19	4	Anos	F
8	EVNP	E14	2	Anos	F
9	EVNP	E21	1	Ano	M
10	EVNP	EV-B84	1	Ano	F
11	EVNP	TNR	4	Anos	F
12	EVNP	TNR	10	Anos	F
13	EVNP	TNR	7	Anos	F
14	EVNP	TNR	3	Anos	F
15	EVNP	TNR	4	Anos	F
16	EVNP	TNR	1	Ano	M
17	EVNP	TNR	18	Anos	F
18	EVNP	TNR	5	Anos	M
19	Poliovírus Vacinal tipo 1 (Sabin Like 1 - SL1)	NR	1	Ano	F
20	Poliovírus Vacinal tipo 3 (Sabin Like 3 - SL3)	NR	2	Meses	M
21	Poliovírus Vacinal tipo 1 (Sabin Like 1 - SL1)	NR	7	Meses	F
22	Poliovírus Vacinal tipo 3 (Sabin Like 3 - SL3)	NR	5	Anos	F

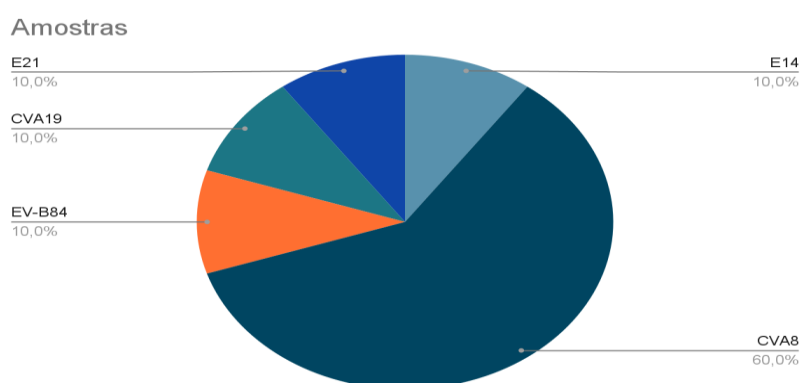
Fonte: NDE/CV/IAL - IOC/FIOCRUZ. TNR – Tipagem não Realizada. NR – Não Realizado. RD - Rabdomiossarcoma Humano. F – Feminino. M – Masculino.

Gráfico 1 - Amostras de refugiados/repatriados menores de 21 anos entre janeiro a outubro de 2022



Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 2 - Genótipos de EVNP caracterizados por sequenciamento genômico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos neste estudo foram coletados de um grupo que não possui sintomas, com o objetivo de rastrear quais sorotipos de EVNP estão em circulação, diante da presença de pessoas advindas de área de circulação de poliovírus. É importante fazer o rastreamento dos EVNP, devido ao aumento dos casos de PFA ocasionados por esses vírus, relatando que nessa população estudada está ocorrendo à circulação de EVNP.

Diante da vigilância dos poliovírus no Brasil, os materiais coletados foram fezes, e por serem pessoas assintomáticas, que não possuem manifestações clínicas, não foi necessária a coleta de outro tipo de material biológico mais invasivo. Em casos de infecções neurológicas, as amostras de fezes e respiratórias têm sido consideradas as mais

convenientes para serem submetidas ao teste de EV, além de LCR e sangue (CARMONA, R. de C.C, *et al.*, 2020).

O coxsackievirus e echovirus foram relacionados a surtos com comprometimento motor (DIAS, A. P. M., 2018). O coxsackievirus A8 (CVA8), pertence à espécie *EV-A* foi o mais encontrado neste estudo, tem um perfil de causar doença febril, doença de mão pé boca, herpangina (HA), mas ocasionalmente levam a distúrbios neurológicos graves, como PFA. Em 2012 na Tailândia, o CVA8 foi a causa mais prevalente de HA. (SONG, Y. *et al.*, 2020). O coxsackievirus A19 (CVA19) pertence à espécie *EV-C*, e tem sido associado a casos de doenças respiratórias e gastrointestinais, meningite asséptica, gastroenterite, PFA e enterite aguda (Yi, L., Zhang, L., Feng, L. *et al.*, 2022).

O enterovirus B84 (EV-B84) pertence à espécie *EV-B*, causa viral mais comum de miocardite aguda, paralisia flácida aguda e meningite asséptica. A taxa de isolamento do vírus é extremamente baixa e não é um sorotipo prevalente no mundo. O primeiro relato do vírus na China foi de um paciente com PFA em 2004 (ZHENG, H. *et al.*, 2016).

O echovirus 14 (E14) pertence à espécie *EV-B* está associado a casos de síndrome gastrointestinal, meningite asséptica, paralisia, necrose hepática neonatal fatal, o genótipo também é considerado raro (CHEN, P. *et al.*, 2017). O echovirus 21 (E21) pertence à espécie *EV-B*, este genótipo não possui muitos isolados, mas já foi isolado de um paciente com PFA (LIU, H. *et al.*, 2020).

No Brasil, um estudo de 1.215 amostras de paciente com suspeita de doenças infecciosas do SNC, realizado no Estado de São Paulo entre 2004 a 2014 por CARMONA, R. de C.C, *et al.* (2020), identificou o E14 que foi associado a doença meningite asséptica (MA), e o E21 associado a meningoencefalite, ambos encontrados em (0,6%; n = 1/176) amostras positivas. E-6 foi o mais comumente identificado, seguido E-30; E18; CV-B5; E4; E11; CVB2 e E9; E7; CVA9, CVB1, CVB3, CVB4, E13, E14 e E21. Segundo CARMONA, R. de C.C, *et al.* (2020) no Brasil os EVs foram detectados durante todo o ano e a variação sazonal é mais proeminente durante a primavera, já o pico de ocorrência foi no verão.

As amostras são de refugiados, sendo assim, esses genótipos podem ser comuns em seu país de origem, a chegada ao Brasil pode aumentar a probabilidade da introdução de genótipos não circulantes.

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados de EVNP (CVA8, CVA19 E14, E21 e EV-B84), demonstram conhecimento de quais genótipos estão circulando entre refugiados/repatriados assintomáticos durante janeiro a outubro de 2022 no Estado de São Paulo, Brasil, demonstrando o perfil de circulação silenciosa dos EVs, que podem sofrer mutações até causarem manifestações clínicas mais graves, e em grandes surtos essas doenças podem ter uma grande proporção. Os achados não foram de casos de PFA, mas estudos anteriores relacionaram esses genótipos a casos de PFA. A vigilância epidemiológica e laboratorial tem feito um papel de extrema importância no controle e no rastreamento dos EVNP, a partir da grande comoção que a poliomielite tem causado com o risco de reintrodução no país, porém, vemos que outros agentes estão circulando com potencial de causar PFA e a probabilidade

da introdução de novos genótipos no Brasil. Outros estudos precisam ser feitos para que os EVNP não venham causar grandes surtos semelhantes aos poliovírus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colegas Adriana Jorge, Amanda Dias, Antônio Erculiani, Daniele de Moraes, Fabricio Caldeiras, Gabriel Ferreira, Gisele Nemer e Lucas Leme do Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz (IAL), que realizaram o diagnóstico dos Enterovírus Não Pólio, a Divisão de Doenças e Transmissão Hídrica e Alimentar, Centro de Vigilância Epidemiológica, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo e o Laboratório de Enterovírus, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, Ministério da Saúde.

REFERÊNCIAS

CARMONA, R. de C.C, et al. Distribution of species enterovirus B in patients with central nervous system infections in São Paulo State, Brazil. *Journal of Medical Virology*. v. 92, ed. 12, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jmv.26131>>. Acesso em: 02 nov. 2022.

HARVALA, H. *et al.* Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. In: *Journal of Clinical Virology*. v. 101, p. 11-17, abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.01.008>>. Acesso em: 22 nov. 2022.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES EXECUTIVE COMMITTEE. The new scope of virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. *Nat Microbiol*. v. 5, ed. 5, p. 668-674, 2020. Disponível em: <[doi: 10.1038/s41564-020-0709-x](https://doi.org/10.1038/s41564-020-0709-x)>. Acesso em: 10 nov. 2022.

RACANIELLO, V. R. One hundred years of poliovirus pathogenesis. In: *Virology*. v. 344, ed. 1. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.015>>. Acesso em: 05 nov. 2022

SANGER, F.; NICKLEN, S; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. ed.12, v. 74, p.5463-7. 1977.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS – CCD. CENTRO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA “PROF. ALEXANDRE VRANJAC”. DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR – DDTHA. DIVISÃO DE IMUNIZAÇÃO – DVIMUNI. DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO RESPIRATÓRIA – DVRESP. CENTRO DE INFORMAÇÕES ESTRATÉGICAS EM VIGILANCIA EM SAÚDE –CIEVS-SP. NOTA CONJUNTA Nº 3/2022 – DDTHA/CIEVS-SP/DVIMUNI/DVRESP/CVE/CCD/SES-SP. Alerta para risco de reintrodução da poliomielite no Brasil e recomendações para ações de Vigilância Epidemiológica das Paralisias Flácidas Agudas (PFA) junto aos refugiados/repatriados advindos de áreas de circulação de poliovírus (selvagem e/ou derivado vacinal). São Paulo, 2022.

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.

NIX, W.A.; OBERSTE, M.S; PALLANSCH, M.A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* v. 44, p. 2698–2704, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Enterovirus surveillance guidelines: Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative, Geneva. World Health Organization; 2015. p.1-46.

SANGER, F.; NICKLEN, S; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ed.12, v. 74, p.5463-7. 1977.

KRONEMAN, A. *et al.* An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *Journal of Clinical Virology.* v. 51, ed. 2, p. 121-5. jun. 2011. Disponível em: . Acesso em: 25 nov. 2022.

DIAS, A. P. M. Avaliação de um protocolo visando o diagnóstico rápido dos enterovírus associados a casos de paralisia flácida aguda. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

SONG, Y. *et al.* Genetic Diversity Analysis of Coxsackievirus A8 Circulating in China and Worldwide Reveals a Highly Divergent Genotype. *Viruses.* v. 12, ed.10, p.1061, set. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/10/1061>> . Acesso em: 25 dez. 2022.

ZHENG, H. *et al.* Isolation and Characterization of a Highly Mutated Chinese Isolate of Enterovirus B84 from a Patient with Acute Flaccid Paralysis. *Sci Rep.* v. 6, n. 31059, ago. 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep31059>> . Acesso em: 26 nov. 2022.

CHEN, P., *et al.* Filogeografia evolutiva e padrão de transmissão do echovirus 14: uma exploração da dinâmica espaço-temporal com base na vigilância da paralisia flácida aguda de 26 anos em Shandong, China. *BMC Genomics.* v. 18, n. 48, jan. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12864-016-3418-3>>. Acesso em: 27 nov. 2022.

LIU, H. *et al.* Caracterização de uma nova cepa de echovirus 21 isolada de uma criança saudável na China em 2013. *Arch Virol.* v. 165, p. 757–760, jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00705-019-04506-4>> Acesso em: 25 nov. 2022.

ESTUDO DESCRITIVO DA FEBRE DE CHIKUNGUNYA NO BRASIL (2017 – 2022) COM RECORTE PARA O ESTADO DE SÃO PAULO (2015 – 2022)

Jacqueline Barbosa Mendonça de Oliveira¹; Gabriela Bastos Cabral²

¹ Pós-graduanda em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública, Vigilância Epidemiológica, Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de Santos (SP); e-mail: oli.jbar@gmail.com

² Mestra em Biomedicina do Núcleo de Ciências Biomédicas, Instituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratório Regional de Santos (SP)

Resumo: A Febre de Chikungunya se caracteriza como uma síndrome febril de início súbito, com artralgias intensas, evolução debilitante e possibilidade de cronificação. No Brasil a circulação do vírus do Chikungunya foi registrada em 2014 e atualmente está presente em todas as Unidades Federativas, sendo o país das Américas com o maior número de casos de dengue e Chikungunya. Em 2021 ocorreu um surto no estado de São Paulo (ESP), com 98% dos casos confirmados concentrados na Região Metropolitana da Baixada Santista (RMBS). Esse trabalho tem como objetivo evidenciar a flutuação de casos confirmados do vírus da Febre de Chikungunya no Brasil, com recorte para o estado de São Paulo. Os dados foram coletados em plataformas de domínio público *on-line* (DataSUS e CVE). Foram calculados e representados cartograficamente os coeficientes de incidência do agravo tanto para o país, quanto para o ESP. No período estudado o Brasil apresentou 627.149 casos confirmados, concentrando mais de 50% nos anos de 2017 e 2022. A região nordeste apresentou maior número de casos, seguida pela região sudeste. As características epidemiológicas predominantes foram “sexo feminino, faixa etária de 20 a 39 anos, e raça parda”. No período estudado o ESP apresentou um total de 18.262 casos confirmados, destes 80% concentrados no ano de surto, 2021. Dos dez municípios do ESP com maior número de casos (81,10% do total) cinco correspondem a municípios localizados na RMBS. O agravo se configura como um obstáculo para a saúde pública, permanecendo necessários investimentos na estrutura de vigilância sanitária e epidemiológica, na promoção em saúde, no saneamento básico e na educação.

Palavras-chave: Vírus Chikungunya; Mapeamento geográfico; Epidemiologia descritiva; Vigilância Epidemiológica; Saúde Pública.

INTRODUÇÃO

A Febre de Chikungunya (CHIK) se caracteriza como uma síndrome febril de início súbito, com artralgias intensas, evolução debilitante e possibilidade de cronificação (ROSS, 1956; MORRISON, 1979; SÃO PAULO, 2021).

Esse agravo é transmitido principalmente por mosquitos vetores do gênero *Aedes* sp., por isso é classificado como um arbovírus. Nas últimas décadas as arboviroses têm sido responsáveis por um elevado número de surtos, epidemias e casos de mortalidade pelo mundo (COSTA *et al.*, 2019; MAEDA *et al.*, 2022).

Como a alta densidade populacional é um dos fatores que propicia a inserção, transmissão e manutenção da circulação viral, e os vetores possuem capacidade de

dispersarem diferentes vírus, existe a possibilidade de sobreposição de transmissão, ocorrendo assim uma co-circulação (NUNES *et al.*, 2015; MORAIS *et al.*, 2022).

No Brasil a circulação do vírus do Chikungunya (CHIKV) foi registrada em 2014, sendo caracterizada atualmente como endêmica, é uma das arboviroses de maior circulação territorial, juntamente com o dengue (DEN) (COSTA *et al.*, 2019; YAKOB, 2022).

O Brasil atualmente é o país das Américas com o maior número de casos do DEN e CHIK (PAHO, 2022), se configurando como área de interesse de estudos de dispersão, flutuação e perfil epidemiológico.

Dentro do território nacional distinguimos as regiões nordeste e sudeste como as mais acometidas, sendo que a região sudeste é a mais populosa. Nesta região o estado de São Paulo (ESP) notificou apenas casos importados até 2015, mas a partir de 2016 casos autóctones também foram notificados. Em 2020 ocorreu um surto de CHIKV na unidade federativa (UF), e em 2021 ocorreu uma maior disseminação do agravo, com 98% dos casos confirmados se concentrando na Região Metropolitana da Baixada Santista (RMBS) (IBGE, 2012; SÃO PAULO, 2014, 2021; MAEDA *et al.*, 2022).

Considerado como centro industrial do país, com o melhor Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) nacional, e a presença do maior porto da América Latina (Porto de Santos) (IBGE, 2012; SÃO PAULO, 2013), o ESP se configura como área de interesse de estudos epidemiológicos sobre a CHIK.

Com o objetivo de evidenciar a flutuação dos casos, utilizando dados secundários de domínio público, esse trabalho se configura como retrospectivo, descritivo e quantitativo dos casos confirmados da Febre de Chikungunya no Brasil, com recorte para os casos confirmados no estado de São Paulo.

METODOLOGIA

Os casos confirmados de CHIK e as características epidemiológicas (raça, sexo e faixa etária) do país foram coletados na plataforma de domínio público DataSUS, através do aplicativo TabNet Win32 3.0 (BRASIL, 2022b), do ano de 2017 a 2021. Para o ano de 2022 foi considerado o BEPA (BRASIL, 2022a). Os casos confirmados de CHIK no ESP por município foram obtidos na plataforma de domínio público de dados estatísticos do CVE, do ano de 2015 a novembro de 2022 (SÃO PAULO, 2022).

Foram elaborados dois bancos de dados no *software Microsoft Excel 2013*, utilizados para avaliação descritiva por ano, UF, municípios, características epidemiológicas e coeficiente de incidência do agravo.

Os coeficientes de incidência foram calculados por UF (Brasil), e por município (ESP). Este coeficiente foi determinado através da razão entre o número de casos confirmados e a população estimada de determinada área geográfica (IBGE), sendo expresso por 100 mil habitantes (hab.) (BRASIL, 2021, 2022a). Os coeficientes foram apresentados utilizando o *software Quantum GIS Desktop* versão 3.16.10 (Projeção SIRGAS 2000 / EPSG:4674).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de 2017 a 2022, o Brasil apresentou um total de 627.149 casos confirmados para CHIK. Dois anos do período estudado concentraram mais de 50% dos casos (26,52% em 2017 e 27,04% em 2022). O segundo ano de maior número de casos nacionais foi 2017, corroborando com Faria *et al.* (2022). A região nordeste foi a que concentrou maior número de casos (61,22%), seguida pela região sudeste (29,87%) (Fig. 1).

Após um pico em 2017 (129.385 casos) (Fig. 2.A), a região nordeste apresentou uma queda com manutenção da circulação do vírus até o ano de 2022 (Fig. 2.D), no qual volta a se configurar como região mais acometida (147.367 casos). De Oliveira *et. al.* (2021) inferiram que a redução no número de casos ao longo de 2018 – 2020 se deveu à diminuição de população suscetível. Além disso, é demonstrado um pico na região sudeste em 2019 (81.645 casos) (Fig. 2.C).

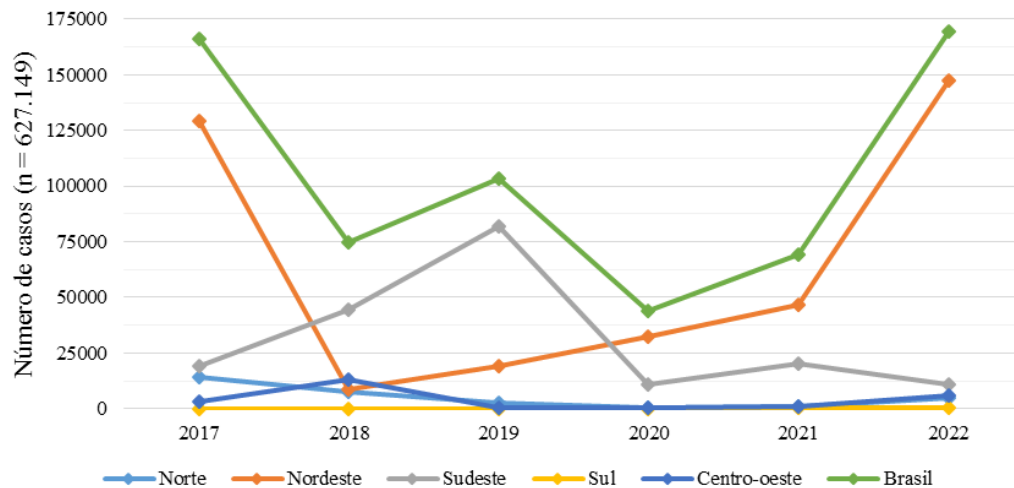
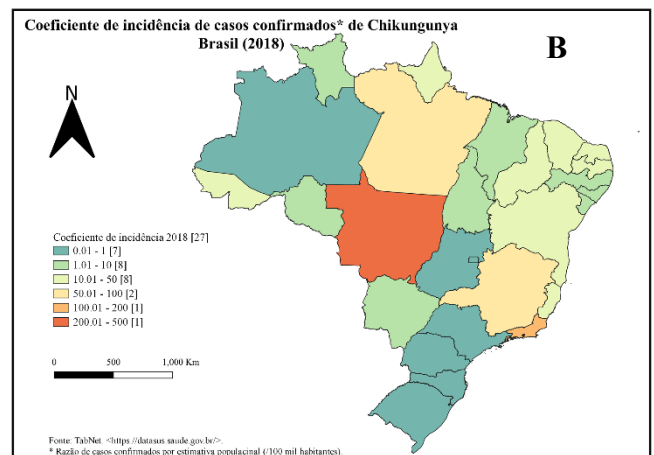
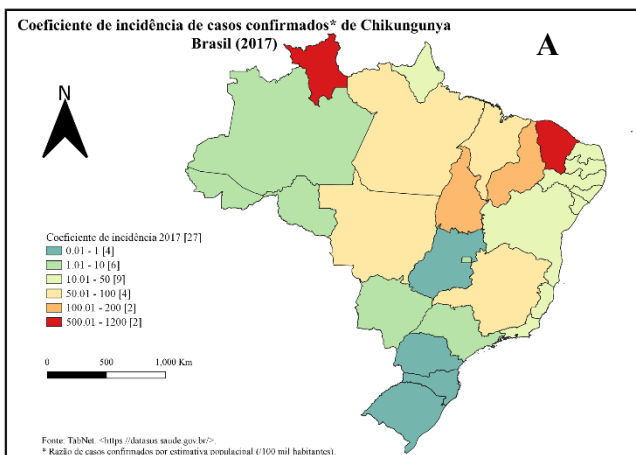


Figura 1. Casos confirmados de Chikungunya por ano, por região geográfica e total no Brasil, no período de 2017 a 2022 (n = 627.149).

Fonte: BRASIL (2022b) e BEPA (2022), elaborada pela autora, 2022.



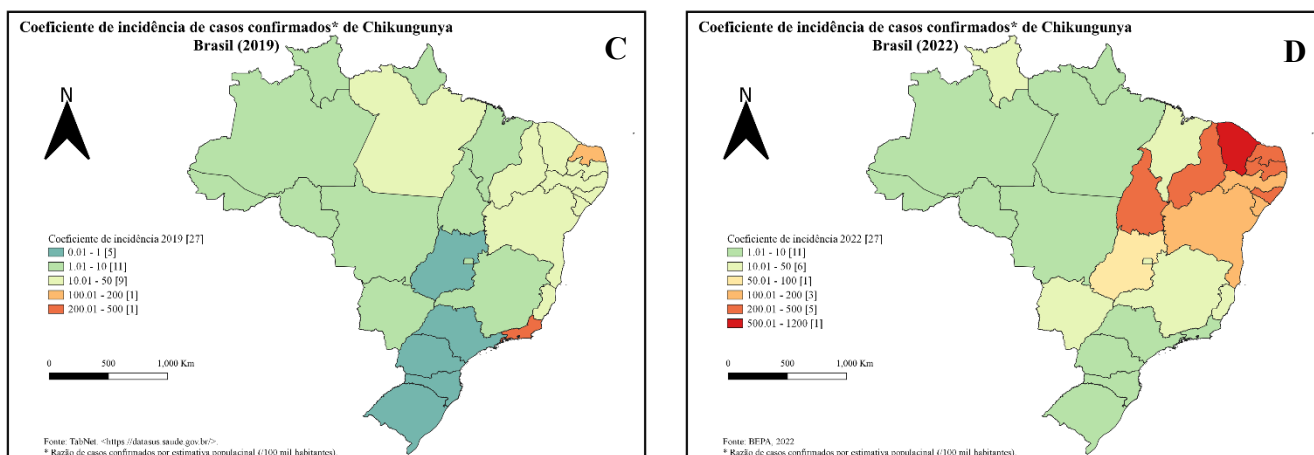


Figura 2. Representação cartográfica do coeficiente de incidência de cada Unidade Federativa do Brasil por ano (A: 2017; B: 2018; C: 2019; D: 2022).

Fonte: BRASIL (2022b) e BEPA (2022), elaborada pela autora, 2022.

As UFs que apresentaram o maior número de casos durante o período estudado variaram entre as regiões nordeste e sudeste, corroborando com Da Silva Neto *et al.* (2022). Em cada ano do período estudado é possível identificar a UF mais acometida, sendo: Ceará em 2017 (64,89%) e 2022 (31,21%) (Fig. 2.A e 2.D), Rio de Janeiro em 2018 (43,51%) e 2019 (75,16%) (Fig. 2.B e 2.C), Bahia em 2020 (43,68%) e Pernambuco em 2021 (30,20%). Em 2021 o ESP foi o segundo estado com maior concentração de casos do país (21,46%).

Corroborando com Nunes *et al.* (2015), as regiões sudeste e nordeste são as que possuem maior potencial de estabelecimento do CHIKV. Os autores descreveram que 35 municípios do Brasil são importantes na manutenção da transmissão, sendo 57% localizados no nordeste e 31% no sudeste.

No ano de 2022 o BEPA (BRASIL, 2022a), até a SE 45, publicou que a região nordeste apresentou a maior incidência (255,5 casos / 100 mil hab.), seguida das regiões centro-oeste (35,8 casos / 100 mil hab.) e norte (25,7 casos / 100 mil hab.). Esse estudo obteve a região nordeste com maior incidência (281,98 casos / 100 mil hab.), seguida pela região norte (41,48 casos / 100 mil hab.) e pela região centro-oeste (28,14 casos / 100 mil hab.) (Fig. 2.D).

Em relação às características epidemiológicas as categorias predominantes nos casos confirmados no país foram: “parda” (51,30%), “feminino” (61,64%) e “entre 20 – 39 anos” (34,74%), corroborando com Nunes *et al.* (2015) e Silva *et al.* (2018).

A característica “raça” pode ser justificada pela composição étnica da região de maior incidência de casos. Segundo Costa *et al.* (2019) essa característica necessita ser analisada com cautela devido sua subjetividade. Além disso, sugerem que o número maior de casos entre as mulheres pode estar relacionado ao tempo de permanência em suas residências, sendo este o local de maiores focos do vetor, e por procurarem com mais frequência assistência médica. Indicam, também, que a “faixa etária” encontrada estaria relacionada à população economicamente ativa, que trabalha ou estuda durante o dia.

A caracterização epidemiológica encontrada neste estudo é verificada em outros países com registros de surtos e epidemias de CHIK (SISSOKO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2018).

O ESP foi uma região de importante transmissão do CHIKV no ano de 2021, como a segunda UF de maior número de casos do ano (21,46%), sendo superado apenas por Pernambuco (30,20%). Ao longo do período estudado o ESP apresentou um total de 18.262 casos confirmados para CHIK (Fig. 3).

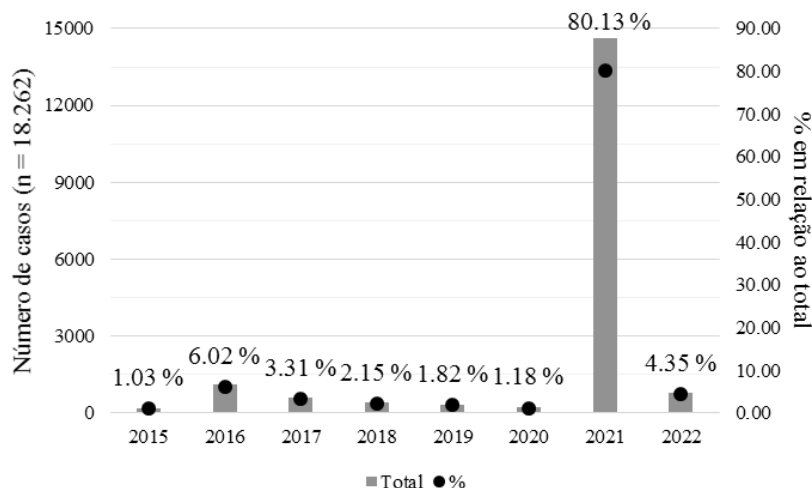


Figura 3. Número absoluto e porcentagem (%) de casos distribuídos por ano de notificação no estado de São Paulo, no período de 2015 a 2022.

Fonte: São Paulo (2022), elaborada pela autora, 2022.

Durante o período de 2015 a 2020, no ESP os casos ocorreram de forma esporádica e com incidência entre 0,1 e 1,6 casos / 100 mil hab. (Fig. 4.A e 4.B). Em 2021 houve um crescimento exponencial, aumentando a taxa para 29,7 casos / 100 mil hab. (SÃO PAULO, 2021), correspondendo a 80,13% de todos os casos confirmados no estado no período estudado (Fig. 4.C).

No ano de 2021 ocorreu pela primeira vez transmissão expressiva do CHIKV no ESP, concentrando na RMBS 98% dos casos confirmados, com uma incidência de 715 casos / 100 mil hab. na região (SÃO PAULO, 2021; MAEDA *et al.*, 2022). Esse fato é corroborado com os trabalhos de Silva *et. al.* (2018) e Costa *et. al.* (2019), que apresentaram a suscetibilidade da população como responsável pela transmissão efetiva (Fig. 4.C).

O ano com menor número de municípios com casos foi 2020 (32 municípios) e o maior foi 2016 (162 municípios). Até novembro de 2022 o ESP notificou 794 casos confirmados (105 municípios), sendo este o terceiro ano de maior número de casos no estado, depois de 2021 (14.634 casos) e 2016 (1.100 casos).

No ESP 10,26% (301 / 645) dos municípios apresentaram ao menos um caso de CHIK durante o período estudado (n = 18.262). Destes, 3,33% (10 / 301) dos municípios concentraram 89,74% dos casos (16.388). Dentre eles cinco municípios corresponderam à 81,10% de todos os casos e compõem a RMBS (Santos, Guarujá, São Vicente, Praia Grande e Cubatão). O município com maior representatividade de casos foi Santos (42,6%).

A flutuação dos casos no ESP obtida nesse estudo é corroborada pelas representações dos BEPA do CVE (SÃO PAULO, 2016, 2019 e 2020). Assim, é possível inferir que após a instalação do CHIKV na grande São Paulo e na RMBS houve manutenção da infecção nestas regiões, pois se apresentaram em destaque ao longo de todo o período.

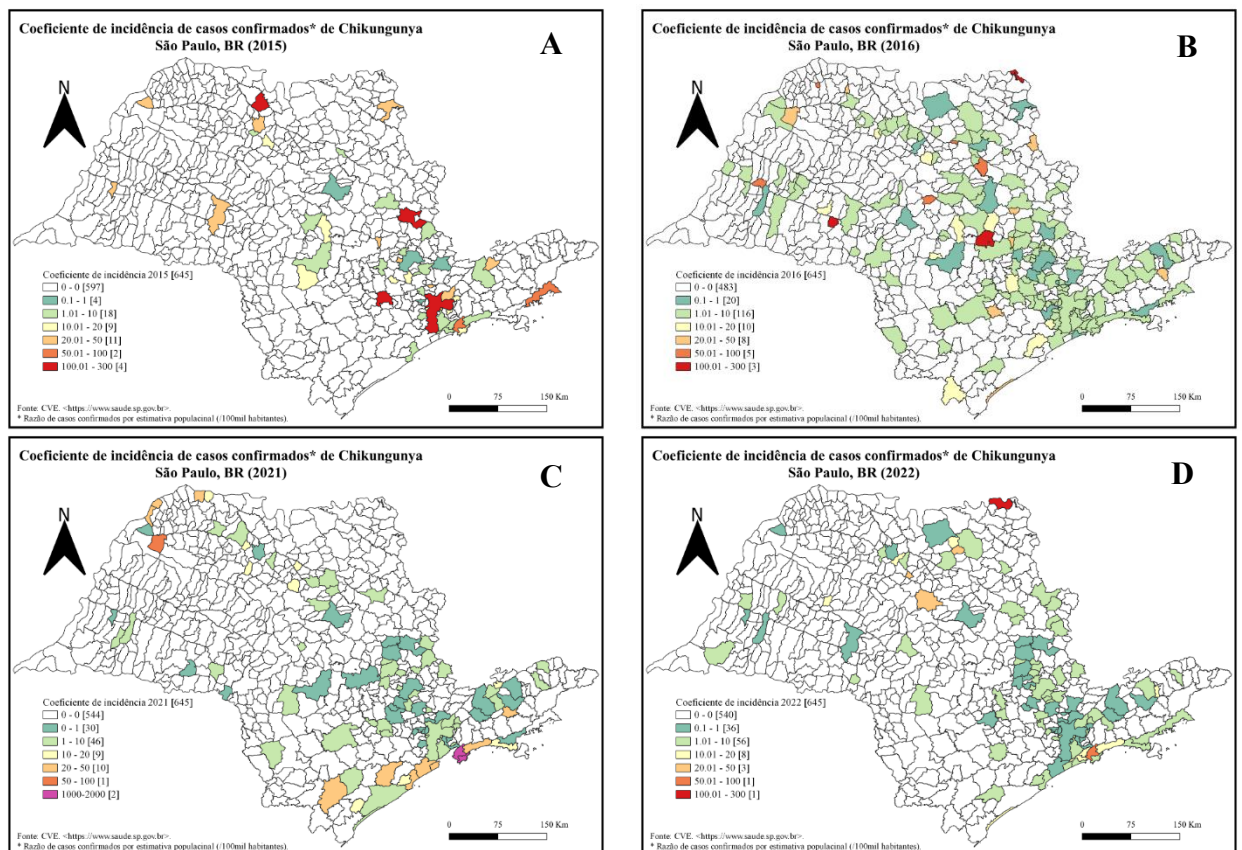


Figura 4. Representação cartográfica do coeficiente de incidência de cada município do estado de São Paulo por ano (A: 2015; B: 2016; C: 2021; D: 2022).

Fonte: Dados CVE (2015 – 2022), elaborada pela autora, 2022.

CONSIDERAÇÕES

Após oito anos de sua inserção no Brasil o vírus do Chikungunya apresentou capacidade de instalação e manutenção do ciclo de transmissão viral por todo o território, de forma que o país possui o maior número de casos absolutos nas Américas.

A partir dos coeficientes de incidência foi possível identificar o nordeste como região de maior incidência e o sul como região de menor incidência de casos confirmados. Assim como, foi possível identificar anos de transmissão expressivos em outras regiões.

Ainda que a circulação do vírus esteja presente no ESP desde 2015, existe a possibilidade de uma epidemia. Isso se deve ao fato de que, somente em 2021 houve uma transmissão expressiva no estado, concentrada na RMBS, e mais de 50% dos municípios do estado não apresentaram casos confirmados durante o período estudado.

As características epidemiológicas predominantes encontradas para os casos confirmados se mostram coerentes com outros estudos, porém a caracterização do perfil epidemiológico e de transmissão do Chikungunya no país se configura como complexa.

Desta forma, o agravo se configura como um obstáculo para a saúde pública, permanecendo necessários investimentos na estrutura de vigilância sanitária e epidemiológica, na promoção em saúde, no saneamento básico, na educação, e, não obstante, na pesquisa para que com dados atualizados e mais robustos o agravo possa ser melhor compreendido, monitorado, avaliado e controlado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora pela paciência, orientações, e confiança em meu conhecimento e produção. Agradeço às coordenadoras da regional pela disponibilidade, atenção e conhecimentos. Agradeço ao Instituto Adolfo Lutz pela oportunidade de vivenciar a experiência de pós-graduanda, absorvendo todos os conhecimentos que pude ter contato.

REFERÊNCIAS

ROSS, R. W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, 54(02), 177–191. 1956. DOI:10.1017/s0022172400044442.

MORRISON, J. C. L. Chikungunya Fever. **International Journal of Dermatology**, 18(8), 628–629. 1979. DOI:10.1111/j.1365-4362.1979.tb04677.x.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Protocolo de Manejo Clínico de Chikungunya no Estado de São Paulo**. 2021. 56p.

COSTA, A. K. S.; NINA, L. N. S.; CARVALHO, A. C.; BOMFIM, M. R. Q.; FELIPE, I. M. A. Dengue e Chikungunya: Soroepidemiologia em usuários da Atenção Básica. **Revista de Enfermagem UFPE On Line**, v.13, n.4, p. 1006 – 1014. 2019. DOI: 10.5205/1981-8963-v13i04a238828p1006-1014-2019.

MAEDA, A. Y. *et al.* Circulation of Chikungunya virus East-Central-South African genotype during the 2020–21 outbreak in São Paulo State, Brazil. **Journal of Clinical Virology Plus**, v. 2, n. 2, jun. 2022. DOI: 10.1016/j.jcvp.2022.100070.

NUNES, M. R. T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, abr. 2015. DOI 10.1186/s12916-015-0348-x

MORAIS, S. S. F. de *et al.* Mapeamento de Casos e Análise Inferencial da Incidência de Chikungunya em uma Capital do Nordeste Brasileiro. **Archives Of Health Investigation**, v. 11, n. 3, p. 403–410, mar. 2022. DOI: 10.21270/archi.v11i3.5709.

YAKOB, L. Predictable Chikungunya Infection Dynamics in Brazil. **Viruses**, v. 14, n. 9, ago. 2022. DOI: 10.339/v14091889.

PAHO. Pan American Health Organization. PLISA – Health Information Platform for the Americas. Chikungunya Cases. 2022.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Alerta 01 Surto de Chikungunya – estado de São Paulo: Sala de Situação Estadual de Enfrentamento às Arboviroses 2021**. 2021.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativas de População. **Censo Brasileiro de 2010**. Rio de Janeiro: IBGE. 2012.

SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo “Prof. Alexandre Vranjac”. **Informe Epidemiológico – 09/06/2014**, 2014

SÃO PAULO. São Paulo é o Estado com melhor IDH – Órgão da ONU divulgou nesta segunda o Índice de Desenvolvimento Humano dos municípios brasileiros. **Do Portal do Governo**, São Paulo, 29/07/2013. 2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde – DATASUS. **TabNet**. Epidemiológicas e Morbidade, Doenças e Agravos de Notificação, 2007 em diante (SINAN). Febre de Chikungunya. 2022b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Brasília, v.53, n.43, nov. 2022a.

SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo “Prof. Alexandre Vranjac”. **Chikungunya – Dados Estatísticos**, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. 5ª ed. Brasília. 2021. 683 – 767. ISBN 978-65-5993-102-6.

FARIA, J. M. L. *et al.* Zika e Chikungunya entre 2017 e 2020: Um Estudo Epidemiológico. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, supl. 1, p. 120, jan. 2022. DOI: 10.1016/j.bjid.2021.101965.

DE OLIVEIRA, E. C. *et al.* Short report: Introduction of chikungunya virus ecsa genotype into the brazilian midwest and its dispersion through the americas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, abr. 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009290.

DA SILVA NETO, S. R. *et al.* Arboviral disease record data – Dengue and Chikungunya, Brazil, 2013 – 2020. **Scientific Data**, v. 9, n. 1, mai. 2022. DOI: 10.1038/s41597-022-01312-7.

SILVA, N. M. *et al.* Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, v. 27, n. 3, p. e2017127, set. 2018. doi: 10.5123/S1679-49742018000300003.

SISSOKO, D. *et al.* Post-Epidemic Chikungunya Disease on Reunion Island: Course of Rheumatic Manifestations and Associated Factors over a 15-Month Period. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, mar. 2009. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000389.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Boletim Epidemiológico Paulista**. São Paulo, v. 13, n. 147, mar. 2016.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Boletim Epidemiológico Paulista**. São Paulo, v. 16, n. 188, agos. 2019.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Boletim Epidemiológico Paulista**. São Paulo, v. 17, n. 203, nov. 2020.

ESTUDO DA REDUÇÃO DOS AÇÚCARES NOS REFRIGERANTES

Maiara Stephanie da Silva Yoshinaga¹; Mahyara Markievicz Mancio Kus-Yamashita²; Cristiane Bonaldi Cano³

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CEFRO-SES– IAL; E-mail: maiara.yoshinaga19@gmail.com

³Cristiane Bolandi Cano do Núcleo de Químico-físicas e Sensorial de Alimentos – CALI–IAL

²Mahyara Markievicz Mancio Kus-Yamashita do Núcleo de Químico-físicas e Sensorial de Alimentos – CALI – IAL

Resumo: O alto consumo de alimentos ultraprocessados de baixo valor nutritivo pode estar relacionado ao aumento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis, sendo que, os refrigerantes que contêm grande quantidade de açúcares, são considerados um dos produtos industrializados mais consumidos mundialmente. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, juntamente com as indústrias e produtoras de alimentos e bebidas, realizaram um acordo que tem como objetivo estabelecer metas na redução dos teores de açúcares presentes na formulação de produtos, dentre um deles, os refrigerantes. O objetivo deste trabalho foi determinar os carboidratos e sua quantidade nos refrigerantes coletados para atendimento ao Programa Nacional de Monitoramento de Alimentos, durante o período de 2021-2022. Foram coletadas 32 amostras de refrigerantes coletados pela VISA-SP, na determinação de carboidratos, pelo método CLAE-ELSD desenvolvido no IAL. A composição do perfil de carboidratos encontrados nas análises cromatográficas nos refrigerantes foi de frutose, glicose e sacarose. Os resultados sugerem que os refrigerantes de sabores de guaraná e frutas diversas tinham maiores valores de concentração de sacarose entre 51 e 59, seguidos de uma menor concentração de glicose e frutose em torno 20 a 26%. Enquanto no sabor de cola observou-se tinham menores valores de sacarose em torno de 32,5 %, seguidos de 35,3 % de glicose e 32,2 % de frutose. Conclui-se que nos refrigerantes de sabor de guaraná, frutas diversas e cola avaliados no PRONAMA, houve a modificações na sua composição em relação à quantidade de sacarose, sendo substituída pelo açúcar invertido, sugerindo que há reformulação dos produtos.

Palavras-chave: bebidas açucaradas, CLAE, Doenças Crônicas não Transmissíveis, frutose, glicose, sacarose

INTRODUÇÃO

As Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNTs) é um dos assuntos mais retratados no que se refere a saúde humana, atualmente é uma das maiores causas de mortalidade e maioria das situações vem gerando doenças como obesidade, hipertensão e diabetes, que está correlacionadas aos maus hábitos na qualidade de vida e principalmente no que diz respeito a alimentação. Hoje em dia o consumo de alimentos processados e ultraprocessados, ricos em gorduras, sódio e açúcares, estão cada vez mais frequentes, ocasionando as DCNT (SVS, 2016).

Quando se trata de alimentos industrializados, uns dos mais populares nessa classe são os refrigerantes, uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo, só no Brasil em 2021, o consumo per capita no mercado brasileiro de refrigerantes foi de 59,52 de litros por habitante anual (ABIR, 2021).

Diante desse agravo relacionado às DCNTs, órgãos em todo mundo vem desenvolvendo meios para promover hábitos alimentares que possam assegurar uma vida saudável. Com a Agenda 2030 da Organização Mundial da Saúde, foi proposto o Objetivo de Desenvolvimento Saudável (ODS) 3- Saúde e bem-estar, onde são criadas várias tentativas de programas para redução do consumo de refrigerantes com açúcar. No Brasil, foi criado o acordo de 2023 com as Indústrias para reduzir em até 33,8 % a quantidade de açúcar em bebidas açucaradas (refrigerantes, bebidas mistas e néctares de frutas), conforme Figura 1 (ONU, 2022; BRASIL, 2022; BRASIL, 2021).



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 1: Proposta da ANVISA e Indústrias através do Acordo 2023 para redução de açúcar em refrigerantes.

A reformulação dos alimentos e bebidas é uma nova estratégia para melhorar o perfil nutricional, sendo que dos alvos que se deseja atingir é a redução do teor de açúcar em especial a sacarose adicionada. A indústria possui dois principais métodos: a redução no conteúdo de açúcares adicionados sem modificações adicionais na formulação do produto ou, a substituição parcial/total do nutriente por outros ingredientes como os edulcorantes (Markey, et al, 2015).

Conforme a alegação “açúcares reduzidos” e qualquer alegação susceptíveis de ter o mesmo significado para o consumidor, só podem ser efetuadas se o valor energético do produto com esta alegação é menor que a quantidade de energia em um produto quando comparado com o seu original, portanto os fabricantes estão reformulando o seu produto para atingir este objetivo de reduzir os açúcares adicionados (Rýdlová, L., et al, 2020).

O Programa Nacional de Monitoramento de Alimentos (PRONAMA), coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tem como objetivo avaliar a segurança e a qualidade dos alimentos, sendo importante ferramenta para o planejamento de ações de vigilância sanitária e saúde. No ano de 2022, o PRONAMA teve como planejamento verificar a adequação das fórmulas dos refrigerantes para redução do açúcar conforme o Acordo de 2023. Portanto, o objetivo deste trabalho foi de determinar o perfil dos carboidratos e sua quantidade nos refrigerantes, coletados no PRONAMA-VISA, no estado de São Paulo no período de 2021-2022 (BRASIL, 2022).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 32 amostras de refrigerantes que variaram entre marcas e sabores, para o programa de monitoramento PRONAMA pelas Vigilâncias Sanitárias do Estado de São Paulo (VISA-SP). As análises foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz (IAL), por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) marca Shimadzu, método in House desenvolvido no IAL-2018, nas seguintes condições: coluna HILIC com temperatura de forno de a 32° C, fase móvel: Acetonitrila: Acetato de Etila: Água (50:40:10:v:v:v), bomba isocrática com vazão de fluxo de 0,2 mL/min, detector de espalhamento de luz (ELSD) com forno a 40°C, vazão de gás de 39-41 psi e processadas a detecção. Os dados foram processados em planilha de Excel versão 2010.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme a Figura 2, no período de 2021 e 2022, foram coletadas pelas Vigilâncias Sanitárias do Estado de São Paulo em vários municípios, 32 amostras de refrigerantes de marcas variáveis nos seguintes sabores: 16 amostras no sabor guaraná, 4 amostras no sabor de cola, e nos sabores de frutas foram 3 amostras no sabor laranja, 2 amostras no sabor de limão, 2 amostras no sabor de limão com laranja e os sabores de framboesa, maçã, mix de frutas, tutti-frutti e uva continham somente uma amostra coletada. Sendo assim, para representar melhor a amostragem dos refrigerantes com vários sabores de frutas, foi criada neste trabalho a denominação sabores de frutas diversas. Com relação às amostras coletadas, as maiores quantidades no sabor de guaraná podem estar relacionadas às marcas de refrigerantes comercializadas nos municípios do Estado de São Paulo.

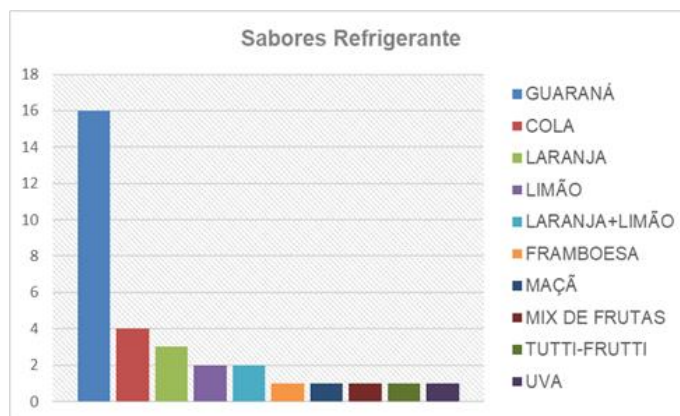


Figura 2. Amostras de refrigerantes coletadas no período de 2021-2022 agrupadas por tipo de sabor

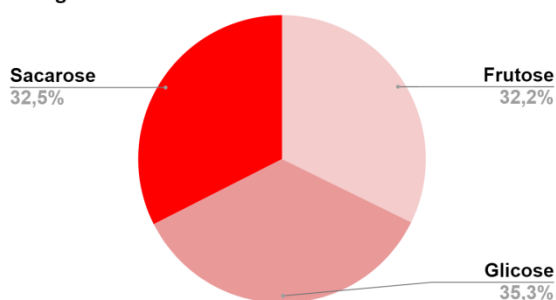
Fonte: Dados da pesquisa

Na análise do perfil de carboidratos dos refrigerantes realizada por cromatografia líquida, foram encontradas em todas as amostras, frutose, glicose e sacarose em proporções diferentes para cada tipo de sabores e marcas. Nas 16 amostras de refrigerantes no sabor de guaraná, observou-se que na composição continham 59,5 % de sacarose, seguidos de 20,3% de glicose e 20,1% de frutose, mostrando que a quantidade de sacarose era maior em relação à quantidade de frutose e glicose (Figura 3b).

Com relação às 4 amostras de refrigerante sabor Cola, descritos na Figura 3a, observou-se que na composição continham 32,5 % de sacarose, seguidos de 35,3 % de glicose e 32,2 % de frutose, o que sugere que neste tipo de sabor há uma maior quantidade de glicose em relação aos demais, e a quantidade de frutose e sacarose eram mais próximos.

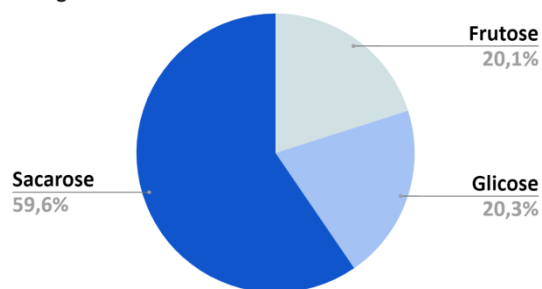
Nas 12 amostras de sabores de frutas diversas, conforme a Figura 3c, observou-se que na composição continham 51,0% de sacarose, seguidos de 26,0% de glicose e 23,0% de frutose, indicando que a quantidade de sacarose era maior em relação aos demais carboidratos, e a quantidade de frutose era maior quando a comparada à glicose.

Refrigerante de Cola



(a)

Refrigerante de Guaraná



(b)

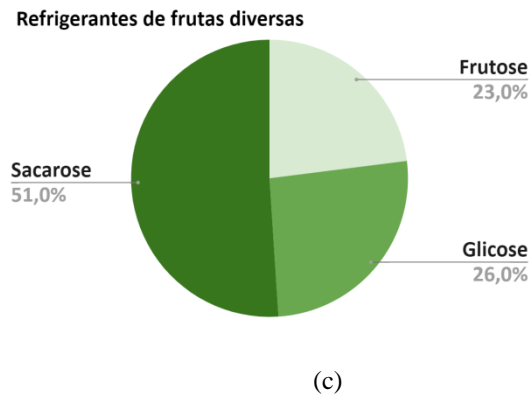


Figura 3: Representação Gráfica do perfil de carboidratos (sacarose, frutose, glicose) por tipo de sabor

No sabor de guaraná, a concentração média de frutose foi $1,71 \pm 1,23 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$, de glicose de $1,75 \pm 0,82 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ e sacarose de $5,07 \pm 0,75 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$, estes resultados sugerem que há amostras com teores de sacarose mais altos, em relação aos demais carboidratos. Nos sabores de frutas de diversas a concentração média de frutose foi $1,67 \pm 0,91 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$, na glicose de $1,87 \pm 1,00 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ e na sacarose de $3,67 \pm 1,03 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$, estes resultados mostram que as concentrações de sacarose estão mais baixas comparadas as de guaraná este fato pode estar relacionado a quantidade de suco de frutas adicionados nestes tipos de refrigerantes. Nos refrigerantes de cola pode se observar a concentração média de sacarose foi de $2,95 \pm 1,13 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$, seguidos de glicose de $2,93 \pm 1,80 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ e frutose $3,20 \pm 2,02 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$, estes resultados indicam que a mostra os valores de sacarose estão mais próximos dos valores dos refrigerantes de frutas diversas, e que há uma também uma proporção mais próxima de sacarose com frutose e glicose. Estes resultados sugerem que nos refrigerantes de sabores de guaraná e diversas frutas tinham valores mais altos de sacarose, pois haviam mais amostras que não tinham redução de açúcar adicionado (sacarose), enquanto os refrigerantes de cola continham mais amostras com redução de açúcar adicionado (sacarose), que seguem alguns artigos da literatura que mostram que em bebidas com baixo teor de açúcar os valores se encontram 2,5g de açúcar por 100mL em produtos líquidos (Rýdlová, L., et al, 2020).

Nas amostras com redução de açúcar pode se observar no perfil e na quantidade individual de carboidratos um aumento nas concentrações de frutose e glicose e uma diminuição na sacarose, indicando que estes produtos foram adicionados outro tipo de açúcar como xarope de açúcar invertido, sugerindo que os fabricantes vem modificaram as fórmulas para se adequarem ao pacto com ANVISA (Rýdlová, L., et al, 2020).

CONCLUSÕES

A amostragem dos refrigerantes coletadas no PRONAMA 2021 e 2022 foi mais representativa para o sabor de guaraná, seguida dos sabores de frutas diversas e de cola, respectivamente. Contudo, observou-se que no caso dos sabores de fruta havia poucas amostras replicadas em alguns sabores, o que prejudicou a avaliação da composição dos carboidratos quanto à redução dos açúcares. Os refrigerantes analisados demonstraram que as

indústrias estão realizando formulações com redução nas quantidades de sacarose, pois havia amostras com e sem indicação da redução de açúcar, favorecendo uma maior visibilidade para comparar os resultados.

Com estes resultados, pode-se sugerir que houve uma redução do açúcar adicionado (sacarose) em algumas amostras de refrigerantes nos sabores de guaraná, frutas diversas e cola, este fato pode estar relacionado ao fato de ter sido adicionado o açúcar invertido como substituto da sacarose em sua composição. Sendo assim, através das análises do perfil de carboidratos em refrigerantes sugere-se que as indústrias estão modificando as suas formulações para se adequarem ao acordo 2023 proposto pela ANVISA e ao PRONAMA.

REFERÊNCIAS

SVS, Painéis Saúde Brasil: Doenças crônicas não transmissíveis. [S. l.], 2016. Disponível em: <https://svs.aims.gov.br/daent/centrais-de-conteudos/paineis-de-monitoramento/saude-brasil/dcnt/>. Acesso em: 1 dez. 2022.

ABIR, Volume de produção do mercado brasileiro de refrigerantes dos anos de 2010 a 2021. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://abir.org.br/o-setor/dados/refrigerantes/>. Acesso em: 30 dez. 2022.

ONU, Objetivos de Desenvolvimento Sustentável [S. l.]: 2022 Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 05 dez. 2022.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAUDE, PLANO DE AÇÕES ESTRATÉGIAS PARA O ENFRETAMENTO DAS DOENÇAS CRONICAS E AGFAOS NÃO TRANSISSIVEIS NO BRASIL 2021-2030 [S. l.]: 2022 Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/doencas-cronicas-nao-transmissiveis-dcnt/09-plano-de-dant-2022_2030.pdf/view Acesso em: 05 dez. 2022.

BRASIL, ANVISA, Programa Monitoramento dos Teores de Sódio e Açúcares em Alimentos Industrializados [S. l.]: 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/programas-nacionais-de-monitoramento-de-alimentos/teores-de-sodio-e-acucares-em-alimentos-industrializados#:~:text=No%20caso%20dos%20a%C3%A7%C3%BAcares%2C%20h%C3%A1,anos%20de%202020%20e%202022>. Acesso em: 05 dez. 2022.

BRASIL, ANVISA, Programa Nacional de Monitoramento de Alimentos (Pronamas). [S. l.]: 2022 Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/programas-nacionais-de-monitoramento-de-alimentos> Acesso em: 05 dez. 2022.

MARKEY, Oonagh; LOVEGROVE, Julie A.; METHVEN, Lisa. Sensory profiles and consumer acceptability of a range of sugar-reduced products on the UK market. Food Research International, v. 72, p. 133-139, 2015.

RÝDLOVÁ, L., HRUBÁ, M., ŠEVČÍK, R., & RAJCHL, A. Reformulation of fruit and vegetable products. *Eat & live correctly*, p. 107, 2020. <https://www.ctpp.cz/images/files/reformulace%20web.pdf#page=107>. Acesso em: 05 jan 2023.

IMPORTÂNCIA DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMA

Marcio Pedroso Motta¹, Gislene Mitsue Namiyama²

¹Bolsista do Curso de Especialização em Microscopia Eletrônica NME/IAL
e-mail:marciomotta02@gmail.com

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

Resumo: O Micoplasma é dividido em 200 espécies, sendo que 16 são encontradas em humanos, apenas cinco são de grau de patogenia preocupante, sendo estas: *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. hominis*, e *U. parvum* e *U. urealyticum*. Medem em torno de 0,1 a 0,2 µm de largura e 1 a 2 µm de comprimento, não apresenta parede celular, o que faz com que a sua morfologia seja pleomórfica. O Micoplasma é caracterizado e reconhecido como a menor bactéria de vida livre, necessitando sempre de uma célula hospedeira para complementar a síntese proteica. Por este motivo, seu crescimento é demasiado lento, fazendo com que sua detecção em meio de cultura seja demorada e por vezes tardia. Esta bactéria é a causa de muitas contaminações em meios de cultura. Em humanos, este microrganismo está relacionado a problemas como: inflamações do trato respiratório, do trato urinário, complicações na gestação e em neonatos. A infecção por Micoplasma é subnotificada, em grande parte por desconhecimento ou negligenciada. Isto pode causar resistência pelo uso inadequado de antibióticos de amplo espectro, não sendo específico para Micoplasma. Os estudos que envolvem Micoplasma *in vitro* necessitam que se recrie o mais fielmente um ambiente endógeno a célula, isso faz com que o cultivo em meio de cultura desta bactéria exija meios propícios e específicos como fatores de nutrição que auxiliem no crescimento *in vitro*, como temperatura, pH e enzimas. Há várias formas de diagnosticar o Micoplasma, a técnica de coloração negativa através da Microscopia Eletrônica de Transmissão é uma delas e faz sua análise morfológica, outra técnica seria o PCR que faz a identificação da espécie do Micoplasma

Palavras chaves: Mycoplasma, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Diagnóstico.

INTRODUÇÃO

"Mollicutes" é derivada do latim *mollis* (que significa "suave" ou "flexível"), e *cutis* ("pele") também conhecido como *Mycoplasma*, que é a forma taxonômica mais conhecida (UPHOFF; DREXLER, 2011).

Os *Mycoplasmas* são considerados a menor bactéria de vida livre, (WAITES et al., 2012), resultantes de várias mudanças evolutivas e adaptativas, necessitando sempre de uma célula hospedeira para complemento de sua síntese proteica. Tem em torno de 0,1 a 0,2 μm de diâmetro de tamanho, seu genoma é composto de DNA e RNA, tem entre 580 a 2200 Kilo bases (Kbp) e entre 23-40% das bases citosina(C) e Guanina (G), sua membrana é constituída por lipoproteínas. Não possui parede celular, o que confere sua morfologia pleomórfica, ou seja, formato variável, além disso, lhe dá resistência a uma vasta classe de antibióticos.

A falta de parede celular faz com que a membrana celular tenha um papel fundamental no processo de infecção, transporte de diversos nutrientes, interação com a célula que está sendo infectada e a defesa imunológica do hospedeiro (MUGUNTHAN; HARISH, 2022). Esta membrana celular é a principal via de contato com o ambiente do hospedeiro. Algumas destas proteínas sofrem variações antigênicas por intermédio de comutações (liga/desliga), embaralhamento de domínio entre variações de tamanho para a modificação de componentes antigênicos na superfície da célula, com a finalidade de produzir heterotipos que possibilitam a evasão ao sistema imune do hospedeiro. Quando *in vivo*, estes estão associados ao tecido do epitélio, com algumas exceções quando ocorre invasão intracelular (WAITES et al., 2012). Suas lipoproteínas são fortes ativadores, através dos receptores do tipo Toll (TRL2) (WAITES; TALKINGTON, 2004; VERITAS, [s.d.]; WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005).

O *Mycoplasma* agrupa vários gêneros com mais de 200 espécies, das quais 16 são encontradas em humanos, destacando-se o *Mycoplasma*, *Ureaplasma* e *Acholeplasma*, por causar infecções importantes. Seu tamanho e capacidade de autorreplicar-se favorecem a sua contaminação em cultivos celulares, comprometendo a qualidade dos testes diagnósticos e terapias celulares que empregam esses produtos. Ademais, esse microrganismo não é visível à microscopia óptica de luz necessitando de Microscopia Eletrônica de Transmissão, e testes diagnósticos mais precisos, como os testes moleculares para sua identificação.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo contextualizar o *Mycoplasma* nos produtos e na Saúde Pública e o emprego da Microscopia Eletrônica na sua identificação.

Esta revisão bibliográfica descreve sobre o *Mycoplasma*, as espécies de importância para Saúde Pública e a utilização da Microscopia Eletrônica de Transmissão para análise morfológica.

MATERIAL E MÉTODO:

Trabalho descritivo, empregando as bibliografias disponíveis em julho a dezembro de 2022, com a finalidade de discorrer sobre o Micoplasma e o seu impacto à Saúde Pública tanto na qualidade de cultivos celulares empregados em diagnósticos e tratamentos como na patogenia a seres humanos. Foi realizado levantamento bibliográfico nas bases de dados PUBMED, SCIELO, Livros Principles of biochemistry, Biologia Celular e Molécula, Manual Microbiologia e Microbial Physiology, empregando as palavras chave Micoplasma, cultura celular, Microscopia Eletrônica de Transmissão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Principais Micoplasmas patogênicos ao homem.

1.1. *M. pneumoniae* (MP): patógeno exclusivo de humanos, resultando em infecções do trato respiratório superior e inferior, destacando-se em quadros de pneumonias atípicas da comunidade (PAC). Infecção insidiosa de curso prolongado, de transmissão respiratória, com período de incubação de até 1-4 semanas, o que favorece a sua disseminação na comunidade, podendo ocasionar surtos em adultos e crianças. Os sintomas mais comuns são dor de cabeça, tosse e traqueobronquite podendo evoluir para pneumonias e ocasionalmente infecções mais graves como encefalites. A alta morbidade e eventual mortalidade reforçam a necessidade de tratamento oportuno com antibiótico adequado (WAITES & TALKINGTON, 2004).

1.2. *M. genitalium* (MG): é responsável por infecções da pelve e do trato urinário como a uretrite não gonocócica (UNG) e a cervicite, sendo pouco comum a sua detecção na ausência de infecções clínicas. Está classificado como uma infecção de transmissão sexual (IST) devido à necessidade de contato direto com a mucosa genital, uretral ou retal contaminada (JENSEN, 2004; WAITES et al., 2012).

1.3. *M. hominis* (MH): tem um tropismo preferencial por tecidos da uretra, colo do útero ou vagina, mas acomete principalmente as mulheres. Da população feminina em geral sexualmente ativa, 21% a 53% das mulheres não apresentam sintomas ao serem colonizadas por este patógeno, o que pode trazer diversas complicações as mulheres gestantes, devido a possibilidade da transmissão vertical ao neonato no momento do parto (WAITES et al., 2012). Em adultos, podem causar pielonefrite, inflamação pélvica corioamnionite, endometrite pós-parto, vaginose bacteriana, artrite, osteoartrite, infecções de feridas. Já em neonato, pneumonia congênita, meningite, bacteremia e abscessos e infecções sistêmicas (WAITES et al., 2012).

O MH tem a sua patogenia ligada a citoaderência, como os demais Micoplasmas, resultando em lesões teciduais, devido à ação de mediadores pró-inflamatórios, acionados pelas células do sistema (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005).

1.4. *Ureaplasmas*: Se ligam a uma variedade de células humanas, incluindo eritrócitos, espermatozóides e células epiteliais da uretra, interferindo na sua fisiologia, como por exemplo, na redução da motilidade do espermatozoide, resultando na infertilidade masculina. Sua ligação espontânea aos neutrófilos causa ativação do sistema complemento.

Destacam-se 2 espécies de Ureaplasmas, o *U. parvum* e *U. urealyticum*, que têm tropismo preferencial por células do colo uterino e da vagina, nas quais são frequentes, em torno de 40-80%, em mulheres sexualmente ativas, contra 5-20% de infecção em células urogenitais masculinas. A transmissão pode ser via sexual ou vertical, resultando em infertilidade, endometriose pós-parto, corioamnionite, parto prematuro ou aborto espontâneo às mulheres e pneumonia, bacteremia, meningite e doença pulmonar crônica ou displasia broncopulmonar (DBP) em neonatos (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005).

2. *Mycoplasma spp.* - contaminantes celulares

Culturas de células podem facilmente ser infectadas por Micoplasmas, que é um dos contaminantes mais presentes nos laboratórios de cultivos atualmente. Suspeita-se que a principal contaminação desses cultivos ocorra pelo próprio homem. Além disso, uma cultura contaminada dissemina facilmente o Micoplasma entre as demais, devido a produção de aerossóis durante a manipulação das células. Outro fator que pode contribuir para a contaminação das culturas é a grande movimentação de pessoas com acesso ao laboratório ou ao local onde as amostras e meio de culturas ficam armazenadas (UPHOFF; DREXLER, 2011).

As células infectadas pelo Micoplasma têm seu metabolismo, funções celulares e crescimento modificado, que podem levar a morte celular e/ou interferir nos ensaios clínicos ou diagnósticos (WAITES et al., 2012; LEVY; LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA, 2004; WAITES; TALKINGTON, 2004). Esta interferência pode ser minimizada através de protocolos de biossegurança inseridos nas rotinas obrigatória dos laboratórios através de processos de triagem e inspeção de amostras, as ações de controles de acesso às amostras e aos meios de culturas, a higienização constantes de bancadas e cabines de biossegurança (UPHOFF; DREXLER, 2011).

3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Em relação ao Micoplasma, a técnica de coloração negativa se mostra fiel em suas imagens, revelando de fato os números reais das quantidades de Micoplasmas infectando a célula hospedeira, através da análise da morfologia do grupo ao qual essa bactéria pertence (TAKAYAMA et al., 1983). Esta técnica também permite visualizar alterações minuciosas no tamanho e no aspecto morfológico do Micoplasma, incluindo suas estruturas internas (NAKANE; MIYATA (2009)). Quando este não está em contato a nenhuma superfície apresenta morfologia esférica semelhante a cocos, porém quando está em contato com superfície ocorre mudança para a forma filamentosa (BALISH; KRAUSE (2006)). Durante o processo de adesão é possível visualizar as alterações no tamanho e formato de proteínas de adesão (MATSUIKE et al. (2023)).

A MET permite analisar as diferentes etapas da infecção da célula desde o início, fases da replicação e as alterações provocadas pelo Micoplasma na célula hospedeira, como por exemplo, as alterações estruturais e morfológicas ocasionadas na célula, bem como as alterações na permeabilidade da membrana e as modificações na estrutura das mitocôndrias. A observação destas alterações na célula hospedeira só é possível pela técnica de corte ultrafino da Microscopia Eletrônica de Transmissão, que possibilita a visualização de áreas mais claras e mais escuras, evidenciando essas alterações, como por exemplo, a perda das cristas mitocondriais, e/ou granulação citoplasmática (SESSO et al., 2017).

o processo de adesão é possível visualizar as alterações no tamanho e formato de proteínas de adesão (MATSUIKE et al. (2023)).

CONCLUSÕES

Em laboratório, o *Mycoplasma* pode causar muitas complicações como contaminante de cultura, resultando em perda de material e de tempo, e, para mitigar esta situação se fazem necessários à identificação e detecção da fonte de contaminação, bem como a implementação de procedimentos básicos de eliminação de contaminantes.

Esta bactéria pertence ao grupo de patógenos tanto de seres humanos quanto de animais. O *M. pneumoniae* é a principal espécie de patogenia humana deste grupo, e causa e causa infecções no trato respiratório superior, como a pneumonia adquirida na comunidade. Outras espécies de *Mycoplasma* patogênicas incluem *M. genitalium*, espécies de *Ureaplasma* (incluindo a *U. parvum* e *U. urealyticum*) e *M. hominis* associados a infertilidade, partos prematuros, ISTs, entre outras.

A MET tem se mostrado uma ferramenta importante na pesquisa e diagnóstico de *Mycoplasmas*, seja no controle de qualidade dos cultivos celulares produzidos para auxiliar no diagnóstico desse patógeno humano, ou como agente infeccioso, em ambas as situações sendo impactantes à Saúde Pública.

REFERÊNCIAS:

- HU, P. C. et al. A *Mycoplasma genitalium* protein resembling the *Mycoplasma pneumoniae* attachment protein. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 5, p. 1126–1131, 1 maio 1987.
- JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 18, n. 1, p. 1–11, jan. 2004.
- LEVY, C. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. 9. ed. SEPN 515, Edifício Omega. Bloco B, Brasília (DF), CEP70770-502: Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. v. 1. p. 50.
- MOAT, A.; FOSTER, J.; SPECTOR, M. **MICROBIAL PHYSIOLOGY**.–4th; p.24. ed.p.cm.Includes bibliographical references and index.ISBN 0-471-39483-1 (paper: alk. paper)1. Microorganisms—Physiology.Title.QR84.M64 2002571.29–dc21. Disponível em: https://www.academia.edu/35002636/Microbial_Physiology_4th_Edition_A_G_Moat_J_W_Foster_and_M_P_Spector
- MUGUNTHAN, S. P.; HARISH, M. C. In silico structural homology modeling and functional characterization of *Mycoplasma gallisepticum* variable lipoprotein hemagglutinin proteins. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 943831, 2022.
- NAZARZADEH, F. et al. Detection and Evaluation of Macrolide Resistance (Erythromycin) in *Mycoplasma hominis* Isolated from Endocervical Specimens of Patients Referring to Ibn Sina Infertility Treatment Centre, Tehran, Iran. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 16, n. 2, p. 95–101, 2022.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger's Principles of biochemistry**. Fourth Edition ed. [s.l.] W. H. Freeman, 2004. p. 5.
- NIKFARJAM, L.; FARZANEH, P. **Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture**. Cell J. 2012 Winter;13(4):203-12. Epub 2011 Dec 22.
- PEREYRE, S. et al. The increased incidence of *Mycoplasma pneumoniae* in France in 2011 was polyclonal, mainly involving *M. pneumoniae* type 1 strains. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 4, p. E212–E217, 1 abr. 2013.
- SESSO, A. et al. Bacteria arise at the border of mycoplasma-infected HeLa cells, containing cytoplasm with either malformed cytosol,

mitochondria and endoplasmicreticulum or tightly adjoined smooth vacuoles. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. 1, p. e84, 21 dez. 2017.

TAKAYAMA, H. et al. In situ Electron Microscopic Observation of Negatively Stained Tissue Culture Cells Contaminated with Mycoplasmas. **Microbiology**, v. 129, n. 11, p. 3379–3384, 1 nov. 1983.

UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Detecting Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, n.1, p. 93–103, 2011.

VERITAS. **Guia Prático sobre Contaminação em Cultura Celular InvivoGen**. Disponível em: <<https://www.veritasbio.com.br/guia-pratico-sobre-contaminacao-em-cultura-de-celulas/>>. Acesso em: 19 set. 2022.

WAITES, K. B. et al. Molecular Methods for the Detection of Mycoplasma and Ureaplasma Infections in Humans. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 14, n.5, p. 437–450, set. 2012.

WAITES, K. B.; KATZ, B.; SCHELONKA, R. L. Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.4, p. 757–789, out.2005.

WAITES, K. B.; TALKINGTON, D. F. *Mycoplasma pneumoniae* and Its Role as a Human Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 697–728, 1 out.2004.

TENDÊNCIAS EM PESQUISA NO REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL: USO DE SIMILITUDE ASSOCIADA À BIBLIOMETRIA

Clarissa Menezes¹; Ingrid Dias²; Samanta Etel Treiger Borborema³

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - CPM – IAL; E-mail: clara.parasito@gmail.com

²Estudante de Mestrado em Ciências – CCD/SES

³Docente/pesquisador do Núcleo de Parasitoses Sistêmicas – CPM – IAL

Resumo: As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitida pela picada de insetos fêmeas conhecidos como flebotomíneos. Estima-se que existam mais de 1 (um) bilhão de pessoas vivendo em área de risco para alguma forma da doença, surgindo mais de 1 milhão de novos casos por ano. Destes, pelo menos 30 (trinta) mil correspondem a novos casos de leishmaniose visceral (LV), decorrente da infecção pela *L. infantum* nas Américas e Europa e pela *L. donovani* na África e Ásia. Assim, o objetivo deste projeto foi identificar, através do uso de ferramentas computacionais, as tendências em pesquisa no que concerne ao tratamento da LV. Para isso, foi realizada uma análise bibliométrica, utilizando dois programas computacionais para obtenção de dados, sendo o Publish or Perish para mineração de artigos, e o VOSviewer para elaboração de análises bibliométricas através de figuras. As análises bibliométricas foram capazes de mensurar tendências para o tratamento de leishmanioses, o reposicionamento de fármacos como estratégia para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas e o uso de fármacos anti-histamínicos como potencial protótipo. Por fim, observou-se que a bibliometria é uma ferramenta potencial nas pesquisas científicas, visando mensurar dados quantitativos, tratando-os e interpretando em informações qualitativas; prevendo assim, o trajeto que a LV tem tomado nos últimos anos em atendimento ao que se preconiza a Organização Pan-Americana da Saúde, além de promover maiores conhecimentos acerca da doença.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral; Análise Bibliométrica; Programa Computacional; Reposicionamento de Fármacos; Anti-histamínicos.

INTRODUÇÃO

Em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) emitiu um apelo para que os países realizassem maiores investimentos no combate de doenças negligenciadas, principalmente as tropicais, doenças existentes nas áreas próximas aos trópicos. Em sua grande maioria, estas doenças são parasitoses, afetando cerca de 1,5 bilhão de indivíduos em 149 países. Foi estabelecida como meta, o ano de 2030 para erradicação de 30 doenças negligenciadas, investindo neste período, pelo menos US\$ 34 bilhões, levando a uma diminuição progressiva no número de casos (BVS, 2015).

As leishmanioses representam um conjunto de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. As manifestações clínicas podem variar desde lesões cutâneas (leishmaniose cutânea - LC) até o comprometimento visceral (leishmaniose visceral - LV), sendo a última fatal se não for tratada adequadamente (McGwire e Satoskar, 2014).

Diante disto, o nosso grupo identificou uma problemática importante, onde é necessário compreender além dos aspectos das leishmanioses, os tratamentos disponíveis e como a tecnologia pode auxiliar na procura sobre tendências na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para LV. Em razão disto, indaga-se: quais tratamentos estão sendo investigados atualmente para a LV, e como a ciência, alinhada à tecnologia, pode auxiliar no entendimento quanto às medidas que estão sendo tomadas neste cenário?

Diante das diversas abordagens na busca de novas opções terapêuticas, tem-se a estratégia do reposicionamento de fármacos. Uma metodologia que consiste no uso de um fármaco já disponível no mercado para outras indicações terapêuticas, considerando que tenham ação contra outra enfermidade (JOURDAN *et al.*, 2020). A estratégia de reposicionamento de fármacos é uma promissora aliada na busca de novas alternativas de tratamento para as leishmanioses, com isso, os fármacos anti-histamínicos estão sendo estudados por sua atividade antileishmania descrita por diferentes grupos de pesquisa. Por este motivo, o uso de ferramentas computacionais pode ser um importante diferencial quando aplicado para elucidar o cenário atual em relação ao desenvolvimento de fármacos candidatos para esta parasitose.

Logo, o objetivo geral deste projeto é identificar, através do uso de ferramentas computacionais, as tendências em pesquisa no que concerne ao tratamento da leishmaniose visceral.

MATERIAL E MÉTODOS

Primeiramente, foi usado o programa de acesso gratuito Publish or Perish (PoP) (<https://harzing.com/resources/publish-or-perish>), realizando três pesquisas individuais: (i) tendências para o tratamento das leishmanioses; (ii) uso do reposicionamento de fármacos para as leishmanioses; (iii) estudo de fármacos anti-histamínicos para as leishmanioses. Para realizar um filtro de estudos, foram utilizados como métricas de pesquisa o esquema apresentado na Figura 1.

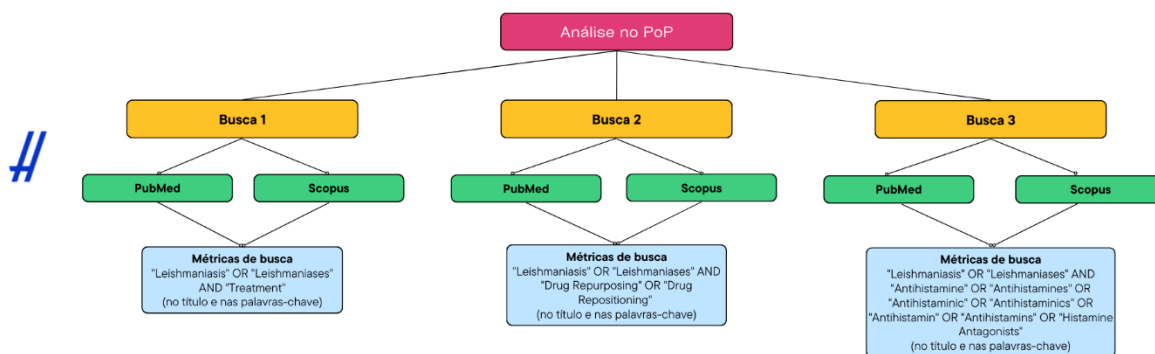


Figura 1 – Fluxograma de análise.
Fonte: A autora (2022).

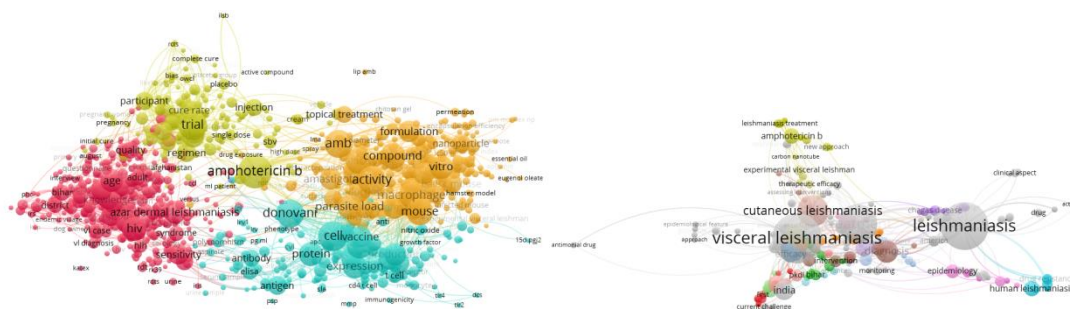
As bases de dados selecionadas foram PubMed e Scopus, por serem referências na área da pesquisa em saúde. Os resultados encontrados para cada uma das análises, sendo 6

(seis) ao total, foram salvos no formato RIS para análise de similitude realizada na etapa seguinte.

Já a análise de similitude foi realizada no programa de acesso gratuito VOSviewer (<https://www.vosviewer.com>), estruturando agrupamentos sobre cada assunto na relação de similitude entre os artigos encontrados em cada base de dado. O VOSviewer alerta sobre realizar uma análise de similitude considerando 60% de relevância das métricas encontradas. O programa encontra, além do mapeamento, termos (palavras mais repetidas, indicando tendências nos artigos), ligações (relação dos termos entre si) e agrupamento de cada tendência.

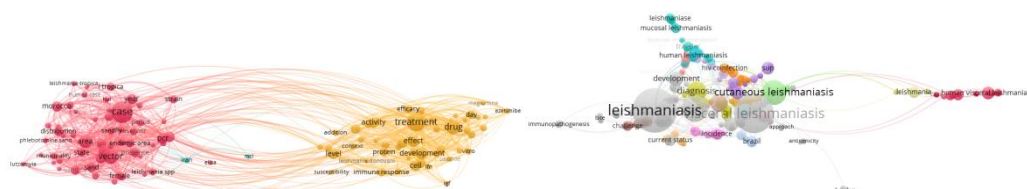
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2, considerando a **busca 1**, entre os 2.279 artigos científicos encontrados na base de dados Pubmed, percebe-se que as tendências apontam para: “anfotericina B”, “compostos”, “*L. donovani*”, “vacinas”, “terapias imunogênicas” e “imunologia”. Para esta análise foram encontrados 1.034 termos, distribuídos em 5 agrupamentos diferentes e 87.257 ligações. Entre os 200 artigos científicos encontrados na base de dados Scopus, percebe-se que as tendências apontam para: “formas clínica da leishmaniose - visceral e cutânea”, “doença em humanos” e “epidemiologia”. Para esta análise foram encontrados 488 termos, distribuídos em 50 agrupamentos diferentes e 1.695 ligações.



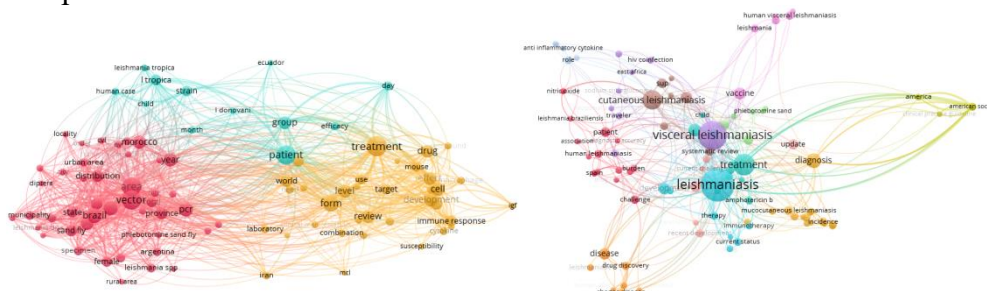
Figuras 2– Análise da similitude sobre leishmaniose e tratamento usando a base de dados PubMed (à esquerda) e Scopus (à direita) no programa VOSviewer. Fonte: A autora (2022).

Na Figura 3, considerando a **busca 2**, entre os 220 artigos científicos encontrados na base de dados Pubmed foram identificados 107 termos, distribuídos em 3 agrupamentos diferentes e 3.253 ligações. As tendências apontam para: “tratamento”, “desenvolvimento de compostos”, “resposta imunológica” e “estudos sobre o vetor”. Entre os 200 artigos científicos encontrados na base de dados Scopus foram identificados 484 termos, distribuídos em 44 agrupamentos diferentes e 1.474 ligações. As tendências apontam para: “formas clínicas da leishmaniose - visceral e cutânea”, “desenvolvimento de compostos”, “imunopatogênese” e “coinfecção com HIV”.



Figuras 3 - Análise da similitude sobre leishmaniose e reposicionamento de fármacos usando a base de dados Pubmed (à esquerda) e Scopus (à direita) no programa VOSviewer. Fonte: A autora (2022).

Na Figura 4, considerando a **busca 3**, entre os 192 artigos científicos encontrados na base de dados Pubmed foram identificados 91 termos, distribuídos em 3 agrupamentos diferentes e 2.454 ligações. As tendências apontam para: “estudos do vetor”, “*L. donovani*”, “*L. tropica*”, “paciente”, “tratamento”, “alvos”, “animais de laboratório”, etc. Existe uma forte ligação entre os estudos encontrados, delimitando uma área de pesquisa que se divide em estudar o vetor, as espécies de *Leishmania* e também desenvolvimento de compostos. Entre os 200 artigos científicos encontrados na base de dados Scopus foram identificados 102 termos, distribuídos em 12 agrupamentos diferentes e 414 ligações. As tendências apontam para: “tratamento”, “leishmaniose visceral”, “descobrimto de drogas”, “imunoterapia” e “vacinas”.



Figuras 4 - Análise da similitude sobre leishmaniose e fármacos anti-histamínicos usando a base de dados Pubmed (à esquerda) e Scopus (à direita) no programa VOSviewer. Fonte: A autora (2022).

A busca na base de dados Scopus dentro do programa PoP foi realizada no modo padrão, isto é, estabelecido para se buscar no máximo 200 artigos científicos. Ao longo das análises observou-se a possibilidade de existir mais artigos relevantes do tema estudado.

De acordo com Ferreira-Neto *et al.* (2022), através de bibliometria, é possível mensurar alguns dados importantes para a área científica, indicando por exemplo que, grande parte das pesquisas são realizadas em países onde existem grandes contribuições financeiras, o que é refletido no número de publicações anuais. O Brasil é o segundo país que mais contribuiu com a produção científica sobre o desenvolvimento de medicamentos para doenças negligenciadas no período de 2010 – 2020, antecedido apenas pelos Estados Unidos da América. No Brasil ainda, as principais instituições que desempenham pesquisas acerca de doenças negligenciadas são a Universidade de São Paulo (USP), a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e o Instituto Adolfo Lutz (IAL). Os autores apontam ainda que, a Leishmaniose foi a principal doença negligenciada encontrada nos artigos publicados (n = 201) no período entre 2010 a 2020, devida à endemicidade no país.

Para este fim, Mendes *et al.* (2021) comenta que a análise bibliométrica pode ser realizada para compreensão de um fenômeno, caracterizando-se como uma análise qualitativa, sendo possível auxiliar na pesquisa científica e também prever quais serão os tópicos mais pesquisados de acordo com sua relevância. Por este motivo, o uso de tecnologias se mostra bastante promissor, considerando que a realização de uma matriz que contemple estudos previamente prospectados por um programa pode ter dados mais limpos e específicos. Na plataforma do VOSviewer, por exemplo, ao dar o comando de análise bibliométrica pela similitude dos textos, o aviso de métricas de relevância é indicado ao usuário, demonstrando que serão consideradas palavras com mais de 60% de relevância de acordo com o próprio programa, procedimento que realizado de maneira manual, poderia incidir em maior tempo de tratamento de dados, como também grande volume de artigos a serem lidos.

O estudo de Pimentel e Teixeira (2020), realizou uma análise bibliométrica de forma manual na plataforma Web of Science, com parte dos dados tratados também no programa VOSviewer. Os autores afirmam que é possível realizar uma busca bibliométrica para entender como as produções científicas têm se desenvolvido na sociedade, independentemente da temática escolhida pelo pesquisador. Vê-se que é possível encontrar estudos entre o período de tempo desejado, palavras correlacionadas, autores e também países que têm ligação com as tendências de pesquisa. Utilizando os anos de 1979 a 2019, foram encontrados 1.655 artigos sobre turismo sustentável, temática utilizada pelos autores, incidindo que as métricas possuem forte influência sobre os achados do programa.

Nas análises bibliométricas por similitude realizadas no presente estudo, não foi vista uma queda gradativa conforme se afunilavam as métricas determinadas na metodologia, mas sim um aumento de ligações e agrupamentos de acordo com a área de interesse, como por exemplo o tratamento. O estudo de Ferreira-Neto *et al.* (2022), também corrobora para esse achado, tendo em vista que em sua análise, foram encontrados 410 artigos que tinham relação com a finalidade de prevenir, tratar ou diagnosticar as doenças negligenciadas, encontrando-se 378 artigos que visavam somente o tratamento das doenças. Isso pode ser explicado, pois a compreensão da doença hoje, não é mais o enfoque dos pesquisadores, mas sim a utilização de novas tecnologias que busquem terapias para doenças negligenciadas.

Já no que tange o reposicionamento de fármacos, não foram encontradas na literatura pesquisas bibliométricas voltadas para este fim, encontrando menos artigos do que a primeira análise, porém com um maior número de ligações, indicando que mesmo tendo poucos estudos voltados para reposicionamento de fármacos para leishmanioses, eles se ligam entre si. Isto também pode indicar que pouco tem se investido em pesquisas de reposicionamento de fármacos para o tratamento da LV.

A título de comparação, foi visto no estudo de Figueredo *et al.* (2020) que houve grande interesse global em pesquisas voltadas para a COVID-19, onde na análise bibliométrica realizada para o coronavírus, foi possível observar palavras como “*sequence*”, “*genome*”, “*vaccine*” e outras tendências voltadas para terapias imunogênicas. Isso pode explicar o grande interesse em pesquisas de vacinas e alvos genéticos para doenças negligenciadas, já que o avanço científico promovido pelo interesse em estudar o vírus, abriu porta para outros microrganismos. No entanto, é necessário compreender a realidade de cada local, considerando que doenças negligenciadas atingem locais mais vulneráveis e nem todos teriam recursos financeiros para obtenção de altas tecnologias voltadas para o tratamento de doenças negligenciadas, como no caso da LV.

Com isso, ao analisar o estudo da classe terapêutica de fármacos anti-histamínicos como estratégia de reposicionamento de fármacos, viu-se um número considerável de estudos. Entretanto, identificou-se uma tendência de pesquisa voltada para a LV, mas não com nomes específicos dos possíveis fármacos que poderiam ser reposicionados para este fim, garantindo assim menores custos para o tratamento e maior acessibilidade para áreas vulneráveis.

Albuquerque (2020) versa em sua pesquisa, também de teor bibliométrico, que apesar de existir esse tipo de metodologia na área da saúde no geral, ainda carecem estudos mais aprofundados a respeito de mensuração de indicadores confiáveis para compreensão do estado da arte da produção científica. No caso de tripanossomatídeos, Santos *et al.* (2021) concorda com tal afirmação em sua análise bibliométrica sobre a doença de Chagas, inferindo que o aumento no interesse sobre essas pesquisas tem crescido nos últimos anos, no entanto, ainda faltam recursos para incentivo às novas terapias, além de mais informação e acesso às tecnologias para os países endêmicos.

CONCLUSÕES

No mais, através destas análises foi possível demonstrar as tendências previstas para o tratamento da LV, além de comprovar tendências sobre o uso da estratégia de reposicionamento de fármacos e a possibilidade do uso de anti-histamínicos como candidato à ação antileishmania. Tem-se que a bibliometria pode ajudar em muito nas pesquisas científicas, visando mensurar dados quantitativos, tratando-os e interpretando em informações qualitativas; prevendo assim, o trajeto que a LV tem tomado nos últimos anos em atendimento ao que se preconiza a OPAS, além de promover maiores conhecimentos acerca da doença. Além disso, com os dados encontrados, será possível mensurar novos caminhos para o tratamento das leishmanioses no geral, vendo como promissora a estratégia de reposicionamento de fármacos, mas carecendo de mais investimentos para este método.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Ingrid de Oliveira Dias pela ajuda nas análises bibliométricas, corroborando para os achados obtidos neste estudo.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. E. S. O. **Análise bibliométrica na produção científica em saúde: um estudo no Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal do Pará (UFPA)**. 2020. 90 f. Dissertação [Mestrado em Ciência da Informação] – Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.
- BVS - Biblioteca Virtual em Saúde. **OMS pede investimentos no combate a doenças tropicais negligenciadas**. Site oficial BVS, 2015. Disponível em: <<https://bvsmms.saude.gov.br/oms-pede-investimentos-no-combate-a-doencas-tropicais-negligenciadas/#:~:text=A%20Organiza%C3%A7%C3%A3o%20Mundial%20da%20Sa%C3%BAde%20considera%20doen%C3%A7as%20tropicais%20negligenciadas%20a,lepra%2C%20a%20filar%C3%ADase%20inf%C3%A1tica%2C%20a%20>>. Acesso em 17 set. 2022.
- FERREIRA-NETO, P. T. P *et al.* Desenvolvimento de novos medicamentos para doenças negligenciadas: uma análise bibliométrica. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v. 16, n. 2, p. 366-387, 2022.
- FIGUEREDO, W. N. *et al.* Análise bibliométrica da produção brasileira sobre a Covid-19. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 34, e. 37107, 2020.
- HARZING, A. W. (2007). **Publish or Perish [software]**, available from <https://harzing.com/resources/publish-or-perish>
- JOURDAN, J. P. *et al.* Drug repositioning: a brief overview. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1145-1151, 2020.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. *Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment*. **Quarterly Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.
- MENDES, M. H. *et al.* Portólio E-V eficiente: bibliometria das evoluções considerando simulação ou métricas do risco com espaço objetivo aumentado. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, e57310413802, 2021.
- PIMENTEL, P. C.; TEIXEIRA, R. M. Análise bibliométrica da produção científica de empreendedorismo e turismo sustentável. **Turismo: Visão e Ação**, v. 22, n. 3, p. 552-574, 2020.

VAN ECK, N. J.; WALTMAN, L. (2010) *VOSViewer: Visualizing Scientific Landscapes [Software]*. Available from <https://www.vosviewer.com>

MÉTODOS DE DETECÇÃO DO COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis*: EVOLUÇÃO HISTÓRICA

Lais Santos Pereira¹, Andrea Gobetti Coelho Bombonatte²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública -IAL; E-mail: pereira.lais99@gmail.com

²Docente/pesquisador do Depto de Tuberculose e Micobacterioses – CLR Santos – IAL.

Resumo: A Tuberculose (TB) é uma doença bacteriana infectocontagiosa, transmissível caracterizada pelo acometimento principal dos pulmões, transmitida pelo *Mycobacterium tuberculosis*, pertencente ao complexo *M. tuberculosis* (CMTB). Apresentou-se os métodos microbiológicos para identificação e diagnóstico da Tuberculose (TB) presentes no Brasil e no mundo, em um contexto histórico, através de um estudo de natureza básica, exploratório, utilizando-se a técnica de revisão bibliográfica. Estudos apontam, ao longo dos anos, variados métodos validados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e assim incorporados pelo PNCT, para o diagnóstico e identificação do CMTB na questão da TB. Apresentam-se entre métodos tradicionais baseados em meios de cultura sólidos ou líquidos, os automatizados detectam a presença microbiana pelo metabolismo *in vitro*, e os genotípicos avaliam mutações no DNA de *M. tuberculosis*. Os avanços da tecnologia, investimentos em pesquisa e a modernização dos métodos diagnósticos, nos permitem uma melhor detecção e avaliação de um caso novo de TB em pacientes mais graves, diminuindo a possibilidade de transmissão de TB, principalmente quando se fala em TB resistente, efetivando o início do tratamento adequado e aumentando as chances de cura.

Palavras-chaves: *Mycobacterium tuberculosis*; diagnóstico; Tuberculose.

INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença bacteriana infectocontagiosa, transmissível caracterizada pelo acometimento principal dos pulmões, mas que também pode atingir outros órgãos ou ocorrer de forma disseminada por todo o corpo. A doença é causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, conhecido como Bacilo de Koch, pertencente gênero Micobactérias, ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB). Por ser endêmica, ainda é causa de óbitos por todo o mundo, caracterizando-se como um problema de saúde pública (BRASIL, 2022).

Em 1990, a doença foi caracterizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma emergência global, e desde então é alvo de diversas políticas públicas para sua erradicação. Para tal, o maior desafio está na busca de métodos de diagnóstico rápidos, que agilizem o início de um tratamento eficaz e alcancem a cura em 100% dos casos. Estima-se que cerca de mais de 1 milhão de casos não sejam notificados por ano,

dificultando seu controle e caracterizando uma falha nas políticas e programas de controle (OMS, 2020).

A doença pode se manifestar por duas formas clínicas classificadas como TB pulmonar (TBP), a mais frequente e de maior relevância, pois mantém a cadeia de transmissão da doença ativa, diante da sua transmissão pela fala, espirro ou tosse, e a TB extra-pulmonar (TBEP), que acomete outros órgãos que não o pulmão, presente principalmente em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (BRASIL, 2017).

É considerada uma doença grave, mas que possui cura, já que os tratamentos quimioterápicos se mostram eficientes desde 1950. O diagnóstico laboratorial do paciente infectado é realizado através de exames como a baciloscopia, cultura, ou outros mais específicos que envolvem a detecção do DNA bacilar, que atualmente mostram avanços graças à evolução da biologia molecular (SOUZA, 2006; BRASIL, 2022)

Assim, os métodos diagnósticos que norteiam a detecção da TB têm sido alavancados nos últimos anos com inovação tecnológica. Com resultados mais seguros, a biologia molecular nos traz mais rapidez e especificidade para que o tratamento desse paciente seja assertivo e de total recuperação. No entanto devemos entender que por mais que a tecnologia auxilie em um processo sucinto, a utilização de métodos considerados “antigos” ainda se faz necessária, diante da complexidade das microbactérias.

MATERIAL E MÉTODO

Foi realizada uma revisão sistemática, utilizando como fonte as seguintes bases de dados saúde: LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SCIELO (Scientific Electronic Library on-line), MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line), BVS (Biblioteca Virtual em Saúde), Periódicos CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) e Google Acadêmico. Foram incluídos artigos, dissertações ou teses, completos; sendo originais, cujas metodologias fossem baseadas em estudos observacionais, presentes em um dos bancos de dados acima mencionado, publicados entre 2000 e 2022; em periódicos nacionais e internacionais, em idiomas português, inglês ou espanhol. O processo de síntese dos dados foi realizado por meio de uma análise descritiva dos estudos selecionados, sendo o produto da análise apresentado de forma narrativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diagnósticos da TB nos dias de hoje demandam resultados praticamente automáticos para que a profilaxia adequada seja ofertada o quanto antes ao paciente. Segundo o estudo realizado por Datta et. al. (2017) os métodos tradicionais como a baciloscopia apresentam uma alta taxa de falsos negativos, principalmente quando falamos de amostras de crianças e pacientes com HIV, mas ofertam uma metodologia rápida e fácil, o que mantém esse teste ainda como uma via principal de detecção da doença.

A cultura líquida, metodologia aplicada pelo sistema BACTEC MGIT 960 também se mostrou extremamente necessária para a detecção de micobactérias não tuberculosas, levando a um diagnóstico mais eficiente. Seu acréscimo a baciloscopia foi de 40%, segundo Pedro et. Al, o que proporciona uma melhora tanto no diagnóstico quanto na condução de tratamento desses casos (CHIKAMATSU et al., 2014).

Por mais que os testes convencionais sejam capazes de detectar e rastrear a TB, os testes moleculares fornecem resultados confiáveis e rápidos que sendo aplicados ao atendimento médico trazem ainda mais eficiência ao tratamento do paciente, especialmente se aplicadas a laboratórios de contato inicial.

O GeneXpert MTB/RIF se mostra como uma ferramenta importante devido à sua alta especificidade e sensibilidade quando analisamos amostras extrapulmonares, apresentando um menor tempo para identificar o CMTB. De acordo com Weyer et al. (2013) seu sistema automatizado, com resposta rápida e detecção da resistência a rifampicina é sua maior vantagem, principalmente a pacientes que necessitam de tratamento enquanto esperam pelos resultados dos métodos tradicionais (WEYER et al, 2013; HUH et al., 2014).

A utilização do LPA (Line Probe Assay) como metodologia na rotina de diagnóstico trouxe uma rapidez na detecção de multi-resistências a fármacos de primeira e segunda linha (GONÇALVES et al., 2012). No estudo feito por Nathavitharana et al. (2017), o LPA apresentou cerca de 96,7% de sensibilidade e 98,8% de especificidade, sendo altamente favorável para a detecção da resistência a rifampicina e isoniazida, e também para a avaliação de drogas injetáveis e fluoroquinolonas.

A evolução dos métodos não ocorreu para que um substituísse o outro, mas para que cada um fosse complementar para obtenção de um diagnóstico ainda mais completo. A baciloscopia continua sendo essencial na luta contra a TB, principalmente no acompanhamento do tratamento. Os desafios que as cepas multirresistentes nos trazem, torna necessário o aprimoramento das técnicas e materiais disponíveis para o diagnóstico da TB (BRASIL, 2008).

A implementação desses métodos de detecção da TB, do ponto de vista epidemiológico para o tratamento das populações mais afetadas, é a lacuna correta que precisa ser preenchida para que os casos de TB se encerrem. A junção da sensibilidade, especificidade e tempo de resposta dos métodos, com as medidas que priorizam conter as lacunas de detecção, pacientes e sistema de saúde é a chave para que a cadeia de transmissão termine (ZELNER et al., 2014).

A TB continua sendo a maior causa de mortalidade no mundo devido a sua alta taxa de infecção, mas, felizmente, a tecnologia de ponta que muitos dos testes diagnósticos vêm apresentando, a meta de erradicação global pode ser alcançada (THERON et al., 2014). No entanto, a contenção da transmissão ainda depende de inúmeros fatores, como o tempo eficiente em que o paciente procura o serviço de saúde, sintomas e o padrão da transmissão antes do diagnóstico ser confirmado. A baixa sensibilidade dos testes continua sendo a maior razão de haver uma lacuna entre a incidência da doença e a notificação dos casos (OMS, 2014).

Todos os métodos, tanto tradicionais como também os mais recentes, se mostram ferramentas imprescindíveis para a detecção da TB. Com tudo, a principal maneira de acabar com a TB é impedindo a sua dispersão, tratando e impedindo que o paciente continue transmitindo a doença para outros indivíduos (RAVISHANKAR et al., 2009).

A Figura 1 nos mostra em uma linha evolutiva, os métodos que apresentamos hoje em uso no Brasil, juntamente com as novas metodologias que estão em processo de endossamento pela OMS. Podemos ver a evolução dos métodos através das necessidades com que os casos de TB foram evoluindo, e urgência em precisarmos realizar exames com resultados mais rápidos e eficientes.

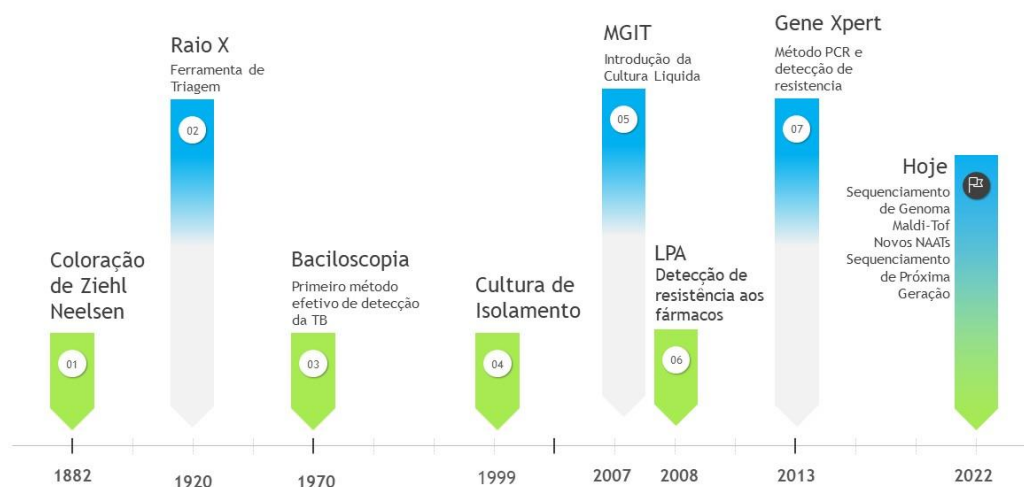


Figura 1 - Linha evolutiva dos métodos de detecção. Fonte: elaborada pelo autor, 2022.

CONCLUSÕES

A avaliação da implementação de novos testes deve levar sempre em conta os resultados que queremos alcançar com a aplicação da metodologia. Evitar transmissões, o tempo disponível dos resultados, capacidade humana aplicada, precisam ser avaliados quando a inovação é validada.

A natureza da TB, sistema de saúde e o comportamento do paciente são pontos cruciais que determinam o sucesso ou não do tratamento e manutenção da cadeia de transmissão. Quando integrados, esses fatores formam uma estrutura unificada, que quando analisadas de maneira correta, incrementam na informação disponível para a evolução das tecnologias e métodos, acrescentando na eficácia da implementação destes testes.

Com um diagnóstico positivo, a interação que esse paciente tem com outros indivíduos e com o sistema de saúde é intrínseca, o que reflete majoritariamente na transmissão da doença. Se um teste mais sensível, aumentar a probabilidade de diagnóstico, a duração e transmissão da doença podem cair pela metade em sua fase ativa.

Se falarmos das populações periféricas, a incorporação de novos testes é impactante, mas necessita do esforço que o sistema de saúde tem ao implantá-lo. Sensibilidade e especificidade não podem ser as únicas lacunas a ser preenchidas pelos testes diagnósticos, mas o valor incremental epidemiológico que estes testes trará a essas populações, tendo em vista que a maior cadeia de transmissão da doença ocorre quando o paciente acessa o sistema de saúde.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Brasil Livre da Tuberculose: Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual nacional de vigilância laboratorial da tuberculose e outras micobactérias**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil**. – Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 492 p. : il. 10 de nov de 2022.
- CHIKAMATSU, K et al. **Comparative evaluation of three immunochromatographic identification tests for culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex**. BMC Infectious Diseases, v. 14, n. 1, p. 1- 7, 2014.
- DATTA, S et al. **Comparison of sputum collection methods for tuberculosis diagnosis: a systematic review and pairwise and network meta-analysis**. The Lancet Global Health, v. 5, n. 8, p. e760-e771, 2017.
- HUH, Hee Jae et al. **Performance evaluation of the Xpert MTB/RIF assay according to its clinical application**. BMC Infectious Diseases, v. 14, n. 1, p. 1–6, 2014.
- NATHAVITHARANA, R R. et al. **Accuracy of line probe assays for the diagnosis of pulmonary and multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and metaanalysis**. European Respiratory Journal, v. 49, n. 1, 2017.
- RAVISHANKAR, N et al. **Financing of global health: tracking development assistance for health from 1990 to 2007**. The Lancet, v. 373, n. 9681, p. 2113-2124, 2009.
- SOUZA, Marcus Vinícius Nora. **Tuberculose em gestantes: um importante problema de saúde pública mundial**. Rev. Bras. Farm, v. 87, n. 4, p. 132–8, 2006.
- WEYER, K et al. **Rapid molecular TB diagnosis: evidence, policy making and global implementation of Xpert MTB/RIF**. European Respiratory Journal, v. 42, n. 1, p. 252-271, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2014**. World Health Organization, 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2020**, [s.l.]: World Health Organization, 2020.

ZELNER, Jonathan L. et al. **Age-specific risks of tuberculosis infection from household and community exposures and opportunities for interventions in a highburden setting.** American journal of epidemiology, v. 180, n. 8, p. 853-861, 2014.

ANÁLISE DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA HEPATITE B REALIZADO PELO INSTITUTO ADOLFO LUTZ CENTRAL ENTRE JANEIRO E JULHO DE 2022

**Julia Gabriela dos Santos Pedro¹; Amanda Vieira Lima¹; Marcílio Figueiredo Leme²;
Adriana Parise Compri²**

¹ Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública do Laboratório de Hepatites do Instituto Adolfo Lutz Central; e-mail: jgabriela12@gmail.com; e-mail: vieira14amanda@gmail.com.

² Pesquisador Científico do Laboratório de Hepatites do Instituto Adolfo Lutz Central; e-mail: marcilio.lemos@ial.sp.gov.br; e-mail: adriana.compri@ial.sp.gov.br.

RESUMO

A hepatite B é um grande problema de saúde pública; e a quantificação de seu DNA é um excelente marcador da atividade do HBV, sendo utilizada para diagnóstico de fases crônicas. OBJETIVOS: avaliar o papel do laboratório de Hepatites do IAL Central na rotina de diagnóstico da hepatite B no período de janeiro a julho de 2022. MATERIAIS E MÉTODOS: foram incluídas neste estudo as amostras e suas requisições da rotina de Hepatite B do Laboratório de Hepatites do IAL Central e os dados gerados foram exportados do GAL para uma planilha criada no Excel e compilados a partir de análises estatísticas descritivas e cálculos por ferramentas disponíveis no programa. RESULTADOS E DISCUSSÃO: Do total de amostras recebidas, 203 amostras não foram processadas, onde 33% dos motivos para o não processamento foram relacionados diretamente à condição da amostra e 31% em decorrência do cadastro e critérios estabelecidos. Os principais resultados de exames com a finalidade de confirmação de diagnóstico foram não detectados e entre log 2,00 a 2,99, corroborando com resultados da literatura. Resultados de avaliação de indicação de tratamento obtiveram grande parte dos resultados entre log 2,00 a 2,99, com valores de carga viral próximos ao estabelecido para indicação de tratamento. Dentre os exames com a finalidade de monitoramento de tratamento, 57,1% possuíam carga viral não detectável e 48,8% abaixo do limite da quantificação demonstrando a efetividade do tratamento. CONCLUSÃO: De acordo com os dados encontrados, é evidente a importância do laboratório para o diagnóstico da hepatite B colaborando na vigilância, promoção e prevenção de saúde.

Palavras-chaves: Carga viral, Diagnóstico, Hepatite B, Rede de Diagnósticos.

INTRODUÇÃO

Globalmente, as hepatites virais são responsáveis por mais de 1,34 milhão de óbitos por ano, dos quais 66% são causados pelo vírus da hepatite B. Essas mortes decorrem de complicações de infecções crônicas como insuficiência hepática, cirrose e hepatocarcinoma (1,2,3). A epidemia da hepatite B levou a OMS a estabelecer como objetivo a eliminação das hepatites virais até 2030, com o Brasil sendo um dos países signatários devido à sua prevalência baixa a intermediária de portadores de HBsAg e à presença de áreas de alta

endemicidade, como a bacia amazônica e regiões do Sul e Sudeste. Entre 2000 e 2021, 264.640 casos de hepatite B foram diagnosticados no Brasil, com 34,2% concentrados na região Sudeste ^(4,5).

A quantificação do HBV-DNA no sangue é um excelente marcador da atividade do HBV podendo ser feita por uma vasta gama de técnicas moleculares como espectrofotometria, PCR em tempo real, PCR digital, métodos de amplificação isotérmica e biossensores ⁽⁶⁾.

O laboratório de Hepatites do IAL Central é o laboratório coordenador responsável pelos 18 laboratórios do Programa Estadual de Hepatites Virais que compõe a Rede de Diagnóstico Molecular de Hepatite B, atuando na vigilância epidemiológica das hepatites virais, realizando a confirmação de diagnóstico, avaliação da indicação de tratamento, monitoramento do tratamento, genotipagem e pesquisa de mutações resistentes aos antivirais, acompanhamento de carga viral na gestação e, atualmente, ajudando a elucidar casos de hepatite aguda de etiologia desconhecida.

Este artigo tem como objetivo avaliar o papel do laboratório de Hepatites do IAL Central na rotina de diagnóstico molecular da hepatite B nas regiões por ele atendidas no período de janeiro a julho de 2022 por meio da apresentação dos motivos de cancelamento dos exames solicitados e propor soluções para as não conformidades e análise das finalidades apresentadas nas solicitações de exame e correlacionando-as com os resultados obtidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídas neste estudo as amostras e suas requisições da rotina de Hepatite B do Laboratório de Hepatites do IAL Central. O levantamento de dados secundários como dados demográficos, epidemiológicos e resultados de exames foram exportados do Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) para uma planilha criada Microsoft Excel 2010 e compilados a partir de análises estatísticas descritivas e calculados por ferramentas disponíveis no programa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O laboratório de Hepatites do IAL Central, coordenador e executor da Rede Estadual de Diagnóstico Molecular das Hepatites B e C, recebeu, através do sistema GAL, 1165 cadastros de pacientes para a realização do exame de identificação do vírus da hepatite B por PCR (quantitativo) em tempo real em amostras de sangue de pacientes provenientes das regiões de Osasco, Vale do Ribeira, Franco da Rocha e da cidade de São Paulo.

962 amostras foram processadas e encaminhadas para a liberação de resultado e 203 foram canceladas, sendo 33% dos cancelamentos relacionados diretamente à condição da amostra, 31% em decorrência do cadastro e critérios estabelecidos no protocolo do Ministério da Saúde e 35% não foram descritos (tabela 1).

Dentre os 33% de cancelamentos relacionados à amostra, 27,1% apresentaram resultado duvidoso (discordância entre resultado do exame e finalidade apresentada na requisição ou com resultados anteriores) e houve a necessidade de uma nova coleta para confirmação do resultado obtido, mas foram descritos como volume insuficiente para confirmação de resultado em decorrência do GAL não ter uma opção para informar o real motivo do cancelamento. O HBV é extremamente transmissível comparado ao HIV e o HCV, principalmente pelo tempo de viabilidade. Deve-se avaliar com muita precisão casos de contaminação de amostras e, portanto nestes casos, solicitar uma nova coleta ⁽²⁾. De modo geral, os outros cancelamentos relacionados à amostra foram em consequência de condutas

errôneas da unidade solicitante (tabela 1). Houve a liberação de 962 resultados com média de dias entre a data de recebimento e a data de liberação dos meses estudados de $7,4 \pm 5$ dias, demonstrando assim que, mesmo com problemas evitáveis, o laboratório se manteve dentro do tempo estipulado de 15 dias para a liberação de resultados para ambos os kits utilizados (7).

Tabela 1 - Processamento das amostras do Laboratório de Hepatites Virais do IAL Central para a realização do PCR quantitativo em tempo real de Hepatite B no período de janeiro a julho de 2022

	Total (n=1165)	%
Amostras processadas	962	83
Amostras não processadas	203	17
Descrição dos motivos para o não processamento de amostras		
	Total (n=203)	%
Sem motivo descrito	72	35,5
Descrição dos motivos relacionados às n=63 requisições		31,0
IAL central não realiza exames fora de seu fluxo estabelecido	28	13,8
Expiração da data de cadastro na triagem	19	9,4
Cadastro em duplicidade	9	4,4
Solicitação em desacordo com critérios do protocolo do Ministério da Saúde	7	3,4
Descrição dos motivos relacionados às n=68 amostras		33,5
Volume insuficiente para confirmação de resultado	55	27,1
Envio de material inadequado para realização do exame	5	2,5
Amostra com identificação duvidosa	3	1,5
Amostra hemolisada	3	1,5
Incidente técnico laboratorial	1	0,5
Volume insuficiente para realização do teste	1	0,5

A quantificação do DNA do HBV permite confirmar o diagnóstico, identificar portadores crônicos, avaliar a progressão da doença, resposta terapêutica e avaliar a possibilidade de interrupção do tratamento (4), portanto, o campo de preenchimento da finalidade do exame se demonstra extremamente importante para a realização e liberação de resultados. O campo foi preenchido em 825 requisições das quais, 21,9% dos pacientes (n=255) necessitavam do exame para avaliar a indicação do tratamento para hepatite B, 32,8% (n=382) para monitoramento do tratamento, 12,9% (n=150) para confirmação de diagnóstico. Em 17% (n=198) não houve informação devido a não realização do exame e em 12,2% (n=142) das solicitações o campo de finalidade não foi preenchido e, portanto, o exame foi realizado sem a finalidade descrita (tabela 2). O preenchimento da finalidade do exame não é obrigatório, mas auxilia na interpretação do exame quando finalizado, permitindo compreender casos de resultados discordantes ou duvidosos, principalmente em amostras com carga viral baixa.

Tabela 2 - Finalidade das solicitações de exames de PCR quantitativo em tempo real para Hepatite B no período de janeiro a julho de 2022

Finalidade	Total (n=1165)	%
Avaliar indicação de tratamento	255	21,9
Monitorar tratamento	382	32,8
Confirmação de diagnóstico	150	12,9
Hepatite aguda de causa desconhecida	26	2,2
Genotipagem (resistência)	5	0,4
Gestante portadora do HBV	4	0,3
Investigação de transmissão vertical	3	0,3
Finalidade não descrita	142	12,2
Exame não realizado	198	17

Das 150 requisições que estavam com a finalidade descrita como confirmação de resultado, não foi detectada a presença do HBV em 59,3% (n=89) das amostras. Os resultados entre log 2,00 a 2,99 foram a maior porcentagem descrita, encontrados em 14,7% (n=22) das amostras de carga viral quantificável de pacientes, corroborando com resultados da literatura. Dentre as amostras positivas, 17,3% apresentaram carga viral maior que log 3,00, indicando que o HBV estava em uma replicação ativa. Como estes pacientes não estão em tratamento, espera-se encontrar uma replicação viral elevada confirmando a atividade da doença. Também é normal resultados com carga viral não detectável, demonstrando que o paciente não está com hepatite B ativa. Resultados com carga viral baixa são suspeitos, podendo ser em decorrência da integridade da amostra, contaminação cruzada ou troca de amostras ⁽⁸⁾ (tabela 3).

Tabela 3 - Resultado das solicitações para confirmação de diagnóstico por PCR quantitativo em tempo real de Hepatite B no período de janeiro a julho de 2022

Logarítmo	Média (log)	Total (n=150)	%
<1,00	<1,00	3	2,0
1,00 - 1,99	1,66	9	6,0
2,00 - 2,99	2,61	22	14,7
3,01 - 3,98	3,45	12	8,0
4,04 - 4,80	4,48	5	3,3
5,21 - 5,82	5,81	1	0,7
6,52 - 6,93	6,80	1	0,7
7,15 - 7,91	7,56	3	2,0
8,07 - 8,95	8,77	2	1,3
>9,00	>9,00	2	1,3
Não Detectável	0	89	59,3

A avaliação de indicação de tratamento foi a segunda maior finalidade, apresentada em 21,9% (n=255) das solicitações. Destaca-se que 35,3% (n=90) dos resultados detectados estavam no intervalo de log 2,00 a 2,99 com média de resultados de log 2,55 (tabela 4) expressando replicação viral ativa, com valores de carga viral próximos ao estabelecido para indicação de tratamento (HBV-DNA >log 3,00), demonstrando a necessidade de análise de

outras características clínicas para inclusão em terapia antiviral. Em 15,7% (n=40) a carga viral não foi detectada sugerindo o preenchimento incorreto do campo de finalidade do exame na requisição, visto que não é um resultado esperado para os pacientes em avaliação de indicação de tratamento ou diagnóstico errôneo de portador de hepatite B pela falta de replicação viral. Estas requisições sugerem a avaliação da progressão da doença, sendo esperados valores que expressam a replicação do vírus sem diminuição da carga viral. A indicação de tratamento deve ser fundamentada em características clínicas, carga viral, níveis de ALT, status do HBeAg e intensidade do dano hepático^(4,9,10) (tabela 4).

Tabela 4 - Resultado das solicitações para avaliação de indicação de tratamento por PCR quantitativo em tempo real de Hepatite B no período de janeiro a julho de 2022

Logarítmo	Média (log)	Total (n=255)	%
<1,00	<1,00	14	5,5
1,00 - 1,99	1,63	64	25,1
2,00 - 2,99	2,55	90	35,3
3,01 - 3,98	3,43	33	12,9
4,04 - 4,80	4,51	8	3,1
5,21 - 5,82	5,42	3	1,2
8,07 - 8,95	8,07	1	0,4
>9,00	>9,00	2	0,8
Não Detectável	0	40	15,7

A principal razão para as solicitações de quantificação da carga viral da Hepatite B por PCR foi o monitoramento de pacientes em tratamento, representando 32,8% (n=382) das requisições. Dentre estes, 57,1% (n=218) possuíam carga viral não detectável e grande parte dos pacientes, 48,8% (n=80), possuíam resultados abaixo do limite da quantificação. Segundo a Sociedade Brasileira de Infectologia⁽¹¹⁾, o tratamento para HBV com o objetivo de cura clínica almeja baixos níveis de HBV-DNA para o controle de replicação viral e a normalização de aminotransferases. Portanto, estas requisições sugerem que o paciente tenha feito uso de medicamento e apresente níveis baixos ou não detectáveis de HBV-DNA sérico. A carga viral alta presente em 4,8% das amostras sugere a ausência de tratamento contra o HBV ou possível troca de amostras, podendo ter acontecido na unidade solicitante ou no próprio laboratório executor, sendo necessária a confirmação com uma nova amostra^(8,11) (tabela 5).

Tabela 5 - Resultado das solicitações para monitoramento de tratamento por PCR quantitativo em tempo real de Hepatite B no período de janeiro a julho de 2022

Logarítmo	Média (log)	Total (n=382)	%
<1,00	<1,00	80	20,9
1,00 - 1,99	1,46	44	11,5
2,00 - 2,99	2,52	22	5,8
3,01 - 3,98	3,44	9	2,4
4,04 - 4,80	4,13	3	0,8
5,21 - 5,82	5,44	1	0,3
6,52 - 6,93	6,77	2	0,5
8,07 - 8,95	8,39	3	0,8
Não Detectável	0	218	57,1

CONCLUSÃO

Os dados levantados e interpretados evidenciam a importância do Laboratório de Hepatites do Instituto Adolfo Lutz Central para o diagnóstico molecular de hepatite B colaborando na vigilância, promoção e prevenção de saúde. As solicitações de exames canceladas demonstram a necessidade de uma maior atenção e comunicação pela unidade solicitante, com treinamentos e reciclagem dos funcionários que realizam o preenchimento das requisições, coleta e envio de amostras. Novos campos para informações relevantes sobre o histórico do paciente auxiliariam o laboratório na compreensão e assertividade quanto ao resultado obtido no exame solicitado.

REFERÊNCIAS

1. NASSAL, Michael. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut, Germany*, v. 64, n. 12, p. 1972–1984, 2015. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309809. Acesso em: 9 ago. 2022.
2. GUVENIR, Meryem; ARIKAN, Ayse. Hepatitis B Virus: From Diagnosis to Treatment. *Polish Journal of Microbiology, Northern Cyprus*, v. 69, n. 4, p. 391–399, 2020. DOI: 10.33073/pjm-2020-044. Acesso em: 10 ago. 2022.
3. DUARTE, Geraldo; PEZZUTO, Paula; BARROS, Tiago Dahrug et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: hepatites virais. *Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasil*, v. 30, n. spe1, 2021. DOI: 10.1590/s1679-4974202100016.esp1. Acesso em: 15 set. 2022.
4. FERRAZ, Maria Lucia et al. Brazilian Society of Hepatology and Brazilian Society of Infectious Diseases Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Hepatitis B. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases, Brazil*, v. 24, n. 5, p. 434–451, 2020. DOI: 10.1016/j.bjid.2020.07.012. Acesso em: 19 set. 2022.
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais 2022. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. b. v. número especial Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2022-numero-especial>.
6. LIU, Yue-Ping. Rapid and quantitative detection of hepatitis B virus. *World Journal of Gastroenterology, China*, v. 21, n. 42, p. 11954, 2015. DOI: 10.3748/wjg.v21.i42.11954. Acesso em: 18 out. 2022.
7. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. *Biologia Médica - Exames*. [s.d.]. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/ial/exames/biologia-medica-exames>. Acesso em: 4 nov. 2022.
8. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções. Brasília, 2017. 120 p.
9. TANG, Lydia S. Y. et al. Chronic Hepatitis B Infection. *JAMA, Baltimore*, v. 319, n. 17, p. 1802, 2018. DOI: 10.1001/jama.2018.3795. Acesso em: 15 ago. 2022.
10. PAWLOTSKY, Jean-Michel. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology, France*, v. 122, n. 6, p. 1554–1568, 2002. DOI: 10.1053/gast.2002.33428. Acesso em: 21 nov. 2022.
11. SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. Recomendações da SBH e SBI para Tratamento da Hepatite C no Brasil com novos DAAs. Brasil: Dimitris Pappus, 2015. Acesso em: 29 set. 2022.

A SÍNDROME PÓS-COVID-19

Luiza Marit de Jesus¹; Gabriela Bastos Cabral²

¹ Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública –IAL – Regional Santos; E-mail: lmarit4@gmail.com

² Biomédica do Núcleo de Ciências Biomédicas – IAL – Regional Santos.

Resumo: Cerca de 10 a 20% dos infectados pela COVID-19 apresentam sintomas da COVID longa. Os sintomas são diversos, afetando múltiplos órgãos, como respiratório, cardiovascular, neurológico, renal, gastrointestinal e até dermatológico. Através de um estudo de revisão bibliográfica foi possível caracterizar as principais complicações pós-COVID-19 e sua fisiopatologia. A fadiga foi o sintoma mais comum relatado nos estudos, seguida por falta de ar, tosse e dores musculares. Complicações neurológicas e psiquiátricas também estão entre as manifestações extrapulmonares mais prevalentes da pós-COVID. Os fatores de risco para COVID longa são: sexo feminino, comorbidades pré-existentes, pessoas que não tomaram a vacina, casos graves de COVID-19 e pacientes mais idosos. Crianças que tiveram a síndrome podem apresentar uma condição rara chamada de Síndrome Inflamatória Multissistêmica em Crianças (MIS-C). Os casos de síndrome pós-COVID-19 estão aumentando constantemente no mundo todo. E uma melhor compreensão da COVID longa é essencial para identificar e avaliar medidas para prevenir e tratar esses sintomas de longo prazo.

Palavras-chave: COVID-19; infecção persistente; infecções por coronavírus.

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, a Organização Mundial de Saúde (OMS) foi alertada sobre diversos casos de pneumonia aguda na cidade de WuHan, na província de Hubei, na China. A doença foi identificada como uma nova cepa de coronavírus e foi nomeada como COVID-19, uma infecção respiratória aguda grave, causada pelo vírus SARS-CoV-2 (OPAS, 2021).

Esse vírus se disseminou mundialmente com rapidez devida sua alta transmissibilidade, obrigando a OMS a declarar o surto global de COVID-19 como uma pandemia, em março de 2020. Desde então, essa pandemia já foi responsável por mais de 600 milhões de casos confirmados de COVID-19, incluindo mais de 6 milhões de mortes ao redor do mundo (WHO, 2022).

A pandemia de COVID-19 ainda não está controlada, e o mundo tem que lidar com suas consequências. Há inúmeros casos de pacientes que contraíram a doença e tiveram persistência dos sintomas mesmo após sua recuperação, segundo relatos de literatura. Foi observado que a infecção passou a afetar múltiplos órgãos, descrevendo uma série de sintomas respiratórios, cardíacos, renais, neurológicos e psiquiátricos. (DESAI *et al.*, 2022; MEHANDRU & MERAD, 2022).

Esses sintomas prolongados da doença, denominado como “COVID de longa duração”, “COVID longa” ou “Síndrome pós-COVID-19”, estão sendo cada vez mais

frequentes. À medida que a pandemia do COVID-19 progride, conseqüentemente o número de casos de pessoas com COVID longa aumentam da mesma forma, tornando-se assim uma nova preocupação para saúde pública mundial (BRIGHTLING & EVANS, 2022).

Este estudo reúne informações sobre a Síndrome pós-COVID-19, permitindo compreender melhor os mecanismos do vírus e as conseqüências causadas no corpo humano.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo de revisão bibliográfica, sobre a Síndrome pós-COVID-19. Para realização desta pesquisa, foi feita a busca de dados já publicados, utilizando como fonte as seguintes bases de dados de saúde: Google Acadêmico e National Center for Biotechnology Information (NCBI – PubMed). Foram utilizadas as palavras-chaves em português e inglês: COVID-19, COVID longa e síndrome pós-COVID-19. Após o levantamento do material foram selecionados artigos entre os anos de 2020 a 2022.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A OMS estimou que 10 a 20% dos pacientes com COVID-19 apresentaram sintomas prolongados por meses após a infecção. Não se sabe ainda os mecanismos exatos responsáveis pelas complicações pós-COVID, mas existem alguns meios fisiopatológicos do vírus que podem ser os responsáveis por essas condições em longo prazo. Após o vírus adentrar o corpo humano e atingir o sistema imunológico, ocorre um processo chamado de “tempestade inflamatória”, no qual, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 (Interleucina 1) e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa). Esse fenômeno possui um potencial para lesionar outros órgãos e tecidos, causando assim, infecções extrapulmonares (LÜSCHER, 2020; WHO, 2022).

Os casos de sintomas pós-COVID estão crescendo constantemente, de acordo com o estudo realizado por Sykes *et al.* (2021), dos 134 pacientes que atenderam os critérios de pesquisa, 86% relataram pelo menos um sintoma persistente após a infecção por COVID-19. Já em um estudo de Carfi *et al.* (2020), de um total de 143 pacientes, foram acompanhados sendo que 32% apresentaram um ou dois sintomas e 55% apresentaram três ou mais, após dois meses do início dos sintomas.

Apesar dos sintomas prolongados causados pela COVID-19 afetarem múltiplos órgãos, as manifestações mais frequentes são respiratórias, cardiovasculares e neurológicas. Os sintomas podem variar desde os mais comuns, como tosse, fadiga, dor de cabeça, perda de memória, dificuldade de concentração, distúrbios do sono, até os sintomas mais graves, como doenças tromboembólicas venosas, miocardite, insuficiência cardíaca aguda, além de ansiedade e depressão (AHMAD *et al.*, 2021; MIRANDA *et al.*, 2022; MEHANDRU & MERAD, 2022).

Muitas sequelas pulmonares de longo prazo foram relatadas após a infecção por COVID-19 (DESAI *et al.*, 2022). Segundo Boutou *et al.* (2021), manifestações como dispnéia, dependência de ventilador, dependência de oxigênio, anormalidades no teste de função pulmonar (PFT) e doença pulmonar fibrótica foram relatados após a doença. A dispnéia é o sintoma pulmonar mais comum relatado após a infecção por COVID-19 leve ou grave, podendo persistir em 72,9% a 53% dos pacientes por aproximadamente dois meses após o início dos sintomas (GARRIGUES *et al.*, 2020; HALPIN *et al.*, 2021). Anormalidades radiográficas também foram observadas em um número de casos

significativos de pacientes que se recuperaram da COVID-19 (HUANG *et al.*, 2021; VAN GASSEL *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2020).

Os sintomas cardíacos são uma queixa comum após a recuperação da COVID-19. Há evidência que a COVID longa causa lesões cardíacas, gerando complicações como, insuficiência cardíaca, miocardite, palpitações no peito, trombose e disfunção cardíaca. A miocardite e arritmia são as complicações cardiovasculares mais frequentes em pacientes que tiveram COVID-19 (SEYEDALINAGHI *et al.*, 2020).

Através do estudo de Puntmann *et al.* (2020), o exame de ressonância magnética cardíaca (RMC) realizado em 100 pacientes recuperados da infecção de COVID, sendo que 67 (67%) se recuperaram em casa, enquanto 33 (33%) precisaram de hospitalização, resultou em um total de 78 (78%) pacientes com uma anormalidade nas imagens de RMC, sendo que as mais prevalentes foram a inflamação miocárdica detectada em 60 (60%) dos pacientes, independente de condições preexistentes e a gravidade da infecção.

As complicações neurológicas e psiquiátricas estão entre as manifestações extrapulmonares mais prevalentes da COVID, afetando mais de 30% dos pacientes (MAO *et al.*, 2020). Entre as manifestações neuropsiquiátricas, cefaleia, distúrbio do sono, “nevoeiro cerebral”, ansiedade e depressão, foram observadas com maior frequência em pacientes que se recuperaram da doença (AHMAD *et al.*, 2021; ASADI-POOYA *et al.*, 2022; MIRANDA *et al.*, 2022).

Para compreender melhor as consequências neurológicas do COVID-19, foi realizada uma ampla investigação, feita por Crunfli *et al.* (2022), trata-se de um estudo brasileiro da UNICAMP em parceria com a USP. Após analisar o exame de ressonância magnética de 81 indivíduos diagnosticados com infecção leve por COVID-19 e comparar com o exame de 81 voluntários saudáveis, foi possível observar uma redução na espessura cortical exclusivamente no hemisfério esquerdo, incluindo o giro reto esquerdo, giro temporal superior, giro sulco temporal e sulco colateral transversal posterior.

Além disso, o estudo foi composto por análise de tecido cerebral de pessoas que foram a óbito por COVID-19 e de material produzido com células-tronco, e com isso, foi possível identificar que as células alvo do SARS-CoV-2 são os astrócitos. Essas células são responsáveis pela sustentação dos neurônios, que após serem infectadas pelo vírus causam a disfunção neuronal ou até a morte do neurônio (CRUNFLI *et al.*, 2022).

Um dos fatores importantes é o perfil de pacientes mais suscetíveis à síndrome pós-COVID-19. Alguns estudos mostram que pessoas com comorbidades tem tendência a desenvolverem os sintomas da síndrome pós-COVID-19 por um maior período de tempo, como é o caso do estudo de Miranda *et al.* (2022), onde demonstrou que pacientes com comorbidades como: hipertensão arterial crônica, diabetes, cardiopatia, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal crônica e em fumante e/ou alcoólatra, teve a duração média maior dos sintomas do que em pacientes sem comorbidades.

Em relação à faixa etária, alguns estudos reforçam que pacientes com mais idade estão propícios a terem sintomas mais graves, levando a um período pós-COVID-19 mais longo (MIRANDA *et al.*, 2022; SUDRE *et al.*, 2021). Mas apesar dessa prevalência, qualquer pessoa pode desenvolver a COVID longa, como também já foi relatado em outros estudos.

Estudos demonstram que o acometimento da COVID longa é superior em mulheres em relação aos homens. De acordo com o estudo de Sykes *et al.* (2021), as mulheres eram significativamente mais propensas a relatar sintomas prolongados de ansiedade, fadiga, mialgia e distúrbio do sono. Em outro estudo, Halpin *et al.* (2021), também apresentou essa

predominância, 54,3% das mulheres tiveram queixas de fadiga, em comparação com 29,6% dos homens.

As evidências de COVID longa em crianças e adolescentes são limitadas, há poucos estudos sobre a frequência com que as crianças que contraem a COVID-19 desenvolvem a síndrome pós-COVID ou com que gravidade isso os afeta (RAO *et al.*, 2022; ZIMMERMANN *et al.*, 2021).

Em um estudo realizado pelo Instituto Nacional do Coração, Pulmão e Sangue, em inglês National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) e pela Researching COVID-19 to Enhance Recovery (RECOVER), foi realizada uma análise nos registros de saúde entre os anos de 2020 e 2021, sendo observado que a COVID longa era incomum em pacientes com menos de 21 anos, e os sintomas da síndrome podem diferir dos sintomas em adultos (RAO *et al.*, 2022).

Uma condição rara pode ser desenvolvida em crianças e adolescentes duas a seis semanas após a COVID-19, mesmo que não apresentem sintomas. A doença é chamada de síndrome inflamatória multissistêmica em crianças (MIS-C), essa condição é caracterizada por inflamação em vários órgãos do corpo incluindo coração, pulmões, rins, cérebro, pele, olhos ou órgãos do trato gastrointestinal. A causa do MIS-C ainda não é conhecida (ABDEL-HAQ *et al.*, 2021; ALKAN *et al.*, 2021).

CONCLUSÕES

Considerada uma doença que afeta múltiplos órgãos, a pandemia da COVI-19 e suas consequências estão longe de serem resolvidas. Portanto, é de suma importância estudos mais aprofundados para poder compreender a fisiopatologia da COVID longa e com isso criar novas estratégias para prevenir as complicações e ajudar no tratamento de pacientes com sintomas persistentes recorrentes a COVID-19.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAQ, N. *et al.* SARS-CoV-2-associated multisystem inflammatory syndrome in children: clinical manifestations and the role of infliximab treatment. **Eur J Pediatr** 180, 1581–1591 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00431-021-03935-1>

AHMAD, M. S. *et al.* "LONG COVID": an insight. **European review for medical and pharmacological sciences**, 25(17), 5561–5577, 2021. https://doi.org/10.26355/eurrev_202109_26669

ALKAN, G. *et al.* Clinical features and outcome of MIS-C patients: an experience from Central Anatolia. **Clinical Rheumatology**, 40(10), 4179–4189. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10067-021-05754-z>

ASADI-POOYA, A. A. *et al.* Long COVID syndrome-associated brain fog. **Journal of Medical Virology**, 94(3), 979–984, 2022. <https://doi.org/10.1002/jmv.27404>

BOUTOU, A. K. *et al.* Long covid-19 pulmonary sequelae and management considerations. **Journal of Personalized Medicine**, 11(9), 2021. <https://doi.org/10.3390/jpm11090838>

BRIGHTLING, C. E., & EVANS, R. A. Long COVID: which symptoms can be attributed to SARS-CoV-2 infection? *Lancet* (London, England), 400(10350), 441–451, 2022. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01385-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01385-X)

CARFÌ, A., BERNABEI, R., LANDI, F., & GROUP, FOR THE G. A. C.-19 P.-A. C. S. Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA*, 324(6), 603–605, 2020. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12603>

CRUNFLI, F. *et al.* Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(35), 2022. <https://doi.org/10.1073/pnas.2200960119>

DESAI, A. D. *et al.* Long-term complications of COVID-19. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (Vol. 322, Issue 1, pp. C1–C11), 2022. American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00375.2021>

GARRIGUES, E. *et al.* Post-discharge persistent symptoms and health-related quality of life after hospitalization for COVID-19. In *Journal of Infection* (Vol. 81, Issue 6, pp. e4–e6). W.B. Saunders Ltd, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.08.029>

HALPIN, S. J. *et al.* Post discharge symptoms and rehabilitation needs in survivors of COVID-19 infection: A cross-sectional evaluation. *Journal of Medical Virology*, 93(2), 1013–1022. 2021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmv.26368>

HUANG, C. *et al.* 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a cohort study. *The Lancet*, 2021. 397(10270), 220–232. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32656-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32656-8)

LÜSCHER, T. F. Understanding COVID-19: In the end it is the endothelium-what else? *European Heart Journal*, 2020. 41(32), 3023–3027. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa706>

MAO, L. *et al.* Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurology*, 77(6), 683–690, 2020. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127>

MEHANDRU, S., & MERAD, M. Pathological sequelae of long-haul COVID. In *Nature Immunology*, 2022. (Vol. 23, Issue 2, pp. 194–202). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01104-y>

MIRANDA, D. A. *et al.* Long COVID-19 syndrome: a 14-months longitudinal study during the two first epidemic peaks in Southeast Brazil. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 116(11), 1007–1014, 2022. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trac030>

OPAS. Histórico da pandemia de COVID-19. *Organização Pan-Americana da Saúde*. 2021. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19/histórico-da-pandemia-covid-19>. Acesso em: 10 out. 2022.

PUNTMANN, V. O. *et al.* Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **JAMA Cardiology**, 5(11), 1265–1273, 2020. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.3557>

RAO, S. *et al.* Clinical Features and Burden of Postacute Sequelae of SARS-CoV-2 Infection in Children and Adolescents. **JAMA Pediatrics**, 176(10), 1000–1009, 2022. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2022.2800>

SEYEDALINAGHI, S. A. *et al.* Late Complications of COVID-19; a Systematic Review of Current Evidence. In **Archives of Academic Emergency Medicine** (Vol. 9, Issue 1, p. e14), 2020. Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services. <https://doi.org/10.22037/aaem.v9i1.1058>

SUDRE, C. H. *et al.* Attributes and predictors of long COVID. *Nature Medicine*, 27(4), 626–631, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01292-y>

SYKES, D. L. *et al.* Post-COVID-19 Symptom Burden: What is Long-COVID and How Should We Manage It? **Lung**, 199(2), 113–119, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00408-021-00423-z>

VAN GASSEL, R. J. J. *et al.* High Prevalence of Pulmonary Sequelae at 3 Months after Hospital Discharge in Mechanically Ventilated Survivors of COVID-19. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 203(3), 371–374, 2020. <https://doi.org/10.1164/rccm.202010-3823LE>

WHO. Painel do Coronavírus da OMS (COVID-19). **World Health Organization**. 2022. Disponível em: <https://covid19.w+ho.int/>. Acesso em: 15 out. 2022.

ZHAO, Y. *et al.* Follow-up study of the pulmonary function and related physiological characteristics of COVID-19 survivors three months after recovery. **EClinicalMedicine**, 25, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100463>

ZIMMERMANN, P.; PITTET, L. F.; & CURTIS, N. How Common is Long COVID in Children and Adolescents? In **Pediatric Infectious Disease Journal** (Vol. 40, Issue 12, pp. E482–E487), 2021. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003328>

HEMODIÁLISE: UM BREVE HISTÓRICO DE SUA EVOLUÇÃO E LEGISLAÇÕES

Karoline Bitencourt Pereira¹; Tatiana Caldas Pereira²

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

²Docente do Curso de Especialização Vigilância Laboratorial em Saúde Pública

Resumo: A hemodiálise é uma terapia renal substitutiva que visa filtrar o sangue através de uma membrana semipermeável e assim reter os metabólitos indesejáveis, tal terapia necessita de grandes volumes de água que devem estar de acordo com a legislação vigente. No estado de São Paulo há o monitoramento de caráter fiscal para garantia de que os serviços de hemodiálise sigam as regulamentações. O objetivo do trabalho foi apresentar a evolução da hemodiálise e verificar o impacto da legislação que dispõe a respeito das normas ao serviço prestado de hemodiálise, juntamente com o programa de monitoramento da água de hemodiálise no Estado de São Paulo, e conferir a importância deste programa ao longo dos anos. Esta revisão da literatura abrange artigos científicos, livros, boletins e sites disponíveis em bancos de dados virtuais BVS e Google Scholar. A legislação colabora para que o tratamento de hemodiálise seja seguro para o paciente, porém ainda há pontos que devem ser avaliados e futuramente incluídos visando à saúde de pacientes debilitados que necessitam deste tratamento. O programa tem sido eficiente para elucidar a progressão das melhorias dos serviços de diálise conferindo mais confiança aos pacientes, nota-se a importância para garantir o apoio às tomadas de decisões e minimizar os riscos pertinentes associados à hemodiálise e assim garantir segurança aos pacientes que utilizam este recurso.

Palavras-chave: hemodiálise, histórico, legislações, programa de monitoramento

INTRODUÇÃO

Lesões renais são progressivas e irreversíveis, e sem o devido tratamento podem ocasionar doença renal crônica e levar a falência dos rins. Atualmente, terapias substitutivas vêm sendo utilizadas de acordo com o estágio da lesão renal, são elas transplante renal ou a equipe médica pode optar pela hemodiálise. (NASCIMENTO; MARQUES, 2005; VESTENA, *et al.*, 2009).

A hemodiálise possui duas formas de ser realizada, uma delas é a hemodiálise convencional, em que o sangue extraído é conduzido ao dialisador através de uma bomba, em sequência são submetidos à solução de diálise que é composta por água e sais, os metabólitos presentes no sangue atravessam uma membrana semipermeável e ficam diluídos na solução de diálise, assim os metabólitos presentes no sangue são reduzidos e o sangue pode voltar a circular no paciente (ROMÃO *et al.*, 2004; TINOCO *et al.*, 2017).

A segunda forma é a hemodiálise peritoneal, em que através de um cateter inserido no abdome do paciente, se adiciona à solução de diálise na cavidade abdominal, e assim

como na diálise convencional a diferença de pressão faz com que os metabólitos saturados presente no sangue difundam a membrana natural que neste caso é o peritônio e encontrem o dialisato que pode ser drenado (PECOITS *et al.*, 2014). É imprescindível seguir um controle de qualidade rigoroso a fim de minimizar riscos além das complicações já esperadas aos pacientes (MAGLIO *et al.*, 2020). Desde 1999, o Centro de Vigilância Sanitária (CVS) em parceria com o Instituto Adolfo Lutz realiza o Programa de Monitoramento nos Serviços de Diálise do Estado de São Paulo com o objetivo de monitorar a qualidade da água tratada para diálise dos Serviços de Hemodiálise do Estado de São Paulo. No programa, são coletadas amostras de água utilizadas na terapia de hemodiálise e realizadas análises microbiológicas e físico-químicas de acordo com os parâmetros da legislação específica vigente (BRASIL, 2022).

O aumento de pacientes portadores de DRC grave e a dificuldade para encontrar um rim disponível e compatível para realização de transplante, contribuem para uma maior indicação por parte da equipe médica para a realização da terapia de hemodiálise. Desta forma, o estudo da evolução da terapia de hemodiálise, das legislações e do Programa de Monitoramento nos Serviços de Diálise do Estado de São Paulo contribui para a criação de Políticas Públicas e para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes com DRC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão da literatura abrangendo artigos científicos, livros, boletins e sites disponíveis em bancos de dados virtuais BVS e Google Scholar. Foram utilizados os descritores: “hemodiálise”, “vigilância” e “legislação”. Deste modo os critérios de inclusão foram artigos que relatem marcos histórico da hemodiálise, bem como as legislações vigentes e que ressaltem a importância da gestão de qualidade nos serviços de diálise. Artigos não relacionados ao tema não foram incluídos para avaliação. Após seleção e análise dos artigos, os dados foram comparados de acordo com os objetivos sugeridos neste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Portaria de nº 2.042 foi à primeira legislação que estabeleceu o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços de hemodiálise e cadastro para junto ao SUS. Nesta legislação, os parâmetros microbiológicos e físico-químicos receberam maior atenção além de exigências específicas aos dialisadores (BRASIL, 1996).

Na Portaria nº 82 de 03 de janeiro de 2000, passou a ser permitido o tamponamento dos dialisadores também com acetato e sua descontaminação com menor frequência. O dialisador poderia ser utilizado até 12 vezes para o mesmo paciente ou até 20 vezes quando utilizada a máquina automática que teste a integridade das fibras. Foi incluída a quantificação de cloro residual livre com o limite máximo de 0,2 mg/L (BRASIL, 2000).

A RDC nº 154 de 15 de junho de 2004 exigia que o tamponamento dos dialisadores fosse somente por bicarbonato de sódio. Os metais berílio, tálio e antimônio foram inclusos aos parâmetros físico-químicos e também a unidade de medida da endotoxina foi alterada de 1µg/mL para 2 EU/mL (BRASIL, 2004).

A legislação vigente até o momento, RDC nº 11 de 13 de março de 2014, mudou a quantificação de cloro residual livre para fontes alternativas como água de poços, é permitido

detecção maior que 0,5 mg/L, mas para fonte de rede pública permanece 0,2 mg/L. Também houve alteração nos limites máximos permitidos de endotoxina que foi reduzido para 0,25 EU/mL e a quantificação máxima de bactérias heterotróficas permitida diminuiu para 100 UFC/mL (BRASIL, 2014).

Em 2007, 80% das amostras analisadas apresentaram valores insatisfatórios para os ensaios de bactérias heterotróficas, endotoxina bacteriana, sódio, potássio, magnésio, cálcio, cromo, arsênio, alumínio, fluoretos, nitratos e condutividade contribuindo para que o programa de monitoramento da água tratada para diálise permanecesse (BRASIL, 2004; MARCATTO *et al.*, 2008).

Em 2008, 155 clínicas estavam cadastradas e somente 38,7% apresentaram resultados não conformes. No ano de 2009, 28,7% dos serviços de hemodiálise cadastrados apresentaram resultados não conformes (ALMODOVAR *et al.*, 2018; BUZZO *et al.*, 2010). Em 2010 somente 19% dos serviços de hemodiálise precisaram de recoleta. Em 2011, 83,3% dos serviços de diálise apresentaram resultados satisfatórios, no ano seguinte houve um pequeno decréscimo de 82,7% de resultados não conformes, porém em 2013, 87,4% apresentaram resultado em conformidade com a legislação vigente (ALMODOVAR *et al.*, 2018).

Em 2014, as amostras foram descartadas por seis meses, pois os serviços de hemodiálise estavam em período de adequação da nova RDC nº 154 de 13 de março de 2014, e das amostras coletadas após alteração da legislação vigente, somente 9% das amostras apresentaram parâmetros não conformes, porém em 2015 e 2016 a quantia de amostras com parâmetros insatisfatórios aumentou para 17% e 21% respectivamente. Além da alteração da legislação, a crise hídrica que São Paulo sofreu nos anos de 2014 e 2015 também pode ter contribuído para uma diminuição da qualidade da água utilizada em serviços de saúde (ALMODOVAR *et al.*, 2018; BUZZO *et al.*, 2010; BRASIL, 2014)

A Resolução RDC nº 11 de 13 de março de 2014 também alterou o número de coletas de caráter fiscal, de duas coletas para quatro coletas quando o serviço de hemodiálise apresentasse resultado insatisfatório. Em 2015, 17% dos resultados estavam insatisfatórios na quarta recoleta (ALMODOVAR *et al.*, 2018; HILINSKI, 2019).

CONCLUSÕES

Devido à tragédia ocorrida em 1996 em Caruaru – PE, em que diversos pacientes de hemodiálise vieram a óbito devido à infecção na água utilizada para hemodiálise, foi verificada a necessidade de uma legislação específica para regulamentar os serviços de hemodiálise. Ao longo dos anos a legislação passou por modificações e tornou-se cada vez mais rigorosa. Porém, sem o programa de monitoramento da água tratada para hemodiálise não haveria como conferir se os serviços de hemodiálise estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação vigente. Verifica-se que o programa é imprescindível para que haja um monitoramento eficaz e um acompanhamento direto do CVS para que os serviços de diálise mantenham os resultados satisfatórios contribuindo para o bem estar do paciente.

A legislação impõe que o tratamento de hemodiálise seja o mais seguro possível para o paciente, mas ainda há parâmetros que podem ser inclusos na legislação uma vez que pela Farmacopeia Brasileira restringe a presença de *Pseudomonas aeruginosa* em água ultrapura. Em água de diálise este parâmetro não está incluso e este microrganismo pode ser facilmente encontrado em sistema de tratamento de hemodiálise (Farmacopeia Brasileira, 2022; AQUILINO *et al.*, 2010). Além disso, o Brasil possui proporção continental e cada região

detém sua peculiaridade, deste modo deveria ser avaliado o risco pela contaminação de todos os metais pesados e não somente alguns.

O monitoramento da água tratada para hemodiálise possui importância e eficiência a fim de garantir apoio à tomada de decisões, minimizar riscos associados à hemodiálise, além de fiscalizar a qualidade do serviço prestado e assim garantir a segurança aos pacientes que utilizam este recurso.

REFERÊNCIAS

ALMODOVAR, A. A. B. et al. Efetividade do programa de monitoramento da qualidade da água tratada para diálise no estado de São Paulo. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 40, p. 344-350, 2018.

AQUILINO, B.; REIS, B. Produção de biofilme por bastonetes Gram negativos não fermentadores isolados de água de hemodiálise. 201

BENTES, V.S.; MESCHEDÉ, M.S. C. Qualidade da água utilizada em serviços de hemodiálise antes e após passar por sistema de tratamento em Santarém, Oeste do Pará, Amazônia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 80, p. 1-13, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº. 36, de 19 de janeiro de 1990. Estabelece normas e o padrão de Potabilidade da Água destinada ao Consumo Humano, a serem observadas em todo o território nacional. Brasília: Diário Oficial da União. 1996 Disponível em Ministério da Saúde. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1990/prt0036_19_01_1990.html>. Acesso em: 14 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº. 82, de 03 de janeiro de 2000. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. Brasília: Diário Oficial da União. 2000 Disponível em:

<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2000/prt0082_03_01_2000.html>. Acesso em: 15 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº. 2042, de 11 de outubro de 1996. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. Brasília: Diário Oficial da União. 1996 Disponível em Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.pharmanet.com.br/legisla/p2042.htm>>. Acesso em: 14 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução Nº. 11, DE 13 DE MARÇO DE 2014. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. Brasília: Diário Oficial da União. 2014. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0011_13_03_2014.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC No. 154, de 15 de junho de 2004. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. Brasília: Diário Oficial da União. 2004. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2004/rdc0154_15_06_2004_rep.html>. Acesso em: 14 nov. 2022

BUZZO, M. L. et al. A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. *periodicos.saude.sp.gov.br*, v. 69, n. 1, p. 1–6, 2010

COSTA, M. L. A.; CHAVES, A. R.; PEREIRA, A. A. **Avaliação da qualidade da água de hemodiálise em uma unidade de diálise localizada em Belo Horizonte, MG**. In: Congresso Brasileiro De Gestão Ambiental.

DE SÁ TINÔCO, J. D. et al. Complicações em pacientes renais crônicos submetidos à hemodiálise. **Cogitare Enfermagem**, v. 22, n. 4, 2017

Farmacopeia Brasileira — Português (Brasil). Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira>>. Acesso em: 14 nov. 2022

JESUS, P. R. de et al. **Avaliação microbiológica da água utilizada nos serviços de hemodiálise na cidade do Rio de Janeiro nos anos de 2015 e 2016**. 2017.

JUNIOR, João Egidio Romão. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. **J. Bras. Nefrol.**, v. 26, n. 3 suppl. 1, p. 1-3, 2004.

MARCATTO, M. I. S. J. et al. Projeto de reativação e implantação do Programa de Monitoramento da Água Tratada para Hemodiálise do Estado de São Paulo, SP—Agosto de 2007. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 56, p. 9-12, 2008.

MELO, P. R. S.; RIOS, Evaristo Carlos Silva Duarte; GUTIERREZ, Regina Maria Vinhais. Equipamentos para hemodiálise. 2000.

MUNIZ, R. M. et al. Caracterização dos clientes em Diálise Peritoneal Ambulatorial Contínua-CAPD da região sul do Brasil. **Cogitare Enfermagem**, v. 14, n. 2, p. 318-323, 2009.

NASCIMENTO, C. D.; MARQUES, I R. Intervenções de enfermagem nas complicações mais frequentes durante a sessão de hemodiálise: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 58, p. 719-722, 2005.

NETO, C.M.; D'AVILA, R. **Tratamento de água para hemodiálise: conceitos e recomendações**. EDUC—Editora da PUC-SP, 2021.

PECOITS, R.F.S.et al. **Modalidades de terapia renal substitutiva: hemodiálise e diálise peritoneal**. 2014.

REIS, B.A.B. Produção de biofilme por bastonetes gram negativos isolados de água de hemodiálise. 2010.

VESTENA, Z. B. et al. *Cogitare Enfermagem* Universidade Federal do Paraná. *Cogitare Enfermagem*, v. 14, n. 2, p. 318–323, 2009.

INVESTIGAÇÃO DE ARBOVIROSES EM CASOS SUSPEITOS DE DENGUE E LEPTOSPIROSE NA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

Gabriel Negri de Sá Shiraichi¹; Milena Polotto de Santi²; Denise Haddad Xavier³; Fernanda Modesto Tolentino Binhardi²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - CLR X - IAL - São José do Rio Preto; E-mail: bielnegri@gmail.com

²Pesquisadora do Núcleo de Ciências Biomédicas - CLR X - IAL - São José do Rio Preto

³Agente Técnica de Assistência à Saúde - Biologista - CLR X - IAL - São José do Rio Preto

RESUMO

Introdução: As arboviroses e leptospirose estão amplamente distribuídas nas regiões tropicais sendo consideradas doenças negligenciadas de extrema importância em saúde pública. Estes agravos apresentam sintomatologia e sazonalidade semelhantes, o que dificulta seu diagnóstico, diferenciação e tratamento. **Objetivo:** investigar a presença dos arbovírus dengue, zika e chikungunya em amostras suspeitas para dengue e leptospirose recebidas no Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto no período de abril a setembro de 2022. **Material e métodos:** foram analisadas 100 amostras de pacientes residentes na região de São José do Rio Preto, sendo 81 suspeitas para sorologia de dengue e 19 suspeitas para sorologia de leptospirose. Investigou-se a presença dos arbovírus CHIKV, DENV e ZIKV por qPCR. **Resultados:** O sorotipo 1 de dengue foi detectado em 2 amostras (2%), sendo duas crianças do sexo masculino. Do total de amostras, 53% eram do gênero masculino e 47% feminino. Quanto à idade, 13% menores de doze anos, 38% de doze a trinta anos, 37% de trinta a sessenta anos e 12% maiores de sessenta anos. Adicionalmente, 77 das 81 amostras negativas para dengue foram testadas para leptospirose pela técnica de ELISA e duas amostras apresentaram resultados positivos para IgM. **Conclusão:** O percentual de positividade encontrada para os arbovírus foi baixo, possivelmente pelo período do estudo. Apenas o DENV-1 foi detectado. Houve detecção de IgM para leptospirose em duas amostras com suspeita e negativas para dengue. No entanto, testes adicionais para confirmação deste resultado serão necessários.

Palavras-chave: Arboviroses, Dengue, Leptospirose.

INTRODUÇÃO

As epidemias causadas por arbovírus na última década demonstraram que estes continuam apresentando-se como uma ameaça à saúde humana e animal em escala global. As arboviroses apresentam ampla distribuição geográfica, abrangendo todos os continentes, predominando nos trópicos, onde os surtos dessas doenças tendem a ser mais comuns por apresentarem condições climáticas mais favoráveis aos ciclos de transmissão.¹

O Brasil é responsável pela maioria das notificações anuais de dengue no mundo, e vem enfrentando diversos surtos relacionados a outras arboviroses, como chikungunya, zika e febre amarela.²

Outro agravamento de importância em Saúde Pública é a leptospirose, uma zoonose de expressiva importância na América do Sul, principalmente no Brasil, devido ao clima

tropical úmido. É uma doença negligenciada em muitos países, sendo na maioria das vezes subnotificada devido à sua semelhança sintomatológica com outras doenças, principalmente em países com crescimento urbano exacerbado e descontrolado, em que a situação socioeconômica e sanitária do país é precária.³

O diagnóstico clínico das arboviroses pode ser confundido com outras patologias como a leptospirose devido à sintomatologia semelhante, por isso, é importante e pertinente que esta vigilância de arbovírus seja realizada não somente nas amostras negativas para dengue, mas também em amostras de casos suspeitos de leptospirose, uma importante zoonose de notificação compulsória, cujo diagnóstico também é realizado pelo Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto. Assim, o objetivo do estudo foi investigar a presença dos arbovírus vírus do dengue (DENV), vírus zika (ZIKV) e vírus chikungunya (CHIKV) em amostras suspeitas para dengue e leptospirose recebidas no Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto no período de abril a setembro de 2022.

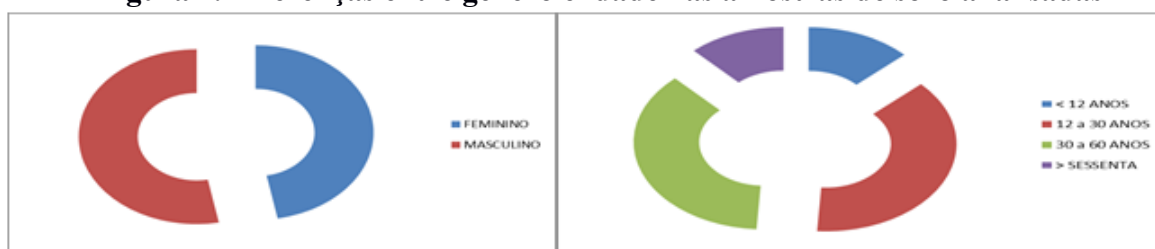
MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 81 amostras de soro de pacientes com suspeita de dengue nos meses de agosto e setembro e 19 amostras com suspeita de leptospirose nos meses de abril a setembro de 2022. As amostras estão armazenadas no Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto (SP) e são provenientes de pacientes oriundos de cidades pertencentes à região do Departamento Regional de Saúde-XV (DRS-XV). O kit comercial de ELISA utilizado na rotina foi o Panbio Leptospira IgM ELISA da marca Abbott para triagem de leptospirose. A extração do RNA foi realizada com o Qiampr Viral RNA Kit (QIAGEN Inc., USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Para a detecção do RNA do ZIKV foram utilizados primers e protocolo de Lanciotti e colaboradores (2008) e para a detecção do CHIKV o protocolo de Lanciotti e colaboradores (2007). Em ambas as reações foi adicionado um controle interno da qualidade, RNase P humana como controle endógeno, conforme protocolo estabelecido pelo CDC (WHO/CDC, 2009). Para a detecção do RNA dos quatro sorotipos de DENV foram utilizados primers e protocolo do multiplex qPCR segundo Lanciotti e colaboradores (2005). Foi adicionado um controle interno da qualidade, RNase P humana como controle endógeno, conforme protocolo estabelecido pelo CDC (WHO/CDC, 2009). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz (CAAE: 89374718.0.0000.0059).

RESULTADOS

Das 100 amostras de soro analisadas, duas foram positivas para DENV sorotipo-1 (DENV-1), ambas do gênero masculino e com idade inferior a doze anos. Do total de amostras, 53% eram do gênero masculino e 47% feminino. Quanto à idade, 13% menores de doze anos com predomínio do gênero masculino, 38% de doze a trinta anos, 37% de trinta a sessenta anos e 12% maiores de sessenta anos com predomínio do gênero feminino (Figura 1). Entre doze e 60 anos não houve diferença significativa entre os gêneros.

Figura 1. Diferenças entre gênero e idade nas amostras de soro analisadas



As amostras analisadas foram provenientes dos seguintes municípios: São José do Rio Preto (77%), Jales (12%), Catanduva (3%) e Votuporanga (8%). Em sua maioria, as amostras foram coletadas com até três dias do início dos sintomas, no entanto, 18% dessas amostras foram coletadas com mais de quatro dias de sintomas. Também foram realizados testes de IgM ELISA para leptospirose em 77 das 81 amostras negativas para dengue. Destas, duas amostras apresentaram resultado positivo para IgM de leptospirose.

DISCUSSÃO

Por conta do clima tropical úmido do Brasil somado ao crescimento urbano exacerbado e falta de infraestrutura, o vetor das arboviroses dengue, zika e chikungunya, a fêmea do mosquito *Aedes aegypti*, cresce e se estabelece em qualquer ambiente propício para sua proliferação, tornando-se o fator principal a ser combatido para efetivar o controle dessas enfermidades. Epidemiologicamente, essas são as arboviroses predominantes no país e atualmente o seu crescimento é proveniente da negligência na atual pandemia de SarsCoV-2 com a grande possibilidade de subnotificação por questões de semelhança em sintomatologia, tendo uma queda nas notificações no período onde normalmente é visto um aumento nos casos.^{2,4}

No presente estudo foram investigadas a presença de DENV, ZIKV e CHIKV em 100 amostras, sendo 81 de pacientes com sorologia negativa para dengue e 19 com sorologia negativa para leptospirose, por meio de ensaios de biologia molecular. O DENV-1 foi detectado em duas amostras, sendo dois meninos de 6 e 12 anos. As crianças acabam se tornando mais suscetíveis a serem infectadas devido sua rotina de vivência com outras crianças em espaços abertos, como parques e na própria escola, onde acabam por não tomar as medidas profiláticas regularmente, como o uso do repelente.⁵

Em São José do Rio Preto essas arboviroses são endêmicas, sendo a dengue considerada hiperendêmica na cidade,⁶ com circulação dos 4 sorotipos já detectados.² Em nosso estudo apenas o DENV-1 foi encontrado. Este achado está em consonância que as demais regiões do Estado, nas quais o DENV-1 também foi predominante.^{2,7}

Devido às análises das amostras negativas para dengue terem sido realizadas com amostras dos meses de agosto e setembro é compreensível que a taxa de positividade seja baixa, levando em consideração que a sazonalidade da doença se inicia normalmente no mês de janeiro e vai até junho, e na região de São José do Rio Preto costuma aumentar o nível de pluviosidade nos meses de setembro e outubro, seguindo o padrão desde 2014 com esse aumento nos respectivos meses, conforme disponibilizado pela SeMAE de São José do Rio Preto.^{8,9}

Outro importante agravo investigado neste estudo foi a leptospirose, uma doença com alta incidência, em média 13.000 notificações anuais com 3.500 confirmações e alta taxa de letalidade.¹⁰ A leptospirose apresenta sintomatologia semelhante às arboviroses, tanto pela sintomatologia quanto pela sazonalidade. Há ainda diversos relatos de coinfeção dengue e leptospirose, o que dificulta o diagnóstico e o tratamento correto dos pacientes.^{11,12,13,14,15}

Em nosso estudo, das 77 amostras negativas para dengue testadas para leptospirose, duas apresentaram resultado positivo para IgM. No entanto, apesar da importância deste achado, cabe ressaltar que testes adicionais para confirmação deste resultado serão necessários.

CONCLUSÃO

Pode se concluir que a positividade encontrada para os arbovírus foi baixa, possivelmente pelo período do estudo. Apenas o DENV-1 foi detectado. Houve detecção de

IgM para leptospirose em duas amostras com suspeita e negativas para dengue. No entanto, testes adicionais para confirmação deste resultado serão necessários.

Considerando os dados apresentados pelas Secretarias Municipal e Estadual de Saúde somados aos resultados encontrados neste trabalho é inegável a necessidade de conscientizar a população sobre estes agravos e os cuidados contra o vetor *Aedes aegypti*, considerando que os agravos estudados são endêmicos na região.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de realizar este trabalho e por todo o conhecimento adquirido durante minha estadia no IAL São José do Rio Preto, agradeço aos meus pais, família e amigos pelo apoio incondicional e às minhas colegas de laboratório por todo o conhecimento e ajuda providos que foram essenciais para a realização desta conquista, à minha orientadora Fernanda por toda ajuda e paciência durante o processo como um todo, meus sinceros agradecimentos a todos e ao Instituto Adolfo Lutz pela oportunidade. Muito obrigado.

REFERÊNCIAS

¹FIGUEIREDO LTM; FONSECA BAL. Dengue. In Tratado de Infectologia. São Paulo. Atheneu, p. 204-217, 2002.

²COLOMBO TE, VEDOVELLO D, PACCA-MAZARO CC, MONDINI A, ARAUJO JR JP, CABRERA E, LOPES JC, DOS SANTOS INP, REIS AFN, COSTA FR, CRUZ LEAA, FERREIRA JR J, ROCHA ESO, KROON EG, BRONZONI RVM, VASILAKIS N, NOGUEIRA ML. Dengue virus surveillance: Detection of DENV-4 in the city of São José do Rio Preto, SP, Brazil. Acta Tropica. v. 164, p. 84-89, 2016.

³OLIVEIRA, EH de.; HOLANDA, CE.; ANDRADE, SM de.; COSTA, RPC.; TAMINATO, RL.; SANTOS, DA Leptospirrose no Brasil: uma abordagem da saúde pública. Investigação, Sociedade e Desenvolvimento. v. 11, n. 6, p. e19411627111, 2022.

⁴MASCARENHAS MDM, . Ocorrência simultânea de COVID-19 e dengue: o que os dados revelam?. Cadernos de Saúde Pública. v. 36, n. 6, 2020.

⁵MARTINS MM, PRATA-BARBOSA A, DA CUNHA AJLA. Arboviral diseases in pediatrics, Jornal de Pediatria, v. 96, n. 1, p. 2-11, 2020.

⁶SANTI MP, TOLENTINO-BINHARDI FM, AGÜERO LM, PAGNOCA EVRG, BINHARDI MFB, FLORES MNP, SOARES MMCN. Detecção de arboviroses em gestantes na região noroeste do Estado de São Paulo. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR. v. 25, n. 1, p. 37-42, jan./abr. 2021.

⁷BRASIL. CVE Centro de Vigilância Epidemiológica. Disponível em <https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/dengue/2022/dengue22_import_autoc_mes.htm>. Acesso em: 24 de nov. de 2022.

⁸MORAES BC, SOUZA EB, SODRÉ GRC, FERREIRA DBDS, RIBEIRO JBM. Sazonalidade nas notificações de dengue das capitais da Amazônia e os impactos do El Niño/La Niña]. *Cad Saude Publica*. v. 35, n. 9, e00123417, 2019.

⁹SEMAE. Índice Pluviométrico. Disponível em <<https://semae.riopreto.sp.gov.br/indice-pluviometrico-semae.aspx>>. Acesso em: 24 de nov. de 2022.

¹⁰VICENTE JCS, LEITE MCB, DA SILVA MO, VICENTE JDS, JUNIOR JBO, MELO SMM, DINIZ ATN. Caracterização clínica-epidemiológica dos casos confirmados de leptospirose em um hospital de emergência. *Revista Arquivos Científicos (IMMES)*, Macapá, AP. v. 5, n. 1, p. 97-107, 2022.

¹¹GONÇALVES APP, MELO AC, DOS SANTOS IC, FAZOLI KGZ, TREVISANI AC, CAMILO FF, KAMIGOUCHI T, GONÇALVES DD. Aspectos epidemiológicos da dengue e leptospirose em um município de região fronteira do Brasil. *Braz. J. of Develop.*, Curitiba. v. 6, n. 7, p. 43085-43097, 2020.

¹²TOLEDO TF, LIMA MKS, FLOREZ LFC, MAZZA RS, SOUZA IJ, TONHA VCA, MORE MCFSS, BASANO SA, PEREIRA EGB, PEREIRA FR. Diagnóstico diferencial entre dengue e leptospirose: relato de caso. *Revista Brasileira de Doenças Infecciosas*. v. 26, n. 2, set. 2022.

¹³RELÉ MC, RASAL A, DESPANDE SD, KOPPIKAR GV, LAHIRI KR. Infecção mista por *Leptospira* e Dengue em paciente com pirexia. *Jornal Indiano de Microbiologia Médica*. v. 19, n. 4, p. 206-207, 2001.

¹⁴MEGUINS, LC, JUNIOR, HOM. Leptospirosis and dengue co-infection in a Brazilian Amazon patient. *Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua*, v. 1, n. 4, p. 97-99, 2010.

¹⁵RODRÍGUEZ NMP, GALLOWAY R, BLAU DM, TRAXLER R, BHATNAGAR J, ZAKI SR, RIVERA A, TORRES JV, NOYD D, SANTIAGO-ALBIZU XE, GARCÍA BR, TOMASHEK KM, BOWER WA, SHARP TM. Case series of fatal *Leptospira* spp./dengue virus co-infections-Puerto Rico, 2010-2012. *Am J Trop Med Hyg*. v. 91, n. 4, p. 760-5, 2014.

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE DETERGENTES ENZIMÁTICOS

Mariana Assis de Moraes¹; Fernanda Fernandes Farias²

¹Estudante do Curso de especialização Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - IAL; e-mail: m.assmoraes@gmail.com

²Docente e orientador/pesquisador científico do Núcleo de Ensaio 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: Detergentes são produtos saneantes destinados à limpeza de superfícies ou tecidos, alguns deles possuem enzimas melhorando a eficácia sobre matéria orgânica. Em suas formulações possuem pelo menos uma enzima proteolítica, podendo ser acrescida de outra enzima, por exemplo, a amilase. A maior parte dos detergentes enzimáticos exige diluição, que se não respeitada, ou caso a solução não seja utilizada dentro do prazo, a eficácia do detergente pode ser afetada. Este trabalho teve como objetivo estudar a estabilidade da atividade enzimática proteolítica e amilolítica de detergentes enzimáticos, diluídos conforme indicação do fabricante. O método analítico para determinação enzimática foi conduzido conforme preconiza a RDC nº 703/2022, que dispõe sobre detergentes enzimáticos de uso hospitalar. A atividade proteolítica das amostras se demonstrou estável durante as primeiras 4 (quatro) horas após a diluição do produto. Após 24 horas, um dos produtos apresentou diminuição expressiva da atividade proteolítica, enquanto para o outro, o decréscimo mais acentuado ocorreu em 72 horas. Quanto à atividade amilolítica, houve aumento em 4 (quatro) horas após diluição e após 24 horas a mesma cessou, em ambos os produtos. Essa variação pode comprometer a eficácia do detergente e aponta a importância da informação que consta no rótulo, pode também comprometer o resultado de testes analíticos dependendo do tempo entre a diluição da amostra e a execução do ensaio.

Palavras-chave: Detergentes enzimáticos; Ensaio Enzimáticos; Estabilidade Enzimática

INTRODUÇÃO

A Legislação Brasileira define como produto saneante a substância ou preparação destinada a superfícies inanimadas, tecidos e ambientes com finalidade de limpeza, desinfecção, desinfestação, desinfecção de água e alimentos para o consumo humano (ANVISA, 2012). A vigilância de saneantes tem grande importância para conter riscos causados por saneantes, principalmente para os profissionais de saúde, que estão em frequente exposição a esses produtos pela limpeza e desinfecção constante de superfícies, materiais e equipamentos (SANTOS et al., 2011). Detergentes são destinados à limpeza de superfícies e tecidos (BRASIL, 2022). Os detergentes que possuem enzimas em sua formulação podem ser considerados mais eficientes sobre a matéria orgânica que os detergentes comuns (LOPES, 2009).

A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 703 de 2022 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe sobre os detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médicos. Produto que possui em sua formulação um tensoativo e pelo menos uma enzima proteolítica, podendo ser acrescida uma enzima amilolítica, e outros componentes de sua formulação, e tem como objetivo remover a sujidade clínica e evitar a formação de compostos nas superfícies de dispositivos (BRASIL, 2022).

Dispositivos médicos podem se transformar em reservatórios ou fontes de microrganismos, em decorrência de práticas inadequadas de limpeza, e assim causar infecção hospitalar em pacientes expostos (CENTURIÓN, 2017).

A maior parte dos detergentes enzimáticos exige preparo de diluição para sua aplicação. Caso não seja preparado corretamente, ou não seja respeitada a validade da solução preparada, a eficácia do detergente enzimático pode ser impactada.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade de detergentes enzimáticos de uso hospitalar, através da determinação do período em que se apresenta a atividade proteolítica e amilolítica após reação enzimática.

MATERIAL E MÉTODOS

O método de análise seguiu os ensaios analíticos descritos pela RDC nº 703 de 2022.

Para a atividade proteolítica foram utilizados os reagentes: solução tampão tris-HCl 0,05 M, azocaseína 2% (m/v) e ácido tricloroacético (TCA) 20% (m/v). E os equipamentos: banho termostático Solab Científica®, centrifuga para microtubos Quimis® e espectrofotômetro UV/VIS Genesy S Thermo Scientific®.

Para a atividade amilolítica foram utilizados os reagentes: DNS (3,5-dinitrosalicílico), solução tampão citrato, solução de amido 1% (m/v) e solução de glicose 1% (m/v). E os equipamentos: banho termostático Solab Científica®, vórtex Fisherbrand® e espectrofotômetro UV/VIS Genesy S Thermo Scientific®.

Os produtos analisadas fazem parte do Programa de Monitoramento Analítico Pós-Mercado de Saneantes de Uso Hospitalar, programa proposto pela ANVISA, do qual o Instituto Adolfo Lutz participa por meio do Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneantes, a fim de monitorar a qualidade de saneantes hospitalares, incluindo detergentes enzimáticos. A diluição dos dois produtos se deu conforme as instruções no rótulo gerando duas amostras distintas (amostra 1 e amostra 2).

O ensaio de atividade proteolítica foi realizado em quadruplicata, com um branco para cada replicata. Para a amostra, em microtubos foram adicionados 200 µL de tampão

tris-HCl 0,05 M e 100 μL de azocaseína 2% (m/v). Para preparar o branco, foram adicionados 800 μL de TCA 20% (m/v) junto ao tampão e azocaseína. Os tubos foram incubados em banho termostático a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 minutos. Foram adicionados 100 μL de amostra em cada um dos microtubos, incubando-os por mais 15 minutos, a mesma temperatura. Passados 15 minutos, foram adicionados 800 μL de TCA nos microtubos da amostra. Em seguida, foram centrifugados a 6000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos em cubetas e procedeu-se à análise em espectrofotômetro ($\lambda=400\text{ nm}$). Para zerar o equipamento foi utilizado tampão tris-HCl 0,05 M. As amostras foram analisadas imediatamente no tempo 0 (zero) e em tempos de 15 minutos após a primeira leitura, 30 min, 1 (uma) hora, 2 (duas) horas, 3 (três) horas e 4 (quatro) horas. Foi realizado um segundo ensaio para leitura de 24 horas após tempo 0 (zero). A amostra 2 foi analisada nos mesmos intervalos de tempo que a amostra 1, mas foi realizado um segundo ensaio para outra leitura em 4 (quatro) horas, e um terceiro ensaio para leitura em 72 horas.

Para o ensaio da atividade amilolítica foram realizados três ensaios para cada amostra. Foi confeccionada uma curva analítica para cada dia de ensaio. Os dados de preparo das soluções de calibração são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores para construção da curva analítica de glicose

Tubo n°	Volume da solução de glicose (μL)	Volume do tampão (μL)	Concentração final de glicose ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)
0	0	600	0,000
1	20	580	0,06515
2	40	560	0,1303
3	60	540	0,1954
4	80	520	0,2609
5	100	500	0,3257
6	120	480	0,3909
7	140	460	0,4560

Fonte: RDC n° 703 de 2022

Os tubos da curva analítica foram fervidos em banho-maria por 5 minutos. Adicionou-se 1,5 mL de DNS e 15 mL de água ultrapura. Foram agitados em vórtex e analisados em espectrofotômetro ($\lambda=550\text{ nm}$).

Os ensaios da atividade amilolítica foram realizados em quadruplicata, realizando um branco de amostra para cada e mais um branco do equipamento. Para a amostra, foram adicionados em tubos 300 μL de tampão citrato mais 200 μL da solução de amido. Para os brancos da amostra foram adicionados 500 μL de tampão citrato em cada tubo. E para o tubo do branco do equipamento foram adicionados 400 μL de tampão e 200 μL da solução de amido. Os tubos foram levados a banho-termostático a $40^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 minutos. A seguir, foram adicionados 100 μL de amostra em cada um dos tubos, com exceção do tubo do branco do equipamento. As amostras ficaram no banho por mais 30 minutos. Foram adicionados 1,5 mL de DNS em todos os tubos, sendo levados para fervura por 5 minutos. Após resfriados à temperatura ambiente, foram adicionados 15 mL de água ultrapura em cada tubo e agitados em vórtex. Foram analisados em espectrofotômetro ($\lambda=550\text{ nm}$). A leitura foi realizada nos tempos 0 (zero) e em tempos de 15 minutos após a primeira leitura, 30 min, 1 (uma) hora, 2 (duas) horas, 3 (três) horas e 4 (quatro) horas e 24 horas. As leituras foram feitas utilizando a mesma reação, com exceção da leitura de: 4 (quatro) horas, em que foram realizadas duas leituras, uma com a mesma reação das anteriores e outra após novo ensaio; e 24 horas, em que foi realizada após novo ensaio utilizando a mesma amostra preparada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade proteolítica da amostra 1 se demonstrou estável durante as primeiras 4 (quatro) horas após reação enzimática. Após diluição a atividade proteolítica diminuiu consideravelmente em 24 horas, como indicado na Figura 1, considerando a média dos valores dos preparos.

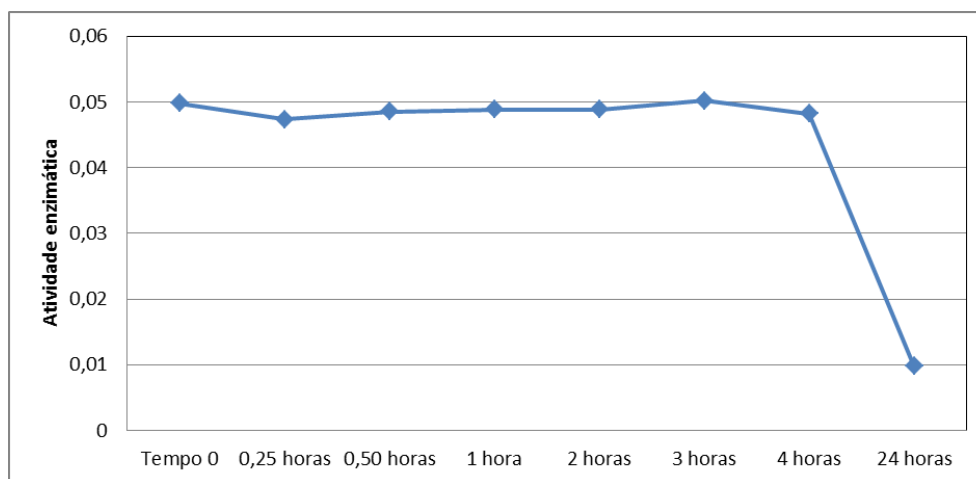


Figura 1 – Atividade proteolítica da amostra 1

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

A atividade proteolítica da amostra 2 teve comportamento parecido com a amostra 1. As leituras de 4 (quatro) horas após tempo 0 (zero) tiveram valores parecidos, mesmo com nova reação. Já a análise após 72 horas, apresentou decaimento na atividade proteolítica, como indicado na Figura 2, considerando a média dos resultados.

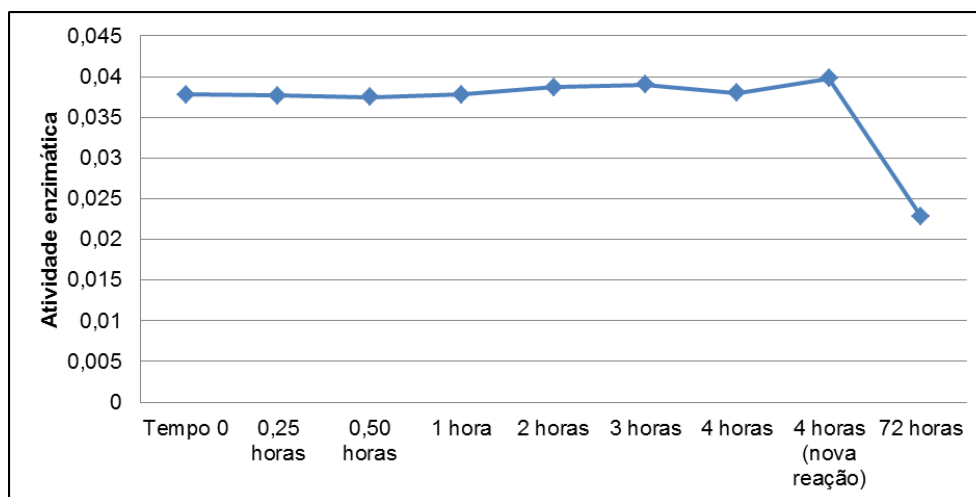


Figura 2 – Atividade proteolítica da amostra 2

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

Proteases são suscetíveis à degradação, oxidação e desnaturação. Essas enzimas também podem catalisar a degradação de outros componentes da formulação dos detergentes (VALLS et al., 2011). Além da formulação, o pH e a temperatura também podem interferir na atividade proteolítica. De acordo com um estudo feito por Lopes (2012), foi verificado

que detergentes enzimáticos com baixas atividades proteolíticas não apresentaram eficiência na limpeza.

A atividade amilolítica da amostra 1 e 2 tiveram comportamento parecido. Durante as primeiras 4 (quatro) horas após reação enzimática, a atividade amilolítica aparentou estar estável com pequeno aumento no valor. Entretanto, quando realizada a segunda reação, 4 (quatro) horas após a leitura no tempo 0, o valor da atividade amilolítica aumentou consideravelmente. A leitura de 24 horas foi realizada utilizando a mesma amostra diluída para o primeiro e segundo ensaio, e obteve-se resultado negativo, o que é considerado zero. A Figura 3 apresenta a atividade amilolítica das amostras pelo tempo de leituras, considerando a média dos resultados.

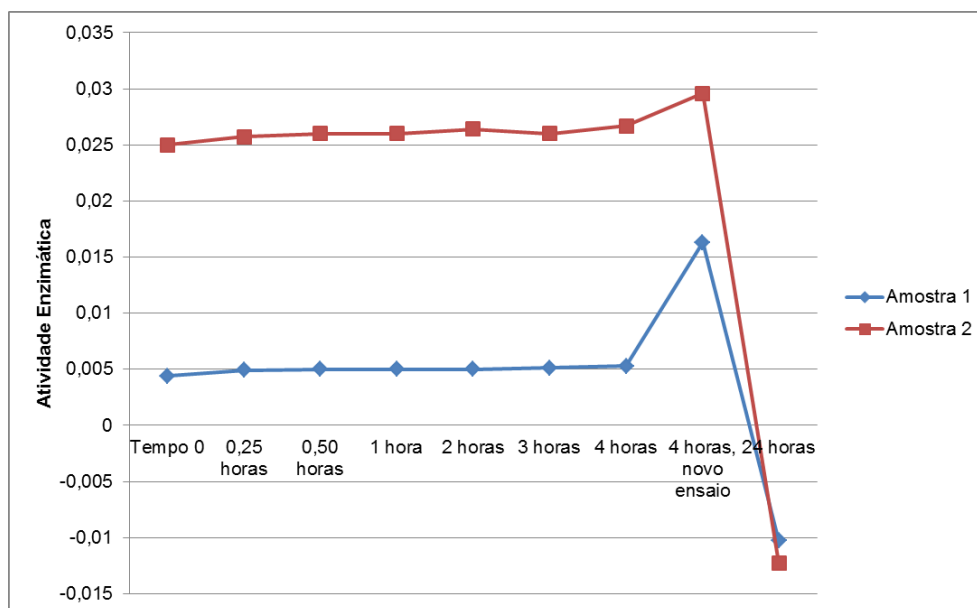


Figura 3 – Atividade amilolítica das amostras

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

A elevação da atividade enzimática para leitura de 4 (quatro) horas pode ser explicada pelas variáveis intrínsecas do método, mas o mais provável é o fato de ter sido feita nova reação. Após 24 horas de uma solução previamente diluída não se encontra mais atividade enzimática.

A atividade proteolítica das amostras se demonstrou estável durante as primeiras 4 (quatro) horas após a diluição do produto. Após 24 horas e 72 horas houve diminuição da atividade proteolítica. Quanto à atividade amilolítica, houve aumento em 4 (quatro) horas após diluição e após 24 horas as amostras não apresentavam mais atividade amilolítica.

CONCLUSÕES

A variação da atividade enzimática pode comprometer a eficácia do produto, consequentemente a capacidade de limpeza de dispositivos médicos. Para os produtos testados, a atividade proteolítica se demonstrou estável durante as primeiras 4 (quatro) horas após a diluição do produto. Após 24 horas (amostra 1) e 72 horas (amostra 2) houve diminuição da atividade proteolítica. Quanto à atividade amilolítica, houve aumento em 4 (quatro) horas após diluição e após 24 horas não havia mais atividade amilolítica para ambos os produtos.

Estes resultados contribuem para demonstrar a relevância do cuidado na utilização e preparo destes detergentes enzimáticos, e de conter a informação de uso imediato após diluição, como consta na legislação vigente.

REFERÊNCIAS

1. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Orientações para os consumidores de saneantes.** (2012).
2. SANTOS, J. A. T. et al. Gravidade de intoxicações por saneantes clandestinos. Florianópolis. **Texto & Contexto – Enfermagem**, v. 20, n. spe, p. 247-254, 2011. DOI <https://doi.org/10.1590/S0104-07072011000500031>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/tce/a/hZ6zPNCC8NgtLJYN7XDcN9x/?lang=pt>. Acesso em: 19 set. 2022.
3. BRASIL. Resolução (RDC) nº 703, de 16 de maio de 2022. Dispõe sobre detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo. Brasília, DF, 2022.
4. LOPES, L. S. **Otimização da determinação de atividade enzimática como metodologia para avaliação em detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde.** 2009. 58f. Monografia (Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços vinculados à Vigilância Sanitária.) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.
5. CENTURIÓN, M. P. B. **Estudo da lipase em detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde.** RJ. 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.
6. VALLS, C. et al. Characterization of the Protease Activity of Detergents Laboratory Practicals for Studying the Protease Profile and Activity of Various Commercial Detergents. Espanha. **Biochemistry And Molecular Biology Education**, v. 39, n. 4, p. 280-290, 2011. DOI <https://doi.org/10.1002/bmb.20488>. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmb.20488>. Acesso em: 27 out. 2022.
7. LOPES, L. S. **Estudo da atividade proteolítica e desempenho de detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde.** RJ. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

AVALIAÇÃO DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE MENINGITE EM TRÊS PRINCIPAIS REGIÕES METROPOLITANAS DA MACROMETRÓPOLE PAULISTA – SÃO PAULO, BAIXADA SANTISTA E CAMPINAS, 2017 A 2021

Tiffany Matias Gonçalves¹, Andrea Gobetti Coelho Bombonatte².

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Epidemiológica em Saúde Pública – IAL; tiffany.matias.tm@gmail.com

²Docente/Pesquisador do Depto de Tuberculose e Micobacterioses – CLR Santos – IAL.

Resumo: Devido à sua alta morbimortalidade, a meningite representa um importante problema de saúde pública. É considerada endêmica no Brasil, com alta taxa de notificação em países em desenvolvimento, diretamente relacionada a fatores socioeconômicos, condições básicas de saúde instáveis e concentração populacional. A ocorrência de surtos episódicos está associada principalmente às populações mais pobres devido à grande concentração de pessoas no mesmo espaço/tempo, habitações mal ventiladas e grande número de pessoas por dormitório. O presente estudo propôs identificar o perfil epidemiológico de meningite entre os anos de 2017 e 2021 nas três principais regiões metropolitanas da macro metrópole paulista – Baixada Santista, Campinas e São Paulo analisando as variáveis etiologia, sexo, faixa etária e grau de escolaridade. Trata-se de um estudo transversal descritivo retrospectivo baseado na análise de bancos de dados obtidos a partir do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), disponibilizados pelo Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DataSUS). Dados demonstram que a meningite asséptica foi a etiologia com maior predominância, apresentando 66,20% (n=8.386) dos casos notificados, o sexo masculino foi o mais afetado com 56,58% (n=7.168), sendo a faixa etária de 1-4 anos com 22,81% (n=2.890) a mais acometida. Em relação ao grau de escolaridade, a doença atingiu mais a população com ensino médio completo com quase 35% nas três regiões analisadas. O perfil epidemiológico demonstrou-se semelhante sem diferenças expressivas entre si nas três regiões estudadas. É importante que a notificação compulsória seja realizada corretamente, para que não haja subnotificação dos casos de meningite, contribuindo para que a vigilância epidemiológica tenha subsídios necessários para tomada de decisão, aprimorar o manejo clínico do paciente, bem como ações de educação em saúde voltadas para a prevenção, além de melhorar a qualidade de vida da população e reduzir a mortalidade e morbidade.

Palavras-chave: MENINGITE; DOENÇA MENINGOCÓCICA; PERFIL EPIDEMIOLÓGICO; METROPOLES PAULISTAS.

INTRODUÇÃO

A meningite é uma doença cuja patogênese inclui um processo inflamatório das meninges (aracnoide, pia-máter e dura-máter) e líquido cefalorraquidiano (LCR) afetando o sistema nervoso central (SNC), podendo ser causado por processo infeccioso ou não infeccioso (ZUETER; ZAITER, 2015; DAZZI; ZATTI; BALDISSERA, 2014; TUNKEL; SCHELD, 1993).

Devido ao seu caráter endêmico e alta incidência em crianças, a meningite é considerada uma doença de grande importância pública. De acordo com o Catálogo Nacional de Notificações Compulsórias do Ministério da Saúde, a Portaria nº 204 de 2016, a doença está na lista dos agravos de notificação compulsória, que deve ser declarada por meio do SINAN (LIMA, 2017).

Embora a meningite causada por outras bactérias (MB) tenha se mantido como a principal causa de morte nos últimos anos, dados do DataSUS mostram que a meningite asséptica é a mais prevalente no Brasil, afetando principalmente homens, adultos de 20 a 39 anos e crianças de 1 a 4 anos, com níveis de escolaridade apresentando ensino fundamental completo e incompleto (MACEDO JUNIOR; NICOLETTI; SANTOS, 2021).

Fatores como zona de residência, acesso à educação e índices socioeconômicos podem influenciar no agente etiológico da doença devido a condições como a falta de acesso a itens básicos de higiene e saneamento básico (SILVA *et al.*, 2020).

A intrincada epidemiologia da meningite é ilustrada pelas diferenças na incidência entre faixas etárias, sexos e condições socioeconômicas. Esse quadro epidemiológico complexo demonstra a tendência dos patógenos ambientais em interferir no desenvolvimento da patogênese. Dessa forma, compreender a distribuição, os subtipos e as características dos acometidos pode ajudar a esclarecer algumas dúvidas sobre epidemiologia, etiologia ambiental, eficácia da implementação de políticas públicas e outros fatores relacionados à vigilância em saúde.

Diante da relevância de se conhecer a incidência das meningites e o perfil epidemiológico do agravo em determinadas regiões do Brasil, a fim de entender o comportamento da doença em grandes aglomerados populacionais, o presente estudo buscou identificar o comportamento da patologia entre os anos de 2017 e 2021 em três em três regiões metropolitanas da macrometrópole paulista.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa de caráter transversal descritivo retrospectivo baseado na análise do banco de dados da plataforma do DataSUS, tendo como critério de inclusão os casos positivos da doença entre os anos de 2017 e 2021 nas regiões escolhidas.

Os casos foram selecionados nas informações de saúde epidemiológicas e morbidade, dentro do grupo de Doenças e Agravos de Notificação no período de 2017 a 2021 (SINAN). Dado este passo, foi escolhida a opção Meningite e como abrangência geográfica o estado de São Paulo e a região de saúde de notificação – Região metropolitana da Baixada Santista, Campinas e São Paulo - sendo analisada as seguintes variáveis: análise de frequência da etiologia da doença, frequência por sexo das pessoas acometidas, frequência pela categoria de faixa etária e grau de escolaridade das pessoas infectadas. A base de dados utiliza a seguinte classificação das etiologias: Meningite Meningocócica (MM); Meningococemia (MMCC); Meningite meningocócica + meningococemia (MM+MMCC); Meningite Tuberculosa (MTBC); Meningite causada por outras bactérias (MB); Meningite não especificada (MNE); Meningite Asséptica (MV); Meningite de outra etiologia (MOE); Meningite causada pela presença de Hemófilo (MH); Meningite causada por Pneumococos (MP) (SÃO PAULO, 2001).

Os dados obtidos a partir do aplicativo TABNET foram tabulados em planilhas do Microsoft 365 Excel® para posterior uso na confecção dos gráficos e análises estatísticas através do *software GraphPad*. Por se tratar de dados secundários de um banco de domínio público, não foi necessário submeter o trabalho ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP). A análise estatística foi realizada pela análise de variância Two-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni, considerando-se significativo os valores de p com um asterisco (*) para p ajustados entre 0,01 e 0,05 e dois asteriscos (**) para p ajustados

entre 0,01 e 0,001. A análise estatística e os gráficos foram obtidos pelo *software GraphPad Prism®* versão 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das três regiões metropolitanas escolhidas para o estudo, houve 12.668 casos positivos para meningite, no período de 2017 a 2021, sendo 509 notificados na região da Baixada Santista, 1.683 na região de Campinas e 10.476 notificados na região de São Paulo. Destes, 66,20% (8.386/12.668) corresponde a MV, 12,09% (1.532/12.668) a MB e 5,82% (737/12.668) a MNE.

Na Figura 1, observa-se que nas três regiões analisadas as etiologias com maior incidência são respectivamente, MV com 40,08% (204/509) na Baixada Santista, 50,68% (853/1.683) na região de Campinas e 69,96% (7.329/10.476) na região de São Paulo, MB com 24,95% (127/509) na Baixada, 21,09% (355/1.683) em Campinas e 10,02% (1.050/10.476) em São Paulo e MNE com 11,79% (60/509) na Baixada, 11,11% (187/1.683) na região de Campinas e 4,68% (490/10.476) na região de São Paulo, apresentando diferença significativa em relação aos demais tipos de meningite. Não houve diferença significativa entre os mesmos tipos de meningite em relação as regiões analisadas.

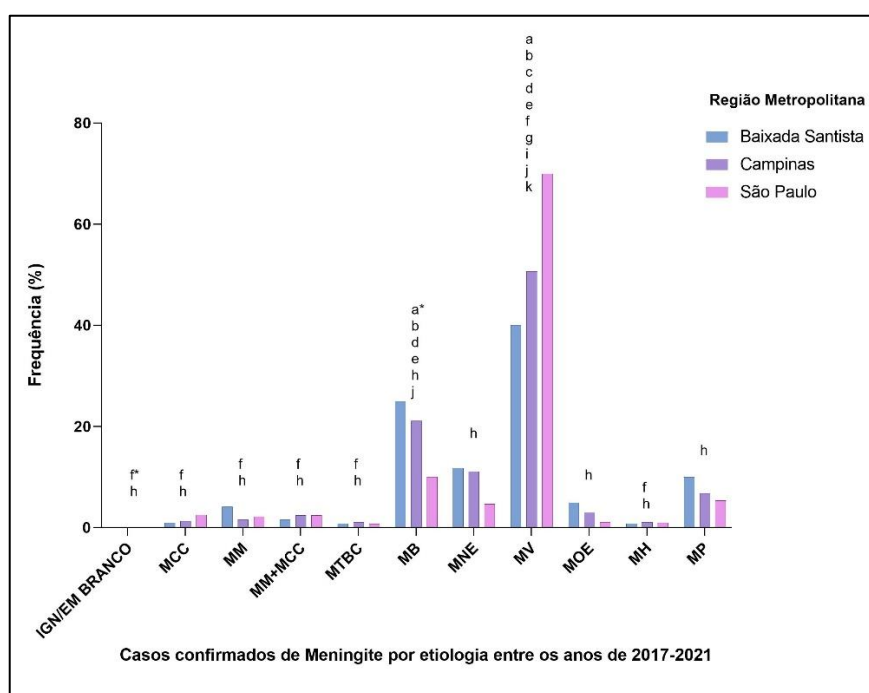


Figura 1 - Comparação dos casos confirmados de meningite, segundo a etiologia da doença, nas regiões metropolitanas da macrometrópole paulista – São Paulo, Baixada Santista e Campinas, 2017-2021.

Fonte: DataSUS, 2022.

Apresentação de diferenças estatísticas significativas entre os grupos quando comparado a: ^a comparado com IGN/em branco, ^b comparado com MCC, ^c comparado com MM, ^d comparado com MM+MCC, ^e comparado com MTBC, ^f comparado com MB, ^g comparado com MNE, ^h comparado com MV, ⁱ comparado com MOE, ^j comparado com MH, ^k comparado com MP. Valores de significância entre as diferenças estatísticas: (*) P ajustados entre 0,01 e 0,05 e dois asteriscos (**) P ajustados entre 0,01 e 0,001, ANOVA-Bonferroni.

A pesquisa mostrou que os homens são os mais acometidos pela meningite do que as mulheres. Dentre uma população de 12.668 casos positivos da doença nas três regiões metropolitanas analisadas, 56,58% (7.168/12.668) correspondem ao sexo masculino, 43,4% (5.498/12.668), ao sexo feminino e 0,02% (2/12.668) foram ignorados.

No entanto, quando se compara a frequência dos casos confirmados por sexo nas três regiões analisadas, não foi observado diferença significativa entre as regiões, em que o sexo

masculino na Baixada Santista apresentou 55,21% (281/509), e o feminino 44,6% (227/509); na região de Campinas o sexo masculino correspondeu a 59,24% (997/1.683) e o feminino, 40,76% (686/1.683); e na região de São Paulo o sexo masculino correspondeu a 56,22% (5.890/10.476), e o sexo feminino a 43,78% (4.586/10.476) (Figura 2).

Segundo a OMS, os homens são mais propensos a desenvolver qualquer tipo de problema de saúde, pois estão em constante atividade física em contato com o mundo exterior, o que aumenta o risco de infecção por enteroviroses. Vários fatores contribuem para o desenvolvimento de meningite na população masculina, desde a hesitação dos homens em procurar ajuda médica, a demora na procura de cuidados primários de saúde, até a falta de adesão ao tratamento para comorbidades crônicas, podendo tornar os sintomas da meningite mais graves e levar até a um quadro de óbito (SILVA GOMES *et al.*, 2019).

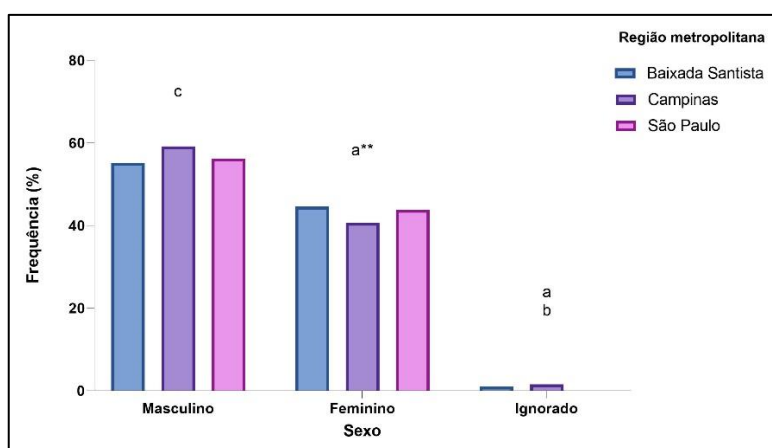


Figura 2 - Comparação dos casos confirmados, segundo o sexo, nas três regiões metropolitanas da macrometrópole paulista – São Paulo, Baixada Santista e Campinas, 2017-2021.

Fonte: DataSUS, 2022.

Apresentação de diferenças estatísticas significativas entre os grupos quando comparado a: ^a comparado com o sexo masculino; ^b comparado com o sexo feminino; ^c comparado com o ignorado. Valores de significância entre as diferenças estatísticas: (*) P ajustados entre 0,01 e 0,05 e dois asteriscos (**) P ajustados entre 0,01 e 0,001, ANOVA-Bonferroni.

Ao analisar a variável faixa etária, observa-se que na frequência de casos analisados nas três regiões as populações na faixa etária entre 1-4 anos, menor que 1 ano e 20-39 anos foram as mais acometidas pela meningite, respectivamente, com 22,81% (2.890/12.668), 17,80% (2.255/12.668) e 16,97% (2.150/12.668). Seguida das faixas etárias 40-59 anos (12,89%, 1.633/12.668) e 5-9 anos (12,01%, 1.521/12.668).

Quando se compara os casos positivos de meningite considerando-se a faixa etária em relação as três regiões metropolitanas estudadas, observa-se que a predominante foi de 1-4 anos, onde a Baixada Santista apresentou um percentual de 16,50% (84/509), Campinas 19,25% (324/1.683) e a região de São Paulo 23,69% (2482/10.476). Entretanto, não foi possível verificar diferença significativa entre as mesmas faixas etárias nas diferentes regiões, porém verifica-se significativa variabilidade entre as diferentes faixas etárias (Figura 3).

É comum que crianças e adolescentes sejam o grupo com a maior tendência de desenvolvimento de um quadro de meningite, porque o sistema imunológico ainda é imaturo, resultando em uma resposta imune ineficaz. A gravidade da meningite também está diretamente relacionada com a faixa etária do paciente, preparo do seu sistema imunológico, agente etiológico responsável pela meningite, comorbidades, diagnóstico e tratamento precoce da doença, como por exemplo recém-nascidos e lactentes, que têm maior incidência de mortalidade, uma vez que seu sistema imunológico não tem capacidade de montar uma resposta efetiva contra microrganismos invasores (ZANIN *et al.*, 2020).

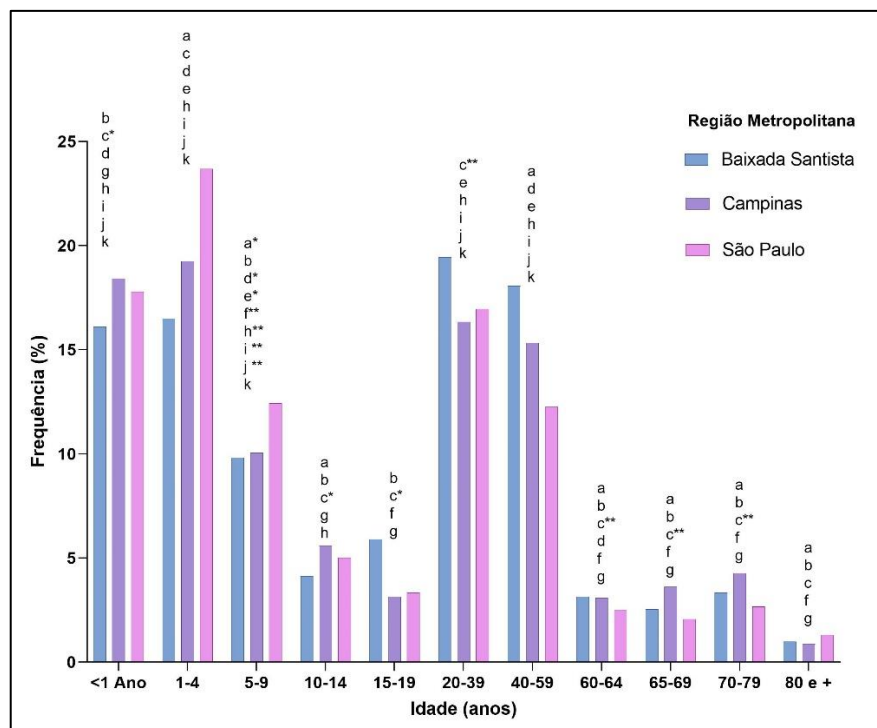


Figura 3 - Comparação dos casos confirmados de meningite, segundo a faixa etária, nas três regiões metropolitanas da macrometrópole paulista – São Paulo, Baixada Santista e Campinas, 2017-2021.

Fonte: DataSUS, 2022.

Apresentação de diferenças estatísticas significativas entre os grupos quando comparado a: ^a comparado com a faixa etária < 1 ano; ^b comparado com a faixa etária 1-4 anos; ^c comparado com a faixa etária 5-9 anos; ^d comparado com a faixa etária 10-14 anos; ^e comparado com a faixa etária 15-19 anos; ^f comparado com a faixa etária 20-39 anos; ^g comparado com a faixa etária 40-59 anos; ^h comparado com a faixa etária 60-64 anos; ⁱ comparado com a faixa etária 65-69 anos; ^j comparado com a faixa etária 70-79 anos; ^k comparado com a faixa etária 80 e + anos. Valores de significância entre as diferenças estatísticas: (*) P ajustados entre 0,01 e 0,05 e dois asteriscos (**) P ajustados entre 0,01 e 0,001, ANOVA-Bonferroni.

Na Tabela 1 observam-se os casos de meningite segundo o grau de escolaridade da população, sendo que os grupos com ensino médio completo, da 5^a a 8^a série incompleta e 1^a a 4^a série incompleta foram os mais acometidos, nas três regiões analisadas. Sendo 9,63% (49/509) na Baixada Santista, 5,41% (91/1.683) na região de Campinas e 3,69% (387/10.476) na região de São Paulo em relação a população que apresenta ensino médio completo. Vale evidenciar que nas três regiões houve alto índice de casos que foram ignorados ou não registrados apresentando 36,35% (185/509) na Baixada, 34,64% (583/1.683) na região de Campinas e 35,61% (3730/10.476) na região de São Paulo. Vale ressaltar que as informações registradas são de suma importância e estão sendo subnotificadas, como mostra os dados referentes ao grau de escolaridade e evidencia a necessidade de manter uma abordagem preventiva do sistema público de saúde para se ter subsídios para tomada de decisão. Não foram verificadas diferenças significativas entre os casos positivos segundo grau de escolaridade entre as três regiões analisadas, evidenciando que apesar de apresentarem diferenças significativas em concentração populacional, apresentam perfil epidemiológico segundo grau de escolaridade semelhante.

Tabela 1. Frequência dos casos confirmados de meningite em três regiões metropolitanas da macrometrópole paulista – São Paulo, Baixada Santista e Campinas, segundo o grau de escolaridade, no período de 2017-2021.

Grau de Escolaridade	BS (%)	(n)	CAMP (%)	(n)	SP (%)	(n)	Total
Ign/Branco	36,35	185	34,64	583	35,61	3730	4498

Analfabeto	0	0	0,24	4	0,18	19	23
1ª a 4ª série incompleta do EF	3,93	20	2,67	45	2,62	274	339
4ª série completa do EF	1,18	6	1,25	21	0,84	88	115
5ª a 8ª série incompleta do EF	3,54	18	4,75	80	2,14	224	322
Ensino fundamental completo	1,18	6	2,26	38	1,50	157	201
Ensino médio incompleto	2,95	15	1,60	27	1,28	134	176
Ensino médio completo	9,63	49	5,41	91	3,69	387	527
Educação superior incompleta	0,59	3	1,37	23	0,75	79	105
Educação superior completa	2,36	12	2,85	48	3,13	328	388
Não se aplica	38,31	195	42,96	723	48,26	5056	5974
total	100	509	100	1683	100	10476	12668

Fonte: DataSUS, 2022

Segundo Barata *et al.* (2020), o nível de escolaridade não está significativamente relacionado com a incidência de meningite, corroborando com os dados apresentados nesta pesquisa. Como podemos verificar na Tabela 1, indivíduos analfabetos não tiveram altos índices de desenvolvimento da patogenia, representando menores valores quando comparado a outros graus de escolaridade.

É possível observar que, apesar de diferenças significativas quanto a índice populacional e área demográfica das regiões metropolitanas do estudo, o perfil epidemiológico das meningites analisados a partir das variáveis etiologia, sexo, faixa etária e grau de escolaridade demonstrou-se semelhante sem diferenças expressivas entre si nas três regiões.

No entanto, verifica-se que quando comparadas ao perfil epidemiológico do Brasil nos anos de 2018 e 2019 descrito por Junior *et al.* (2021), houve uma desconformidade quanto a faixa etária mais acometida, visto que no Brasil houve maior frequência de casos positivos confirmados entre os 20 e 39 anos, enquanto nas três regiões a faixa mais afetada foi a de 1 a 4 anos, podendo demonstrar possíveis baixos índices de vacinação infantil nas regiões.

CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, a meningite continua sendo uma doença de notificação compulsória de grande importância para a saúde pública no Brasil. O perfil epidemiológico demonstrou-se semelhante sem diferenças expressivas entre si nas três regiões estudadas, embora seja dependente de múltiplos fatores, desenvolvendo-se por meio de patogênese associada a alta variabilidade de patógenos envolvidos no processo sendo de etiologia infecciosa ou não.

Apesar das limitações encontradas pelo uso de dados secundários, o estudo destaca que a frequência de meningite apresenta altos números para etiologias como a meningite asséptica e a meningite bacteriana. A meningite não é uma doença fácil de erradicar devido à sua alta transmissão aérea e é prejudicada por fatores como o acesso precário ao saneamento básico e aos insumos básicos de higiene. No entanto, vemos que a vacinação é eficaz para a prevenção a longo prazo, destacando a importância de políticas públicas quanto a prevenção da doença, bem como também da agilização dos processos diagnósticos quando em casos suspeitos afim de diminuir suas altas taxas de morbimortalidades.

O estudo ainda evidenciou que recorrentemente informações de suma importância estão sendo subnotificadas, como mostra os dados referentes ao grau de escolaridade. Este ponto evidencia a necessidade de manter uma abordagem preventiva no sistema público de saúde, o que requer serviços de vigilância epidemiológica mais organizados e ativos, a fim

de monitorar adequadamente o comportamento da doença e determinar os impactos na saúde da população e as respostas às intervenções.

Sugerem-se, para as regiões, estudos que possam inferir nos casos da doença como o índice de vulnerabilidade social para que se entenda como o status socioeconômico pode impactar no desenvolvimento da patologia, a fim de que se possa pensar em políticas públicas de melhoria de qualidade de vida da população e ações de educação em saúde para lidar com a prevenção podendo trazer a redução da letalidade e morbidade da meningite.

REFERÊNCIAS

ZUETER, A. M.; ZAITER, A. Infectious meningitis. **Clinical Microbiology Newsletter**, v37, n. 6, p. 43-50, 2015.

DAZZI, M. C.; ZATTI, C. A.; BALDISSERA, R. Perfil dos casos de meningites ocorridas no Brasil de 2009 à 2012. **Revista Uningá Review**, 19(3):33-36, 2014.

TUNKEL, A. R.; SCHELD W. M. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Ver.* 1993; 6(2):118-36.

LIMA, R. A. A. ocorrência da meningite após o advento da vacinação como política pública de saúde. [dissertação]. Vitória: **Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória**; 2017.

MACEDO JUNIOR, A. M.; NICOLETTI, G. P.; SANTOS, E. C. G. “Meningite: breve análise sobre o perfil epidemiológico no Brasil-Br, nos anos de 2018 e 2019”. **International Journal of Development Research**, 11, (01), 43751-43756, 2021.

SILVA, A. C. B.; CONCEIÇÃO RODRIGUES, E. L.; TRINDADE, E. L. Avaliação dos casos de meningite por definição do agente etiológico no estado do Pará entre os anos de 2010 a 2019. **Brazilian Journal of Health Review**, 3(4), 7729-7736, 2020.

SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Meningites: manual de instrução, critérios de confirmação e classificação de casos. São Paulo: CVE, 2001.

SILVA, L. G.; SILVA, B. V. P.; SILVA, P. S. A.; JUNIOR, F. T. D. S. S.; SAMPAIO, L. S.; MATOS, L. F. L.; VERDE, R. M. C. L. **Aspectos epidemiológicos das meningites virais no estado do Piauí no período de 2007 a 2017**. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 2019; 11(10), e433-e433.

ZANIN, E. B.; CZAPLA, B. L.; FUKUYAMA, A. C. W.; ORTINÃ, T. T. C.; SILVA LIMA, U. T. Perfil epidemiológico das meningites em pacientes pediátricos na cidade de Cascavel/PR em 10 anos. **Revista Thêmaet Scientia**, 10(1E), 120-130, 2020.

BARATA, R. S.; VIEIRA, C. M.; OLIVEIRA, R. A. C.; GUEDES, J. A.; GONÇALVES, N. V. A meningite criptocócica: análise espacial, epidemiologia e fatores de risco no estado do Pará, Amazônia oriental brasileira. **Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, 16, 74-83, 2020.

INVESTIGAÇÃO DE COINFECÇÕES HTLV-HIV EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS NO NOROESTE PAULISTA

José Eduardo Gonçalves Sbroggio Pereira¹; Marcia Maria Costa Nunes Soares²;
Fernanda Modesto Tolentino²; Milena Polotto de Santi²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CLR – IAL – SJRP; E-mail:
jeduardo.gsbroggio@gmail.com

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

Resumo: As retrovíroses humanas emergiram como pandemias nas últimas décadas e são importantes causas de morbidade e mortalidade humana. Dentre elas, estão os vírus linfotrópicos de células T humana do tipo 1 e do tipo 2 (HTLV-1 e 2) que foram os primeiros retrovírus humanos isolados e identificados, e o HIV (vírus da imunodeficiência adquirida). As principais vias de transmissão desses vírus são a vertical, sexual e por componentes sanguíneos contaminados. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar a existência de coinfeções HTLV com HIV em pacientes atendidos em unidades pertencentes à divisão regional de saúde XV do estado de São Paulo. Para isso, foi realizada uma busca e análise dos resultados de HTLV e HIV nos bancos de dados Siscel, Sigh e GAL. A análise dos dados mostrou que 28 pacientes apresentaram coinfeção HTLV-HIV, sendo 60,7% dos soropositivos para HIV coinfectados com HTLV-1 e 39,3% coinfectados com HTLV-2. Dos coinfectados, 26% apresentaram idade entre 38 e 48 anos e 74% idade igual ou superior a 49 anos; 43% dos pacientes eram do sexo feminino e 57% do sexo masculino. Os municípios que apresentaram maior número de pacientes coinfectados foram Catanduva e São José do Rio Preto. Grande parte dos pacientes foram provenientes de serviços especializados em HIV/AIDS (Coordenadoria DST/AIDS, Serviço De Atendimento Especializado Saecrt HIV/AIDS (SAE) e alas específicas de infectologia dos hospitais). Estes achados evidenciam a importância do rastreamento de ambos os vírus, principalmente em pacientes de grupos de risco para HTLV como usuários de drogas injetáveis com compartilhamento de seringas.

Palavras-Chaves: Coinfeção; Infecções por HTLV 1; Infecções por HTLV-2; HIV.

Introdução

As retrovíroses humanas emergiram como pandemias nas últimas décadas e são importantes causas de morbidade e mortalidade humana. Dentre elas, estão os vírus linfotrópicos de células T humana do tipo 1 e do tipo 2 (HTLV-1 e 2) e o HIV (vírus da imunodeficiência adquirida). O HTLV-1 e HTLV-2 foram os primeiros retrovírus humanos isolados e identificados e podem persistir no hospedeiro, de forma silenciosa, durante vários anos ou décadas (MONTANHEIRO, 2007).

As principais áreas endêmicas para a infecção pelo vírus HTLV-1 são sudoeste do Japão, algumas áreas do Caribe e redondezas, América do Sul com foco na Colômbia e Guiana Francesa, algumas áreas da África intertropical e Oriente Médio e regiões isoladas na Austrália (GESSAIN e CASSAR, 2012). O número de infectados no mundo é entre 10 a

20 milhões, e, no Brasil, estima-se que existam cerca de dois milhões de pessoas infectadas com HTLV-1, e dessas, aproximadamente 90% permanecerão assintomáticas ao longo de suas vidas. Em bancos de sangue em algumas regiões do país os infectados correspondem a até 2% (EDLICH et al., 2000).

O HTLV-2 é endêmico em populações indígenas isoladas em tribos de pigmeus na África e tem se disseminado entre usuários de drogas intravenosas e seus parceiros sexuais na América do Norte e Europa (Itália, Espanha, França, Noruega, Suécia, Irlanda e Reino Unido) (LOWIS et al., 2002). A presença do HTLV-2 entre índios americanos é antiga, e teria sido introduzida em áreas urbanas das Américas, Europa e Ásia, principalmente entre usuários de drogas intravenosas, transmitido principalmente por exposição ao sangue contaminado, resultante do compartilhamento de agulhas e seringas (HALL et al., 1994). O HTLV-2 predomina na população nativa do Brasil (CATALAN-SOARES e CARNEIRO-PROIETTI, 2005).

O HIV (vírus da imunodeficiência humana) é um retrovírus, classificado na subfamília dos *Lentiviridae*. É o causador da AIDS, uma doença que ataca o sistema imunológico, cujas células alvo são os linfócitos T CD4+. O ciclo de infecção ocorre através da alteração do DNA dessa célula, onde o HIV multiplica-se. Após o processo de multiplicação, os linfócitos são rompidos e os novos vírus continuam o ciclo. A transmissão pode ocorrer através de relação sexual sem camisinha, compartilhamento de seringas, transmissão vertical, transfusão de sangue contaminado, instrumentos perfurocortantes (Ministério da Saúde, 2018).

A principal via de transmissão do HTLV é a transmissão vertical, principalmente relacionada à amamentação (HINO, 2011). A transmissão sexual, principalmente, não exclusivamente, ocorre do homem para a mulher e supõe-se que isto seria a explicação para o aumento da soroprevalência com a idade em mulheres (MURPHY et al., 1989; STUVER et al., 1993; TAKEZAKI et al., 1995; KAPLAN et al., 1996; ROUCOUX et al., 2005). A transmissão por componentes sanguíneos contaminados (contendo linfócitos infectados com HTLV) é responsável por uma alta proporção (15-60%) de infecção em receptores de sangue (OKOCHI et al., 1984). A infecção por HTLV-1 está presente também entre usuários de drogas intravenosas, mas em extensão menor que o HTLV-2 (MURPHY et al., 1999). A relação sexual desprotegida, o contato com sangue ou tecido e a amamentação podem expor os indivíduos não apenas ao HTLV, mas a uma variedade de outros patógenos, como vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Treponema pallidum*, vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite B (HBV), vírus do papiloma humano (HPV) e vírus do herpes simples (HSV) (ROSADAS et al., 2022). O HTLV e o HIV possuem similares vias de transmissão, o que favorece a coinfeção (PEREIRA, 2019). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi determinar a ocorrência de coinfeções HTLV-HIV em pacientes diagnosticados para HTLV no Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto e atendidos na abrangência da Divisão Regional de Saúde XV (DRS-XV). Os resultados são importantes para serem utilizados nas estratégias de profilaxia junto à população em geral e, principalmente, entre os grupos de risco.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no CLR-IAL de São José do Rio Preto, onde é realizada o diagnóstico sorológico de HTLV dos pacientes de todos os municípios pertencentes à DRS-XV, distribuídos em sete colegiados (Santa Fé do Sul, Jales, Fernandópolis, Votuporanga, São José do Rio Preto, José Bonifácio e Catanduva). Trata-se de um estudo retrospectivo

com levantamento de banco de dados, no qual foi investigada a presença da coinfeção HTLV-HIV entre os pacientes que apresentaram sorologia reagente para HTLV no período de março de 2015 a dezembro de 2021.

Os dados foram obtidos nas plataformas SIGH (Sistema de Informação e Gestão Hospitalar), GAL (Gerenciador de Ambiente Laboratorial) e SISCEL (Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos e Carga Viral), e, posteriormente organizados em uma tabela no Microsoft Excel para serem analisados.

Resultados e Discussão

A análise dos dados mostrou que das 38 amostras, 28 pacientes apresentaram coinfeção HTLV-HIV 73,68% (28/38). Das 28 amostras com coinfeção, 17 (60,7%) coinfectados HTLV-1-HIV e 11 (39,3%) coinfectados HTLV-2-HIV, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados dos pacientes HTLV reagentes coinfectados com HIV.

<i>PACIENTE</i>	<i>IDADE</i>	<i>SEXO</i>	<i>MUNICÍPIO</i>	<i>UNIDADE SOLICITANTE</i>	<i>TIPO HTLV</i>	<i>HIV</i>
1	054A	M	CATANDUVA	HEC	HTLV-I	R
2	040A	F	CATANDUVA	HEC	HTLV-II	R
3	057A	M	CATANDUVA	HEC	HTLV-I	R
4	054A	F	CATANDUVA	HEC	HTLV-II	R
5	050A	M	CATANDUVA	HEC	HTLV-I	R
6	056A	M	CATANDUVA	HPA	HTLV-I	R
7	052A	M	CATANDUVA	HEC	HTLV-I	R
8	063A	F	CATANDUVA	HEC	HTLV-II	R
9	049A	M	CATANDUVA	HEC	HTLV-I	R
10	056A	M	CATANDUVA	COORDENADORIA DST AIDS	HTLV-I	R
11	054A	F	CATANDUVA	COORDENADORIA DST AIDS	HTLV-I	R
12	051A	F	CATANDUVA	HEC	HTLV-I	R
13	063A	M	CATANDUVA	COORDENADORIA DST AIDS	HTLV-I	R
14	049A	F	CATANDUVA	COORDENADORIA DST AIDS	HTLV-I	R
15	043A	M	CATANDUVA	HEC	HTLV-I	R
16	051A	M	CATANDUVA	HEC	HTLV-II	R
17		M	CATANDUVA	HEC	HTLV-I	R
18	038A	F	FERNANDÓPOLIS	CADIP	HTLV-II	R
19	051A	F	FERNANDÓPOLIS	CADIP	HTLV-II	R
20	063A	F	JALES	LABORATÓRIO SUS	HTLV-I	R
21	068A	M	SANTO ANDRÉ	SAE	HTLV-I	R
22	051A	F	SJRP	SAE	HTLV-II	R
23	048A	F	SJRP	SAE	HTLV-I	R
24	044A	M	SJRP	SAE	HTLV-II	R
25	057A	M	SJRP	SAE	HTLV-II	R
26	043A	M	SJRP	SAE	HTLV-II	R

27	048A	F	SJRP	SAE	HTLV-I	R
28	049A	M		SAE	HTLV-II	R

Legenda: SAE - Serviço De Atendimento Especializado; R – Reagente; SJRP – São José do Rio Preto; HEC – Hospital Emilio Carlos (ala da infectologia); HPA – Hospital Padre Albino; CADIP - Centro de Atendimento a Doenças Infectocontagiosas e Parasitárias.

Os pacientes que apresentaram coinfeção foram provenientes dos municípios de Catanduva, Fernandópolis, Jales, Santo André e São José do Rio Preto. Os municípios com maior número de pacientes infectados foram os de Catanduva, com 60,7% (17/28) pacientes, e São José do Rio Preto com 21,4% (6/28) pacientes.

Analisando a faixa etária, foi observado que a idade mínima dos infectados foi de 38 anos e a máxima de 68 anos, sendo 26% (7/27) com idade variando de 38 a 48 anos e 74% (20/27) com idade igual e superior a 49 anos, isso pode ser um indicativo da demora na suspeita e consequente diagnóstico da infecção por HTLV. O diagnóstico em idade mais avançada nos coinfectados pode ser explicado devido ao curso assintomático, do vírus HTLV, sendo descobertos somente quando algumas das complicações crônicas são evidenciadas (PEREIRA et al, 2020). A implementação de estratégias de prevenção do HIV em meados da década de 1980 pode ter reduzido o risco de novas infecções por HTLV-I (Dourado et al, 2003). Segundo a Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo, desde 1986, o Estado de São Paulo conta com leis que visam o controle do HIV, baseados na Lei 5.190/1986, que vem a estabelecer que todo o material para transfusão de sangue em hospitais e bancos de sangue seja testado para detecção da presença do vírus. A PORTARIA Nº 1.376, DE 19 DE NOVEMBRO DE 1993, inseriu a obrigatoriedade da realização dos testes sorológicos para as doenças de Chagas, Sífilis, Hepatite, SIDA/AIDS, HTLV I/II nos bancos de sangue. Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos (2013), todos os indivíduos infectados pelo HIV-1 devem ser testados para HTLV-1/2. Isso pode ter corroborado com a diminuição da transmissão, não só do HIV como do HTLV também, entre outras doenças. Além disso, pode ser um possível indicativo do fato da maioria dos pacientes serem de idade mais avançada, já que existe a coinfeção mesmo quando o HTLV encontra-se latente, podendo ter sido infectados em um período anterior à introdução dos testes sorológicos em bancos de sangue.

Em relação ao gênero, 43% (12/28) dos pacientes coinfectados foram do sexo feminino e 57% (16/28) foram do sexo masculino. A coinfeção se mostrou mais frequente em pacientes do gênero masculino em comparação ao gênero feminino assim como em estudo de Pereira e colaboradores publicado em 2020.

A maioria dos pacientes coinfectados com foram provenientes de serviços especializados em HIV/AIDS como Coordenadoria DST/AIDS, Serviço De Atendimento Especializado Saecrt HIV/AIDS (SAE) e alas específicas para doenças infecciosas em hospitais, mostrando que a coinfeção entre essas duas doenças é comum e ocorre de forma frequente (CATERINO-DE-ARAÚJO, 2015). O estudo de Caterino-de-Araujo e colaboradores (2015) realizado na cidade de São Paulo, demonstrou que a coinfeção HTLV-HIV teve como maior fator de risco o compartilhamento de seringas por usuários de drogas injetáveis, e que, a maioria dos coinfectados descobriram a infecção por HIV entre 1990 e 1991, quando compartilhavam seringas e agulhas ao injetar drogas ilícitas ou mantinham relações sexuais com usuários de drogas injetáveis. Sendo assim, é de extrema importância o rastreamento de ambos os vírus em pacientes pertencentes aos grupos de risco.

Conclusão

A análise dos dados mostrou que 28 pacientes apresentaram coinfeção HTLV-HIV, sendo 17 (60,7%) coinfectados com os vírus HTLV-1-HIV e 11 (39,3%) coinfectados com os vírus HTLV-2-HIV.

A coinfeção se mostrou mais frequente em pacientes do gênero masculino em comparação ao gênero feminino.

Os municípios com maior número de coinfectados HTLV-HIV foram Catanduva com 60,7% (17/28) seguido por São José do Rio preto com 21,4% (6/28) pacientes.

Em relação à faixa etária, observou-se que o maior número de indivíduos infectados tinham idade igual ou superior a 49 anos 74% (20/27).

Referências Bibliográficas

Assembleia Legislativa do estado de São Paulo. Notícias. Dezembro Vermelho: novos casos de HIV têm alta de quase 20% no Estado de São Paulo, 2021. Disponível em: <<https://www.al.sp.gov.br/noticia/?id=431668#:~:text=Desde%201986%2C%20o%20Estado%20de,detec%C3%A7%C3%A3o%20da%20presen%C3%A7a%20do%20v%C3%ADrus.>>. Acesso em: 10 de outubro de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 1.376, de nov. 1993. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 de dez. 1993.

CATALAN-SOARES, Bernadette; CARNEIRO-PROIETTI, Anna Bárbara de F.; PROIETTI, Fernando Augusto. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, p. 926-931, 2005.

CATERINO-DE-ARAÚJO, Adele et al. Current prevalence and risk factors associated with human T lymphotropic virus type 1 and human T lymphotropic virus type 2 infections among HIV/AIDS patients in São Paulo, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 31, n. 5, p. 543-549, 2015.

DA INFEÇÃO, TERAPÊUTICAS PARA MANEJO. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA MANEJO DA INFEÇÃO PELO HIV EM ADULTOS. 2013.

DOURADO, Inês et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 34, n. 5, p. 527-531, 2003.

EDLICH, Richard F.; ARNETTE, Jarrett A.; WILLIAMS, Freddie M. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). **The Journal of emergency medicine**, v. 18, n. 1, p. 109-119, 2000.

GESSAIN, Antoine; CASSAR, Olivier. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 388, 2012.

HALL, William W. et al. Human T cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. In: **Seminars in Virology**. Academic Press, 1994. p. 165-178.

HINO, Shigeo. Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. **Proceedings of the Japan Academy**, Series B, v. 87, n. 4, p. 152-166, 2011.

KAPLAN, Jonathan E. et al. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 12, n. 2, p. 193-201, 1996.

LOWIS, George W.; SHEREMATA, William A.; MINAGAR, Alireza. Epidemiologic features of HTLV-II: serologic and molecular evidence. **Annals of epidemiology**, v. 12, n. 1, p. 46-66, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA, PREVENÇÃO E CONTROLE DAS INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS, DO HIV/AIDS E DAS HEPATITES VIRAIS. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV em adultos e crianças. 2018.

MONTANHEIRO, Patricia Aparecida. **Quantificação de carga proviral do vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) e marcadores imunológicos em indivíduos portadores e pacientes com TSP/HAM**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MURPHY, Edward L. et al. Evidence among blood donors for a 30-year-old epidemic of human T lymphotropic virus type II infection in the United States. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 6, p. 1777-1783, 1999.

MURPHY, Edward L. et al. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Annals of internal medicine**, v. 111, n. 7, p. 555-560, 1989.

OKOCHI, Kazuo; SATO, Hiroyuki; HINUMA, Yorio. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. **Vox sanguinis**, v. 46, n. 5, p. 245-253, 1984.

PEREIRA, Felicidade Mota et al. Distribution of human T-lymphotropic virus (HTLV) and hepatitis C co-infection in Bahia, Brazil. **PloS one**, v. 15, n. 7, p. e0223087, 2020.

PEREIRA, Felicidade Mota et al. **Taxa de infecção do vírus linfotrópico de células humanas (HTLV), vírus da hepatite C (HCV), coinfeção HTLV/HCV no Estado da Bahia e impacto da coinfeção HTLV/HCV no perfil de citocinas**. 2019. Tese de Doutorado. Instituto Gonçalo Moniz.

ROSADAS, Carolina; TAYLOR, Graham P. HTLV-1 and co-infections. **Frontiers in Medicine**, v. 9, 2022.

ROUCOUX, Diana F. et al. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. **The Journal of infectious diseases**, v. 191, n. 9, p. 1490-1497, 2005.

STUVER, Sherri O. et al. Heterosexual transmission of human T cell leukemia/lymphoma virus type I among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki Cohort Study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 1, p. 57-65, 1993.

TAKEZAKI, Toshiro et al. Incidence of human T lymphotropic virus type I seroconversion after age 40 among Japanese residents in an area where the virus is endemic. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 3, p. 559-565, 1995.

AVALIAÇÃO DA ROTINA DE DIAGNÓSTICO E ACOMPANHAMENTO DA HEPATITE C REALIZADA PELO INSTITUTO ADOLFO LUTZ CENTRAL ENTRE OS MESES DE JANEIRO A JULHO DE 2022

Amanda Vieira Lima¹; Julia Gabriela dos Santos Pedro¹; Clóvis Roberto Abe Constantino²; Adriana Parise Compri²

¹ Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública do Laboratório de Hepatites do Instituto Adolfo Lutz Central; E-mail: vieira14amanda@gmail.com

² Pesquisador Científico do Laboratório de Hepatites do Instituto Adolfo Lutz Central; E-mail: adriana.compri@ial.sp.gov.br

RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite C é um grave problema de saúde pública, sendo que 85% dos indivíduos infectados progridem para a fase crônica. Além disso, muitos pacientes são assintomáticos, dificultando o diagnóstico e levando a doença a avançar durante décadas sem suspeita clínica, o que aumenta o risco de complicações como cirrose e carcinoma hepatocelular. O diagnóstico envolve o uso de técnicas sorológicas para a triagem e técnicas de biologia molecular como o RT-qPCR, para a confirmação do resultado. O RT-qPCR faz a quantificação do vírus HCV e, por isso, é usado não apenas para o diagnóstico, mas também para medir a eficácia do tratamento. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a rotina dos exames de RT-qPCR para o diagnóstico e tratamento da hepatite C. Para tanto, foram selecionados os exames realizados entre os meses de janeiro a julho de 2022 no Laboratório de Hepatites do Instituto Adolfo Lutz Central. O levantamento de dados foi feito por meio do Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) e das requisições de solicitação de exames dos pacientes. Os resultados mostraram que a maioria dos infectados eram do sexo masculino 55% com média de idade de 53,2 anos. Para o diagnóstico, 57,7% dos exames apresentaram resultado não detectável, evidenciando a importância do RT-qPCR para confirmar a infecção ativa. Nos exames para avaliação da doença após o tratamento, 96,7% foram não detectáveis indicando que os medicamentos administrados foram eficazes. Em relação à rotina, falhas foram encontradas sendo propostas medidas para a sua melhoria, o que impacta diretamente nos resultados liberados aos pacientes atendidos pela rede. Portanto, com as ferramentas utilizadas foi possível avaliar a rotina que envolve o diagnóstico e tratamento da hepatite C no Laboratório de Hepatites do Instituto Adolfo Lutz Central e propor ações para reduzir as não conformidades.

Palavras-chave: Diagnóstico; Hepatite C; Rotina; RT-qPCR; Tratamento

INTRODUÇÃO

A hepatite C é responsável por aproximadamente 71 milhões de infecções no mundo, sendo 700 mil no Brasil, representando uma das principais doenças crônicas hepáticas, o que levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a propor que até 2030 houvesse um esforço global para reduzir a incidência e mortalidade desse agravo.^(1, 2, 3)

O vírus da hepatite C (HCV) é transmitido através do sangue contaminado que está presente principalmente nos objetos perfurocortantes, e por esse motivo, usuários de drogas

injetáveis e profissionais da área da saúde estão entre os grupos mais suscetíveis. Cerca de 85% dos infectados não conseguem eliminar espontaneamente o vírus e a doença evolui para o estado crônico que é caracterizado pela persistência viral por mais de 6 meses. Somado a isso, muitos pacientes progridem de maneira assintomática, dificultando o diagnóstico e levando a doença a avançar durante décadas sem suspeita clínica, aumentando o risco de complicações como cirrose e carcinoma hepatocelular.^(4, 3)

O diagnóstico envolve o uso de técnicas sorológicas para a triagem e técnicas de biologia molecular como a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para a confirmação do resultado. A RT-qPCR faz a quantificação do vírus HCV e por isso é usada não apenas para o diagnóstico, mas também para medir a eficácia do tratamento.⁽⁵⁾

No estado de São Paulo o Laboratório de Hepatites do Instituto Adolfo Lutz (IAL) Central é o laboratório de referência e coordenador da rede de biologia molecular, que além de realizar as rotinas de PCR quantitativo em tempo real para as hepatites B e C atua auxiliando outros laboratórios da rede.⁽⁶⁾

Tendo em vista os aspectos envolvendo a hepatite C e a importância dos exames de biologia molecular para o monitoramento dessa doença, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a rotina dos exames de RT-qPCR para o diagnóstico e tratamento da hepatite C.

MATERIAL E MÉTODOS

Para que o objetivo pudesse ser atingido foi realizado um levantamento de dados secundários dos pacientes com suspeita ou confirmação de hepatite C, atendidos entre os meses de janeiro a julho de 2022 no Laboratório de Hepatites do IAL Central. As informações foram retiradas do Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) e das requisições de exames dos pacientes, que foram encaminhadas junto com as amostras, levando em consideração parâmetros que possibilitassem conhecer o perfil dos pacientes atendidos pela rede, como sexo e idade, além dos motivos para as solicitações dos exames e as ocorrências que causaram o cancelamento de parte deles. As tabelas de resultados foram geradas através do programa Microsoft Excel 2010.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período analisado 1307 exames de biologia molecular do tipo RT-qPCR foram solicitados ao Laboratório de Hepatites do IAL Central. Os motivos assinalados na requisição para justificar a realização do exame são apresentados conforme a Tabela 1. O campo marcado como vazio 19,9% representa exames que foram cadastrados no GAL, mas o resultado não foi liberado. O campo ignorado 12,9% representa requerimentos em que o motivo do exame não foi preenchido pela unidade solicitante. A falta ou o incorreto preenchimento desse campo pode levar a incompatibilidade entre o motivo e o valor da carga viral prejudicando a análise do resultado.

Como já mencionado, uma parcela dos exames não foram liberados ficando retidos nos status de aguardando triagem (3,1%), exames cancelados (7,7%) e exames não realizados (89,2%). As ocorrências que levaram aos seus cancelamentos são apresentadas na Tabela 2. Nota-se que muitas das ocorrências são devido a falhas na etapa pré-analítica, por exemplo, o envio da amostra para o local errado de realização do exame, como em “O IAL Central não é referência para esta solicitação” 19,6% fazendo com que a solicitação não esteja em conformidade com o que é determinado pelo Ministério da Saúde (MS) ocasionando desperdício de tempo e mão de obra. Além disso, quase metade dos cancelamentos 46,2% não teve um motivo registrado, o que prejudica a adoção de medidas

para evitar falhas no futuro. Vale ressaltar que, dentre os exames não liberados, nos exames cancelados e aguardando triagem o sistema GAL não permite colocar o motivo do cancelamento, só sendo permitido para os exames com status não realizados.

Tabela 1. Motivo assinalado na requisição do exame

Motivo	n (1307)	%
Avaliação pós-tratamento	456	34,9
Diagnóstico	331	25,3
Vazio	260	19,9
Campo ignorado	168	12,9
Hepatite desconhecida	30	2,3
Indicação de tratamento	28	2,1
Monitorar tratamento	14	1,1
Suspeita de reinfecção	11	0,8
Genotipagem	9	0,7

Tabela 2. Ocorrências relacionadas ao cancelamento de exames

Ocorrência	n (260)	%
Volume insuficiente para confirmação do resultado. Favor enviar nova amostra.	20	7,7
Cadastro de solicitação de exame descartado devido à expiração do prazo de triagem.	19	7,3
Cadastro duplicado	24	9,2
A solicitação não está de acordo com os critérios do MS. O intervalo para um novo pedido é de 3 meses.	13	5
Mesmo após a centrifugação não foi possível separar o plasma das células.	1	0,4
O IAL Central não é referência para esta solicitação	51	19,6
O tubo não foi centrifugado antes de ser enviado. Amostra com hemólise	4	1,5
Volume insuficiente para repetição do teste, por duas vezes houve inibição do controle interno da reação. Favor enviar nova amostra.	3	1,2
Problemas (equipamento) durante a execução do teste, volume insuficiente para repetição. Favor enviar nova amostra	2	0,8
Solicitação enviada, Hepatite B, ver requisição	1	0,4
Volume insuficiente para realização do teste. Volume de soro inferior a 1 mL.	2	0,8
Sem motivo	120	46,2

Do total de solicitações, 1047 exames foram liberados 80,1% sendo que destes foram considerados abaixo do limite de quantificação 0,4% (n=4), detectáveis 21,8% (n=229) e não detectáveis 77,7% (n=814). A maioria dos resultados detectáveis foram em pacientes do sexo masculino 55,0% (n=126), semelhante à proporção relatada no Boletim

Epidemiológico do MS (2021), onde os homens representaram 57,6% dos infectados entre os anos de 1999 a 2020.⁽⁷⁾

Em relação à idade, a maioria dos resultados detectáveis 31,4% (n=72) foi na faixa etária de 40 a 49 anos e média de 53,2 anos, estando de acordo com Carvalho-Louro et al. (2020) que menciona uma maior prevalência de HCV depois dos 40 anos e sugere a intensificação de campanhas para o diagnóstico a partir dessa idade.⁽¹⁾

Das requisições que tiveram como motivo o diagnóstico (Tabela 3) mais da metade deles foi não detectável 57,7%, pois os anticorpos detectados no teste rápido (TR) são anticorpos totais não diferenciando infecção ativa de passada, isto mostra a importância do exame de RT-qPCR para confirmação do diagnóstico. Dentre os detectáveis, a maioria apresentou log alto com média de 5,7 indicando a necessidade de se iniciar o tratamento o quanto antes a fim de evitar as complicações clínicas e a disseminação do vírus, como demonstrado na literatura.^(5, 8)

Tabela 3. Resultados dos pacientes que buscavam o diagnóstico

Resultado	Diagnóstico				
	n (331)	%	Log	n (139)	%
Abaixo do limite de quantificação	1	0,3	2,00 a 2,99	2	1,4
			3,00 a 3,99	3	2,2
			4,00 a 4,99	18	12,9
			5,00 a 5,99	53	38,1
Detectável	139	42,0	6,00 a 6,99	60	43,2
			7,00 a 7,99	3	2,2
			Não Detectável	191	57,7

No decorrer do ano de 2022, casos de hepatite aguda grave de etiologia desconhecida vêm acometendo crianças. Diante disso, o IAL Central enquanto laboratório de referência recebeu amostras de hepatite de causa desconhecida para a investigação do HCV. Das 30 amostras analisadas, todas apresentaram resultado não detectável, confirmando que o HCV não é o agente etiológico desse agravo como observado em outros países.^(9, 10)

Quanto ao motivo de solicitação para genotipagem, os resultados são em sua maioria detectáveis 88,9% (n=8) e com valores de carga viral alta, o que é esperado já que o recomendado é que a genotipagem seja feita antes do início do tratamento. No momento da solicitação, a requisição do paciente foi preenchida tendo como motivo a genotipagem, mas como o Laboratório de Hepatites do IAL Central não é referência para a solicitação deste exame, somente o RT-qPCR foi realizado.

O rastreio periódico do HCV é recomendado principalmente entre os grupos mais expostos aos fatores de risco considerando a possibilidade de reinfecção já que a hepatite C não confere imunidade protetora após a primeira exposição⁽²⁾. Dentre as 11 amostras analisadas tendo como finalidade a suspeita de reinfecção, 18,2% (n=2) apresentaram resultado detectável.

A maioria dos resultados foi para verificar a avaliação pós-tratamento (Tabela 4), para averiguar se a resposta virológica sustentada (RVS) foi alcançada. Destes, 96,7% foram não detectáveis, evidenciando a eficácia do tratamento. Dos 2,6% que foram detectáveis todos apresentaram valor de carga viral alta com log acima de 4. Dentre as explicações prováveis está, a de que, parte dos pacientes não aderiram ao tratamento, não responderam ao tratamento indicado ou a finalidade do exame estava incorreta quando preenchida pela unidade requisitante.^(1, 11)

Exames de RT-qPCR também foram feitos para os pacientes que precisavam monitorar o tratamento, com o intuito de saber se a carga viral estava diminuindo ao longo do tempo. Destes, 92,9% (n=13) apresentaram resultado não detectável, mostrando que o tratamento estava funcionando como mencionado por Duarte et al (2021).⁽¹²⁾

Tabela 4. Resultados dos pacientes em avaliação pós-tratamento

Avaliação pós- tratamento					
Resultado	n (456)	%	Log	n (12)	%
Abaixo do limite de quantificação	3	0,7	2,00 a 2,99	0	0
			3,00 a 3,99	0	0
Detectável	12	2,6	4,00 a 4,99	3	25,0
			5,00 a 5,99	4	33,3
			6,00 a 6,99	5	41,7
			7,00 a 7,99	0	0
Não Detectável	441	96,7			

Para os casos em que o motivo foi a indicação de tratamento, 67,9% (n=19) dos pacientes apresentaram resultado detectável. A indicação de tratamento é importante para a obtenção de um valor de carga viral atualizado uma vez que o paciente só consegue retirar o medicamento se apresentar um resultado de carga viral de até 3 meses como definido pelo MS.⁽²⁾

Através das requisições também foi possível verificar quais pacientes fizeram uso de medicamentos considerando a somatória dos que estavam em avaliação pós-tratamento e monitorando o tratamento (n=470). Desse total, 13,0% das requisições estavam com o campo em branco e 70,0% não possuíam o campo de medicação para ser preenchido em decorrência do modelo de ficha mais recente. Dada a importância dessa informação para acompanhar a evolução clínica do paciente seria interessante a adaptação do modelo atual com a inclusão desse campo.

Portanto, é fundamental o comprometimento de todos os profissionais envolvidos e a possibilidade de treinamento e/ou reciclagem, bem como a revisão periódica dos protocolos visando o aprimoramento das etapas da rotina para a correta realização do exame.

CONCLUSÃO

O desenvolvimento desse estudo possibilitou conhecer o perfil dos pacientes atendidos, identificar parâmetros para melhorar e aumentar a qualidade dos exames de rotina de RT-qPCR para HCV realizados pelo Laboratório de Hepatites do IAL Central e pela rede estadual, que coordena.

REFERÊNCIAS

1. CARVALHO-LOURO, D. M. et al. **Hepatitis C screening, diagnosis, and cascade of care among people aged > 40 years in Brasilia, Brazil.** BMC Infectious Diseases, v. 20, n. 1, 10 fev. 2020.
2. MS - 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. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções.** Brasília: Ministério da Saúde; 2019.
3. ABU-FREHA, N. et al. **Chronic hepatitis C: Diagnosis and treatment made easy.** European Journal of General Practice, v. 28, n. 1, p. 102–108, 31 dez. 2022.
4. MS - 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. **Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
5. _____. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
6. LEMOS, M. F. et al. **Diagnóstico Molecular da Hepatite C dos pacientes atendidos pelo Instituto Adolfo Lutz Central, entre março de 2012 e março de 2013.** Boletim Epidemiológico Paulista - BEPA. V. 12 No 139. Julho de 2015.
7. MS - 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. **Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais 2021.** Brasília: Ministério da Saúde, No. especial jul. 2021.
8. BATTISTAM, D. C. **Avaliação da Carga Viral do Vírus da Hepatite C (VHC) no Plasma Pobre em Plaquetas.** Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica. Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu - SP. 2019.
9. MARSH, K. et al. **Investigation into cases of hepatitis of unknown aetiology among young children, Scotland, 1 January 2022 to 12 April 2022.** Eurosurveillance, v. 27, n. 15, p. 1–7, 14 abr. 2022.
10. VIDAL, A. R. et al. **Hepatitis of unknown aetiology in children - epidemiological overview of cases reported in Europe, 1 January to 16 June 2022.** Eurosurveillance. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), v. 27, n. 31. 4 ago. 2022.

11. ROCHA, L. S. Avaliação das mutações de resistência ao tratamento com os novos antivirais de ação direta (DAA) em pacientes com hepatite C crônica. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa). Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, 2019.

12. DUARTE, G. et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: hepatites virais. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 30, n. especial 1, 2021.

AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DA APLICAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE CONVENCIONAL EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE CÃES EM TRATAMENTO PARA LEISHMANIOSE VISCERAL NO MUNICÍPIO DE BAURU – SP.

Vanessa da Silva Campos¹; Valéria Medina Camprigher²; José Eduardo Tolezano³
Virgínia Bodelão Richini-Pereira⁴

¹ Estudante do curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – Centro de Laboratórios Regionais II Bauru (CLR II Bauru); E-mail: vanessa_sophis@hotmail.com

² Médica Veterinária da Secretaria Municipal de Saúde de Bauru-SP

³ Pesquisador do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz São Paulo

⁴ Docente/Pesquisador do CLR II Bauru.

RESUMO

As leishmanioses são zoonoses causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, estando entre as doenças negligenciadas em Saúde Pública. O objetivo deste trabalho foi avaliar o protocolo de PCR convencional (cPCR) para diagnóstico e acompanhamento de cães em tratamento para Leishmaniose Visceral Canina com miltefosina e alopurinol, comparando com o diagnóstico sorológico preconizado pelo Ministério da Saúde. Participaram 34 cães de quatro áreas do município de Bauru-SP, soropositivos no teste rápido imunocromatográfico (Teste Rápido de Plataforma de Duplo Percurso TR DPP[®]) e Ensaio Imunoenzimático ELISA. Destes animais, 44,11% foram positivos no exame molecular em pelo menos uma das amostras avaliadas (sangue, soro ou linfonodo). A cPCR foi realizada em três etapas, a primeira avaliação antes do início do tratamento (T0), e as demais avaliações após um mês (T1) e dois meses (T2) do início do tratamento. Das 184 amostras examinadas ao longo do tratamento, 76 (41,3%) foram de sangue, 75 (40,8%) de soro e 33 (17,9%) de linfonodo. No T0 a positividade no sangue foi de 32,35%, no soro de 11,76% e linfonodo 37,5%. No T1 a positividade no sangue foi de 17,86%, no soro 7,14% e no linfonodo 28,57%. No T2 a positividade no sangue foi de 7,14%, no soro não houve amostras positivas e no linfonodo apenas uma amostra positiva. O tratamento induziu melhora dos sinais clínicos e decaimento da positividade na cPCR, sugerindo efetividade do tratamento. A cPCR é um bom método complementar de confirmação do diagnóstico sorológicos e monitoramento do tratamento, contribuindo com as ações de vigilância e controle da LVC de forma mais assertiva e eficiente.

Palavras-chave: Diagnóstico Molecular; Leishmaniose; Reação em Cadeia da Polimerase; Saúde Única; Vigilância em Saúde Pública

INTRODUÇÃO

O conceito de Saúde Única (*One Health*) correlaciona a saúde humana, animal e ambiental com o objetivo de planejar e implementar programas, políticas, legislação e pesquisa por meio da comunicação de múltiplos setores, envolvendo profissionais de forma multissetorial e transdisciplinar com uma visão unificada para melhoria da saúde de todos os seres vivos e ambiente (RÜEGG, *et al.*, 2018; CARNEIRO; BREWER, 2021).

Ainda pensando em Saúde Única e sua correlação com todos os seres vivos, como assunto de relevância em saúde pública temos as zoonoses, que de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) são doenças naturalmente transmitidas de animais vertebrados

para seres humanos e vice-versa, dentre estas, de grande importância podemos destacar as leishmanioses, que são causadas por protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania* spp. que acomete tanto seres humanos quanto outros mamíferos. No ambiente urbano, o cão doméstico é o principal reservatório da Leishmaniose Visceral (LV) (BIDAISEE; MACPHERSON, 2014; ASOKAN; ASOKAN, 2015; GEBREYES *et al.*, 2020; AKHOUNDI *et al.*, 2016).

O Ministério da Saúde preconiza para o diagnóstico canino, o TR-DPP® (Dual Path Plataform, Biomanguinhos, Brasil) como triagem, e o confirmatório com o ensaio imunoenzimático (EIE, BioManguinhos, Brasil) (BRASIL, 2011), porém, a reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem sendo demonstrada como um exame diagnóstico complementar com boa sensibilidade e especificidade para a confirmação de casos (FERREIRA; MORAES, 2021). Em cães soropositivos, a recomendação do Programa Nacional de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral, é a realização da eutanásia. Porém há uma demanda crescente por métodos alternativos com o uso de fármacos como medida auxiliar ao controle da doença.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a PCR convencional (cPCR) no diagnóstico complementar da LV canina, bem como o acompanhamento dos cães em tratamento para LV Canina no município de Bauru – SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 34 cães soropositivos, utilizando-se de sangue, soro e linfonodos. Os cães foram submetidos ao tratamento de LV, e os mesmos eram procedentes de quatro áreas mais críticas em relação à incidência da LV canina e humana no município. Como proteção ao ambiente, os animais receberam uma coleira impregnada por deltametrina 4% (Scalibor™/MSD), que está sendo trocada a cada 6 meses. O protocolo de tratamento iniciou de forma simultânea com a administração de Miltefosina a 2mg/kg por via oral uma vez ao dia por 28 dias e alopurinol a 20 mg/kg por via oral duas vezes ao dia por 6 meses e depois a diminuição para 10 mg/kg com uso contínuo; associado a Domperidona a 0,5 - 1 mg/kg por via oral duas vezes ao dia durante 30 dias a cada 6 meses; além da Prednisona a 0,5 mg/kg por via oral duas vezes ao dia, quando necessário.

Para a realização do teste rápido das amostras de soro canino, foi utilizado o kit TR-DPP® para leishmaniose visceral canina (Bio-Manguinhos), seguido do teste confirmatório imunoenzimático EIE – Leishmaniose Visceral Canina (Bio-Manguinhos). A extração do DNA das amostras, foi realizada com o kit Extracta–DNA e RNA (Loccus®, Brasil), conforme instruções do fabricante. A PCR convencional foi realizada com os *primers* para *Leishmania* spp, da região kDNA, LINR4 e LIN19 (ARANSAY *et al.*, 2000). O material amplificado foi visualizado em transluminador de luz Syngene® (DigiGenius, USA).

Os dados fazem parte de resultados parciais do Projeto de Doutorado de Valéria Medina Camprigher, “Uso da miltefosina como tratamento em cães sorologicamente positivos para Leishmaniose visceral no município de Bauru – São Paulo, aprovado pelo Conselho Técnico Científico (CTC) do Instituto Adolfo Lutz (nº59L-2019) e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) no 02/2020.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cães foram avaliados clinicamente e após confirmação laboratorial de LV pelos métodos diagnósticos preconizados pelo Ministério da Saúde, foi realizada a avaliação da cPCR, nos seguintes tempos: T0 – antes do início do tratamento, T1 – após um mês do início do tratamento e T2 – após dois meses do início do tratamento. Destes cães, 38,2% (13/34) eram fêmeas e 61,8% (21/34) machos. A maior parte dos animais não tinha raça definida

82,3% (28/34), o restante dos cães estava distribuído nas seguintes raças: *Boxer*, *Chihuahua*, Labrador, Pastor Alemão, *Pitbull* e *Schnauzer*.

A tabela 1 mostra a distribuição dos animais de acordo com os sinais clínicos e demonstra que após o tratamento, houve regressão de alguns deles. Em estudo realizado em Florianópolis, também foi demonstrado a eficácia do tratamento de cães com Milteforan® (ROSAR, 2022) e em Andradina, houve diminuição do escore clínico durante as análises, porém 24% dos animais foram a óbito (LISBOA *et al.*, 2018), sendo que nos nossos estudos, a porcentagem de óbitos foi de 8,8% e desistência no tratamento de 11,8%. A taxa de perda de animais ao longo de um período de análise é comum, sendo nossos índices considerados baixos se comparado com outros estudos (REITHINGER *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2018).

Tabela 1: Dinâmica de positividade para Leishmaniose Visceral em cães submetidos ao tratamento em diferentes períodos e avaliação dos sinais clínicos comumente relatados para a doença.

Tempo de Tratamento	N = 34		N = 30		N = 27	
	T0	%	T1	%	T2	%
Sinais Clínicos						
Perda de peso	6	17,6	4	13,3	1	3,7
Mucosa hipocorada	2	5,9	1	3,3	-	-
Linfoadenomegalia	18	52,9	10	33,3	5	18,5
Alopecia	4	11,8	1	3,3	-	-
Hiperpigmentação	2	5,9	1	3,3	-	-
Úlceras	6	17,6	3	10	-	-
Descamação	12	35,3	5	16,7	3	11,1
Prurido	14	41,2	4	13,3	5	18,5
Conjuntivite	6	17,6	4	13,3	1	3,7
Opacidade da Córnea	4	11,8	1	3,3	1	4,3
Ceratite	2	2,9	-	-	-	-
Onicogribose	8	23,5	5	16,7	2	7,4
Pododermatite	1	2,9	-	-	1	3,7
Claudicação	2	5,9	-	-	-	-
Vômito	4	11,8	2	6,7	1	3,7

Os animais foram avaliados antes do tratamento (T0), um mês após a primeira dose do tratamento (T1) e dois meses após o início do tratamento (T2). Fonte. Elaborada pelo autor, 2022.

Dos 34 animais soropositivos, 44,11% também foram positivos na cPCR em pelo menos uma das amostras avaliadas (sangue, soro ou linfonodo). De acordo com Lopes *et al.* (2016) a cPCR é um método bastante eficiente, apresentando resultados melhores quando se utiliza mais de uma amostra do mesmo animal, isto porque algumas amostras biológicas são mais sensíveis do que as outras. Outro ponto importante a se destacar é que a associação entre duas amostras aumenta a sensibilidade do diagnóstico molecular da leishmaniose, assim como em nosso trabalho, em que se utilizou mais de uma amostra para realizar a PCR, o resultado foi confirmado como positivo, em ao menos uma dessas amostras.

Em áreas endêmicas, normalmente os exames sorológicos já apresentam sensibilidade maior, pois há uma grande exposição do cão ao parasita (MARTINEZ *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2017). Em uma região endêmica de Pernambuco, os valores de positividade obtidos nos testes sorológicos foram 71,4% (127/178) com TR-DPP®, 70,2% (125/178) Exame Imunoenzimático (EIE) e 50,6% (90/178) com reação de (RIFI) e nos testes moleculares, a positividade foi de 20,2% (36/178) na cPCR e 38,8% (69/178) na qPCR (EVARISTO *et al.*, 2021). Já, em um trabalho na mesma região do presente estudo, ao realizar os ensaios moleculares em amostras TR-DPP® positivas, foi identificado 63,9% amostras positivas para cPCR e 65% para qPCR (RAMOS-AUGUSTO, 2018),

Alguns fatores podem interferir na PCR, entre eles a presença de inibidores, fatores relacionados aos *primers* e ao protocolo de extração do DNA, bem como a sensibilidade da cPCR pode depender do tipo de amostra avaliada (SILVA *et al.*, 2017). Assim, foram analisadas amostras de linfonodo, sangue e soro nos diferentes tempos: T0, T1 e T2. A tabela

2 demonstra a distribuição da positividade na cPCR. Importante salientar, que não foi realizada a coleta de linfonodo de todos os animais, pois alguns não apresentavam os mesmos aumentados. Além disso, no T1 e T2, não foi possível coletar amostras de alguns animais, e desta forma o número de amostras foi menor. No T2, apesar da positividade da amostra de linfonodo ser de 50%, isso não indica que houve elevação da positividade e sim, diminuição do número amostral final.

Tabela 2: Distribuição da positividade para *Leishmania* spp. em diferentes amostras, na cPCR e em diferentes tempos de tratamento.

% POSITIVIDADE NA CPCR			
AMOSTRAS	T-0	T-1	T2
SANGUE	32,35% (11/34)	17,86% (5/28)	7,14% (1/14)
SORO	11,76% (4/34)	7,14% (2/28)	0% (0/13)
LINFONODO	37,5% (9/24)	28,57% (2/7)	50% (1/2)

Os animais foram avaliados antes do início do tratamento (T0), um mês após a primeira dose do tratamento (T1) e dois meses após o início do tratamento (T2). Fonte. Elaborada pelo autor, 2022.

Nossos resultados demonstraram uma maior positividade em amostras de linfonodo, corroborando com dados da literatura que indicam uma melhor sensibilidade nessas amostras (PALTRINIERI *et al.*, 2016; MARCELINO *et al.*, 2020). Monteiro (2014), ao utilizar amostras de linfonodo de 58 cães para realização da PCR, demonstrou sensibilidade alta, identificando o DNA de *Leishmania* spp. em 47 (81%) dos cães, sendo 35 sintomáticos e 12 assintomáticos. De acordo com Travi *et al.* (2018), cães com sintomatologia clínica apresentam uma maior carga parasitária, facilitando sua identificação tanto em amostras de sangue quanto de medula óssea, contudo nos casos em que os cães são assintomáticos, o material biológico a ser analisado deve ser o mais sensível, preferindo amostras de medula óssea e de linfonodo.

A identificação de animais positivos não é tão sensível quando se utiliza o sangue periférico, isso porque o nível de parasitemia no momento da coleta é algo incerto, podendo resultar em falso negativo (BRAGA *et al.*, 2014; PIETRO *et al.*, 2020). Além disso, outro fator a ser levado em consideração para analisar a diferença entre os exames sorológicos e moleculares é o estadiamento clínico da leishmaniose visceral canina (JERICÓ *et al.*, 2019).

Nos nossos estudos, a positividade na cPCR, utilizando amostra de sangue foi de 32,35% e isso pode estar relacionada aos animais possuírem uma carga parasitária baixa, não sendo possível sua detecção. Embora a cPCR tenha se mostrado eficaz na detecção de *Leishmania* spp., seus resultados são determinados apenas em dois valores possíveis, positivo ou negativo e desta forma, a PCR em tempo real quantitativo (qPCR) pode ser mais sensível, permitindo a avaliação da carga parasitária pela avaliação da quantidade de DNA específico na amostra avaliada (STRAUSS-AYALI *et al.*, 2004; DA SILVA, *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que amostras de sangue podem ser uma alternativa de diagnóstico e/ou complemento para os exames sorológicos, devido a capacidade do qPCR em detectar menor carga parasitária e por ser mais fácil de se obter em grande escala (FRANCINO *et al.*, 2006; MAIA *et al.*, 2009).

Assim, o trabalho demonstrou que a cPCR é um bom método diagnóstico complementar a ser utilizado no monitoramento de cães positivos, confirmando os diagnósticos sorológicos de leishmaniose e para o monitoramento da carga parasitária ao longo do tratamento, será fundamental a inclusão de exames de qPCR, a fim de avaliar a carga parasitária nesses animais e contribuir com as ações de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Canina de forma mais assertiva e eficiente.

CONCLUSÕES

O tratamento foi capaz de induzir uma melhora dos sinais clínicos, com manutenção ou melhora no estadiamento clínico, sugerindo efetividade no tratamento de cães com LVC, mesmo não havendo cura parasitológica total. As técnicas moleculares podem ser utilizadas como ferramentas complementares ao diagnóstico de LVC, sendo que a utilização de mais de uma amostra biológica por animal, melhora a sensibilidade diagnóstica.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Bauru-SP pelas amostras caninas e à FAPESP (2018/25889-4), pelo apoio financeiro ao projeto.

REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v.10, n.3, p.e0004349, 2016.

ARANSAY, A. M.; SCOULICA, E.; TSELENTIS, Y. Detection and identification of Leishmania DNA within Naturally infected Sand Flies by Seminested PCR on Minicircle Kinetoplastic DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, n.5, p. 1933-1938, 2000.

ASOKAN G.V.; ASOKAN V. Bradford Hill's criteria, emerging zoonoses, and One Health. **J. Epidemiol. Glob. Health.** v.6, n.3, p.125-129, 2015.

BIDAISEE, S.; MACPHERSON, C. N. L. Zoonoses and One Health: A Review of the Literature. **J. Parasitol. Res.**, v.2014, 2014.

BRAGA, A. R. C.; LANGONI, H.; LUCHEIS, S. B. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.** Botucatu, v.20, p.1-7, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica conjunta nº1, de 29 de dezembro de 2011. **Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)**. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

CARNEIRO, L. A.; BREWER, C. P. One Health: Conceito, história e questões relacionadas – Revisão e reflexão. **Cientifica Digital**, v.1, p. 219-240, 2021.

DA SILVA, R. N. *et al.* Real-time PCR in clinical practice: a powerful tool for evaluating *Leishmania chagasi* loads in naturally infected dogs. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.104, n.2, p.137-143, 2010.

EVARISTO, A. M. C. F. *et al.* Comparison of serological and molecular tests to investigate Leishmania spp. infections in stray dogs from an area of intense visceral leishmaniasis transmission in Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.30, n.3, p.e006621

FERREIRA, A. W.; MORAES, S. L. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Autoimunes**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

FRANCINO, O. *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v.137, n.3-4, p.214-221, 2006.

GEBREYES, W. A. *et al.* Molecular Epidemiology of Infectious Zoonotic and Livestock Diseases: **Microbiol. Spectr.**, v.8, n.2, p.8.2.2.

JERICÓ, M. M.; NETO, P. A.; KOGIKA, M. M. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2019.

LEITE, B.M.M. *et al.* The mass use of deltamethrin collars to control and prevent canine visceral leishmaniasis: A field effectiveness study in a highly endemic area. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v.12, n.5, p.e006496, 2018.

- LISBOA, J. C. L. *et al.* Acompanhamento clínico e laboratorial de cães parasitologicamente positivos para leishmaniose visceral submetidos à terapia com miltefosina associada ao alopurinol. **Rev. M&Z**, v.16, n.3, p.79-80, 2018.
- LOPES E.G. *et al.* Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiol. Infect.**, v.145, n.12, p.2436-2444, 2017.
- LOPES, E. G. *et al.* Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.58, n.41, p.1-7, 2016.
- MAIA, C. *et al.* Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. **Vet. J.**, v.179, p.142-144, 2009.
- MARCELINO, A. P. *et al.* Comparative PCR-based diagnosis for the detection of *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Acta Trop.**, v.207, p.105495, 2020.
- MARTINEZ, V. *et al.* Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. **Parasit. Vectors**, v.4, n.1, p.1-5, 2011.
- MONTEIRO, A. G. **Diagnóstico molecular e identificação das espécies de *Leishmania* na leishmaniose visceral canina no Distrito Federal, Brasil.** 2014 33f. Dissertação (Mestre em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- PALTRINIERI, S. *et al.* Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Vet. Clin. Pathol.**, v.45, n.4, p.552-578, 2016.
- PIETRO, S. D. *et al.* Parasitemia and its variation in canine in canine leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, v.119, n.10, p.3541-3148, 2020.
- RAMOS-AUGUSTO, L. C. **Estudo de *Leishmania* spp. em amostras provenientes de cães e humanos e suas implicações em saúde pública na região de Bauru, São Paulo.** 2018. 114f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.
- REITHINGER, R. *et al.* Are insecticide impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil?. **Int. J. Parasitol.**, v.34, n.1, p.55-62, 2004.
- READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Ann. Rev. Entomol.** v.58, p.227-250, 2013.
- ROSAR, A. S. **Estudo da eficácia do Milteforan® no tratamento da leishmaniose visceral canina na região da grande Florianópolis, SC.** 2022. 115f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.
- RÜEGG, S. R.; HASLER, B.; ZINSSTAG, J. **Integrated Approaches to Health: A Handbook for the Evaluation of One Health.** Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands. 2018.
- SILVA, R. C. *et al.* Detection of *Leishmania (L.) infantum* in stray dogs by molecular techniques with sensitive species-specific primers. **Vet. Q.**, v.37, n.1, p.23-30, 2017.
- STRAUSS-AYALI, D. *et al.* Polimerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **J. Infect. Dis.**, v.189, n.9, p.1729-1733, 2004.
- TRAVI, B. L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLOS Negl. Trop. Dis.**, v.12, n.1, p.e0006082, 2018.

ARMAZENAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS POR MÉTODOS MORFOLÓGICOS E POR BIOLOGIA MOLECULAR

Bryan Kaique de Carvalho¹; Dra Tânia Sueli de Andrade²

¹Estudante do Curso de Vigilância Epidemiológica em Saúde Pública – NCMO – IAL - Central.
bryankaique@hotmail.com

²Pesquisadora Docente do Núcleo de Coleção de Micro-organismos– NCMO– IAL - Central.

As coleções de micro-organismos são responsáveis pela preservação da biodiversidade, para isso é preciso que as linhagens armazenadas estejam corretamente autenticadas. O Núcleo de Coleção Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz possui em seu acervo aproximadamente 10.000 linhagens, sendo pouco mais de 600 fungos, importantes causadores de infecções oportunistas. O objetivo desse trabalho foi avaliar os métodos de liofilização e criopreservação; e caracterizar vinte linhagens fúngicas depositadas no NCMO, por meio de sua morfologia (micro e macroscópicas) e técnicas moleculares como MALDI-TOF e sequenciamento Sanger para os alvos ITS e gene da calmodulina. As linhagens de *Apergillus fumigatus* e *A. terreus* foram identificadas por MALDI-TOF; *A. flavus* apontado como membro do grupo *Aspergillus flavus oryzae*. As linhagens de *Fusarium oxysporum* e *F. solani* foram identificadas por MALDI-TOF e sequenciamento para alvo ITS; *F. equiseti* não pode ser identificado por técnicas moleculares. Uma linhagem de *Curvularia* foi identificada por sequenciamento do gene rDNA região ITS, outra linhagem foi parcialmente identificada, ambas tendo duas espécies como resultado, sendo diferenciadas por macromorfologia. As linhagens de *Fonsecaea pedrosoi* não apresentavam identificação prévia, pois foram encaminhadas para depósito recentemente, os resultados obtidos do sequenciamento do rDNA região ITS, confirmaram a identificação de origem para uma delas, e duas foram parcialmente identificadas. Porém uma linhagem foi identificada como *Phialophora sp* por sequenciamento por micromorfologia, não correspondendo à sua identificação de origem. Todos os gêneros trabalhados apresentaram características descritas na literatura. Tanto os métodos de identificação quanto os de armazenamento se mostram eficientes.

Palavras-chaves: armazenamento; autenticação; coleções de micro-organismos; *Fonsecaea*; fungos

Introdução

A preservação *ex situ*, fora do habitat natural, dos recursos microbiológicos é uma prática indispensável para o conhecimento e uso da biodiversidade, as chamadas coleções de cultura de micro-organismos tem um papel importante neste contexto, como o Núcleo de Coleção Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz, que possui em seu acervo aproximadamente 10.000 linhagens, sendo pouco mais de 600 fungos, importantes causadores de infecções consideradas clássicas e oportunistas. A preservação adequada dos isolados fúngicos é

imprescindível para uso em investigações científicas (SETTE; PAGNOCCA; RODRIGUES, 2013; BOUNDY-MILLS et. al. 2019). Para a conservação de fungos filamentosos a preservação a longo prazo pode ser realizada através da criopreservação a -80°C ou também pela liofilização, processo de sublimação a vácuo (OLIVEIRA; CORTEZ; SOUZA 2016; COSTA et al 2009). Após os processos de manutenção, a autenticação das linhagens garante a qualidade do acervo. No caso dos fungos filamentosos a taxonomia baseia-se principalmente em critérios morfológicos e nas características das estruturas de reprodução assexuada, sem que haja a necessidade de analisar os atributos bioquímicos e fisiológicos, como é realizado com as leveduras (WALSH; HAYDEN; LARONE, 2018). No entanto, alguns gêneros possuem grande similaridade morfológica dentre seus membros, dificultando a caracterização de suas espécies. Para essa diferenciação é necessário o uso de técnicas moleculares, como o sequenciamento genético para regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (WHITE et. al. 1990) e para o gene de calmodulina para o gênero *Aspergillus* (SABINO et al. 2015) assim como a identificação por MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry*) técnica que analisa padrões de espectrometria de massa capaz de identificar linhagens fúngicas de forma extremamente rápida (ANTUNES 2019, PEREIRA 2019, PAZIANI 2021). Com o intuito de garantir a qualidade das linhagens disponibilizadas para a comunidade científica, o objetivo deste trabalho foi avaliar os diferentes métodos de manutenção e autenticação disponíveis no Núcleo, para inclusão no acervo de novas linhagens de fungos filamentosos depositados recentemente no NCMO.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas vinte linhagens depositadas no NCMO, tabela 1, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Curvularia* e *Fonsecaea*.

Tabela 2 Amostragem

IAL	Linhagem	IAL	Linhagem
9712	<i>A. fumigatus</i>	9558 B	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
9713	<i>A. fumigatus</i>	9559	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
9714	<i>A. fumigatus</i>	9560	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
9776	<i>A. fumigatus</i>	9565	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
9777	<i>A. fumigatus</i>	9571	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
9706	<i>A. flavus</i>	9783	<i>Fusarium equiseti</i>
9809	<i>A. terreus</i>	9784	<i>Fusarium oxysporum</i>
9565	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	9782	<i>Fusarium solani</i>
9664	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	9810	<i>Curvularia</i> 1
9558 A	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	9811	<i>Curvularia</i> 2

Identificação morfológica

Para identificação morfológica foram utilizadas às técnicas de microcultivo em lâmina e de colônia gigante, ambas em ágar dextrose batata (WALSH; HAYDEN; LARONE, 2018).

Reação de Sequenciamento

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o kit de extração *Invitrogen PureLink® Genomic DNA mini kit* (Invitrogen-Estados Unidos). Para as culturas de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Curvularia* foram utilizadas culturas com 3-4 dias de crescimento em ágar dextrose batata e culturas de *Fonsecaea* sp foram utilizadas após 14 dias de crescimento em caldo malte. A identificação molecular foi realizada com sequenciamento Sanger para ITS utilizando os oligoiniciadores ITS1-ITS4 e ITS5-ITS4 para as vinte linhagens, e para o gene de calmodulina para as linhagens de *Aspergillus*. Foi utilizando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* e encaminhando a placa ao Laboratório Estratégico e analisada no equipamento 3500 *Genetic Analyzer* (Thermo Fisher). As sequencias foram analisadas no banco de dados *GenBank*, comparando com outras já depositadas

MALDI-TOF

MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry*) foi utilizado para a identificação dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Curvularia*. Os fungos foram incubados em caldo Saboraud (Oxoid[®]) por três dias em banho seco com agitação (Loccus[®], modelo B-HS) a 26°C e 500 RPM, para se obter micélio uniforme. Esse micélio foi submetido ao processo de extração de proteínas, o produto obtido na extração foi posto em um *spot* da placa de MALDI-TOF (1 µL), em seguida cobertos com 1 µL de matriz HCCA. Por fim a placa com as extrações foi inserida no equipamento *MALDI Biotyper®* (*Bruker Daltonics inc*). O equipamento analisa os picos da espectrometria de massa do micro-organismo e o compara com seu banco de dados interno, a similaridade encontrada é avaliada num escore de 0,00 à 3,00, sendo os valores superiores a 2,00 considerados como de alta confiabilidade.

Métodos de conservação

Para avaliar os métodos de preservação as linhagens de *A. fumigatus* e *A. flavus* foram utilizadas para a confecção de criotubos com miçangas, usando caldo Sauton como crioprotetor e para as ampolas de liofilização leite (*skim milk*) com glutamato de sódio a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das vinte linhagens avaliadas no trabalho, dezoito puderam ser identificadas por ao menos uma das metodologias aplicadas, a exceção foram duas linhagens de *F. pedrosoi*.

Das seis linhagens enviadas para sequenciamento do gene de calmodulina somente as linhagens *Aspergillus fumigatus* IAL 9712 e IAL 9714, puderam ser parcialmente identificadas como *A. fumigatus* pela sequência de CMD 6, com 100% de similaridade para ambas. Das quinze linhagens encaminhadas para o sequenciamento para região ITS, treze puderam ser sequenciadas. Seis foram confirmadas com o depósito de origem sendo elas *F. oxysporum* (IAL 9783), identificada como *F. oxysporum* com 99,82% de similaridade e *F. solani* (IAL 9782) identificada como *F. petroliphilum* / *F. solani* com 99,625 de similaridade, ambas com gene consenso (ITS5-ITS4), de acordo com a base de dados *Mycobank*, (<https://www.mycobank.org/>), *F. petroliphilum* é uma variação de *F. solani*; *Fonsecaea pedrosoi* IAL 9560 e IAL 9664 foram parcialmente identificadas com 95,49% e 95,49% de similaridade; *F. pedrosoi* (IAL 9559) com 97,03% de similaridade (ITS 4); *A. fumigatus* (IAL 9777) identificado parcialmente pela sequência com 100% de similaridade

(ITS1). Para a confirmação dessas linhagens é preciso a utilização de novos alvos para o sequenciamento.

A linhagem de *F. pedrosoi* IAL 9558 apresentou resultados compatível com o gênero *Phialophora* sp para duas metodologias. As linhagens de *Curvularia* sp apresentaram como resultado duas possíveis espécies para cada amostra, uma identificada por sequenciamento do gene rDNA região ITS, outra linhagem foi parcialmente identificada, ambas tendo duas espécies como resultado, sendo diferenciadas por micromorfologia.

Todas as linhagens do gênero *Aspergillus* tiveram suas espécies identificadas com MALDI-TOF, correspondendo com a identificação prévia, todas com score acima de 2,30. Para a linhagem de *A. flavus* o resultado foi *Aspergillus oryzae* group.

Já para as linhagens de *Fusarium* spp. todas foram identificadas como espécie (scores entre 2,13 e 2,25), contudo *F. equisiti* (IAL 9783) apresentou dois resultados divergentes da identificação original - *F. oxysporum* / *F. verticilloides*. A linhagem *F. solani* IAL 9782 apresentou como resultado *F. petroliophilum*, mesmo resultado do sequenciamento.

PAZIANI et. al. (2021) descreve em seu trabalho a dificuldade de identificação por MALDI-TOF de espécies de *Fusarium*, a diferença da expressão proteica em ambientes/meios de cultura diferentes de uma mesma espécie torna difícil sua identificação por esse método, em especial os membros do complexo *Fusarium solani* (FSSC). Com as linhagens de *Curvularias* sp. somente foi possível identificar o gênero da Amostra 2 com score de 2,28, sem picos identificados para a Amostra 1.

Todas as linhagens apresentaram características macro e microscópicas como as descritas na literatura (WALSH; HAYDEN; LARONE et. al. 2018) e no banco de dados *Mycobank*. Contudo devido à grande similaridade entre algumas espécies somente essas características não são capazes de caracterizar a espécie de fungos filamentosos, sendo necessárias análises moleculares (ANTUNES 2019). A linhagem de *F. pedrosoi* IAL 9558 identificada pelo sequenciamento como *Phialophora* sp apresentou em sua micromorfologia conídios alongados terminados em forma triangular semelhante a uma taça, característico do gênero *Phialophora*.

Tanto o método de liofilização quanto de criopreservação mostraram-se eficazes para *Aspergillus fumigatus* e *A. flavus*, não foi observado nenhum sinal de contaminação.

CONCLUSÃO

A identificação por sequenciamento da região ITS foi eficaz na identificação de espécies dos gêneros *Fusarium*, *Fonsecaea*, *Phialophora*, *Curvularia* e para *Aspergillus fumigatus*. *A. flavus* IAL 9706 e *A. terreus* (sem IAL) não puderam ser identificados por sequenciamento para ITS assim como para gene da calmodulina, outros alvos são necessários para a caracterização completa dessas linhagens. A identificação por MALDI-TOF não foi capaz de caracterizar a linhagem *A. flavus* IAL 9706 como espécie; somente como grupo.

As espécies do gênero *Aspergillus* podem ser identificadas por MALDI-TOF. Para *Curvularia* a identificação somente foi possível em gênero, sendo necessário adaptar o método de extração de proteínas.

O gênero *Fusarium* trabalhado nesse estudo se mostrou mais difícil de identificar quanto suas espécies devido a grande similaridade dentre os membros de um mesmo complexo.

Somente a morfologia das linhagens não é capaz de caracterizar fungos em espécies, mas podem auxiliar na caracterização de gênero combinados com métodos de biologia molecular. É necessário autenticar toda linhagem depositada para confirmar as informações originais de depósito.

A liofilização com leite e glutamato de sódio a 5% e a criopreservação em miçangas usando caldo Sauton são eficazes na preservação de linhagens do gênero *Aspergillus*;

As metodologias de autenticação aplicadas se mostraram eficientes para a maioria das linhagens estudadas. Das 20 linhagens trabalhadas, 18 puderam ser identificadas por pelo menos um método proposto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, Fernanda Marques Americo. **Avaliação da metodologia de espectrometria de massas MALDI-TOF (VITEK MS®) para identificação de espécies de *Aspergillus* de importância médica.** 2019. Dissertação (Mestrado em Dermatologia) - Faculdade de Medicina, University of São Paulo, São Paulo, 2019. doi:10.11606/D.5.2019.tde-05062019-092951. Acesso em: 2022-11-23.

BOUNDY-MILLS, K. et al. **Preserving US microbe collections sparks future discoveries.** Journal of Applied Microbiology, v. 129, n. 2, p. 162-174, 2020.

COSTA, Edmara Chaves et al. **Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas.** Ciência Animal, v. 19, n. 2, p. 111-122, 2009.

OLIVEIRA, Luciana Aires; CORTEZ, Ana Cláudia A.; SOUZA, João Vicente Braga de. **Avaliação de metodologias de preservação para manutenção de microrganismos do Filo Ascomycota e leveduras do gênero *Candida* pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA.** Diversidade Microbiana da Amazônia, pgs. 58-62, 2016.

PAZIANI, Mario Henrique. **Perfil fenotípico e genotípico de *Fusarium* spp. provenientes de episódios clínicos de fusarioses no Estado de São Paulo.** 2021. Tese (Doutorado em Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021. doi:10.11606/T.60.2021.tde-29092021-053538. Acesso em: 2022-11-28.

PEREIRA, Anielli Souza. **Diversidade e potencial para a produção de enzimas de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* isolados de solo de Mata Atlântica do Quadrilátero Ferrífero.** 2019. 101f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Lavras, 2019.

SABINO, R. et al. **Molecular epidemiology of Aspergillus collected from cystic fibrosis patients.** Journal of Cystic Fibrosis, v. 14, n. 4, 2015.

SETTE, Lara Durães; PAGNOCCA, Fernando Carlos; RODRIGUES, André. **Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation.** Fungal Genetics and Biology, v. 60, p. 2-8, 2013.

WALSH, T. J.; HAYDEN, R. T.; LARONE, D. H. **Larone's Medically Important Fungi.** 6° ed. Washington: [2018]

WHITE, Thomas J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

ORTHOBUNIAVIRUS: VIGILÂNCIA DE INFECÇÕES EM PÁSSAROS DA REGIÃO DO VALE DO RIBEIRA, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.

Júlia Cavalcante Alexandrino¹, Mariana Sequetin Cunha²

Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CV – IAL;

E-mail: juliacavalcante305@gmail.com

²Docente/ Pesquisador do Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial – NDTV – IAL

RESUMO

A ocorrência das arboviroses, vírus transmitidos por artrópodes, tem sido uma ameaça à saúde humana há séculos. Em média, as arboviroses são responsáveis por mais de 700.000 mortes por ano, e a frequência e a magnitude desses surtos estão aumentando globalmente. O gênero *Orthobunyavirus* (OBVs) compreende uma ampla gama de vírus transmitidos por artrópodes que pertencem a família *Peribunyaviridae* da ordem *Bunyavirales* e são prevalentes em todo o mundo. O presente projeto tem por objetivo avaliar a presença de *Orthobunyavirus* em amostras de sangue de aves coletadas na região do Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo, durante investigações de campo realizadas em 2022. As aves foram capturadas com uso de Redes-de-neblina e marcadas com anilhas metálicas do CEMAVE/ICMBio. A coleta das amostras utilizadas aconteceu entre fevereiro e setembro de 2022, onde um total de 270 amostras de sangue foram coletadas e 21 foram selecionadas dentre as que possuíam um maior volume e que testaram negativo para Flavivírus e Alphavírus. Durante o isolamento, nenhum efeito citopático foi observado e as reações de imunofluorescência não apresentaram nenhum indicativo de reação positiva. Diversos trabalhos já evidenciaram a provável circulação do vírus desse gênero na região, e outros mostram que um deles, o Oropouche, que já foi responsável por diversas epidemias, vem se dispersando silenciosamente pelo Brasil fora dos locais endêmicos. Apesar de alta, a viremia em aves e outros vertebrados pequenos é curta, o que faz com que haja necessidade de testar um maior número de amostras e realizar uma coleta constante. Os resultados obtidos no presente estudo mostram que não há circulação de *Orthobunyavirus* nesta região no período estudado, no entanto, ele tem como limitação o pequeno número amostral avaliado. Uma vigilância ativa e contínua permitirá uma melhor compreensão da incidência e da prevalência das infecções por *Orthobunyavirus*, e ajudará a prever possíveis surtos na região.

Palavras-chave: Arbovírus, *Orthobunyavirus*, Vigilância.

INTRODUÇÃO

A ocorrência das arboviroses, vírus transmitidos por artrópodes, tem sido uma ameaça à saúde humana há séculos. Em média, as arboviroses são responsáveis por mais de 700.000 mortes por ano, e a frequência e a magnitude desses surtos estão aumentando globalmente

(WEAVER & REISEN, 2010). Há cerca de 120 anos o primeiro arbovírus foi descoberto pelos cientistas Walter Reed, James Carroll, Aristides Agramonte e Jesse Lazear, que identificaram o Flavivírus causador da febre amarela (WEAVER et al., 2018; CASSEB et al., 2013; DOUAM & PLOSS, 2018). Posteriormente, em 1916, a Fundação Rockefeller criou a “Comissão da Febre Amarela” financiando pesquisas de cientistas nos Estados Unidos, Brasil, Colômbia, Nigéria e Uganda (DOUAM & PLOSS, 2018). Essas pesquisas geram como subproduto o isolamento de arbovírus até então desconhecidas. Esses e outros acontecimentos resultaram na descoberta e isolamento de centenas de novos arbovírus (WEAVER et al., 2018; CASSEB et al., 2013).

O gênero *Orthobunyavirus* (OBVs) compreende uma ampla gama de vírus transmitidos por artrópodes que pertencem a família *Peribunyaviridae* da ordem *Bunyavirales*, de acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), e são prevalentes em todo o mundo. Apesar de uma crescente consciência dos potenciais efeitos prejudiciais dos *Orthobunyavirus* na saúde única, o conhecimento sobre seus ciclos enzoóticos de transmissão, amplificação, hospedeiros e vetores, e fatores bióticos e abióticos relacionados aos eventos de transbordamento para humanos são limitados (WINDHABER ET AL., 2021).

REFERÊNCIAL TEÓRICO

Os vírus pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus* são compostos por três segmentos genômicos distintos de RNA de fita simples (ssRNA) de polaridade negativa, identificados como grande (L), médio (M) e pequeno (S) (DOLGOVA et al., 2022). Há pouca ou nenhuma informação sobre os ciclos de transmissão para muitos dos *Orthobunyavirus* descritos até agora (DIAS et al., 2022).

Entre 1978 e 1990, FERREIRA et al. realizaram um trabalho de vigilância de arbovírus em São Paulo (SP) pelo Instituto Adolfo Lutz. Um total de 11.000 amostras foram coletadas na região do Vale do Ribeira, e diversos arbovírus foram detectados através de técnicas de isolamento em camundongos, seguida da fixação de complemento. Além disso, anticorpos anti-orthobunyavirus foram identificados pelo método indireto de inibição da hemaglutinação, dentre eles, duas amostras com resultado positivo para o *Orthobunyavirus* Caraparu (FERREIRA et al., 1994). Em estudos sorológicos realizados por IVERSSON et al., em população humana da região do Vale do Ribeira, amostras de 337 estudantes foram coletadas entre os anos de 1981 e 1982 e um total 12 amostras apresentaram anticorpos para vírus do gênero *Orthobunyavirus* (IVERSSON et al., 1983). IVERSSON et al 1980, já havia realizado outro estudo em 1980, em que pesquisou anticorpos para arbovírus em 516 moradores de Pariqueira-Açu, região do Vale do Ribeira, em São Paulo, onde 4,6% apresentavam anticorpos para o vírus Caraparu (BUSCH IVERSSON; TRAVASSOS DA ROSA; TRAVASSOS DA ROSA, 1980).

O vírus Oropouche (OROV) é o causador da febre Oropouche e está historicamente envolvido em surtos explosivos com centenas de milhares de casos, principalmente na região amazônica. Um estudo de Romero et al., mostra que no Brasil, nos últimos anos, a disseminação do OROV tem sido cada vez mais evidenciada em outras regiões do país e não apenas em áreas endêmicas, mostrando que o vírus está mais disseminado do que se acreditava originalmente no Brasil (ROMERO-ALVAREZ & ESCOBAR, 2018; DIAS et al., 2022). Isso gera a hipótese da circulação críptica do vírus na região do Vale do Ribeira, que é uma região afetada por diversas epidemias onde presença de outros *Orthobunyavirus* já foi evidenciada.

OBJETIVOS

O presente projeto tem por objetivo avaliar a presença de *Orthobunyavirus* em amostras de sangue de aves coletadas na região do Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo, durante investigações de campo realizadas em 2022.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo amostras biológicas e teve a aprovação do Comitê de Ética do ICMBio 794-1. Os procedimentos de manipulação e processamento das amostras biológicas foram desenvolvidos em laboratórios de Nível de Biossegurança 2 (NB2), de acordo com o preconizado pela OMS.

A coleta das amostras utilizadas aconteceu entre fevereiro e setembro de 2022, de aves da região de Iguape, município situado no Vale do Ribeira em São Paulo. As aves foram capturadas com uso de Redes-de-neblina. As revisões eram feitas de hora em hora, ou períodos mais curtos caso a temperatura do dia esteja muito alta, evitando estresse dos animais. As aves capturadas foram marcadas com anilhas metálicas do CEMAVE/ICMBio - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Aves Silvestres, medidas e soltas. O sangue foi coletado com uso de capilar e as amostras foram identificadas de acordo com data e espécie, e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido

Um total de 270 amostras de sangue foram coletadas e 21 foram selecionadas dentre as que possuíam um maior volume e que eram negativas para gêneros *Flavivirus* e *Alphavirus* por RT-qPCR. As amostras foram inoculadas em monocamadas de células Vero (células epiteliais renais extraídos de um macaco verde africano), C6/36 (uma linhagem de células originadas do mosquito *Aedes albopictus*) e em células TRA-171 (derivadas da larva do mosquito *Toxorhynchitesamboinensis*), somando um total de 5 passagens. Para cada passagem uma placa com um total de 24 poços contendo a monocamada de células foi utilizada e 50 microlitros de cada amostra foram inoculados (sempre em poços separados). Não foram feitas duplicatas e para cada placa haviam 2 controles negativos e um positivo. Cada passagem durava um período de 12 dias de incubação em média e as células eram monitoradas diariamente, sob um microscópio de luz invertida, para observação de possível efeito citopático. Em seguida os Ensaios de Imunofluorescência Indireta (IFA) com anticorpos específicos para os *Orthobunyavirus* Oropouche, Itaquí e Murucutu foram realizados seguindo o protocolo descrito por Gluber et al 1984. As lâminas foram examinadas sob microscópio de imunofluorescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o isolamento nenhum efeito citopático foi observado em nenhuma das passagens realizadas. Os controles positivos e negativos atenderam o resultado esperado, sendo que no positivo o efeito citopático foi observado e no negativo as células permaneceram íntegras. Nas reações de imunofluorescência, realizadas para verificar a presença de *Orthobunyavirus* nas amostras de aves, nenhum indicativo de reação positiva foi observado. Esse resultado não descarta a necessidade de ações de vigilância ativa para essas arboviroses na região, pois apesar de alta, a viremia em aves e outros vertebrados pequenos é curta, o que faz com que haja necessidade de testar um maior número de amostras e realizar uma coleta constante (ASSIS, 2013).

As aves e os roedores são considerados os hospedeiros mais importantes nas arboviroses de impacto para a saúde pública, e os mosquitos e carrapatos são considerados vetores artrópodes mais importantes (GUBLER, 2002). Acredita-se que as aves migratórias sejam responsáveis pela ampla distribuição geográfica de algumas arboviroses importantes (MANCUSO et al., 2022). Os vírus Apeu, Caraparu, Itaquí, Marituba, Nepuyo, Murutucu e Oriboca já foram isolados na floresta amazônica, que é uma das maiores reservas de arbovírus do mundo, e apesar da busca ativa naquela região ter sido realizada na década de cinquenta, ainda pouco se sabe sobre esses vírus (MACEDO et al., 1961). A literatura sobre os alguns sorogrupos do gênero *Orthobunyavirus* é escassa e ainda hoje sua importância é subestimada (ASSIS, 2013).

O vírus Oropouche é responsável por uma das doenças febris mais importantes do Brasil. O conhecimento atual sobre a distribuição do Oropouche, assim como da maioria dos *Orthobunyavirus*, é baseado na vigilância epidemiológica passiva de amostras coletadas em surtos (ROMERO-ALVAREZ & ESCOBAR, 2018). Por outro lado, a vigilância ativa revelou a circulação críptica do vírus em até 2% das pessoas que vivem em áreas não endêmicas, o que sugere uma distribuição silenciosa desse vírus para regiões não endêmicas, reforçando a necessidade de uma vigilância ativa mesmo nessas áreas (F. P. PINHEIRO et al., 1981).

Outra evidência da necessidade de uma vigilância ativa, é o relato do vírus Caraparu na região do Vale do Ribeira no estado de São Paulo (SP), em um trabalho de vigilância em aves realizado pelo Instituto Adolfo Lutz entre 1978 e 1990 (FERREIRA et al., 1994), bem como outros inquéritos sorológicos também realizados nessa região em crianças, adolescentes e adultos, que tiveram como resultado a detecção de anticorpos para o vírus Caraparu, Guaroá, Xingu, Utinga e Tacaiuma (ROSA, 1980; IVERSSON et al., 1983).

Esses resultados indicam que para uma melhor perspectiva do atual cenário epidemiológico dessa região, uma testagem maior e uma coleta constante são medidas necessárias. Certamente, a distribuição subestimada dos *Orthobunyavirus* decorre do simples fato de que as investigações epidemiológicas para estes vírus estão concentradas apenas nas imediações de onde foram inicialmente isolados. Além disso, existem dificuldades nas investigações, devido à interpretação dos resultados dos testes sorológicos, já que são comuns reações cruzadas entre os vírus (ASSIS, 2013).

Nos últimos 30 anos, o surgimento e/ou ressurgimento de arboviroses tem representado uma considerável ameaça à saúde global, e são as ações de vigilância que podem ajudar a prever possíveis surtos. Um exemplo de que novas epidemias podem surgir a qualquer momento é a expansão geográfica contínua dos vírus da Dengue, juntamente com os surtos explosivos do vírus do Nilo Ocidental, do vírus Chikungunya e, mais recentemente, o vírus Zika (VASUDEVAN & HILGENFELD, 2018).

Grande parte das doenças causadas por arbovírus circulam em ambientes rurais entre seus vetores e seus hospedeiros vertebrados, que fazem a amplificação do vírus no ciclo de transmissão (VASUDEVAN & HILGENFELD, 2018). O ser humano pode atuar como um hospedeiro acidental ou como um reservatório, podendo dessa forma transmitir o vírus na presença de vetores competentes, e assim, disseminá-lo para fora do ambiente natural. Um conhecimento mais aprofundado de quais mecanismos impulsionam as mudanças nos ciclos de transmissão que resultam em que a população humana se torne significativamente mais exposta, ajudará a nos preparar para a próxima epidemia/pandemia emergente (OLIVAL et al., 2017).

CONCLUSÃO

Os *Orthobunyavirus* têm um grande potencial para causar surtos. Os resultados obtidos no presente estudo mostram que não há circulação de *Orthobunyavirus* nesta região no período estudado, no entanto, ele tem como limitação o pequeno número amostral avaliado. Uma vigilância ativa e contínua permitirá uma melhor compreensão da incidência e da prevalência das infecções por *Orthobunyavirus*, e ajudará a prever possíveis surtos na região.

REFERÊNCIAS

- ASSIS, M. (2013). “Caracterização dos vírus ITAQUI e CARAPARU (*Orthobunyavirus* do sorogrupo C): patogênese e genes induzidos da resposta imune inata” (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais.
- BUSCH IVERSSON, L., & COIMBRA, T. L. M. (1984). Encefalite na região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil, no período pós-epidêmico de 1978 a 1983: situação do diagnóstico etiológico e características epidemiológicas. *Revista de Saúde Pública*, 18(4), 323–332. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101984000400007>
- BUSCH IVERSSON, L., TRAVASSOS DA ROSA, A. P., & TRAVASSOS DA ROSA, J. *Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira. II-inquérito em pacientes do Hospital Regional de Pariqueira-Açú, 1980.* <https://doi.org/10.1590/S0034-89101981000600002>
- CASSEB, A. DO R., CASSEB, L. M. N., SILVA, S. P., & VASCONCELOS, P. F. DA C. (2013). *Vista do ARBOVÍRUS: Vet. e Zootec.* <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/1030/585>
- DIAS, H. G., DOS SANTOS, F. B., & PAUVOLID-CORRÊA, A. (2022). An Overview of Neglected Orthobunyaviruses in Brazil. *Viruses*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/V14050987>
- DOLGOVA, A. S., SAFONOVA, M. V., FAYE, O., & DEDKOV, V. G. (2022). Current View on Genetic Relationships within the Bunyamwera Serological Group. *Viruses*, 14(6), 1135. <https://doi.org/10.3390/V14061135/S1>
- DOUAM, F., & PLOSS, A. (2018). Yellow fever virus: Knowledge gaps impeding the fight against an old foe. *Trends in Microbiology*, 26(11), 913. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2018.05.012>
- FERREIRA, I., PEREIRA, L., ROCCO, I., MARTI, A., SOUZA, L., & IVERSON, L. (1994). Surveillance of arbovirus infections in the atlantic forest region state of São Paulo, Brazil. I. Detection of hemagglutination-inhibiting antibodies in wild birds between 1978 and 1990. *Revista Instituto de Medicina Tropical*, 36(3), 265–274.
- GUBLER, D. J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Archives of Medical Research*, 33(4), 330–342. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00378-8](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00378-8)
- MACEDO, D. G., MAROJA, O. M., CAUSEY, C. E., & CAUSEY, O. R. (1961). The Isolation of Arthropod-Borne Viruses, including Members of Two Hitherto Undescribed Serological Groups, in the Amazon Region of Brazil *. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 10(2), 227–249. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1961.10.227>
- MANCUSO, E., CECERE, J. G., IAPAOLO, F., DI GENNARO, A., SACCHI, M., SAVINI, G., SPINA, F., & MONACO, F. (2022). West Nile and Usutu Virus Introduction via Migratory Birds: A Retrospective Analysis in Italy. *Viruses*, 14(2), 416. <https://doi.org/10.3390/V14020416/S1>
- OLIVAL, K. J., HOSSEINI, P. R., ZAMBRANA-TORRELIO, C., ROSS, N., BOGICH, T. L., & DASZAK, P. (2017). Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature* 2017 546:7660, 546(7660), 646–650. <https://doi.org/10.1038/nature22975>

RADFORD, A. D., COYNE, K. P., DAWSON, S., PORTER, C. J., & GASKELL, R. M. (2007). Feline calicivirus. *Veterinary Research*, 38(2), 319–335. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2006056>

ROMERO-ALVAREZ, D., & ESCOBAR, L. E. (2018). Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. *Microbes and Infection*, 20(3), 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.013>

VASUDEVAN, S. G., & HILGENFELD, R. (2018). *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies* (R. Hilgenfeld & S. G. Vasudevan, Eds.; 1st ed.). <https://doi:10.1007/978-981-10-8727-1>

Vector-borne diseases. 2010. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>

WEAVER, S. C., & REISEN, W. K. (2010). Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral Research*, 85(2), 328. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2009.10.008>

WINDHABER, S., XIN, Q., & LOZACH, P. Y. (2021). Orthobunyaviruses: From Virus Binding to Penetration into Mammalian Host Cells. *Viruses*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/V13050872>

PRESERVAÇÃO E AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS GRAM-NEGATIVAS DO ACERVO DO NÚCLEO DE COLEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Letícia de Carvalho dos Santos¹, Elizabeth Harummy Takagi²

¹ Estudante do Curso de Vigilância Epidemiológica em Saúde Pública – NCMO – Instituto Adolfo Lutz.
leticia_carvalho1001@hotmail.com

² Docente/pesquisadora do Depto de Coleção de Micro-organismos – NCMO.

RESUMO

Os micro-organismos desempenham um importante papel na manutenção da vida no planeta devido à sua imensa biodiversidade, fornecendo recursos ilimitados para o desenvolvimento de pesquisas e criação de novos conhecimentos. O presente estudo tem como objetivo realizar a autenticação de nove linhagens bacterianas preservadas pelo método de liofilização no Núcleo de Coleção de Micro-organismos (NCMO) do Instituto Adolfo Lutz. Como metodologias foram adotadas técnicas bioquímicas fenotípicas e técnicas moleculares como MALDI-TOF e sequenciamento do gene codificante da porção 16S ribossomal. Duas linhagens de *Acinetobacter baumannii* foram caracterizadas por provas bioquímicas, MALDI-TOF, sequenciamento e amplificação do gene codificador da beta-lactamase do subgrupo OXA-51. Quatro linhagens da bactéria *Citrobacter* sp., uma linhagem de *Edwardsiella tarda*, uma linhagem de *Klebsiella* sp e uma linhagem de *Raoultella planticola* foram autenticadas com o uso do MALDI-TOF complementado com provas bioquímicas. Ao término do estudo, as linhagens autenticadas ficaram disponíveis para fornecimento público, permitindo seu uso em pesquisas de grande relevância, em trabalhos industriais e controle de qualidade em Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENS), contribuindo com a vigilância epidemiológica e consequentemente fazendo parte da história da saúde pública do país.

Palavras-chave: Autenticação, Bactérias Gram-negativas, Coleção, MALDI, Saúde Pública

INTRODUÇÃO

Os micro-organismos desempenham um papel significativo na manutenção da vida no planeta devido à sua imensa biodiversidade, fornecendo recursos ilimitados para o desenvolvimento de pesquisas e criação de novos conhecimentos (JANSSENS, D. *et al.*, 2010).

Os centros de coleção de cultura atuam como depósitos de linhagens para fins de processamento de patentes no campo de biotecnologia, preservando os micro-organismos de forma confidencial e segura, disponibilizando-os após o período de sigilo, além de fornecer linhagens usadas em pesquisas para confirmações de resultados (SMITH, 2003).

O Núcleo de Coleção de Micro-organismos (NCMO) do Instituto Adolfo Lutz atua como coleção de serviço, contando com mais de dez mil linhagens de importância em saúde armazenadas desde a década de 40 em acervo, conservando e distribuindo materiais biológicos com critérios reconhecidos para indústrias e pesquisas (ANDRADE, T. S. *et al*, 2008). No entanto, devido à diversidade do acervo e tempo de armazenamento muitas linhagens ainda necessitam de autenticação por novas metodologias de identificação e caracterização, por isso o presente trabalho visa autenticar algumas linhagens de bactérias Gram negativas depositadas há anos, sem caracterização anterior, garantindo desta forma o fornecimento futuro de material com qualidade assegurada e contribuindo na saúde pública e vigilância epidemiológica.

As linhagens abordadas no presente trabalho são importantes patógenos associados às Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), sendo elas: *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter sp.*, *Edwardsiella tarda*, *Klebsiella sp.* e *Raoultella sp.*

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas nove linhagens de bactérias Gram-negativas conservadas pelo método de liofilização, descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3– Amostras bacterianas.

LINHAGEM	Nº IAL	LOTE
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2457	03 11 2457
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2458	08 08 2458
<i>Citrobacter sp</i>	0091	08 00 91
<i>Citrobacter sp</i>	0092	04 04 92
<i>Citrobacter sp</i>	0239	03 04 239
<i>Citrobacter sp</i>	0244	06 00 244
<i>Edwardsiella tarda</i>	1973	04 14 1973
<i>Klebsiella sp</i>	0504	08 09 504
<i>Raoultella planticola</i>	2075	12 18 2075

*Acrônimo dentro do Núcleo de Coleção de Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz.

Foi realizada a análise macroscópica através da observação do crescimento dos micro-organismos em repique em placa de ágar comum, incubada por 24 horas a 37 °C. A análise microscópica foi analisada por coloração de Gram e a leitura em aumento de 1000x.

A autenticação foi realizada por três métodos: MALDI-TOF (espectrometria de massa por ionização com dessorção a laser assistido por matriz e analisador de tempo de voo), avaliação bioquímica e sequenciamento Sanger.

A identificação por MALDI-TOF foi realizada por extração direta conforme estabelecido pelo fabricante *Bruker*. As proteínas do crescimento bacteriano depositado na placa do MALDI-TOF foram extraídas com ácido fórmico 95%, aplicando uma matriz HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic Acid) que sofreu ionização pela incidência de um feixe de laser do equipamento e estabeleceu um espectrograma de massa para leitura das proteínas.

Para as linhagens de *Acinetobacter baumannii* foram realizadas as provas bioquímicas: malonato, glicose, oxidase, lactose, hemólise em ágar sangue, degradação da gelatina, indol, sacarose, H₂S, ureia e lisina. Para as enterobactérias foram feitas as análises de: nitrato, lisina, malonato, ornitina, ureia, citrato, glicose, oxidase, catalase, lactose, indol, sacarose, H₂S, motilidade e dulcitol.

A interpretação dos resultados foi realizada através da mudança de cores dos meios pelo indicador de pH. A assimilação de carboidratos torna o meio ácido, gerando alteração de cor e sinalizando um resultado positivo. Nas provas de assimilação de aminoácidos, o meio se torna básico pela geração de um grupo amina e a cor permanece a mesma, indicando a positividade.

Para avaliação bioquímica também foi utilizado o Sistema *Bactray* I, seguindo as orientações do fabricante para execução e leitura dos resultados. Cada linhagem foi inoculada em água ultrapura, obtendo turvação final n° 0,5 na escala de *McFarland*, e dispensada no painel de provas direcionando aos depósitos de substrato. A leitura foi realizada após 24h de incubação a 37 °C em condições de umidade 40-60%. Os resultados foram interpretados pela alteração da coloração dos substratos.

Foram realizadas reações em cadeia polimerase (PCR) com o objetivo de amplificar o material genômico das amostras a serem analisadas por sequenciamento. O alvo escolhido foi a porção do gene codificante 16S ribossomal com o uso dos oligoiniciadores 27F / 518R e 341F / 1492R para todas as amostras.

Para as linhagens de *Acinetobacter baumannii* também foi realizado PCR utilizando os oligoiniciadores OXA-51 F e OXA-51 R, que são específicos para esta espécie e auxiliam no direcionamento da identificação (TURTON, J. F. *et al.*, 2006).

A reação do sequenciamento foi realizada com o uso do *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. As amostras foram sequenciadas pelo aparelho 3500 *Genetic Analyzer* (ThermoFisher).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

MALDI-TOF

Os resultados do MALDI-TOF são classificados de acordo com a pontuação conferida pela pesquisa em banco de dados da *Bruker*, sendo a pontuação de 2,00 a 3,00 considerada uma identificação de alta confiança, 1,70 a 1,99 identificações de baixa confiabilidade e abaixo de 1,69 sem identificação.

A leitura dos padrões de proteína das linhagens de *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter sp.* e *Raoultella planticola* apresentaram diferentes resultados com um score superior a 2,0 e por isso não foi possível chegar à uma identificação conclusiva por essa técnica.

Para a linhagem *Edwardsiella tarda* foi concluída a identificação de gênero e espécie, com um score de 2,16. O IAL 504 *Klebsiella sp.* foi identificado como *Klebsiella pneumoniae*, com score 2,33, apresentando duas identificações para subespécie com scores considerados de alta confiança.

PERFIL BIOQUÍMICO

O resultado das provas para *Acinetobacter baumannii* foi compatível com o perfil do gênero e espécie (ANVISA, 2004), exceto pelo consumo do malonato da linhagem *A. baumannii* IAL 2458 que foi negativo.

Para a identificação das linhagens de *Citrobacter* foi utilizado o fluxograma desenvolvido por O'Hara e colaboradores (O'HARA, C. M. et al, 1995). Através da comparação dos resultados obtidos com o fluxograma, foi possível determinar que as linhagens IAL 239 e IAL 244 são da espécie *braakii*, enquanto o IAL 91 e IAL 92 são da espécie *youngae*.

Os resultados das provas bioquímicas direcionaram a identificação do IAL 1973 para *Edwardsiella tarda* e do IAL 504 como *Klebsiella pneumoniae*.

Segundo Walckenaer *et al.* (2008), isolados de *R. planticola* são negativos para ODC (ornitina) e variáveis para a produção de indol, enquanto a *R. ornithinolytica* é positiva para o teste de descarboxilase da ornitina e obrigatoriamente não produz indol. Considerando que a linhagem 2075 apresentou resultado negativo para a prova de ornitina e positivo para indol, foi possível concluir que esta linhagem pertence à espécie *R. planticola*.

BACTRAY

O sistema *Bactray* I é direcionado para bactérias Gram-negativas que são oxidase negativa. Os resultados foram analisados na plataforma online *Bactray*, sendo considerado um resultado aceitável aqueles com semelhança acima de 80%.

O sistema determinou 76,35% de semelhança com *Acinetobacter baumannii* para a linhagem 2457, sendo que para um perfil com 100% de semelhança pelo sistema, a bactéria deveria ser capaz de transformar fenilalanina em ácido fenilpirúvico. Contudo, a literatura demonstra que apenas 87% das linhagens de *A. baumannii* apresentam positividade para esta prova (HOLT, J. G. 1994), levantando então o questionamento da assertividade desta plataforma na análise desta espécie. Não foi possível identificar o IAL 2458 com este sistema, apresentando diferentes relações com resultados abaixo de 50%.

As linhagens de *Citrobacter sp.*, IAL 91 e IAL 92, apresentaram 99,97% de compatibilidade com *Citrobacter freundii*. Todavia, o sistema *Bactray* I não tem em sua composição o substrato “dulcitol”, prova importante para diferenciar as espécies *C. freundii* e *C. youngae*, e por isso este resultado não pode ser considerado como final sem a prova complementar citada.

A linhagem de *Citrobacter sp.* IAL 239 chegou a uma identificação com 100% de similaridade para a espécie *C. braakii* e o IAL 244 apresentou 97,76% de semelhança para *C. braakii*.

Para a linhagem IAL 1973, foi observado semelhança de 99,94% para *Edwardsiella tarda*, correspondendo à identificação original. Para a linhagem *Klebsiella sp.*, IAL 504, foi observada semelhança de 97,63% para a identificação de *Klebsiella pneumoniae*.

Não foi possível concluir a identificação com este sistema para a linhagem de *Raoultella planticola*, pois este gênero não é abordado pelo *BacTray* I.

SEQUENCIAMENTO

Devido a não leitura das duas cadeias de polinucleotídeos das amostras, os resultados obtidos neste processo de sequenciamento não foram decisivos para concluir a autenticação das linhagens, tornando necessária a associação deste resultado com os demais obtidos pelas técnicas anteriores.

OXA-51

O resultado da PCR feita com os oligoiniciadores OXA-51F e OXA-51R foi visualizado em gel de Agarose 1,5%, apresentando bandas claras e únicas e confirmando a espécie das linhagens trabalhadas, pois, de acordo com Turton (2006), o gene codificante da beta-lactamase do subgrupo OXA-51 é intrínseco das linhagens de *Acinetobacter baumannii*.

IDENTIFICAÇÃO FINAL DAS LINHAGENS

Após a realização das técnicas de autenticação, bioquímicas e moleculares, a compilação dos resultados permitiu caracterizar as linhagens para gênero e espécie, como pode ser observado na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Identificação final das linhagens

LINHAGEM INICIAL	Nº IAL	LOTE	IDENTIFICAÇÃO FINAL
<i>A. baumannii</i>	2457	03 11 2457	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>A. baumannii</i>	2458	08 08 2458	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Citrobacter sp</i>	0091	08 00 91	<i>Citrobacter youngae</i>
<i>Citrobacter sp</i>	0092	04 04 92	<i>Citrobacter youngae</i>
<i>Citrobacter sp</i>	0239	03 04 239	<i>Citrobacter braakii</i>
<i>Citrobacter sp</i>	0244	06 00 244	<i>Citrobacter braakii</i>
<i>E. tarda</i>	1973	04 14 1973	<i>Edwardsiella tarda</i>
<i>Klebsiella sp</i>	0504	08 09 504	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>R. planticola</i>	2075	12 18 2075	<i>Raoultella planticola</i>

CONCLUSÃO

As provas bioquímicas, convencionais e do Sistema *BacTray*, foram úteis na identificação das bactérias Gram-negativas em conjunto com outras técnicas complementares. Neste trabalho, a caracterização fenotípica foi fundamental no direcionamento da identificação das espécies das linhagens de *Citrobacter sp* e *Raoultella planticola*., que em conjunto com as demais técnicas permitiu a conclusão da autenticação.

A técnica de MALDI-TOF foi capaz de concluir a identificação de gênero e espécie das linhagens *Edwardsiella tarda* e *Klebsiella pneumoniae* e auxiliou no direcionamento das

espécies das demais linhagens, como no caso da *Raoultella planticola* e espécies de *Citrobacter sp.*

Não foi possível concluir a identificação das linhagens através do sequenciamento devido a não leitura das duas cadeias de polinucleotídeos das amostras, não formando um consenso. Todavia, não se pode determinar que este não é um bom método de autenticação das bactérias Gram-negativas pois a falha na classificação pode ter ocorrido devido à falhas do desenvolvimento do trabalho, necessitando confirmar os resultados.

A amplificação do gene OXA-51, possibilitou a identificação específica das amostras de *A. baumannii* (IAL 2457 e IAL 2458) em razão de sua inerência para com a espécie.

Ao final dos procedimentos, as linhagens autenticadas passaram a estar disponíveis para fornecimento, permitindo seu uso em pesquisas de grande relevância, em trabalhos industriais e em Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs), contribuindo com a vigilância epidemiológica e consequentemente fazendo parte da história da saúde pública do país.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, T. S. *et al.* Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz – 68 Anos de história dedicados à saúde pública. BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista.

DETECÇÃO e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Mod V, 2004. 95p.

HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Ninth Edition – 1994.

JANSSENS, D. *et al.* The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research. **Research in microbiology** v. 161,6 (2010): 422-9. doi:10.1016/j.resmic.2010.03.009.

O'HARA, C. M.; ROMAN, S. B.; MILLER, J. M. Ability of Commercial Identification Systems To Identify Newly Recognized Species of *Citrobacter*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.1, p. 242–245, 1995.

SMITH, D. “Culture collections over the world.” *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* v. 6,2 (2003): 95-100. doi:10.1007/s10123-003-0114-3

TURTON, J. F. *et al.* Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the blaOXA-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. **Journal of Clinical Microbiology**. London, V. 44, No. 8, , p. 2974–2976, 2006.

WALCKENAER, E. *et al.* How to identify *Raoultella spp.* including *R. ornithinolytica* isolates negative for ornithine decarboxylase? The reliability of the chromosomal bla gene. **Journal of microbiological methods** v. 75,3 (2008): 405-10. doi:10.1016/j.mimet.2008.07.01.

CARACTERIZAÇÃO E AUTENTICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS ARMAZENADAS NO NÚCLEO DE COLEÇÕES DE MICRO-ORGANISMOS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Tamires Dantas Campos¹; Vanessa Nieri Zanelatto²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial e Epidemiologia - NCMO - CEFOR; E-mail:
tamiresdancam@gmail.com

²Docente/pesquisadora do Núcleo de Coleção de Micro-organismos – NCMO; E-mail:
vanessa.zanelatto@ial.sp.gov.br

Resumo: As coleções de micro-organismos atuam armazenando, conservando e fornecendo linhagens de importância para pesquisas em diversas áreas da saúde, meio ambiente, indústrias e controle de qualidade. Também faz parte do trabalho das coleções caracterizar e autenticar as linhagens, conferindo maior confiança e especificidade ao material fornecido. A Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz armazena e organiza cepas de grande importância para a saúde pública e pesquisas. Para realizar a autenticação do material depositado, são utilizadas técnicas de identificação fenotípica e métodos de biologia molecular. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e autenticar linhagens de bactérias Gram-positivas armazenadas pelo método de liofilização no Núcleo de Coleção de Micro-organismos (NCMO) do Instituto Adolfo Lutz por meio de identificações fenotípicas, espectrometria de massas (MALDI-TOF) e sequenciamento genético. Foram selecionadas linhagens dos gêneros *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Rhodococcus*, que passaram por identificação. Foi possível diferenciar as espécies dos gêneros *Corynebacterium* por todos os métodos usados, confirmando resultados através de sequenciamento Sanger, não conseguindo distinguir apenas seus biovars. Todas as espécies de *Staphylococcus* foram estabelecidas pelas técnicas tradicionais de identificação. As linhagens de *Streptococcus* foram classificadas como pertencentes ao grupo *viridans* pelas técnicas tradicionais, sendo sua espécie determinada por espectrometria de massas e sequenciamento. As linhagens de *Rhodococcus equi* foram identificadas por espectrometria de massas. Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que a metodologia do MALDI-TOF foi a mais eficiente na autenticação das linhagens estudadas e que os métodos utilizados no NCMO são eficazes na preservação das características originais dos micro-organismos.

Palavras-chave: Coleções de culturas; *Corynebacterium*; *Rhodococcus*; *Staphylococcus*; *Streptococcus*.

INTRODUÇÃO

As coleções de cultura são Centros de Recursos Biológicos (BRC), que armazenam materiais biológicos autenticados, identificados com alta precisão, servindo como repositórios da biodiversidade e centros de recursos microbianos. Estes centros possuem experiência em preservar, cultivar, caracterizar e distribuir linhagens autenticadas,

fornecendo recursos para ensaios de controle de qualidade, inovação e pesquisas (JANSSENS, D. et al, 2010; BECKER, P. et al, 2019).

O Núcleo de Coleção de Micro-organismos (NCMO) do Instituto Adolfo Lutz, membro da *World Federal for Culture Collections* (WFCC) é classificado como uma coleção de serviços, com acervo abrangente, com curadoria profissional e importante papel na caracterização, manutenção e distribuição de micro-organismos, desde 1940 (ANDRADE, T. S., 2008).

O acervo do NCMO é constituído por aproximadamente 10 mil linhagens, desta forma, para mantê-lo atualizado são necessárias revisões constantes, sendo necessário emprego de técnicas modernas para contribuir com este processo. Assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar e autenticar bactérias Gram-positivas, presentes na coleção do Instituto Adolfo Lutz, utilizando técnicas tradicionais e modernas, tornando-as disponíveis para fornecimento. Para isso foram selecionadas linhagens dos gêneros *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, micro-organismos considerados de importância para saúde pública e relacionados a infecções em pacientes imunocomprometidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este trabalho foram selecionados micro-organismos liofilizados depositados no acervo da coleção, a partir do acrônimo IAL, Tabela 1.

Tabela 5 - Linhagens de bactérias Gram-positivas avaliadas neste estudo

IAL	LOTE	LINHAGEM	ORIGEM
93	04/01	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	-
99	04/98	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> biovar <i>gravis</i> C.4	-
101	05/01	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> biovar <i>mitis</i> C.10	-
104	04/01	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	-
1817	09/07	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 21513
1997	12/93	<i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 33707 / CDC B 1480
2042	05/98	<i>Rhodococcus equi</i>	H. Servidor Público 13420
2043	07/99	<i>Rhodococcus equi</i>	H. Emilio Ribas
2052	01/98	<i>Rhodococcus equi</i>	NN INFANTY SC 33446
2106	12/98	<i>Rhodococcus equi</i> 2	UNESP Botucatu
1598	02/10	<i>Staphylococcus sp</i>	2095 CIP J. Pillet
1603	01/03	<i>Staphylococcus aureus ssp. aureus</i> H 209	Fontoura
1604	07/03	<i>Staphylococcus aureus ssp. aureus</i> H 209	Johnson
2012	07/03	<i>Staphylococcus aureus ssp. aureus</i> EF 04	EPM
1828	10/07	<i>Streptococcus mitis</i>	-
1832	09/10	<i>Streptococcus sanguinis</i>	-

Fonte: Autoral, 2022.

Para realizar a autenticação foram utilizados os seguintes métodos:

- Análise macroscópica, analisando a uniformidade do crescimento em meio de cultura, e microscópica, usando coloração de Gram e de Albert-Laybourn (identificando grânulos metacromáticos em bacilos corineformes) e microscópio óptico com aumento de 1000X;
- Identificação fenotípica por meio de provas bioquímicas, diferenciando espécies a partir das transformações químicas num determinado substrato, e antibiograma, avaliando a suscetibilidade a antimicrobianos, sendo necessário, para esta técnica, a produção de

- suspensão bacteriana com turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland e o uso de discos de Novobiocina (5 µg) ou Optoquina (5 mcg);
- MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*) identificando a presença de proteínas específicas através da dessorção de moléculas a laser, sendo estas aspiradas a vácuo até um detector, que avalia seu tempo de chegada, produzindo um gráfico, com picos proteicos, analisado e interpretado de forma computadorizada. Para identificação de bactérias Gram-positivas foi realizada extração proteica em tubo (usando etanol 100%, ácido fórmico 70% e acetonitrila) e extração direta (usando ácido fórmico 95%), comparando os resultados obtidos com os presentes na biblioteca padrão do equipamento Bruker, sendo os que apresentaram *score* entre 2,00 – 3,00, considerados de alta confiança.
 - Sequenciamento genético pelo método Sanger analisando a sequência do gene codificador do RNA ribossomal da porção 16S, onde existem regiões de consenso, variabilidade e hipervariabilidade, que permitem identificar diferentes espécies. Para este trabalho foi realizada a extração de material genético; amplificação utilizando os *primers* 27F/518R. Confirmada amplificação e integridade, foi realizada a purificação dos produtos com o MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification, quantificação em nanoespectrofotômetro, seguindo com a reação de sequenciamento usando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* e encaminhando a placa ao Laboratório Estratégico para ser analisada no equipamento 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises Macroscópica e Microscópica

- *Corynebacterium spp*
Em macroscopia foram realizadas as seguintes observações:
 - IAL 93 (*C. diphtheriae*) – crescimento em 48 horas, com coloração creme, aspecto cremoso, colônias pequenas, bem delimitadas e bordas uniformes;
 - IAL 99 (*C. diphtheriae* bv. *gravis*) e IAL 101 (*C. diphtheriae* bv. *mitis*) crescimento em 48 horas com coloração creme, aspecto cremoso, colônias medianas, bem delimitadas e bordas uniformes;
 - IAL 104 (*C. pseudodiphtheriticum*) - crescimento em 48 horas, com coloração creme, aspecto cremoso, colônias medianas, bordas pregueadas e centro branco;
 - IAL 1817 (*C. glutamicum*) - crescimento em 24 horas, com coloração creme, aspecto cremoso, colônias pequenas, bordas bem delimitadas e uniformes.Em microscopia, as linhagens IAL 93, 99, 101 foram visualizados bacilos roxos, paliçados, com grânulos metacromáticos, confirmados pela coloração de Albert-Laybourn. As linhagens IAL 104 e 1817 apresentaram bacilos de coloração roxa, mais curtos que os anteriores, paliçados, sem grânulos metacromáticos, confirmado pela coloração de Albert-Laybourn. Desta forma, pode-se dizer que todas as linhagens estavam de acordo com a literatura de referência (WITHMAN, W. B., 2012).

- *Rhodococcus equi*
Em macroscopia observou-se que todas as colônias cresceram da mesma forma, visto que todas as linhagens pertenciam a mesma espécie; assim, nas primeiras 24 horas de crescimento, apresentaram coloração creme, aspecto cremoso e formação de colônias isoladas; com 48 horas, o crescimento apresentou coloração alaranjada, aspecto mucoide e brilhante, formando colônias com forma de “gota de lágrima” e bordas lisas.

Em microscopia óptica foi possível visualizar a alteração morfológica decorrente do ciclo celular da espécie. Com menos de 24 horas, foram observados bacilos Gram-positivos;

após 24 horas, foram visualizados cocos Gram-positivos, permitindo dizer que as linhagens estavam de acordo com relatos literários (WITHMAN, W. B. *et al.*, 2012).

- *Staphylococcus spp*

Em macroscopia observou-se que todas as linhagens (IAL 1598, 1603, 1604, 2012), apresentaram crescimento abundante em 24 horas, com coloração amarelada, aspecto cremoso e colônias pequenas. Em ágar sangue, o padrão de crescimento se repetiu, porém a cepa com IAL 2012 apresentou formação halo de β – hemólise, que pode se formar nesta espécie (ANVISA, 2008). Em microscopia óptica, foram observados cocos Gram-positivos, que se distribuíam pela lâmina em diplococos, arranjos lineares e arranjos semelhantes a “cachos de uva”. Os crescimentos e as características microscópicas encontradas estavam de acordo com a literatura (WITHMAN, W. B. *et al.*, 2009).

- *Streptococcus spp*

Em macroscopia foram observados crescimento em 24 horas, das linhagens IAL 1828 e 1832, em jarra de anaerobiose, com formação de zonas de α – hemólise, formando um halo esverdeado ao redor das colônias brilhantes, com aspecto seco, tamanho pequeno e bordas delimitadas. Em microscopia foram observados cocos Gram-positivos dispostos aos pares ou em alinhamento, sendo que os cocos da linhagem IAL 1828 foram considerados maiores quando comparados aos da linhagem IAL 1832. Desta forma, pode-se afirmar que para as linhagens desse gênero, as características observadas foram compatíveis com as descritas na literatura (WITHMAN, W. B. *et al.*, 2009).

Análises Bioquímicas

- *Corynebacterium spp*

Para as diferentes linhagens com diferentes identificações de espécie foram realizadas provas de catalase, redução de nitrito a nitrato, consumo de glicose, sacarose e trealose, além de redução de telurito. Os resultados obtidos foram comparados com a literatura de referência (WITHMAN, W. B., 2012), permitindo concluir que as linhagens de IAL 93, 99, 101 e 104 não apresentaram divergências em relação ao que se era esperado. A linhagem IAL 1817 não apresentou consumo de trealose, divergindo da literatura.

- *Rhodococcus equi*

Para as diferentes linhagens da espécie trabalhada foram realizadas provas de catalase, produção de indol, consumo de lactose, glicose, manitol e xilose, descarboxilação de lisina, ornitina, arginina e degradação da ureia. Os resultados obtidos foram comparados com a literatura de referência (PRESCOTT, J. F., 1991), permitindo concluir que as linhagens IAL 1997, 2043, 2052 e 2106 não apresentaram divergências, porém, existem relatos em desacordo sobre o consumo de glicose para a espécie (SILVA, P. *et al.*, 2010). A linhagem IAL 2042 não apresentou degradação da ureia, divergindo das outras linhagens, porém nem todas as linhagens degradam este substrato (SILVA, P. *et al.*, 2010).

- *Staphylococcus spp*

Para as diferentes linhagens deste gênero foram realizadas provas de catalase, coagulação de plasma, consumo de manitol, degradação de ureia, despolimerização de DNA, além de antibiograma com Novobiocina (5 μ g). Os resultados obtidos foram comparados a literatura de referência (ANVISA, 2008), permitindo concluir que todas as linhagens pertenciam a espécie *S. aureus*.

- *Streptococcus spp*

Para as diferentes linhagens deste gênero foram realizadas provas de catalase, hidrólise de esculina e detecção de α -hemólise, além de antibiograma com Optoquina (5mcg). Os resultados obtidos foram comparados com a literatura de referência (ANVISA, 2008), permitindo concluir que as espécies trabalhadas pertenciam ao grupo *viridans*, não permitindo afirmar a espécie das linhagens.

MALDI-TOF

As diferentes espécies de *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram identificadas por extração direta do crescimento, enquanto as diferentes cepas de *Rhodococcus equi* apresentaram melhor identificação usando extração proteica. A técnica permitiu a identificação de todas as espécies do gênero *Corynebacterium*, porém não identificou os biovares das espécies *C. diphtheriae* trabalhadas.

As linhagens de *Rhodococcus equi* foram identificadas com nomenclatura de *Rhodococcus hoagii*, identificação explicada pela semelhança, considerada controversa, constatada entre as espécies de *Rhodococcus equi* e *Corynebacterium hoagii* (VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., SCORTTI, M., MEIJER, W., 2020).

Todas as linhagens do gênero *Staphylococcus* foram confirmadas como da espécie *S. aureus*. No caso das diferentes espécies de *Streptococcus*, a técnica identificou a linhagem IAL 1832 como *S. sanguinis*, porém, a linhagem IAL 1828 teve resultado inconclusivo, pois houve identificação de duas espécies, *S. mitis* e *S. pneumoniae*, sendo possível descartar a segunda espécie pelo cultivo em ágar bile esculina, que foi negativo, diferindo do esperado para esta espécie (ANVISA, 2008).

Identificação por Sequenciamento Genético

Com base nos resultados obtidos nas técnicas de diferenciação descritas anteriormente, foram selecionadas como para identificação por sequenciamento genético as linhagens de *Corynebacterium*, visando diferenciar os biovares das linhagens IAL 99 e 101, e as linhagens de *Streptococcus*, visando confirmar suas espécies, visto que por pertencerem ao mesmo grupo de *Streptococcus (viridans)*.

Os resultados obtidos permitem dizer que as bactérias Gram-positivas extraídas por kit apresentaram resultados melhores. Além disso, pode-se dizer que a identificação com os *primers* 27F/518R foi mais eficiente, visto que houve formação de leituras consensuais.

A partir do sequenciamento, foi possível dizer que as espécies do gênero *Streptococcus* foram identificadas como *S. mitis* (IAL 1828) e *S. sanguinis* (IAL 1832), com similaridades de 99,7% e 100%, respectivamente. As linhagens de *Corynebacterium* tiveram suas espécies identificadas, confirmando os resultados de outras técnicas, porém, não foi possível identificar os biovares das linhagens IAL 99 e 101, possivelmente pelos *primers* utilizados não abrangerem trechos do genoma que possibilitem isso.

As espécies de *Corynebacterium* identificadas e suas respectivas similaridades foram: *C. diphtheriae* (IAL 93) – 99,13%; *C. diphtheriae* (IAL 99) – 99,1%; *C. diphtheriae* (IAL 101) – 99,77%; *C. pseudodiphtheriticum* (IAL 104) – 98,19%; *C. glutamicum* (IAL 1817) – 100%.

CONCLUSÕES

As linhagens de *Corynebacterium* foram identificadas por meio das técnicas morfológicas, fenotípicas, MALDI-TOF e por sequenciamento genético, porém nenhuma das técnicas permitiu determinar seus biovares, sendo necessários mais estudos. As linhagens de *Rhodococcus equi* tiveram suas espécies confirmadas por meio das técnicas de identificação morfológica e por MALDI-TOF, porém a identificação por técnicas fenotípicas não foi conclusiva por esta espécie ser reativa ao uso de técnicas bioquímicas.

Com os resultados obtidos para as linhagens de *Staphylococcus spp* foi possível determinar a espécie por técnicas de identificação morfológica, fenotípicas e MALDI-TOF, permitindo autenticar a linhagem IAL 1598. As linhagens de *Streptococcus spp* tiveram seu gênero e grupo de classificação determinado como *viridans* por identificação fenotípica e morfológica, porém as suas espécies só foram confirmadas com a identificação por MALDI-TOF e sequenciamento genético.

Assim, verificou-se que os métodos de identificação utilizados foram eficientes para as bactérias Gram-positivas estudadas neste trabalho, sendo que a identificação por MALDI-TOF se destacou como a mais assertiva nos diferentes gêneros trabalhados. Também foi possível verificar que o método de liofilização empregado para a manutenção das linhagens foi eficaz, uma vez que a maioria das características informadas na época do depósito corresponderam as análises realizadas neste trabalho, após muitos anos de preservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, T. S. **Seção de coleção de culturas do Instituto Adolfo Lutz – 68 anos de história dedicados à saúde pública.** *Boletim Epidemiológico Paulista*, São Paulo, nov. 2008.

ANVISA. **Módulo 4 – Gram-positivos.** Disponível em <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/imp_stre4.htm>. Acesso em 14 de outubro de 2022.

BECKER, P. *et al.* **Public microbial resource centers: key hubs for Findable, Accessible, Interoperable and Reusable (FAIR) microorganisms and genetic materials.** Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31471301/>>. Acesso em 17 de outubro de 2022.

JANSSENS, D., *et al.* **The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research.** Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20399265/>>. Acesso em 17 de outubro de 2022.

MACHADO, J. B. A. **Uso da biblioteca genômica RNAr 16S como ferramenta para o estudo da microbiota fecal humana.** Disponível em <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-16012014-140900/pt-br.php>>. Acesso em 18 de novembro de 2022.

PRESCOTT, J. F. ***Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen.** *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 4, 1991. P. 20 – 34. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358176/pdf/cmr00042-0036.pdf>>. Acesso em 14 de novembro de 2022.

SILVA, P. *et al.* ***Rhodococcus equi* isolation from sputum of patients with suspected tuberculosis.** Disponível em <<https://www.scielo.br/j/mioc/a/yT9zSjHLzC9tbDL5L3cX4Mz/?lang=en&format=html>>. Acesso em 16 de novembro de 2022.

VÀZQUEZ-BOLAND, J. A., SCORTTI, M., MEIJER, W. **Conservation of *Rhodococcus equi* (Magnusson 1923) Goodfellow and Alderson 1997 and rejection of *Rhodococcus hoagii* (Morse 1912) Kämpfer *et al.* 2014.** *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2020. Disponível em <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32375930/>>. Acesso em 14 de outubro de 2022.

WITHMAN, W. B. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.** First Edition. 2012.

WITHMAN, W. B. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Second Edition.
Volume Three – The *Firmicutes*. 2009.

WITHMAN, W. B. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Second Edition.
Volume Five – The *Actinobacteria*, Part A. 2012.

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE FUSIONADA (RBD + N) DO SARS-COV-2 EM *E. COLI*

Isabela Fernandes Rodrigues¹; Carlos Roberto Prudêncio².

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – Centro de Imunologia – Instituto Adolfo Lutz; E-mail: isabela.fernandesr@outlook.com

²Docente/pesquisador do Centro de Imunologia – Instituto Adolfo Lutz

Resumo: A pandemia ocasionada pelo SARS-CoV-2 levou a comunidade científica a uma rápida busca por antígenos virais capazes de induzirem uma resposta imunológica eficiente para a produção de vacinas, bem como na aplicação em testes diagnósticos sorológicos. A obtenção e utilização de proteínas recombinantes por meio de técnicas biotecnológicas, tem se mostrado muito eficiente em razão do seu custo-benefício e da sua diversidade de aplicação, contribuindo para o avanço científico. Este trabalho teve como objetivo otimizar o processo de expressão de uma proteína recombinante fusionada (RBD+N) do SARS-CoV-2 em bactérias *E. coli*, avaliando as melhores condições para a obtenção da proteína pura, que futuramente servirá para testes imunológicos *in vitro* e *in vivo*. O vetor de expressão pH6HTC His6 HaloTag® T7 Vector (Promega Corporation, USA) foi utilizado para a expressão da sequência da proteína fusionada. As cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS e Rosetta foram transformadas com o plasmídeo, para a realização da expressão. A extração da proteína foi realizada utilizando os tampões Bug Buster® e Sarkosyl e submetidas à purificação por cromatografia de afinidade. As amostras foram analisadas por gel de SDS-PAGE e *Western Blotting*. A cepa *E. coli* Rosetta no tempo de 4 horas apresentou maior rendimento de proteína expressa, enquanto a *E. coli* BL21 no tempo de 4 horas foi a que menos expressou. Ambas as cepas no tempo de 18 horas expressaram concentrações próximas. Ao avaliar o perfil de purificação, a BL21 apresentou baixa formação de corpo de inclusão possibilitando a liberação da proteína no primeiro estágio de extração proteica. Os resultados do *Western blotting* sugerem maiores investigações de possíveis problemas da sequência gênica no vetor de expressão que possam ter influenciado na purificação devido ao não reconhecimento da proteína pelo anticorpo anti-His tag.

Palavras-chave: *E. coli*; proteína recombinante fusionada; SARS-CoV-2.

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, o aparecimento de diversos casos de pneumonia na cidade de Wuhan, na China, acendeu um alerta para que o governo chinês buscasse a fonte do surto e comunicasse aos órgãos internacionais de vigilância. Posteriormente, em fevereiro, taxonomistas classificaram o vírus em SARS-CoV-2 (do inglês, *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) e a OMS nomeou a nova doença como COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*). Em meados de março já havia a circulação do vírus por diversos países ao redor do mundo, sendo caracterizada como pandemia, impactando fortemente na saúde pública global (SUN *et al.*, 2020).

O vírus possui tropismo pelo trato respiratório, principalmente nas células pulmonares, causando uma série de complicações ao hospedeiro (HARRISON, LIN, WANG, 2020). Os casos variam de leves, moderados e graves. Entre os sintomas comumente relatados estão a tosse, febre e dor de garganta. Em casos mais graves, os

pacientes podem apresentar dor no peito, falta de ar, podendo evoluir para uma síndrome respiratória aguda grave, necessitando de internação hospitalar (WHO, 2022).

Com o rápido aumento dos números de casos mundialmente, houve a necessidade da busca por marcadores virais capazes de auxiliarem na terapêutica e no diagnóstico da nova patologia (YÜCE, FILIZTEKIN, ÖZKAYA, 2021). A procura por sítios ativos e imunogênicos para produção de vacinas foi o foco de diversos grupos de pesquisa na tentativa de desenvolver antígenos recombinantes capazes de induzir a resposta imunológica humoral e/ou celular contra o novo vírus (AWADASSEID *et al.*, 2021).

Este trabalho teve como objetivo otimizar o processo de expressão de uma proteína recombinante fusionada (RBD+N) do SARS-CoV-2 em bactérias *Escherichia coli*, avaliando as melhores condições para a obtenção da proteína pura, que futuramente servirá para testes imunológicos *in vitro* e *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

O vetor de expressão pH6HTC His6 HaloTag® T7 Vector (Promega Corporation, USA) foi utilizado para a expressão da sequência da proteína recombinante resultante da fusão das proteínas RBD (domínio de ligação ao receptor, uma subunidade de proteína Spike, de superfície do vírus) e N (proteína do nucleocapsídeo). As cepas *E. coli* BL21 (DE3) pLysS e Rosetta foram transformadas com o plasmídeo, para a realização da expressão. Foi realizado inicialmente um teste de indução após atingirem OD_{600nm} 0,6 em 5 mL de cultura com concentração 0,4 mM de IPTG, para avaliar as características de cada cepa e posteriormente a expressão em 100 mL de cultura a 0,5 mM de IPTG em dois tempos diferentes (4 e 18 horas). A extração da proteína foi realizada utilizando os tampões Bug Buster® (Novagen®, USA), juntamente com a adição de lisozima (Invitrogen, USA; 1000 U/mL) e Benzonase® Nuclease (Sigma-Aldrich®, USA; 25 U/mL) e Sarkosyl (1,5% Sarkosyl, 25 mM Trietanolamina, 1mM de EDTA) e submetidas à purificação por cromatografia de afinidade. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE e *Western blotting*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

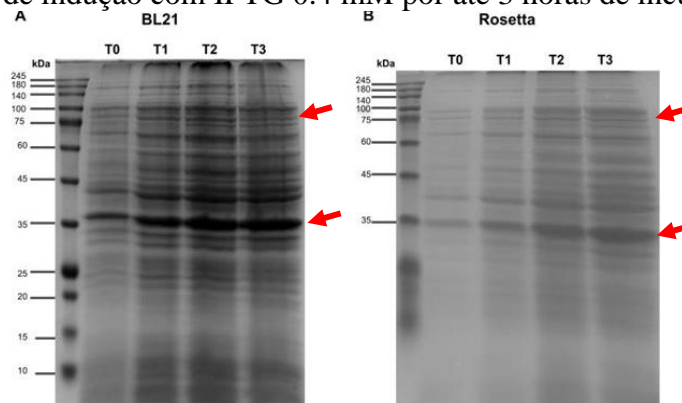
A utilização de bactérias para a produção de proteínas heterólogas tem sido amplamente aplicada no ramo da biotecnologia. Muitas proteínas de interesse comercial têm-se utilizado esse modelo de vetor para estudos estruturais e funcionais devido ao seu baixo custo, fácil manipulação, rápido crescimento e alto rendimento (ROSANO, CECCARELLI, 2014). A espécie *E. coli* é a principal escolha de muitos pesquisadores devido a sua simplicidade genômica passível de transformação com DNA exógeno, ciclo de divisão celular entre 20 a 30 minutos em condições de crescimento favoráveis, além de possuir sua fisiologia bem caracterizada. (FRANCIS, PAGE, 2010).

Com os avanços da engenharia genética, a *E. coli* passou por diversas modificações a fim de melhorar seu desempenho na produção de insumos biotecnológicos, originando diversas cepas. Neste trabalho, a expressão heteróloga da proteína fusionada (RBD+N) foi avaliada nas cepas BL21(DE3) que possui uma cópia da RNA polimerase do fago T7 e possibilita a transcrição de sequências gênicas controladas pelo promotor T7 *lac* UV5 (ROSANO, MORALES, CECCARELLI, 2019; RESENDE, 2015), e na cepa Rosetta que é recomendada para proteínas que contenham códons raros.

Dado tal contexto, as bactérias foram transformadas com o plasmídeo contendo a sequência da proteína recombinante fusionada nessas duas cepas. Para um teste inicial de expressão, foi realizada a indução durante um período de 3 horas, com uma concentração de IPTG de 0,4 mM. Durante o teste, foi retirada uma alíquota pré-indução (T0) e pós-indução

a cada uma hora até completar 3 horas (T1, T2 e T3). As amostras foram submetidas à SDS-PAGE e o resultado está demonstrado na Figura 1. Após análise, foi possível observar que a cepa Rosetta forneceu um gel mais límpido em relação a BL21, tendo uma menor expressão de proteínas basais.

Figura 1. Teste de indução com IPTG 0.4 mM por até 3 horas de incubação.



Na figura A é observada a diferença do perfil de expressão da cepa BL21 em relação a cepa Rosetta (figura B). A seta na região entre 75 e 100 kDa sugere a expressão da proteína recombinante fusionada (RBD+N) e a seta na região de 35kDa a proteína RBD expressa sozinha.

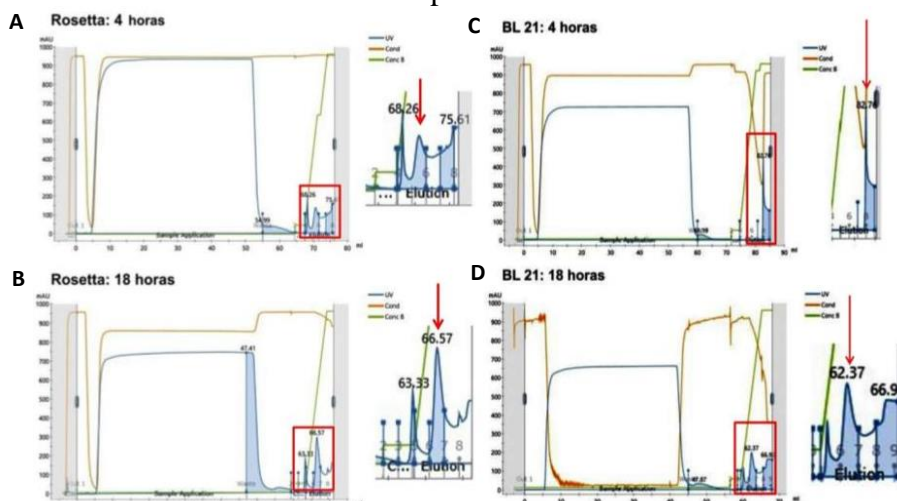
Para dar continuidade aos estudos, a expressão da proteína foi feita em uma escala maior, e decidiu-se alterar a concentração do indutor para 0,5 mM, que se baseou em estudos recém-publicados por Castro e colaboradores (2022), que trabalharam também com uma proteína fusionada (RBD+N), utilizando a concentração de 0,5 mM do indutor durante 18 horas. Portanto, as cepas foram induzidas por 4 e 18 horas de incubação a 37° C. Após a extração da proteína, utilizando dois tipos de detergentes para lisar a célula bacteriana, Bug Buster® e Sarkosyl, notou-se que os sobrenadantes obtidos dos cultivos de 18 horas apresentaram-se um aspecto viscoso, portando, essas amostras foram tratadas com DNase (5 µg/mL), que após o tratamento ficaram fluídas, e essa característica auxilia na purificação por cromatografia de afinidade.

O vetor de expressão pH6HTC His6 HaloTag® T7 possui uma sequência de 6 resíduos de histidinas que são adicionadas na porção C-terminal da proteína alvo. Essa fusão de aminoácidos é responsável por auxiliar na purificação, através de ligações reversíveis ao níquel presente na coluna cromatográfica, permitindo que apenas as proteínas com essa cauda se liguem com maior afinidade, separando-as das demais produzidas (RESENDE, 2015). A reversão dessas ligações é realizada através da adição de imidazol no tampão de eluição, que por competição, se liga ao níquel liberando a proteína que estava imobilizada. A partir desta técnica, espera-se uma obtenção mais pura e sem contaminantes em uma única etapa (BORNHORST, FALKE, 2000). Para a purificação foi utilizado o sobrenadante após a lise celular com o tampão Sarkosyl, diluído no tampão de equilíbrio A (50 mM de Fosfato de sódio, 500 mM de Cloreto de sódio). A eluição da amostra ocorreu utilizando um gradiente de concentração de 5% a 100% do tampão B (50 mM de Fosfato de sódio, 500mM de Cloreto de sódio, 500 mM de Imidazol).

Ao analisar o perfil de purificação, as amostras da cepa Rosetta 4 e 18 horas e a BL21 18 horas apresentaram perfil de eluição próximas, entre 54-58% de imidazol (~ 280 mM). Entretanto, a amostra de BL21 de 4 horas apresentou eluição em 100% da concentração de imidazol (500 mM) presente no tampão (Figura 2). Logo, uma nova expressão dessa amostra foi realizada para observar se é perfil da cepa ou se havia algum erro durante o processo. Após a segunda purificação, observou-se que o perfil de eluição se manteve o mesmo (Figura

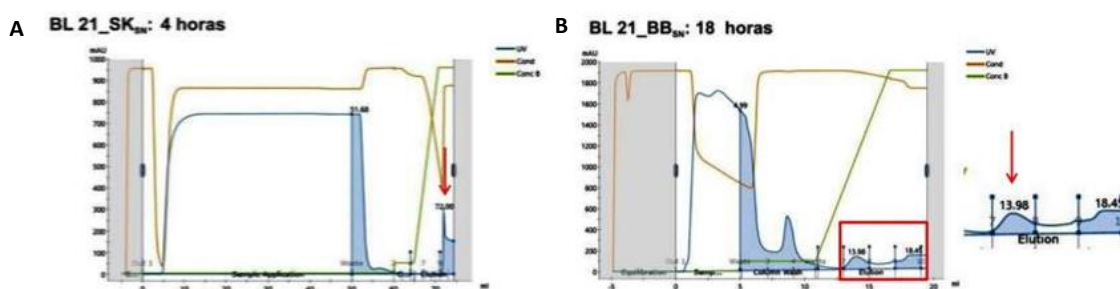
3) e dado tal cenário, surgiu a hipótese de que as proteínas estariam no sobrenadante do Bug Buster®, e que no tempo de 4 horas de indução nessa cepa, a formação de corpos de inclusão é baixa, sendo as proteínas liberadas no primeiro passo de extração.

Figura 2. Cromatograma com o perfil de eluição do sobrenadante oriundo do cultivo da cepa Rosetta e BL21.



Na figura 2A é observado o pico de eluição da amostra Rosetta 4 horas e a figura 2B o pico de eluição da amostra Rosetta 18 horas, ambos indicados pela seta. O perfil do pico de eluição da amostra de 18 horas (figura 2D) apresentou semelhança com a cepa Rosetta, como indicado pelas setas. Entretanto, a diferença no pico de eluição da amostra de 4 horas (Figura 2 C) levantou questionamentos sobre o perfil de expressão de proteína recombinante das cepas em diferentes tempos.

Figura 3. Cromatograma da nova purificação das amostras obtidas da indução de 4 horas da cepa BL21.



A figura 3A apresenta a purificação do sobrenadante do tampão Sarkosyl (SKsn) indicando a eluição em 100% de imidazol. A figura 3B indica a purificação do sobrenadante do Bug Buster® (BBsn) com eluição na concentração de 56%.

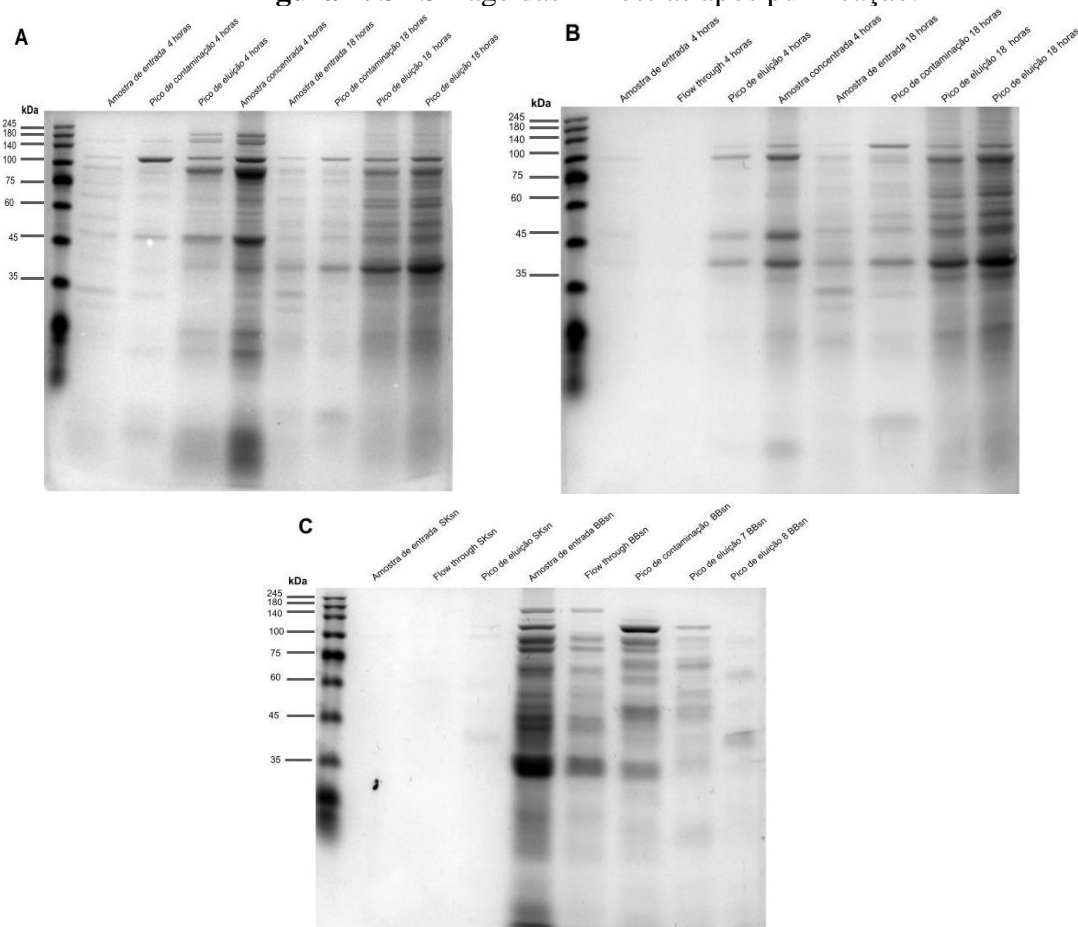
Para uma análise quantitativa das proteínas obtidas nas amostras, foi realizada a concentração das amostras para quantificação utilizando um kit comercial ((Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit - Thermo Fisher Scientific, USA). Os resultados da quantificação estão apresentados na Tabela 1. O eluido da purificação obtidos do cultivo da cepa Rosetta no tempo de 4 horas apresentou maior quantidade de proteína expressa dentre as amostras, enquanto os eluentes da BL21 4 horas produziu proteínas em menor concentração. As amostras de 18 horas apresentaram concentrações próximas.

Tabela 1. Quantificação da proteína expressa.

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (μ G/ML)
BL21 4 horas (Sobrenadante Bug Buster®)	624,1
BL21 4 horas (Sobrenadante Sarkosyl)	417,1
BL21 18 horas (Sobrenadante Sarkosyl)	1130,9
Rosetta 4 horas (Sobrenadante Sarkosyl)	1340,6
ROSETTA 18 HORAS (SOBRENADANTE SARKOSYL)	1073,8

Ao final de todo o processo, as amostras foram submetidas à análise de SDS-PAGE e *Western blotting*. Os resultados da primeira análise revelaram que a amostras provenientes da cepa Rosetta do tempo de 4 horas apresentou uma banda de maior densidade em tempo de 18 horas (Fig. 4A), corroborando com os resultados da quantificação proteica. Observou-se também bandas entre 75 e 100 kDa, que sugere ser a proteína fusionada; porém notou-se uma banda da região de 35 kDa, característico da proteína RBD indicando que a purificação não foi eficiente, pois teoricamente a cauda de histidina estaria presente na proteína quimérica. Em relação à cepa BL21 (Fig. 4B) ocorreu a situação inversa, no tempo de 18 horas a bactéria produziu mais proteína em relação ao tempo de 4 horas. Também foi realizado um gel para analisar a segunda purificação do tempo de 4 horas da BL21 para comparar a eluição da proteína nos diferentes sobrenadantes (Fig. 4C). A partir desses resultados, concluiu-se que a maior concentração de eluição da proteína estava no sobrenadante do Bug Buster® e bem pouca no Sarkosyl. Os resultados do SDS-PAGE também indicaram a ineficiência da purificação, visto que apenas proteínas que possuem cauda de histidina deveriam ser eluída, apresentando-se em uma banda única no gel.

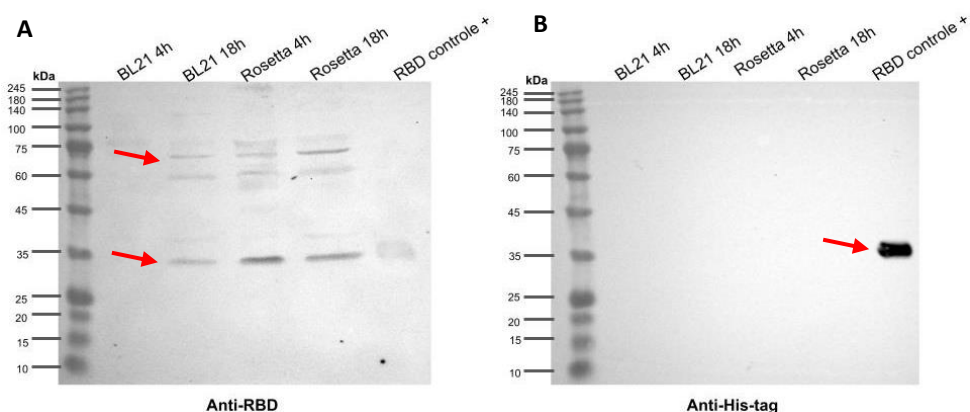
Figura 4. SDS-Page das Amostras após purificação.



Nas figuras A e B é possível observar que as bandas na região entre 75 e 100 kDa sugerem ser a proteína recombinante expressa, sendo possível observar a progressão da espessura após a concentração do pico de eluição. A figura C mostra a diferença de concentração da proteína expressa na BL21 no tempo de 4 horas nos diferentes sobrenadantes.

Em ambos os géis, ficou evidente uma banda espessa próxima a marcação de 35 kDa, que se assemelha ao perfil da proteína RBD sozinha e ainda há necessidade de otimizar o método de purificação. Para confirmar a expressão da proteína fusionada RBD+N, foi realizado um *Western Blotting* com imunorreação com anticorpo primário de coelho anti-His6-tag (Sigma-Aldrich®, USA; diluição 1:1000) e soro de coelho anti-RBD (produzido *in-house* pelo grupo de pesquisa). A membrana tratada com soro anti-RBD, apresentou marcação em duas regiões (~60 kDa e 35 kDa) (Figura 5A), indicando que além da proteína inteira, a bactéria possivelmente também expressou somente a porção da RBD. A membrana tratada com anticorpo anti-His6-tag para analisar o peso molecular e confirmar a expressão da proteína fusionada não apresentou imunorreação para o reconhecimento da cauda de histidina nas amostras pelo anticorpo, reconhecendo apenas o RBD com cauda de histidina (produzido pelo grupo de pesquisa) que foi utilizado como controle positivo (Figura 5B). Desta forma, supõe-se que a cauda da Histidina não está sendo produzida completa, pois está na sequência do vetor e não na sequência gênica da proteína, podendo haver algum problema na fusão entre as sequências. Fato que fica evidente durante a purificação, pois observou-se que um pico de eluição na concentração de aproximadamente 300 mM, sugerindo que apenas proteínas com poli-histidinas (mais de 3 resíduos de aminoácidos) ficariam mobilizadas nas colunas e eluiriam nessa concentração.

Figura 5. Western Blotting das amostras após purificação.



Na figura A é observado reconhecimento da proteína RBD em duas regiões (aproximadamente 75 e 35 kDa). Já a figura B apresenta apenas o reconhecimento da His6-tag na amostra utilizada como controle positivo.

CONCLUSÕES

A utilização de duas cepas de *E. coli*, BL21(DE3) pLysS e Rosetta, permitiu avaliar o perfil em diferentes condições de tempo, mantendo a concentração do indutor e temperatura.

A cepa Rosetta no tempo de 4 horas produziu maior quantidade de proteína recombinante fusionada (RBD+N), enquanto a cepa BL21 no mesmo tempo produziu menor quantidade.

Ao avaliar o perfil de purificação, a BL21 de 4 horas sugere a baixa formação de corpos de inclusão possibilitando a solubilização da proteína no citosol bacteriano e sendo liberado na primeira fase de lise celular.

Os resultados do *Western Blotting* sugerem a necessidade de maiores investigações quanto a possíveis interferentes na sequência gênica no vetor durante a expressão, para continuar otimizando a produção da proteína recombinante fusionada (RBD+N) a fim de obtê-la pura e sem contaminantes.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os colaboradores do laboratório de Imunotecnologia do Instituto Adolfo Lutz que me auxiliaram durante o processo para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

AWADASSEID, Annoor et al. Current Advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines. **International Journal Of Biological Sciences**, v. 17, n. 1, p. 8, 2021.

BORNHORST, Joshua A.; FALKE, Joseph J. [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In: *Methods in enzymology*. **Academic Press**, 2000. p. 245-254.

CASTRO, Julia T. et al. Promotion of neutralizing antibody-independent immunity to wild-type and SARS-CoV-2 variants of concern using an RBD-Nucleocapsid fusion protein. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2022.

FRANCIS, Dana M; PAGE, Rebecca. Strategies to optimize protein expression in E. coli. **Current protocols in protein science**, v. 61, n. 1, p. 5.24. 1-5.24. 29, 2010.

HARRISON, Andrew G.; LIN, Tao; WANG, Penghua. Mechanisms Of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. **Trends in immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100-1115, 2020.

RESENDE, Rodrigo R. **Biotecnologia aplicada à saúde fundamentos e aplicações: Vol 2**. Editora Blucher, 2015.

ROSANO, Germán L; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

ROSANO, Germán L; MORALES, Enrique S; CECCARELLI, Eduardo A. New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update. **Protein science**, v. 28, n. 8, p. 1412-1422, 2019.

SUN, Pengfei et al. Understanding Of COVID-19 based on current evidence. **Journal Of medical virology**, v. 92, n. 6, p. 548-551, 2020.

TEGEL, Hanna et al. Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta (DE3). **Protein expression and purification**, v. 69, n. 2, p. 159-167, 2010.

WANG, Mei-Yue et al. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 587269, 2020.

WHO. World health organization, 2022. Coronavírus Disease (COVID-19) Symptoms. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3>. Acesso em: 06 out. 2022.

WHO. World health organization, 2022. Coronavírus Disease (COVID-19) Prevention. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_2>. Acesso em: 06 out. 2022.

YANG, Haitao; RAO, Zihe. Structural biology Of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 685-700, 2021.

YÜCE, Meral; FILIZTEKIN, Elif; ÖZKAYA, KorinGasia. COVID-19 diagnosis — A review of current methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 172, p. 112752, 2021.

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA COQUELUCHE NO BRASIL, 1998 a 2022.

Nandara Fernanda Alves Rodrigues¹; Elisabete Cardiga Alves²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – IAL- SJRP; E-mail: nandarafernanda@outlook.com

² Docente – CLR- IAL- SJRP X, e-mail elisabete.alves@ial.sp.gov.br

Resumo: A coqueluche é uma doença infecciosa aguda do trato respiratório inferior, altamente contagiosa, causada pela bactéria *B.pertussis*, acomete pessoas de qualquer faixa etária, sendo o grupo de maior risco crianças menores e lactantes. A transmissão ocorre pelo contato direto com pessoa-infectada por meio de gotículas de orofaringe eliminadas por espirro, tosse e fala, bem como pelo contato com objetos contaminados com secreções do doente. A doença evolui em três fases consecutivas: catarral, paroxística e de convalescença. Apesar do Programa Nacional de Imunizações, a coqueluche continua sendo um importante problema de saúde pública, devido à elevada mortalidade infantil. O objetivo deste trabalho é descrever a ocorrência de casos de coqueluche no Brasil no período de janeiro 1998 a novembro de 2022. Trata-se de uma revisão elaborada a partir de artigos científicos, livros, manuais, dissertações de mestrado e portais eletrônicos. Foram utilizadas as seguintes bases de dados: PubMed, LILACS, SciELO, MEDLINE e Google Acadêmico. O estudo realizado demonstrou que as regiões no Brasil com maior número de casos confirmados de coqueluche no intervalo de 1998 a novembro de 2022 foram respectivamente: região sudeste, região sul e a região norte. A maior ocorrência de casos de coqueluche concentrou-se na faixa etária dos menores de 1 ano de idade, principalmente menores de 6 meses. No Brasil a cobertura vacinal diminuiu a partir de 2018 com aumento de casos de coqueluche em indivíduos não vacinados, principalmente na faixa etária de menores de 2 meses e indivíduos com situação vacinal ignorada que ressalta a importância da vacina em crianças, adultos, gestantes, profissionais de saúde e idosos como prevenção da doença. Foi observado um decréscimo significativo da coqueluche no período 2020 a 2022 devido ao foco na assistência e prevenção da covid-19, situação que contribuiu para a diminuição do número de casos de doenças de transmissão respiratória como a coqueluche. A coqueluche ainda deve ser considerada uma doença de importância mundial em saúde pública, portanto devemos reforçar as ações de diagnóstico, prevenção e controle da doença.

Palavras-Chaves: *Bordetella pertussis*; coqueluche; epidemiologia; vacinação

Introdução

A coqueluche é doença infecciosa aguda do trato respiratório inferior, altamente contagiosa, causada pela bactéria *Bordetella pertussis*, acomete pessoas de qualquer faixa etária, sendo o grupo de maior risco crianças menores e lactantes^{1,2}. A transmissão ocorre pelo contato direto com pessoa-infectada por meio de gotículas de orofaringe eliminadas por espirro, tosse e fala, bem como pelo contato com objetos contaminados com secreções do

doente^{3,5,7}. A doença evolui em três fases consecutivas: catarral, paroxística e de convalescença⁴. Na fase catarral ocorrem manifestações respiratórias com sintomas leves de febre pouco intensa, mal-estar geral, coriza e tosse seca. A Fase paroxística é geralmente afebril ou com febre baixa, crise com tosse súbita, rápida e curta⁶. Apesar do Programa Nacional de Imunizações, a coqueluche continua sendo um importante problema de saúde pública, devido a elevada mortalidade infantil^{1,6}. A principal forma de prevenção contra a coqueluche é a imunização. As vacinas penta (difteria, tétano, *pertussis*, hepatite B e *Haemophilus influenza* tipo b), tríplice bacteriana Difteria, Tétano e Coqueluche (DTP) e a vacina DTPa (acelular) estão disponibilizadas nos serviços de saúde do Brasil.³

O diagnóstico da coqueluche é realizado por meio de sinais e sintomas clínicos, Rx de tórax e diagnóstico laboratorial. O diagnóstico laboratorial é realizado com exames inespecífico como o hemograma. Os exames específicos utilizados são os métodos microbiológicos, métodos imunológicos e moleculares.⁸

Foi preconizado pelo Ministério da Saúde, Azitromicina 250 mg como droga de primeira escolha para o tratamento da coqueluche que apresenta maior efetividade quando administrada no início dos sintomas. O quadro inicial é inespecífico e pode causar atraso no diagnóstico e início do tratamento, levando à evolução da doença para quadros mais graves, portanto a prevenção da coqueluche por meio da imunização é vital, especialmente para os neonatos².

Muitos países enfrentam desafios significativos de vigilância, principalmente no diagnóstico clínico, confirmação laboratorial, falta de notificações epidemiológicas incompletas que podem resultar em subnotificação da doença⁹.

Para reduzir o número de casos em lactentes, a imunização materna foi introduzida em muitos países durante a última década. Os dados demonstram que a imunização reduz o número de casos e o número de mortes causadas pela doença⁹.

Avaliações nacionais indicam aumento do risco de doenças imunopreveníveis devido à queda de vacinação, principalmente em crianças menores de um ano. As ações de educação em saúde são fundamentais para a prevenção da coqueluche, portanto informar a população sobre os aspectos epidemiológicos da coqueluche, vacinação como principal medida de prevenção e controle da doença, ressaltam a importância do levantamento bibliográfico do referido estudo para o conhecimento do perfil epidemiológico da Coqueluche no Brasil¹⁰.

Material e Métodos

Este trabalho foi elaborado por meio de uma revisão bibliográfica baseando-se, no perfil epidemiológico da coqueluche. Definiu-se trabalhar com as seguintes bases de dado do PubMed, LILACS, MEDLINE, Google Acadêmico e Scielo, manuais contidos em sites do Ministério da Saúde, dissertações de mestrado e artigos de revista. Realizou-se buscas avançadas selecionando-se palavras-chave, *Bordetella pertussis*, coqueluche, epidemiologia e vacinação.

3. Resultado e Discussão

De acordo com a figura 1 A e 1 B, as regiões no Brasil com maior número de casos confirmados de coqueluche no período de 1998 a novembro de 2022 foram respectivamente: região sudeste, região sul e a região norte.

No Brasil, no intervalo de 1998 a novembro de 2022 o período com maior número de casos foi 2014. De acordo com o boletim epidemiológico do ministério da saúde referente ao período de 2010 a 2014 o aumento do número de casos de coqueluche pode ter ocorrido

devido à ciclicidade da doença, baixas coberturas vacinais, melhoria no diagnóstico laboratorial e variação de cepas entre as regiões.

Houve diminuição expressiva do número de casos de coqueluche no período de 2020 a 2022. De acordo com o boletim epidemiológico do ministério da saúde referente ao período de 2020 a 2022 a queda expressiva de casos se deve-se ao foco na assistência e prevenção ao covid 19 que contribuíram para a redução doenças de transmissão respiratória, como é o caso da coqueluche.

Figura 1 A - Casos confirmados de Coqueluche, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1998- 2022.

Região e UF	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Região Norte	432	386	353	262	198	162	228	248	70	137	296	233	52
Rondônia	123	7	6	10	1	7	11	14	4	1	3	11	22
Acre	275	1	15	5	2	10	22	23	5	0	3	51	0
Amazonas	0	80	103	56	159	80	84	78	21	43	69	22	4
Roraima	13	3	114	1	0	1	1	2	2	2	2	1	1
Pará	20	264	87	176	32	40	89	59	26	80	171	91	24
Amapá	0	13	24	11	3	24	19	71	5	9	47	57	1
Tocantins	1	18	4	3	1	0	2	1	7	2	1	0	0
Região Nordeste	200	372	569	223	95	282	261	314	214	129	215	169	115
Maranhão	19	49	76	87	5	2	4	44	64	18	10	5	6
Piauí	18	2	18	14	1	2	3	5	3	2	1	0	1
Ceará	6	36	93	15	10	10	23	35	11	4	3	11	9
Rio Grande do Norte	57	26	19	10	3	4	34	51	32	12	14	26	15
Paraíba	19	16	45	9	5	0	12	8	2	2	6	1	4
Pernambuco	0	121	136	33	60	227	130	95	80	82	125	39	29
Alagoas	58	55	54	6	3	7	19	20	3	1	30	57	25
Sergipe	0	14	27	5	1	0	1	13	2	2	0	3	0
Bahia	29	53	101	44	7	30	35	43	17	6	26	27	26
Região Sudeste	428	247	161	173	193	359	346	330	198	320	487	269	243
Minas Gerais	108	96	65	32	30	53	63	59	45	40	85	74	22
Espírito Santo	86	68	32	46	96	173	101	58	48	83	73	33	13
Rio de Janeiro	129	16	8	7	10	46	69	44	14	45	77	20	27
São Paulo	105	67	56	88	57	87	113	169	91	152	252	142	181
Região Sul	2.007	491	242	96	186	159	357	273	196	233	336	204	143
Paraná	20	104	18	37	33	26	51	35	44	50	72	42	17
Santa Catarina	100	28	3	17	93	41	29	47	39	46	46	25	19
Rio Grande do Sul	122	84	3	42	60	92	277	191	113	137	218	137	107
Região Centro-Oeste	1.024	174	129	129	77	71	147	104	112	51	93	104	52
Mato Grosso do Sul	178	47	13	16	24	16	40	23	15	24	31	8	24
Mato Grosso	243	14	10	3	11	8	16	3	2	4	10	15	3
Goias	320	40	66	63	28	35	40	55	75	12	20	36	10
Distrito Federal	283	73	40	47	14	12	51	23	20	11	32	45	15
Brasil	4.097	1.670	1.454	883	749	1.033	1.339	1.269	790	870	1.427	979	605

Fonte: Sinan/SVS/MS - atualizado em 28/07/2022

Fonte: O Sistema de Informações de Mortalidade/Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2022

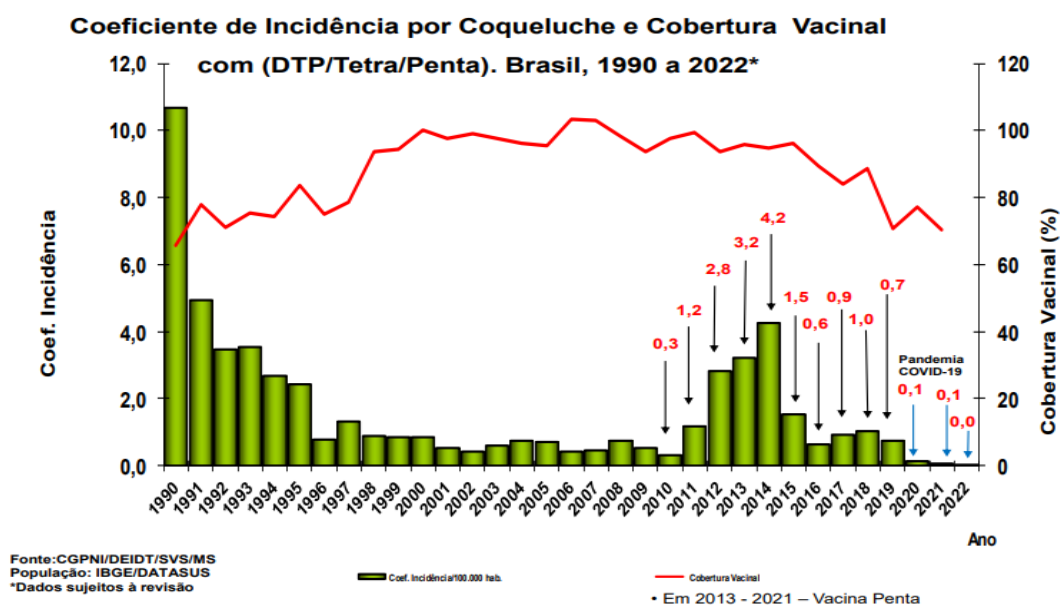
Figura 1 B - Casos confirmados de Coqueluche, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1998- 2022.

Região e UF	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Região Norte	99	311	355	482	237	102	97	81	74	16	9	3
Rondônia	24	6	49	78	27	7	6	5	4	1	0	1
Acre	14	4	3	80	16	0	6	3	3	0	0	0
Amazonas	33	192	143	69	115	63	42	17	14	4	2	1
Roraima	6	7	18	10	6	7	21	5	21	0	0	0
Pará	18	72	81	103	26	4	4	32	18	5	3	0
Amapá	1	19	41	48	5	5	7	2	0	0	1	0
Tocantins	3	11	20	94	42	16	12	17	11	6	2	1
Região Nordeste	426	684	1.035	2.937	964	334	395	685	761	82	68	48
Maranhão	33	34	34	156	79	11	14	26	23	2	1	1
Piauí	0	6	98	364	151	31	30	27	32	2	0	0
Ceará	26	41	35	184	68	15	20	15	39	16	0	1
Rio Grande do Norte	66	146	111	95	68	30	15	22	31	4	2	4
Paraíba	4	12	35	56	18	0	9	2	4	0	1	0
Pernambuco	84	263	174	1.222	410	194	253	406	528	47	49	23
Alagoas	30	33	193	221	34	19	14	36	23	1	3	6
Sergipe	5	3	11	20	4	0	3	3	1	0	0	1
Bahia	178	146	344	619	132	34	37	148	80	10	12	12
Região Sudeste	1.272	2.718	3.352	2.916	1.072	558	735	805	433	87	42	26
Minas Gerais	81	309	480	360	257	112	181	233	183	27	15	8
Espírito Santo	98	1.109	1.104	285	167	106	92	73	27	6	0	1
Rio de Janeiro	176	258	155	111	91	79	50	40	50	15	7	3
São Paulo	917	1.042	1.613	2.160	557	261	412	459	173	39	20	14
Região Sul	380	1.476	1.261	1.475	541	274	590	417	197	44	27	27
Paraná	175	399	528	972	296	118	150	178	101	26	10	4
Santa Catarina	55	305	216	244	117	46	129	71	31	8	4	4
Rio Grande do Sul	150	772	517	259	128	110	320	168	65	10	13	19
Região Centro-Oeste	71	259	404	604	295	62	81	176	101	14	11	9
Mato Grosso do Sul	40	94	130	181	54	6	18	37	5	4	0	0
Mato Grosso	0	23	88	160	72	17	6	31	11	3	0	3
Goias	7	80	123	220	71	8	22	32	31	2	3	3
Distrito Federal	24	62	123	243	99	31	35	76	54	5	8	3
Brasil	2.248	5.448	6.467	8.614	3.110	1.330	1.898	2.184	1.563	243	156	113

Fonte: O Sistema de Informações de Mortalidade/Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2022

A figura 2 demonstra que no período de 1990 a julho de 2022 o coeficiente de incidência da coqueluche foi maior em 1990 com queda no período de 1991 a 1996 e aumento em 1997. A cobertura vacinal diminuiu a partir de 2018, de acordo com o boletim epidemiológico do ministério da saúde de 2018 a 2022 se deve-se a recusa as vacinas, devido a fatores econômicos, sociais, culturais, disponibilidade do imunobiológico, acessibilidade geográfica, capacidade de compreensão e acesso às informações em saúde resultando em não proteção coletiva promovendo a circulação de doenças imunopreveníveis.

Figura 2- Coeficiente de Incidência por Coqueluche e Cobertura Vacinal com (DTP/Tetra/Penta). Brasil, 1990 a 2022.



Fonte: Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações/ Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis/ Secretaria da Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde.

De acordo com a figura 3 a cobertura vacinal diminuiu a partir de 2018 com aumento de casos de coqueluche em indivíduos não vacinados, principalmente na faixa etária de menores de 2 meses e indivíduos com situação vacinal ignorada. Portanto esses dados ressaltam a importância da vacina como prevenção á coqueluche.

Figura 3 - Distribuição dos casos confirmados de coqueluche, segundo faixa etária e situação vacinal, Brasil, 2018 a 2021.

Distribuição dos casos confirmados de coqueluche, segundo faixa etária e situação vacinal, Brasil, 2018 a 2021*

Faixa etária	0D	1D	2D	3D	3D+1R	3D+2R	Ign/Branco	Total
<2 meses	406	16	2	2	1	4	109	540
2-3 meses	252	258	12	3	3	2	150	680
4-5 meses	51	122	105	6	0	0	111	395
6-11 meses	60	67	113	177	4	3	148	572
1-4 anos	31	65	53	219	190	19	210	787
5-9 anos	3	8	12	17	44	134	87	305
10-14 anos	5	4	12	19	51	129	95	315
15-19 anos	1	3	2	3	12	21	30	72
20+ anos	48	18	8	14	23	17	335	463
Total	857	561	319	460	328	329	1.275	4.129

Fonte: Sinan (atualizado em 30/8/2022).
 *Dados sujeitos a alteração.
 Legenda: D – dose R – reforço e Ign – Ignorado

Fonte: Sinan, 2022

4. Conclusão

As regiões no Brasil com maior número de casos confirmados de coqueluche no período de 1998 a novembro de 2022 foram respectivamente: região sudeste, região sul e a região norte.

A maior ocorrência de casos de coqueluche concentrou-se na faixa etária dos menores de 1 ano de idade, principalmente menores de 6 meses.

No Brasil a cobertura vacinal diminuiu a partir de 2018 com aumento de casos de coqueluche em indivíduos não vacinados, principalmente na faixa etária de menores de 2 meses e indivíduos com situação vacinal ignorada que ressaltam a importância da vacina em crianças, adultos, gestantes, profissionais de saúde e idosos como prevenção da doença.

Foi observado um decréscimo significativo da coqueluche no período 2020 a 2022 devido ao foco na assistência e prevenção da covid-19, situação que contribuiu para a diminuição do número de casos de doenças de transmissão respiratória.

A coqueluche ainda deve ser considerada uma doença de importância mundial em saúde pública, portanto devemos reforçar as ações de diagnóstico, prevenção e controle da doença.

Referências Bibliográficas

1- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico: Coqueluche no Brasil: análise da situação epidemiológica de 2010 a 2014**, v. 46, n. 39. 2015. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/coqueluche/arquivos/boletim-epidemiologico-da-coqueluche-brasil-2010-a-2014.pdf>. Acesso em: 03 out. 2022.

2- MACHADO, L. Z.; MARCON, C. E. M. Incidência de coqueluche em crianças menores de 1 ano e relação com a vacinação materna no Brasil, 2008 a 2018. **Epidemiologia e Serviços de Saúde: revista do SUS (RESS)**, Brasília, v. 31, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1590/S1679-49742022000100029>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ress/a/QwfrBxCKsLTyRVYgzKbmfGF/?lang=pt>. Acesso em: 03 out. 2022.

- 3- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe epidemiológico da coqueluche Brasil 2018 a 2019**. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/coqueluche/arquivos/informe_epidemiologico-da-coqueluche-brasil-2018-a-2019.pdf. Acesso em: 04 nov. 2022.
- 4- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde**: volume único [recurso eletrônico]/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 3ª. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 740 p. disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_3ed.pdf. Acesso em: 04 nov. 2022.
- 5- SOARES, J. S.; BRITO, L. C. F.; COÊLHO, M.B.; COSTA, R. K. E.; OLIVEIRA, E. H. Análise do perfil epidemiológico dos casos de coqueluche no estado do Piauí de 2013 a 2018. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, e39810211354, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i2.11354>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/11354>. Acesso em: 05 out. 2022.
- 6- Governo Do Estado De São Paulo. Secretaria De Estado Da Saúde. Coordenadoria De Controle De Doenças. Centro De Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac”/Divisão De Doenças De Transmissão Respiratória e Divisão de Imunização. **Informe Técnico**. Situação Epidemiológica Da Coqueluche, Cenário Global, novembro de 2011, São Paulo, Brasil. Disponível em: https://www.cvpvacinas.com.br/pdf/IF11_COQUELUCHE.pdf. Acesso em: 05 out. 2022.
- 7- FIGUEIREDO, B. Q.; ANDRADE, A. F.; OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, J. P.G.; FERREIRA, K. S.; SILVA, L. S.; SANTOS, M. C. T.; MARRA, M. S.; VALE, S. Diminuição de casos notificados de coqueluche em crianças brasileiras: reflexo do distanciamento social e suspensão das aulas devido à pandemia de Covid-19. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 11, p. e230101119631, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19631>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/19631>. Acesso em: 06 out. 2022.
- 8- HIDALGO, Neuma TR et al. **Manual de vigilância epidemiológica; coqueluche: normas e instruções 2000. 2001**. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/doc/2001/manu_coque.pdf. Acesso em 06 out.2022.
- 9- HOZBOR, D.; ULLOA-GUTIERREZ, R.; MARINO, C. et al. Pertussis in Latin America: Recent epidemiological data presented at the 2017 Global Pertussis Initiative meeting. **Vaccine**, v. 37, n. 36, p. 5414-5421. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.07.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X19308850?via%3Dihub>. Acesso em: 04 nov. 2022.
- 10- Divisão de Imunização. Centro de Vigilância Epidemiológica - “Prof Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil. Coberturas Vacinais de Rotina no Estado de São Paulo – 2013 a 2017. **BEPA**.

Boletim Epidemiológico Paulista, São Paulo, v. 15, n. 177, p.21-25, 2018. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/37943>. Acesso em 09 out.2022.

11- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da coqueluche no Brasil, 2018 a 2021 e semanas epidemiológicas de 1 a 32 de 2022. **Boletim Epidemiológico**, v. 53, n. 40, p. 31-46, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no40/view>. Acesso em: 04 nov. 2022.

MPOX: CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA

Marcela Oliveira de Toledo¹, Cinthya dos Santos Cirqueira², Amaro Nunes Duarte Neto², Thaís de Souza Lima²

¹Estudante do curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública- Programa de Imuno-histoquímica- CPA/NAP- IAL; E-mail: toledomah10@gmail.com

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

Resumo: A Monkeypox (MPOX) é uma doença febril e exantemática aguda, causada por um poxvírus pertencente à família Poxviridae. O primeiro caso foi relatado na África Ocidental e Central em 1971. Em 2003, houve um surto fora da África, e em maio de 2022 foi confirmado o primeiro caso do atual surto global. O presente estudo teve por objetivo realizar uma revisão bibliográfica visando, compreender os aspectos epidemiológicos e patológicos do MPOX. Foram selecionados artigos através das bases de dados PubMed, Science Direct e Web of Science. Entre os 250 artigos encontrados, 6 foram escolhidos e ajudaram na compreensão sobre o diagnóstico histopatológico, além de apontarem as perspectivas futuras para esse surto. Verificou-se que aumento da vigilância e detecção de casos são ferramentas essenciais para entender a epidemiologia dessa doença reemergente, assim como a contribuição das análises histopatológicas de necropsias, visando elucidar os mecanismos virais específicos e o comprometimento sistêmico pela infecção.

Palavras-chave: Autópsia; histologia

INTRODUÇÃO

A Monkeypox (MPOX) é uma doença febril e exantemática aguda, causada por um poxvírus pertencente à família Poxviridae, uma grande e diversificada família de vírus DNA de fita dupla, que se multiplica no citoplasma das células infectadas (ALAKUNLE *et al.*, 2020). É membro do gênero Orthopoxvirus, grupo que apresenta outros integrantes relevantes como o vírus da varíola (Smallpox), agente causador da varíola e o vírus *vaccinia* (vírus usado na vacina contra a varíola humana) (WEINSTEIN *et al.*, 2005).

O primeiro caso humano de MPOX na história médica foi relatado em 10 de setembro de 1970, em uma criança de nove meses, na República Democrática do Congo (RDC) desde então, o MPOX tornou-se endêmico em vários países africanos, principalmente na África Central e Ocidental (LIU *et al.*, 2022). Todos os casos na RDC ocorreram em áreas que fazem fronteira com florestas tropicais e pareciam estar associados ao contato com animais (WEINSTEIN *et al.*, 2005).

No verão de 2003, o MPOX foi identificado como a causa de um surto de varíola nos Estados Unidos (EUA), fato que representou a primeira ocorrência de MPOX fora da África. A maioria das pessoas infectadas adoeceu após o contato com cães-da-pradaria domesticados (WEINSTEIN *et al.*, 2005). Desde 2003, casos de MPOX foram relatados em vários países.

Em sete de maio de 2022, no Reino Unido, foi confirmado o 1º caso do atual surto

global de MPOX fora de áreas endêmicas. No Brasil, o primeiro caso ocorreu em nove de junho de 2022, registrado no estado de São Paulo (Brasil, 2022). No atual surto a transmissão ocorreu de pessoa para pessoa, sem ligação com viagens aos países endêmicos. Até o momento, as pesquisas não apontam a ocorrência de cadeias de transmissão conhecidas (DE BONA *et al.*, 2022).

Os dois meios possíveis de transmissão do MPOX são a transmissão animal-humano e a transmissão humano-humano. O contato com pele lesionada de uma pessoa infectada, gotículas respiratórias, contato com fluidos corporais, ambiente ou itens contaminados do paciente, foram associados à transmissão humano-humano (ALAKUNLE *et al.*, 2020).

Após um período de incubação de 10 a 14 dias, febre, mal-estar e linfadenopatia são observados, na maioria dos pacientes, antes do desenvolvimento de erupção cutânea (WEINSTEIN *et al.*, 2005). A lesão cutânea típica progride através de um estágio papular, vesicular, pustulosa e crostosa, durante um período de 14 a 21 dias, antes que a descamação da crosta deixe uma cicatriz despigmentada (GARNER, 2005). A MPOX é geralmente uma doença autolimitada que dura de 2 a 4 semanas, até que as lesões descamam, mas pode resultar em doença grave em crianças e pacientes com imunodeficiências (LIU *et al.*, 2022)

No atual surto, a maioria dos casos ocorreu em homens que se identificam como homens que fazem sexo com outros homens (HSH), com histórico de exposição durante a relação sexual. Acredita-se que a transmissão através do contato sexual, seja o principal fator do surto atual (CCD, 2022).

O diagnóstico laboratorial é feito por método molecular, que envolve o uso de PCR em tempo real (qRT-PCR). Como método alternativo, está disponível o exame histopatológico, com a pesquisa imuno-histoquímica, que permite a detecção do antígeno viral no tecido, distinguindo entre as infecções por poxvírus e herpes vírus, reservado para casos em que o diagnóstico diferencial é nebuloso, e com poucos relatos na literatura (ALAKUNLE *et al.*, 2020).

O único fármaco disponível para tratamento do MPOX é o Tecovirimat (comercializado como TPOXX, SIGA Technologies, USA), um antiviral que inibe a replicação do patógeno. Na última semana de agosto, o Brasil recebeu os primeiros antivirais para o tratamento sendo autorizado o uso compassivo em casos graves da doença (Brasil, 2022).

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo trata-se de uma revisão bibliográfica cujas bases de dados escolhidas para seleção de artigos foram, PubMed, Science Direct e Web of Science. As palavras-chave empregadas para a busca de estudos científicos originais foram “monkeypox”, “histology”, “histopathology”, “autopsy” com o propósito de ressaltar os principais dados epidemiológicos e histopatológicos da doença.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As doenças reemergentes indicam uma mudança no comportamento epidemiológico de doenças conhecidas, que haviam sido contidas, mas que voltaram a configurar ameaça a saúde humana, como por exemplo, o surto de MPOX em 2022 (DE BONA *et al.*, 2022).

Através da pesquisa dentro da base de dados PubMed, utilizando as palavras chaves

“monkeypox”, “histology”, “histopathology”, “autopsy”, foram encontrados 250 artigos. Os abstracts dos artigos foram examinados e seis artigos foram selecionados, pois se enquadravam como artigos originais sobre a histopatologia do MPOX, descrevendo a patologia da doença ocorrida durante o atual surto e epidemias anteriores, em diferentes regiões do mundo, conforme quadro 1.

Quadro 1 - Achados histológicos descritos na literatura selecionada

Autor (es); País Mês Ano	Nº casos	Órgão	Achados histológicos	IHQ
Stagles, M. J. <i>et. al.</i> Reino Unido 1985	1	Pele (Necropsia)	<ul style="list-style-type: none"> •Necrose epidérmica e necrose celular individual • Acantose • Infiltração de polimorfos de neutrófilos • Presença de células gigantes multinucleares • Infiltração leve de pequenos linfócitos ocorreu nas glândulas sudoríparas • Corpos semelhantes aos corpos de Guarnieri estavam presentes no citoplasma das células 	Não utilizou a IHQ
Garner EUA 2005	2	Pele (biópsia)	<ul style="list-style-type: none"> •Degeneração balonizada dos queratinócitos basais, •Inclusões citoplasmáticas eosinofílicas, •Necrose da epiderme com espongirose, células inflamatórias mistas de liquenóides, •Exibe exocitose de linfócitos, neutrófilos e restos neutrofílicos. •Necrose de queratinócitos, Inflamação dos plexos vasculares superficiais e profundos, •Efeito citopático viral é manifestado por queratinócitos sinciciais multinucleados 	<ul style="list-style-type: none"> •Anticorpo policlonal anti-vaccinia (ViroStat) •Método de polímero conjugado com peroxidase (EnVision Dual Link) •Digestão enzimática com proteinase K (Dako Cytomation) durante 5 minutos •Visualizado com 3,30 diaminobenzidina, precipitado marrom no sítio do antígeno alvo
Khan <i>et al.</i> EUA 08/2022	1	Pele (biópsia)	<ul style="list-style-type: none"> •Necrose epidérmica focal de espessura total e vários queratinócitos multinucleados •Infiltrado inflamatório dérmico composto por linfócitos, neutrófilos e hemácias estendendo-se até a epiderme. 	Não utilizou a IHQ
Ramos Rodriz, Daniel <i>et al.</i> Espanha 09/2022	1	Pele (biópsia)	<ul style="list-style-type: none"> •Necrose de espessura total da epiderme, •Hiperplasia epidérmica com infiltrado neutrofílico, •Infiltrado inflamatório misto e edema dérmico •Degeneração balonizada de queratinócitos 	Não utilizou a IHQ

Chalal, Faris <i>et al.</i> França 11/2022	5	Pele (biópsia)	<ul style="list-style-type: none"> •Infiltrado inflamatório misto, corpos de inclusão intracitoplasmáticos homogêneos eosinofílicos em queratinócitosnecróticos, •Degeneração em balão de queratinócitos, •Dermatite de interface, exocitose de linfócitos e neutrófilos, •Na derme papilar infiltrado inflamatório polimorfo composto por abundantes neutrófilos e linfócitos •Acantose, dermatite deinterface e infiltrado linfocitário nodular dérmico. 	Não utilizou a IHQ
Marones, Carlo A. <i>et al.</i> Italia 11/2022	1	Pele (biópsia)	<ul style="list-style-type: none"> •Necrose epidérmica de espessura total com acantose adjacente e degeneração de queratinócitos •Exocitose de linfócitos, neutrófilos e raros eosinófilos •Processo inflamatório de espessura total infiltrado composto por linfócitos, neutrófilos e eosinófilos em distribuição periécrinae perivascular •Inclusões citoplasmáticas eosinofílicas (corpos de Guarnieri) 	<ul style="list-style-type: none"> •Anticorpo monoclonal anti-CD8 (DAKO) clon e C8/1 44B peroxidase,9200. •CD8 angiotropico+ células T colocalizadas com alterações citopáticas.

*IHQ: Imuno-histoquímica

A literatura apresenta poucos relatos sobre achados histológicos, o presente trabalho utilizou dois estudos de surtos anteriores, um ocorrido no Zaire, área endêmica no ano de 1985 e o outro nos estados unidos em 2005, os demais são relatos do atual surto.

Oito dos casos de biópsia de pele citados, foram em pacientes que se enquadram nas seguintes características: todos do sexo masculino que se identificaram como HSH. Já o artigo de Garner (2005) não menciona a opção sexual dos pacientes. O diagnóstico foi confirmado por meio de método molecular em todas as biópsias de pele, e apenas um paciente era HIV positivo. O artigo de Stangles (1985) relatou o caso de uma criança que morreu após uma doença de cinco dias, no Zaire. Foi o primeiro relato da histopatologia de uma lesão cutânea de MPOX no ser humano.

Em todos os casos citados e descritos, a apresentação clínica foi similar, todos tiveram lesões cutâneas vesicopustulosas típicas e linfadenopatia, somente um apresentou complicações graves ocasionando o óbito. No surto atual, uma característica comum entre os casos foi a localização das lesões, elas estão presentes em sua maioria na região genital e ânus, diferente dos relatos anteriores onde as lesões apareciam no rosto, na palma das mãos e na sola dos pés (PATEL *et al.*,2022)

Os achados histopatológicos foram homogêneos em vários pontos nos onze pacientes, demonstrando degeneração balonizada dos queratinócitos, queratinócitos necróticos, contendo corpos de inclusão eosinofílicos, esféricos, homogêneos, intracitoplasmáticos do tipo Guarnieri, presença de infiltrado inflamatório dérmico misto, às vezes, com eosinófilos e linfócitos profundos perivascularares.

A histopatologia em outros órgãos não foi relatada, apesar da literatura já descrever complicações clínicas desde os surtos anteriores a 2022, como o caso descrito por Stangles (1985), onde não ocorreu nenhuma investigação em outros órgãos para determinar a extensão da doença, seu comprometimento sistêmico e a possível causa do óbito.

Uma situação parecida ocorreu com Menezes *et al.* (2022) que relata a primeira morte por MPOX fora da área endêmica, que ocorreu no Brasil no final de julho de 2022. O homem de 41 anos, portador do vírus HIV e que se identificava HSH, relatou seu último

ciclo de quimioterapia em cinco de julho de 2022, para o tratamento de linfoma difuso de grandes células B com metástases na coluna, crânio e fígado (MENEZES *et al.*,2022). As primeiras lesões cutâneas surgiram na frente e rapidamente progrediu para o restante do corpo, o quadro clínico evoluiu rapidamente, o paciente desenvolveu repentinamente dificuldade respiratória grave, lesão renal aguda e falência múltipla de órgãos, sendo transferido para a unidade de terapia intensiva (UTI) onde faleceu (MENEZES *et al.*,2022).

As disfunções em múltiplos órgãos sugeriram que a causa mais provável da morte fosse sepse, mas não houve crescimento bacteriano em várias hemoculturas e o paciente estava sob antibioticoterapia de amplo espectro. Menezes *et al.* (2022) levantou outras hipóteses, incluindo um envolvimento visceral da doença e destacou como limitação a falta de uma necropsia. A realização de uma necropsia ajudaria a determinar até que ponto o MPOX afetou o organismo do paciente, determinando se a morte de fato foi causada por MPOX ou se o paciente foi a óbito, devido uma condição de saúde subjacente. Este unico artigo demonstra carencia de relatos investigativos acerca da causa das mortes, apontando como perspectivas futuras, a necessidade da ampliação de estudo anatomopatologico das necropsias para a contribuição da elucidação de obitos suspeitos por MPOX.

CONCLUSÃO

De acordo com esse trabalho podemos esclarecer que, o atual surto demonstra mudanças no padrão de transmissão, que antes eram em sua maioria por contato direto com animais e, agora os relatos são de transmissão humano-humano, através do contato com feridas infecciosas e fluidos corporais. Tendo em sua maioria, ocorrido na população HSH, apresentando comumente lesões na região genital, mostrando um padrão diferente dos casos típicos, em que as lesões estavam presentes na cabeça, palma das mãos e planta dos pés.

À luz do exposto, é possível inferir que a limitação do estudo está relacionada aos casos de óbitos por MPOX, nos dois artigos citados não ficou claro se a morte foi relacionada à infecção ou devido a outros agravos de saúde. Portanto, a causa primária da morte relacionada ao MPOX ainda não está clara, um aumento da vigilância e da caracterização minuciosa dos casos, será ferramenta essencial para entender a epidemiologia de doença, assim como análises histopatológicas de necropsias futuras são necessárias para elucidar o comportamento sistêmico do vírus.

REFERÊNCIAS

1. ALAKUNLE, Emmanuel *et al.* Monkeypox virus in Nigeria: infection biology, epidemiology, and evolution. **Viruses**, v. 12, n. 11, p. 1257, 2020.
2. WEINSTEIN, Robert A. *et al.* Reemergence of monkeypox: prevalence, diagnostics, and countermeasures. **Clinical infectious diseases**, v. 41, n. 12, p. 1765-1771, 2005.
3. LIU, Jun *et al.* Retrospective detection of monkeypox virus in the testes of nonhuman primate survivors. **Nature Microbiology**, p. 1-7, 2022
4. Brasil. Brasil confirma primeiro caso de monkeypox. **Ministério da Saúde**. Disponível em:<<https://www.gov.br/saude/ptbr/search?Searchabletext=monkeypox>>. Acesso em: 28 nov. 2022.
5. DE BONA SARTOR, Elisiane *et al.* Emergência e ressurgimento de doenças infecciosas: Os desafios das fronteiras sanitárias. **Visão Acadêmica**, v. 23, n. 3, 2022.
6. BAYER- GARNER, I. B. Monkeypox virus: histologic, immunohistochemical and

- electron- microscopic findings. **Journal of cutaneous pathology**, v. 32, n. 1, p. 28-34, 2005.
7. DE DOENÇAS, **Coordenadoria de Controle. MONKEYPOX-MPX.**
8. MARONESE, Carlo A. *et al.* Clinical, dermoscopic and histopathological findings in localized human monkeypox: a case from northern Italy. **The British journal of dermatology**, v. 187, n. 5, p. 822-823,2022.
9. KHAN, Samavia; RAZI, Shazli; RAO, Babar. It's here, monkeypox: A case report. **JAAD Case Reports**, v. 28, p. 61-63, 2022
10. CHALALI, Faris *et al.* Histological features associated with Human Monkeypox Virus Infection in 2022 outbreak in a non-endemic country.**Clinical Infectious Diseases**, 2022.
11. RAMOS- RODRÍGUEZ, Daniel *et al.* Dermoscopy of Monkeypox:histopathology and clinical correlation. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 2022.
12. STAGLES, M. J. *et al.* The histopathology and electron microscopy of a human monkeypox lesion. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 2, p. 192-202, 1985.
13. PATEL, Aatish *et al.* Clinical features and novel presentations of human monkeypox in a central London centre during the 2022 outbreak: descriptive case series. **bmj**, v. 378, 2022.
14. MENEZES, Yargos Rodrigues; MIRANDA, Alexandre Braga de. Severe disseminated clinical presentation of monkeypox virus infection in an immunosuppressed patient: first death report in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, 2022.

A INCIDÊNCIA DE DENGUE NO PERÍODO DE 2018 A 2021 NA REGIÃO DO VALE DO PARAÍBA LITORAL NORTE.

Alline Correa Leme França¹, Renato Pereira Souza²

¹Estudante do Curso de Especialização no Instituto Adolfo Lutz- Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP-Doutor Antônio Guilherme de Souza; E-mail: allinebiomedicina@hotmail.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Biologia Médica, Centro de Laboratórios Regionais CLR XII IAL Taubaté

RESUMO

A dengue é uma doença considerada pela Organização Mundial de Saúde como um dos principais problemas de saúde pública gerando uma demanda maior em atendimento no serviço público. Uma doença que acomete o Brasil e o mundo onde atinge zonas tropicais e subtropicais. Com a pandemia da COVID – 19, doença de caráter emergente causada pelo novo coronavírus denominado SARS-CoV-2, teve uma grande representatividade por ser um importante fator atual de pressão ao Sistema de Saúde, gerando assim uma subnotificação na captação de casos positivos de dengue na região do Vale do Paraíba Litoral Norte. A verificação do padrão de circulação do vírus da dengue, a correlação sazonal e o comparativo podem ter ocasionado um crescente nos casos positivos no período de 2018 até 2021 na região do Vale do Paraíba Litoral Norte.

Palavras-chave: Dengue, Vale do Paraíba Litoral Norte e COVID 19.

INTRODUÇÃO

Dengue é uma doença de grande relevância, especialmente nos países tropicais, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal mosquito vetor, afetando 50 a 80 milhões de pessoas. Conforme o Ministério da Saúde (MS) possui como aspectos epidemiológicos de uma doença febril aguda, de etiologia viral e de evolução benigna na forma clássica e grave quando se apresenta na forma hemorrágica. A dengue é considerada hoje a mais importante arbovirose (doença transmitida por artrópodes) que afeta o homem e constitui-se em sério problema de saúde pública no mundo, sendo assim, são vários fatores que colaboram para a ocorrência de uma epidemia de dengue em países tropicais e subtropicais, como no Brasil ocorre o aumento da

circulação do mosquito *Aedes aegypti* decorrente ao crescimento demográfico e a desordenada urbanização e a falta de adequação urbana (MENDONÇA, 2009).

De acordo com o Ministério da Saúde o agente etiológico do vírus da dengue é um arbovírus do gênero *Flavivírus*, pertencente à família *Flaviviridae*. Sendo conhecidos quatro sorotipos: 1, 2, 3 e 4. Os vetores são mosquitos do gênero *Aedes*. Nas Américas, a espécie *Aedes aegypti* é a responsável pela transmissão da dengue. O mundo presenciou uma pandemia pelo o vírus COVID-19, doença emergente causada pelo novo coronavírus denominado *SARS-CoV-2*, que provocou impactos significativos em todos os setores da sociedade, principalmente nos sistemas de saúde, pois à sua rápida disseminação por todos os continentes e sua capacidade de provocar óbitos em populações vulneráveis, devido à falta de conhecimento científico sobre o vírus, patogenia e tratamento; sobrecarregando ainda mais o sistema de saúde dos países afetados (MASCARENHAS, et. al., 2020)

Mascarenhas, et. al., e Mendonça, et. al., também relata que o impacto da COVID-19 no sistema público de saúde é muito perceptível pela elevada demanda por internação hospitalar, levando ao esgotamento da oferta de leitos de terapia intensiva e ventiladores pulmonares em algumas regiões do país. De acordo com Yan et. al., 2020 o COVID-19 e dengue possuem paridade clínicas e laboratoriais que foram observadas em pacientes infectados pelo *SARS-CoV-2* e diagnosticados com dengue, por meio de teste rápido, evoluíram para quadros clínicos mais graves, atrasando um tratamento eficaz. No Instituto Adolfo Lutz – Taubaté a técnica utilizada para diagnóstico é o método ELISA o princípio desse teste é uma detecção qualitativa de anticorpos IgM ao antígeno da dengue, para assim auxiliar no diagnóstico laboratorial clínico.

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi elaborado a partir do levantamento de dados epidemiológicos na base de dado do sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial – GAL, que tem por objetivo informatizar o Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública das Redes Nacionais de Laboratórios de Vigilância Epidemiológica e Vigilância em Saúde Ambiental, propiciando um gerenciamento das rotinas, e acompanhando as etapas para realização dos exames/ensaios e a obtenção de relatórios produção, epidemiológicos, analíticos nas redes estaduais de laboratórios de saúde pública.

Foram selecionados e contabilizados, como critérios de inclusão, resultados para dengue, em exames de sorologia ELISA, realizador nos anos de 2018 à 2021, onde foi

permitido o cálculo da Incidência de Dengue no referido período para a Região do Vale do Paraíba Litoral Norte. Foi utilizado como critério de exclusão os resultados não referentes a esse período, assim como testes que tinham como resultado em resposta inespecífica ou inconclusiva.

Foi analisada a incidência de casos positivos de dengue nos anos de 2018 até 2021, e um comparativo foi feito com dados mensais e anuais, com objetivo correlacionar a incidência de captação de casos positivos de dengue nos anos com a ocorrência concomitante de pandemia de COVID 19 em relação aos anos sem pandemia. Os dados foram coletados e analisados mensal e anual para observar os impactos sazonais para cada período do ano (verão, outono, inverno, primavera) e realizado um comparativo para investigar possível aumento ou diminuição de casos positivos.

Resultados

Após levantamento de dados realizado no período de 2018 até 2021 pelo o sistema GAL, foi possível analisar o total de casos regentes e o percentual de sua positividade, representatividade por 100 habitantes e a incidência por 100 habitantes durante esse período, onde foi observado que durante esses períodos ocorreu circulação do vírus.

Com base nesses dados foi possível analisar que no ano de 2018, a idade que mais foi acometida pelo vírus foram os indivíduos com idade de 31 anos, sendo que a idade menor é de 1 ano e a maior 90 anos. Sua representatividade pode ser analisada e foi observado que nos meses de janeiro, fevereiro, março e novembro houve um aumento na circulação do vírus, com isso seu índice de reagentes positivos e sua representatividade por 100 habitantes foi de 0,48%. Já sua representatividade foi de 3,64% e sua incidência média foi de 0,64%. Os casos positivos tiveram variações significativas durante o ano, uma variação ocorreu no mês de setembro que não houve nenhuma notificação de caso positivo para dengue sendo que existiu captação de 58 casos.

Já no ano de 2019, onde começou o período de pandemia do SARS-COV 2, alguns dados coletados mantiveram seus índices, onde foi possível analisar que a idade dos indivíduos acometidos continuou sendo adultos jovens com idade de 34 anos a mais acometida e, a idade menor é 0 ano já a maior de 93 anos. o índice de casos positivos e a sua representatividade é de 0,95%. A representatividade média por 100 habitantes é de 8,61% e a incidência média no ano de 2019 é de 2,97%. Os casos positivos no início de pandemia tiveram algumas variações significativas durante o ano, como no mês de agosto que houve

uma queda nos casos positivos com 15%, porém nos meses de abril 43,3%; maio 52,46% e junho 42,63% teve mais captação de casos positivos, com isso demonstrou uma alta em casos positivos.

Já em período de pandemia ano de 2020, com o levantamento de dados é possível analisar que a idade dos indivíduos acometidos permaneceu adultos jovens, agora com idade de 36 anos, sendo que a idade menor é 1 ano e a maior 94 anos. Através dos dados obtidos foi analisado que o índice de casos positivos e a sua representatividade no ano de 2020 é de 0,87%. Já a representatividade média por 100 habitantes é de 11,90%. Sendo que a incidência média no ano de 2020 é de 3,40%, e um pico de incidência no mês de fevereiro e março e uma queda nos meses de agosto, setembro, outubro, novembro e dezembro. Os casos positivos em período de pandemia tiveram algumas variações significativas durante o ano, como no mês de setembro que houve uma queda nos casos positivos totalizando 4,12%, porém nos meses de fevereiro 42,77%; maio 45,61% e junho 31,44% houve mais captação de casos positivos, com isso demonstrou uma alta em casos positivos.

Já período de pandemia no ano de 2021, foi possível analisar que a idade dos indivíduos acometidos permaneceu adultos jovens, com a idade de 37 anos, sendo que a idade menor é 1 ano e a maior 93 anos. O índice de casos positivos e a sua representatividade no ano de 2021 é de 0,99%. Já a representatividade média por 100 habitantes é de 4,37%, onde demonstra alta representatividade no mês de março e abril, já uma queda em julho, agosto e setembro. A incidência média no ano de 2021 é de 1,56%. No período de pandemia tiveram algumas variações significativas no ano de 2021, como no mês de setembro não houve nenhuma captação de caso positivo de dengue, porém nos meses de fevereiro 43,79%; março 47,61%, abril 49,48% e junho 31,44% houve mais captação de casos positivos, com isso demonstrou uma alta em casos positivos. É possível observar através do levantamento de dados que a equivalência de representatividade e a incidência se mantiveram durante esses anos, tanto em período pré-pandêmico, como pandêmico e pós-pandêmico.

DISCUSSÃO

Conforme a Organização Mundial da Saúde (2008) entre as doenças tropicais, a dengue tornou-se um problema de saúde pública. Pois diversos fatores cooperaram para a recorrência de uma epidemia de dengue nos países tropicais e subtropicais dentre eles destacam-se a proliferação do mosquito *Aedes aegypti*, o crescimento demográfico

desordenado de urbanização, a inadequação de infra-estrutura urbana, o aumento da produção de resíduos não-orgânicos e os modos de vida na cidade ((MENDONÇA, 2009).

De acordo com Borges (2021) a dengue é uma doença de importância pública, é também uma doença endêmica e se expandiu globalmente impulsionada pelas mudanças climáticas e pelo aumento da circulação de pessoas e da urbanização, além da insuficiência de programas de controle de vetores. Doença que apresenta com quadros que variam de assintomática até graves de hemorragia e choque, podendo levar ao óbito. O seu tratamento é baseado principalmente em seus sintomas, por não existir medicamento antiviral específico, com isso é ministrado analgésico e orientado para que o paciente faça reposição de líquidos.

Em 11 de março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) caracterizou o COVID-19 como uma pandemia, sendo assim, o enfrentamento da pandemia SARS-COV 2, pode ser observado uma queda nos registros de casos prováveis e óbitos de dengue. Portanto essa diminuição pode ser resultado de uma subnotificação ou atraso nas notificações das arboviroses associadas a mobilização das equipes de vigilância e assistência para o enfrentamento da pandemia e ao receio da população em procurar atendimento em uma unidade de saúde, conforme relata Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde.

Segundo Mascarenhas, *et. al* (2020) a COVID-19, doença de caráter emergente causada pelo novo coronavírus denominado SARS-CoV-2, resultou impactos em todos os setores da sociedade afetando principalmente os sistemas de saúde, pela à sua rápida disseminação por todos os continentes, com sua capacidade de provocar mortes em populações mais frágeis, pois a falta de conhecimento do vírus é um fator muito relevante. Entretanto, no Brasil. O Brasil tem enfrentado epidemias de dengue desde 1986, mas com o impacto da COVID-19 no sistema público de saúde teve uma perceptível elevada na demanda por internação hospitalar.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Porém, por intermédio do levantamento de dados realizado foi possível analisar que houve circulação do vírus no período pré-pandêmico, no período de pandemia e pós-pandemia, entre os anos de 2018 a 2021, sendo a idade mais afetada a de jovens adultos na faixa de 31 anos a 37 anos. O índice de positividade durante os anos houve variações assim como sua incidência e representatividade.

REFERÊNCIAS

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO - Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde 2 Volume 52 - Nº 10 - Mar. 2021

BORGES, G. B. C. H., ADATI, M. C., VIGO, D. C., MENDONÇA, V. F., ISSOBE, M. A., SANTOS, F. B., ZAMITH, H. P. S. Avaliação dos testes rápidos para diagnóstico da dengue no Brasil Evaluation of rapid diagnostic tests for dengue in Brazil, *Vigil. sanit. debate* 2021;9(1):82-90. Disponível: <https://doi.org/10.22239/2317-269x.01451>

MASCARENHAS, M. D. M., BATISTA, F. M. A., RODRIGUES, M. T. P., BARBOSA, MENDONÇA, F. A., SOUZA A. V., DUTRA D. A. SAÚDE PÚBLICA, URBANIZAÇÃO E DENGUE NO BRASIL Public health, urbanization and dengue's fever in Brazil *Sociedade & Natureza, Uberlândia*, 21 (3): 257-269, dez. 2009

MENDONÇA, F. A., SOUZA A. V., DUTRA D. A. Public health, urbanization and dengue's fever in Brazil. *Sociedade & Natureza, Uberlândia*, 21 (3): 257-269, dez. 2009.

RESPOSTA SOROLÓGICA EM PVHIV E INDIVÍDUOS SEM HIV VACINADOS CONTRA O SARS-CoV-2

Larissa Schneider Cafardo¹; Marisa Ailin Hong²; Luis Fernando de Macedo
Brigido³

¹Estudante do Curso de especialização - CIM – IAL; E-mail:
cafardolarissa@gmail.com

²Docente/pesquisador do Depto de Imunologia – CIM – IAL

³Docente/pesquisador do Depto de Virologia – NDSS – IAL

Resumo: Os impactos causados pela pandemia de COVID-19 levou cientistas do mundo inteiro a buscar métodos terapêuticos e preventivos que fossem eficazes no tratamento de indivíduos infectados e na redução da transmissão do SARS-CoV-2. A maioria das pessoas infectadas com SARS-CoV-2 desenvolveu sintomas clínicos leves, embora casos clínicos moderados e graves tenham sido observados com maior frequência entre indivíduos com comorbidades e idosos, com maior taxa de mortalidade. As comorbidades mais comumente observadas são doenças respiratórias, cardiovasculares, diabetes e imunodeficiências, entre as quais está a infecção pelo HIV. O HIV causa, entre outras alterações, um esgotamento generalizado do sistema imunológico, o que explica a fraca resposta imune à vacinação, como observado para hepatite B e influenza, por exemplo. Para as vacinas SARS-CoV-2, pouco foi relatado sobre a resposta sorológica desses pacientes com HIV. Esse estudo tem como objetivo avaliar o grau de resposta específica contra o RBD da proteína SARS-CoV-2 Spike em pacientes HIV(+) diante da vacinação com produtos disponíveis comercialmente, avaliando a produção de anticorpos e a força de ligação destes anticorpos à proteína RBD (avidez). Para tanto, utilizamos um ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) específico para anticorpos IgG contra a RBD e realizamos a semiquantificação de amostras de soro dos voluntários e avaliação de avidez. Observou-se que não há diferença significativa na resposta produzida por PVHIV e o grupo controle, apesar de PVHIV apresentarem queda no nível do índice ELISA e avidez, ambos produziram anticorpos com alto nível de avidez, principalmente após a dose de reforço com a vacina Pfizer.

Palavras-chave: COVID-19; HIV; SARS-CoV-2; vacina

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, foram reportados à Organização Mundial de Saúde (OMS) diversos casos de pneumonia de etiologia desconhecida na cidade de Wuhan, China. Logo foi identificado que se tratava de uma doença causada por um novo coronavírus, o SARS-CoV-2 (WHO, 2020). Esse novo vírus demonstrou possuir uma rápida capacidade de transmissão e, em 11 de março de 2020, a OMS declarou pandemia pelo novo coronavírus (ORGANIZAÇÃO, 2020).

Os impactos causados pela pandemia, levou cientistas do mundo inteiro a se dedicarem a produzir vacinas eficientes para combater o SARS-CoV-2 (SILVA, 2020). Atualmente, existem quatro vacinas contra a COVID-19 no Brasil com autorização de uso pela ANVISA, sendo uma com autorização para uso emergencial (CoronaVac/Butantan), e três com registro definitivo (AstraZeneca/Fiocruz, Pfizer/Wyeth e Janssen/Johnson&Johnson). As vacinas AstraZeneca e CoronaVac estão em uso desde o início da Campanha Nacional de Vacinação contra a COVID-19 no Brasil, no dia 17 de janeiro de 2021 (MINISTÉRIO, 2022).

A vacina é uma ferramenta de extrema importância na saúde pública, contribuindo com a prevenção e minimização da disseminação de diversas doenças, inclusive da COVID-19. Diversos estudos foram realizados para avaliar os efeitos das vacinas na redução da infecção por SARS-CoV-2. Um desses estudos, realizado em Israel, demonstrou que trabalhadores da saúde que receberam pelo menos uma dose da vacina Pfizer, tiveram uma redução na taxa de infecção de 30% entre 1 e 14 dias e 75% entre 14 e 28 dias após a vacina. Esse mesmo estudo demonstrou ainda que houve uma redução de 47% no período de 1 a 14 dias, e 85% no período de 15 a 28 dias na taxa de casos de COVID sintomática (AMIT, 2021).

Cerca de 50% dos infectados são assintomáticos (ORAN, 2021), ou apresentam sintomas leves como tosse, febre, fadiga e dor de garganta, porém em uma pequena parcela da população, os sintomas podem se agravar podendo levar a óbito. As pessoas mais suscetíveis a desenvolverem a forma mais grave da doença são indivíduos que possuem alguma comorbidade, principalmente asma, câncer, doença cerebrovascular, doença renal crônica, doenças pulmonares crônicas, doenças hepáticas crônicas, fibrose cística, diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2, deficiências, condições cardíacas, HIV, e outras (SERVIÇO, 2022), sendo que mais de 81% das mortes por COVID-19 ocorrem em pessoas com mais de 65 anos (CDC, 2022).

Uma revisão sistemática que selecionou estudos da América do Norte, África, Europa e Ásia analisou a susceptibilidade de infecção ao SARS-CoV-2 e o risco de internação em pessoas vivendo com HIV, e foi constatado que o HIV foi associado a um risco significativamente maior de infecção e um maior risco de mortalidade por COVID-19 (SSENTONGO, 2021). No Brasil, um estudo realizado no estado do Espírito Santo analisou o perfil de internação no ano de 2020, e dentre as morbidades apresentadas pelos pacientes a infecção pelo vírus HIV, neoplasias e doenças renais, foram associadas a maiores riscos de óbito por COVID-19 (MASCARELLO, 2021).

Indivíduos com HIV apresentam uma imunodeficiência que afeta a resposta celular e humoral frente a infecções oportunistas e a produção de anticorpos em nível protetor nas vacinas de hepatite B e Influenza. Portanto é de extrema relevância entender o nível de resposta desses indivíduos frente às vacinas que protegem contra o SARS-CoV-2, considerando o cenário atual.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa caso-controle que visa analisar os níveis e a avidéz dos anticorpos anti-RBD em PVHIV(Pessoas Vivendo com HIV) e indivíduos sem HIV. Para isso, foram selecionados 75 pacientes do Centro Médico de Especialidades (CME) de Santo André com diagnóstico confirmado de HIV, vacinados com pelo menos uma dose da vacina AstraZeneca ou CoronaVac. O grupo controle é composto por 177 profissionais da saúde,

que tenham tomado pelo menos uma dose da vacina AstraZeneca ou CoronaVac. Essas amostras de soro foram coletadas entre os anos 2020-2022 e armazenadas a temperatura de -20°C. O estudo foi aprovado pelos comitês científicos (CTC-IAL no. 39-M/2020) e de ética (CAAE no. 43250620.4.1001.0059).

Os critérios de exclusão foram: Ter tomado como primeira e segunda dose qualquer vacina que não AstraZeneca ou CoronaVac; ter tomado dose de reforço que não seja Pfizer; ter tomado a segunda dose de reforço; pessoas menores de 18 anos, não ter tomado a 2ª dose da vacina; não ter dados completos sobre o esquema vacinal.

Os controles positivos utilizados são pools de amostras sabidamente positivas, previamente testadas para anti-RBD provenientes de pacientes com diagnóstico de COVID-19 definido por teste de PCR ou pela clínica apresentada pelo paciente, e os controles negativos são um pool de amostras coletadas anteriores a 2019, quando o SARS-CoV-2 ainda não era circulante.

O protocolo utilizado foi ELISA *in house* para detecção de anticorpos humanos contra o domínio RBD da proteína Spike do SARS-CoV-2 (MOURA, 2021).

Placas de ELISA *flat well* (Nunc MaxiSorp™) foram sensibilizadas com antígeno RBD na concentração 2,5µg/ml diluído em PBS, à temperatura de 4°C *overnight* (16-18 horas). Na manhã seguinte, as placas foram lavadas 5 vezes com solução de PBS-0,01% *tween* na lavadora de microplacas ELISA Kasuaki™ e foi adicionado a solução de bloqueio a 5% de leite desnatado MOLICO™ diluído em PBS-T, e incubado por 2 horas.

As amostras foram diluídas em PBS-T com 1% de leite desnatado MOLICO™, utilizando a placa *deep well* em diluição 1/100. As placas foram lavadas com PBS-T e foi adicionado as amostras diluídas e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente (~21°C), após esse período as placas foram lavadas.

Após lavagem, foi adicionado a solução de conjugado anti-IgG humano de cabra conjugado a peroxidase de rábano (HRP) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) diluído 1/5.000 em PBS-T e as placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram lavadas após esse período, e foi adicionada a solução One Step-TMB® (Scienco, Santa Catarina, Brasil) e mantido em ambiente escuro por 15 minutos. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico a 2N e realizada a leitura em espectrofômetro utilizando filtro de 450 nm.

Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE), calculado utilizando a fórmula $IE = \text{densidade óptica (DO) da amostra} / \text{cut-off}$. Sendo o cut-off o valor de corte determinado pela densidade óptica do controle negativo + 3 desvios padrão + 0,103 (fator de correção) (MOURA, 2021).

Para avaliação da avidéz dos anticorpos anti-RBD presentes nas amostras avaliadas no ELISA, as mesmas foram submetidas ao agente caotrópico Tiocianato de Potássio [46], na concentração de 1,5M. Seguindo o protocolo de ELISA-RBD descrito acima, foi acrescentada uma etapa extra após a incubação do soro diluído, adicionando-se tiocianato de potássio 1,5M nas amostras pareadas e incubadas pelo período de 20 minutos. Em seguida, foi realizada a lavagem da placa, acrescentado o conjugado anti IgG humano – HRP e incubado por 1 hora em temperatura ambiente.

A avidéz, expressa em porcentagem, foi avaliada utilizando-se a fórmula: Índice de avidéz (IA)% = valor médio da DO da amostra tratada com tiocianato de potássio / valor médio da DO da amostra não tratada multiplicado por 100 (MOURA, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliadas amostras de 252 voluntários, sendo 75 indivíduos que vivem com HIV (PVHIV) e 177 profissionais da saúde que se autodeclararam HIV soronegativos, de acordo com os dados constantes na ficha de admissão no estudo. Todos os voluntários receberam uma dose de reforço da vacina da Pfizer. Foram coletadas 201 amostras de soro, das quais 46 de PVHIV após duas doses de vacina, e 191 amostras de soro, das quais 48 de PVHIV após três doses de vacina.

Todas as pessoas infectadas com HIV neste estudo são atendidas no Centro Médico de Especialidades (CME) de Santo André, com 10 pacientes com CD4 menor que 350 cels/ μ l, e 6 pacientes com carga viral detectável, além disso, todos estão em tratamento com TARV por pelo menos 1 ano (média de 7 anos).

Anticorpos anti-RBD foram detectados em 93,6% das amostras de PVHIV e em 75,5% das amostras provenientes dos profissionais da saúde. Do total de 392 amostras analisadas, 79,84% apresentaram anticorpos IgG específicos para RBD.

Nesse estudo avaliamos os anticorpos de PVHIV vacinadas contra o vírus SARS-CoV-2 responsável pela atual pandemia. Com duas doses de vacina observamos que PVHIV tiveram a produção de anticorpos em 93,61% das amostras, representando um alto nível de soroconversão. E com a dose de reforço, essa taxa subiu para 100%. Outros estudos já demonstraram que PVHIV apresenta uma alta taxa de soroconversão em relação às vacinas contra SARS-Cov-2, uma revisão sistemática que incluiu 28 artigos diferentes, demonstrou que no geral, a taxa de soroconversão foi acima de 85%, corroborando os resultados obtidos (CHUN, 2022).

As pessoas HIV positivas avaliadas nesse estudo possuem valores de CD4+ altos e carga viral controlada, o que pode explicar o alto nível de soroconversão e a alta resposta sorológica às vacinas. No próprio manual do Ministério da Saúde (PCDT), diz que PVHIV que realizam o tratamento com TARV de forma correta com um nível controlado de carga viral e CD4+ acima de 350 cels/mm³ não possuem imunodeficiência em um nível grave, não afetando o esquema vacinal, com exceção da administração de vacina contra hepatite B (MINISTÉRIO, 2018).

Curiosamente, o grupo PVHIV apresentou índice ELISA maior que os profissionais da saúde, 3,02 e 5,98, respectivamente, sendo observada uma diferença significativa ($p=0,01$, teste Mann-Whitney) comparando PVHIV e profissionais da saúde que tomaram vacina AstraZeneca. O período entre a aplicação da vacina e a coleta da amostra de soro dos pacientes foi bem divergente, o que pode refletir nos valores de Índice ELISA entre PVHIV e profissionais da saúde, sendo 84 dias e 205 dias de coleta após a 2ª dose da vacina, respectivamente. Um estudo realizado pela Fiocruz de Minas Gerais que acompanhou uma coorte de 1587 pessoas que tomaram a vacina CoronaVac observou que 91 dias após a 2ª dose da vacina houve uma queda significativa nos níveis de anticorpos, baixando de 98% para 65% entre 91-180 dias (MAILA, 2022).

Quando calculamos a diferença dos níveis de anticorpos antes e após a dose de reforço, valor que chamamos de delta, observamos que os profissionais de saúde tiveram um aumento significativo comparado aos PVHIV ($p=0,0016$), com diminuição do Índice ELISA entre os PVHIV, enquanto no grupo de profissionais da saúde o Índice ELISA foi aumentado. Quando analisamos esses resultados, vimos que 6 amostras dos 38 pacientes do grupo de PVHIV apresentaram uma queda na resposta, enquanto que de 141 voluntários

profissionais da saúde, nenhum apresentou perda na resposta, e ao analisar esses resultados na tabela de contingência 2x2, obtemos um valor de $P=0,00006$, esses valores sugerem que PVHIV podem ter uma maior dificuldade de manter seus anticorpos circulantes por grandes períodos de tempo, mesmo após o estímulo ao sistema imunológico da dose de reforço.

Em relação à avidéz, ambos os grupos PVHIV e profissionais da saúde apresentaram altos níveis de avidéz. Porém ao comparar a diferença na avidéz antes e após a dose de reforço, delta, observamos que os profissionais da saúde tiveram um aumento significativo comparados aos PVHIV ($P=0,001$) com diminuição da avidéz entre os PVHIV e aumento entre os profissionais da saúde.

É importante ressaltar que as condições no esquema vacinal entre os dois grupos foram diferentes. Mesmo sem a orientação de nenhum órgão da saúde, 25 PVHIV tomaram a dose de reforço de forma antecipada, menos de 90 dias após a segunda dose, na teoria isso implicaria principalmente em um grande aumento no título de anticorpos desses pacientes, pois tiveram dois estímulos seguidos no sistema imunológico, porém, esse grupo que tomou a vacina de forma adiantada não apresentou diferença nos valores de IE e avidéz. Outro fator que pode influenciar nessa diferença nos títulos de anticorpos, é que a maioria das pessoas com HIV tomaram AstraZeneca ao invés de CoronaVac, e conforme estudos realizados anteriormente, a resposta sorológica da CoronaVac para a proteína S é muito menor do que a da AstraZeneca (PAULA, N. M.). Na outra via, a maioria dos profissionais da saúde tomaram CoronaVac, impactando diretamente nas respostas sorológicas e mesmo com essa divergência, os profissionais da saúde tiveram um aumento na resposta vacinal após a dose de reforço com a Pfizer, enquanto PVHIV tiveram uma redução na resposta.

CONCLUSÕES

Em conclusão, ambos os grupos produziram anticorpos não sendo observada nenhuma diferença significativa nos valores de índice ELISA, além disso, os anticorpos apresentaram uma boa avidéz. Ademais, a vacinação induziu a soroconversão em mais de 90% dos pacientes.

Esse resultado indica que a infecção pelo vírus HIV não impacta na produção de anticorpos anti-RBD e nem em sua avidéz.

Outro achado importante foi a indução de anticorpos anti-RBD nos diferentes produtos de vacina. Pacientes que receberam CoronaVac tiveram um valor de Índice ELISA muito menor do que os que receberam AstraZeneca, isso pode ter influenciado diretamente no nível de soroconversão entre os dois grupos, por conta disso, seria interessante a realização de um estudo com uma amostragem maior para se fazer uma avaliação mais abrangente.

REFERÊNCIAS

AMIT, S. et al. Early rate reductions of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 in BNT162b2 vaccine recipients. **The Lancet**, v. 397, n. 10277, p. 875-877, 2021.

CDC. People with Certain Medical Conditions. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html>. Acesso em: 14 nov. 2022

- CHUN, H. M. et al. A Systematic Review of COVID-19 Vaccine Antibody Responses in People With HIV. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2022. p. ofac579.
- MAILA, K. Covid-19: Pesquisa avalia resposta gerada por vacinas ao longo de um ano. **Fiocruz**. 2022. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/covid-19-pesquisa-avalia-resposta-gerada-por-vacinas-ao-longo-de-um-ano>. Acesso em: 30 nov. 2022.
- MASCARELLO, K. C. et al. Hospitalização e morte por covid-19 e sua relação com determinantes sociais da saúde e morbidades no Espírito Santo: um estudo transversal. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 30, 2021.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Plano nacional de operacionalização da vacinação contra a COVID-19. maio 2022. p. 12. Disponível em: <https://sbim.org.br/images/files/notas-tecnicas/pno-13edicao-230522.pdf> Acesso em: 23 ago. 2022
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. PCDT. 2018
- MOURA, A. D. et al. Assessment of avidity related to IgG subclasses in SARS-CoV-2 Brazilian infected patients. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.
- ORAN, D. P.; TOPOL, E. J. The proportion of SARS-CoV-2 infections that are asymptomatic: a systematic review. **Annals of internal medicine**, v. 174, n. 5, p. 655-662, 2021.
- ORGANIZAÇÃO Mundial de Saúde declara pandemia do novo Coronavírus. **UNASUS**, 11 mar. 2020. Disponível em: <https://www.unasus.gov.br/noticia/organizacao-mundial-de-saude-declara-pandemia-de-coronavirus> Acesso em: 15 ago. 2022
- PAULA, N. M. et al. Population-Based Analysis of the Immunoglobulin G Response to Different COVID-19 Vaccines in Brazil. **Vaccines**, v. 11, n. 1, p. 21, 2022.
- SILVA, L. O. P. da; NOGUEIRA, J. M. da R. A corrida pela vacina em tempos de pandemia: a necessidade da imunização contra a COVID-19. **RBAC**, v. 52, n. 2, p. 149-53, 2020.
- SERVIÇO DE CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR. Manejo Coronavírus (COVID-19). [S. l.], 31 out. 2022. Disponível em: <https://medicalsuite.einstein.br/pratica-medica/Documentos%20Doencas%20Epidemicas/Manejo-de-casos-suspeitos-de-sindrome-respiratoria-pelo-COVID-19.pdf> Acesso em: 10 nov. 2022
- SSENTONGO, P. et al. Epidemiology and outcomes of COVID-19 in HIV-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.
- WHO. Pneumonia of unknown cause. **World Health Organization**, 5 jan. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2020-DON229> Acesso em: 15 ago. 2022

COMPARAÇÃO DA DETECÇÃO DO SARS-COV-2 EM AMOSTRAS DE GARGAREJO COM E SEM EXTRAÇÃO DE RNA E COM A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA GENEXPERT

Rebeca Castro Malfatti Barbosa de Oliveira¹ Andréia Moreira dos Santos Carmo²

¹Estudante do Curso de Pós Graduação *lato sensu* em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – Vigilância Epidemiológica – CRL IAL de Santo André; e-mail: rebecamalfatti@gmail.com

²Docente e Pesquisadora do Núcleo de Ciências Biomédicas – CRL IAL de Santo André

Resumo:

A Organização Mundial da Saúde decretou pandemia da COVID-19 em 11 de março de 2020. A partir deste momento, foi recomendado o diagnóstico molecular por RT-qPCR para detecção de segmentos alvos do genoma viral que codificam regiões conservadas nos coronavírus e específicas para o SARS-CoV-2, a partir de amostras de swab naso/orofaríngeo. O objetivo deste estudo é avaliar a concordância entre os resultados de detecção do SARS-CoV-2 na rotina diagnóstica e o teste XpertXpress® SARS-CoV-2 em amostras de gargarejo com solução fisiológica e avaliar a possibilidade de amplificação direta do RNA viral, sem a etapa de extração, para então apresentar uma proposta de liberação rápida dos resultados com a utilização de amostras mais simples de serem obtidas e com menor risco biológico aos profissionais envolvidos.

O estudo ocorreu no Centro de Laboratório Regional de Santo André do Instituto Adolfo Lutz, utilizando 69 amostras de gargarejo com soro fisiológico 0,9% estéril, para detecção direta, destas, 58 amostras foram utilizadas para a metodologia utilizando o sistema do GeneXpert, armazenadas sob congelamento e provenientes da testagem de profissionais de saúde do laboratório e do GVE VII, testamos tais métodos e os resultados foram comparados aos da metodologia padrão ouro.

Foi possível perceber que a maioria dos resultados obtidos na detecção direta (sem extração de RNA) dos genes E e N de SARS-CoV-2 em gargarejo corresponderam aos resultados esperados (com extração). E os resultados obtidos no sistema GeneXpert obtiveram correlação positiva ao comparar ao padrão ouro, superior até, a metodologia sem extração. O tempo de liberação dos resultados no sistema GeneXpert foi 2,3 vezes menor que o RT-qPCR utilizado na rotina diagnóstica da COVID-19, com liberação de 4 testes a cada 50 minutos. A proposta de utilização do gargarejo pode ampliar o portfólio de amostras a serem utilizadas no teste Xpert Xpress® SARS-CoV-2. Concluímos que amostras de gargarejo podem ser utilizadas como amostras alternativas à secreção nasofaríngea utilizando o teste XpertXpress® SARS-CoV-2.

Palavras-chave: SARS-CoV-2; Coronavírus; Diagnóstico Laboratorial; RT-PCR; Biologia Molecular

INTRODUÇÃO

O vírus SARS-CoV-2 é o nome do agente causador doença nomeada COVID-19. Este nome é derivado de *Coronavirus disease* a Doença do Coronavírus e “19” referente ao ano de surgimento dos primeiros casos na China, especificamente em Wuhan, divulgado ao final do mês de dezembro de 2019. Posteriormente, ao se espalhar para outros continentes, foi decretado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020, oficialmente como pandemia. É um vírus do tipo RNA, de fita simples com cerca de 30.000 bases, de polaridade positiva, envelopado, esférico e com espículas em sua superfície. Pertence a família *Coronaviridae*, conhecida desde 1960 (MALFATTI, 2020). O envelope do SARS-CoV-2 consiste em uma camada bilipídica onde estão ancoradas as proteínas estruturais de envelope (E), membrana (M), e as espículas (S, spikes), além de uma proteína menor de superfície chamada hemaglutinina esterase (HE). A glicoproteína S é composta por duas subunidades funcionais S1 e S2, sendo a S1 responsável pela ligação do vírus às células do hospedeiro através de uma região denominada *receptor-binding domain* (RBD) que se liga ao receptor *angiotensin-converting enzyme 1* (ACE-1), e a S2, pela fusão, e no interior do vírus há um nucleocapsídeo (N) que protege o RNA genômico (SBAC, 2022). O SARS-CoV-2 apresenta mutações genéticas diversas, alterando a sua virulência em hospedeiros humanos (MALFATTI, 2020).

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 69 amostras de gargarejo de profissionais sintomáticos do CLR IAL de Santo André VIII e GVE VII. O diagnóstico primeiramente foi realizado pelo método padrão ouro, extração foi realizada pela plataforma automatizada Maelstrom™ 9600 (TANbead e pra à amplificação foi utilizado o *kit Allplex™ SARS-CoV-2 Assay* e qPCR QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific).

Na primeira metodologia aqui apresentada, estas amostras foram retestadas sem a etapa de extração. Neste caso, estas foram descongeladas a temperatura ambiente por 10 minutos, 30 µL de cada amostra foi adicionada à microtubos livres de nucleasse, incubados a 95°C por 30 min e posteriormente submetidos a concentração por centrifugação á 8000 rpm por 1 min em centrífuga de microtubos, 10 µL da amostra foi utilizado para o ensaio de qPCR.

Para a realização da segunda metodologia aqui apresentada, o teste XpertXpress® SARS-CoV-2, pela plataforma Genexpert (Cepheid), as amostras não passaram por nenhum preparo prévio, a não ser o descongelamento. A amostra foi cuidadosamente homegeneizada, evitando-se a formação de bolhas e, após a abertura da tampa do cartucho, um volume de 300 µL foi adicionada à “câmara de amostra” utilizando uma pipeta Pasteur que já vem incluída no *kit* (**Figura 1**). O cartucho foi fechado firmemente e inserido no equipamento, foi dado o comando de “iniciar teste” e aguardou-se a liberação dos resultados pela detecção ou não dos genes E e N2 de SARS-CoV-2.



Figura 1. Fluxograma de realização do teste XpertXpress® SARS-CoV-2
 Fonte: Autoria Própria - CANVA. Disponível em: <<https://www.canva.com/>>.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados dos Ct (*Cycle Threshold*), construímos Gráficos de Pearson que nos auxiliou a verificar a correlação positiva entre as metodologias com e sem extração de RNA viral. Houve 53,99% e 71,47% de concordância entre os resultados dos Ct para os Genes E e N, respectivamente. Maioria dos resultados obtidos na detecção direta (sem extração de RNA) dos genes E e N de SARS-CoV-2 em gargarejo corresponderam ao resultados esperados (com extração).

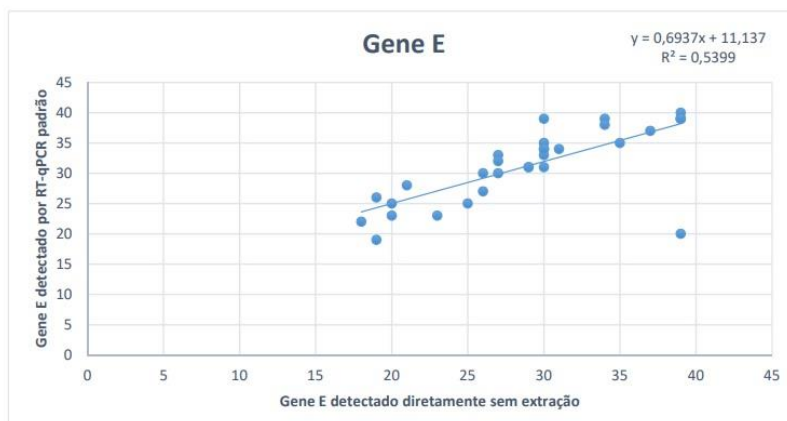


Figura 2. Detecção do Gene E de SARS-CoV-2 por RT-qPCR em amostras de gargarejo com solução fisiológica 0,9% estéril, com e sem a extração de RNA.

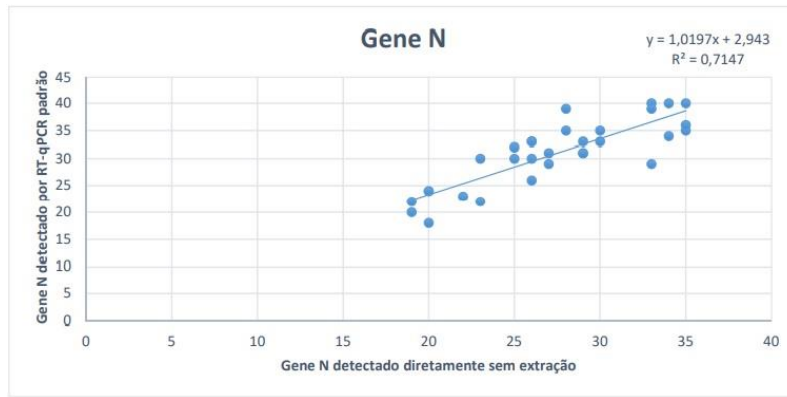


Figura 3. Detecção do Gene N de SARS-CoV-2 por RT-qPCR em amostras de gargarejo com solução fisiologia 0,9% estéril, com e sem a extração de RNA.

De igual forma, ao comparar os resultados obtidos no sistema GeneXpert com os dados do RT-qPCR, verificamos uma correlação positiva entre as metodologias, com 83,05% e 86,96% de concordância entre os *Ct* para a detecção dos Genes E e N/N2, respectivamente e, apenas uma amostra apresentou resultado discordante entre as metodologias.

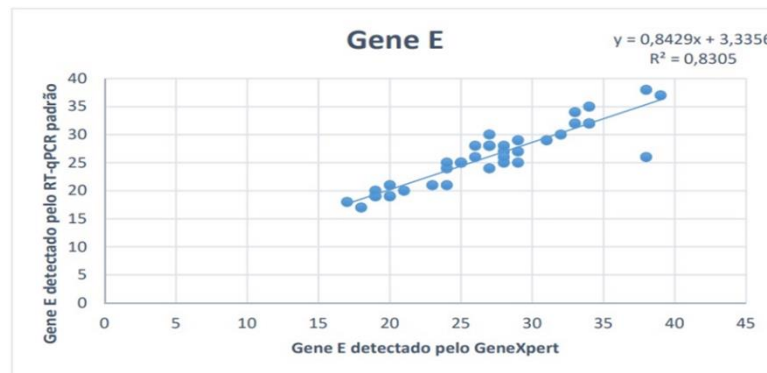


Figura 4. Detecção do Gene E por RT-qPCR e pelo Sistema GeneXpert

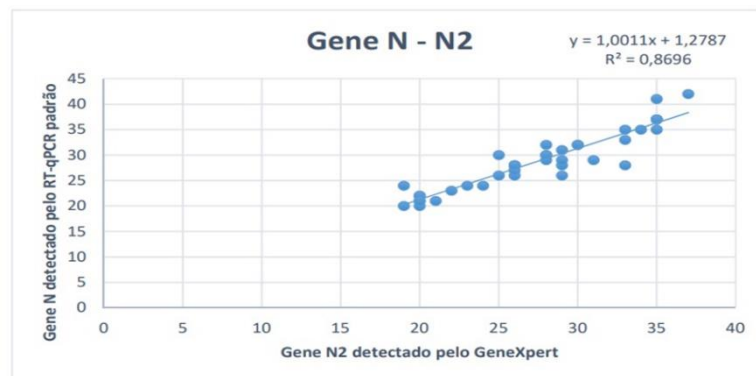


Figura 5. Detecção dos Genes N e N2 por RT-qPCR e pelo Sistema GeneXpert

Atualmente, a RT-qPCR é considerado o padrão ouro para o diagnóstico rápido e sensível da COVID-19, entretanto é um procedimento demorado e complexo, no qual a amostra é obtida por *swab* nasofaríngeo, o que pode causar certo desconforto ao paciente durante a coleta. Além disso, é necessária alta exposição dos profissionais para a realização da coleta e processamento. O presente estudo apresenta uma metodologia diagnóstica comercial de alta sensibilidade, com resultados mais rápidos e manipulação segura para a

detecção do SARS-CoV-2, utilizando o gargarejo como amostra alternativa à secreção nasofaríngea. Utilizando a detecção direta (sem extração de RNA) foi possível detectar os genes E e N de SARS-CoV-2 por RT-qPCR em amostras de gargarejo com solução fisiológica 0,9% estéril, com correlação positiva aos realizados com a extração de RNA automatizada nas mesmas amostras. Comparados com os resultados obtidos na rotina diagnóstica, a aplicação das amostras de gargarejo aos cartuchos Xpert Xpress SARS-CoV-2 no sistema GeneXpert se mostrou eficiente para a detecção dos genes E e N2 de SARS-CoV-2, com resultados concordantes com o teste padrão ouro (RT-qPCR).

Entretanto, na detecção direta, algumas amostras realizadas sem extração (4, 20 e 28) tiveram $CT > 40$, resultado negativo pelo limite de detecção, nesses casos com carga viral baixa, o método sem extração automatizada pode não ser recomendada, porém em pacientes com carga viral alta (valor de CT mais baixo) esta metodologia se mostra uma boa alternativa na realização dos testes, quando, por exemplo, o laboratório não disponibilizar de *kits* de extração. No GeneXpert, a amostra que apresentou resultado discordantes entre as duas metodologias, detectando apenas o Gene N2, pode ser explicado devido à baixa carga viral presente na amostra, uma vez que o *Cycle Threshold* estava bem elevado (41,5) e o limite de detecção do teste padrão ouro é 40,0.

É relatado boa sensibilidade e especificidade na detecção do SARS-CoV-2 em amostras de gargarejo (KOCAGOZ, 2021). Neste sentido, a utilização de cartucho XpertXpress SARS-CoV-2 no Sistema GeneXpert que envolve mínima manipulação das amostras, pode ser uma alternativa segura para a detecção do vírus e para a detecção rápida do SARS-CoV-2 em amostras de gargarejo, sobretudo em profissionais de saúde, para os quais a pandemia tem se mostrado especialmente perigosa (LIPPI, 2020). Esse tipo de amostra dispensa o preparo prévio ou manuseio de micropipetas e ponteiras de diferentes capacidades, microplacas e outros reagentes. Se considerarmos tempo envolvido desde com a recepção até a liberação dos resultados utilizando o XpertXpress® SARS-CoV-2, obtivemos 1h:20min, que correspondeu a um tempo 2,3 vezes menor que o RT-qPCR. Ainda, por se tratar de material auto-coletável, a coleta não precisa ser executada por profissionais capacitados como ocorre com as secreções nasofaríngeas.

CONCLUSÕES

Concluimos que o teste GeneXpert oferece biossegurança elevada aos analistas, e também aos profissionais da coleta, uma vez que, a amostra é auto coletável e a partir da transferência da amostra para o cartucho, todas as etapas do processo são realizadas automaticamente em sistema fechado, ou seja, sem intervenção manual, reduzindo os riscos de contaminação ambiental, inter-amostras e dos profissionais. Portanto, concluimos que amostras de gargarejo podem ser utilizadas como amostras alternativas à secreção nasofaríngea utilizando o teste XpertXpress® SARS-CoV-2, no entanto não é possível a sua aplicação a todos os indivíduos, como as crianças por exemplo, que não possuem a habilidade de realizar tal procedimento. Ainda, apesar de liberar somente 4 resultados a cada ciclo de testes, é particularmente útil para a detecção da COVID-19 em profissionais da saúde, que necessitam de respostas rápidas, assim como em períodos de baixas demandas ou exames solicitações de urgência.

REFERÊNCIAS

MALFATTI, R. et al. **Cardiovascular Changes Caused by COVID-19**. Universidade Cruzeiro do Sul. 2020.

SBAC. **Métodos laboratoriais para diagnóstico da COVID-19**. Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. 2022.

KOCAGOZ, Tanil et al. **Simple concentration method enables the use of gargle and mouthwash instead of nasopharyngeal swab sampling for the diagnosis of COVID-19 by PCR**. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 40, n. 12, p. 2617-2622, 2021.

LIPPI, Giuseppe et al. **Biosafety measures for preventing infection from COVID-19 in clinical laboratories: IFCC Taskforce Recommendations**. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM), v. 58, n. 7, p. 1053-1062, 2020.

DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS E NOROVÍRUS EM CRIANÇAS MENORES DE CINCO ANOS COM GASTROENTERITE AGUDA NO ESTADO DE SÃO PAULO - 2022

Débora Alves Furquim¹; Audrey Cilli²; Simone Guadagnucci Morillo², Rita de Cássia Compagnoli Carmona³

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – NDE/ CV - IAL;

E-mail: deborafurquim226@gmail.com

²Docentes do Núcleo de Doenças Entéricas - Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz

³ Docente /Pesquisador Científico do Núcleo de Doenças Entéricas - Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz

Resumo: Com o advento da vacina para rotavírus, os casos de gastroenterite aguda em crianças menores de cinco anos causados por este agente etiológico diminuíram consideravelmente, em contrapartida os NoV têm se tornado um dos principais causadores deste agravo, tornando-se um problema mundial. A transmissão destes vírus ocorre por via fecal-oral, fômites, água contaminada, entre outros, sendo a diarreia aguda a principal manifestação clínica. O objetivo deste trabalho é detectar e avaliar a frequência de RV e NoV em crianças menores de cinco anos de idade com quadro de GEA no estado de São Paulo. Para detecção de RVA foi utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA), para análise do perfil eletroforético fez-se o uso do EGPA, e para genotipagem foi realizado o RT-PCR e sequenciamento genético. Para detecção de NoV realizou-se o método de RT-qPCR. Os resultados demonstraram que das 255 amostras coletadas, 5,5% (14/255) foram positivas para RVA, e 34,9% (89/225), positivas para NoV com predominância do genogrupo GII (85,4%; 76/89). Por conta dessas mudanças, o papel da vigilância epidemiológica se torna indispensável no rastreamento, identificação e monitoramento de casos de RV e NoV, buscando meios de mitigar possíveis impactos desses vírus na sociedade.

Palavras-chave: diarreia; gastroenterite; rotavírus; norovírus

INTRODUÇÃO

A gastroenterite é caracterizada por uma inflamação do revestimento do estômago, do intestino grosso e delgado; sua principal manifestação clínica é a diarreia aguda. A família de vírus comumente associada às gastroenterites são *Sedoreoviridae* (rotavírus) e *Caliciviridae* (norovírus e sapovírus), sendo muito comum em comunidades fechadas, como por exemplo, creches, hospitais, asilos e cruzeiros (FILHO, 2013). A transmissão destes agentes infecciosos ocorre por via fecal-oral, por meio de alimentos e/ou água contaminada, e a falta de higiene básica como, por exemplo, a lavagem das mãos com água e sabão. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o tratamento mais adequado para casos graves de gastroenterite é a reposição de fluídos e eletrólitos através da reidratação oral, para

casos de desidratação leve e moderada ou, a reidratação intravenosa em casos graves (PARASHAR, NELSO, KANG, 2013).

Os Rotavírus, visão geral

Os Rotavírus (RV) pertencem a família *Sedoreoviridae* do gênero RV, possuem a capacidade de infectar várias espécies animais e humanas, sendo classificados em nove espécies (RVA-RVD e RVAF- RVJ) com base no antígeno de grupo VP6. Os RV espécies A, B e C são encontrados em humanos e animais, enquanto os demais grupos: D-I são predominantes apenas em animais. Recentemente, uma nova espécie (RVJ) foi descoberta em morcegos provenientes de Schreiber, Sérvia (BÁNYAI et al., 2017). O rotavírus espécie A (RVA) é o principal agente causador de gastroenterite aguda em humanos, em sua grande maioria crianças menores de cinco anos de idade (SADIQ et al., 2022).

Os RVs também possuem uma classificação binária baseada nos antígenos de neutralização VP7 (glicoproteína) e a VP4 (proteína sensível à protease), que definem os genótipos G e P, respectivamente. Atualmente, existem 58 genótipos P e 42 genótipos G de RVA (SADIQ et al., 2022). Estas duas proteínas são críticas no desenvolvimento de vacinas, dada suas características imunogênicas (SADIQ et al., 2022).

Seu capsídeo é formado por uma tripla camada proteica de simetria icosaédrica; seu genoma é composto por 11 segmentos de RNA de fita dupla (ds) de polaridade positiva que codifica seis proteínas estruturais: VP4 e VP7 que se localizam na região mais externa do vírus, VP6 que constitui a camada intermediária ou core, VP2 a camada mais interna e que envolvem as proteínas VP1 e VP3; além de outras cinco proteínas não estruturais, a saber: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 e NSP5 (SADIQ et al., 2018).

Os Norovírus, visão geral

Os Norovírus (NoV) por sua vez, pertencem a família *Caliciviridae* que é dividida em cinco gêneros de vírus: Lagovírus, Vesivírus e Nebovírus que infectam exclusivamente animais, Sapovírus e Norovírus que infectam seres humanos e animais. Os NoVs são divididos em sete genogrupos: GI infectam humanos, GII infectam humanos e porcos, GIII presentes em bovinos e ovelhas, GIV infectam humanos, gatos e cães, GV presentes em camundongos, genogrupo GVI infectam cães e gatos, e por fim, o genogrupo GVII infectam cães. O genoma do NoV humano é constituído por RNA de fita simples não envelopado, seu capsídeo é icosaédrico o qual é constituído por proteína VP1 (CVE, 2010; LIZASOAIN et al., 2015; ROBILOTTI et al., 2015).

Seu genoma possui três quadros de leitura aberta (ORFs): ORF-1 codifica seis proteínas não estruturais (NSP), ORF-2 codifica a proteína estrutural VP1, é por meio dela que se consegue diferenciar os sete genogrupos virais, por fim a ORF-3 que codifica a proteína estrutural VP2 que está associada à estabilidade da proteína do capsídeo viral. Sua extremidade 5' possui a proteína VPg e na extremidade 3' contém a cauda poly-A (SILVA, 2019).

Impacto da Vacina RV

Até o ano de 2006, o rotavírus era o principal agente etiológico causador de gastroenterite aguda em crianças em todo o mundo, porém com o advento de vacinas contra

este vírus, tais como, Rotarix™ (GlaxoSmithKline Biologicals, Bélgica) e RotaTeq™ (Merck Inc., EUA) os casos de gastroenterite aguda diminuíram consideravelmente, favorecendo o aumento do número de casos de diarreia aguda por outros vírus, principalmente, norovírus (SILVA, 2019; LUCERO, 2021).

Atualmente, no mundo, existem quatro vacinas contra o RVA, Rotarix™, RotaTeq™, e duas recém-aprovadas pela Organização da Saúde (OMS) a ROTAVAC™ (Bharat Biotech, Índia) e Rotasiil™ (Serum Instituto of Índia, Índia) que estão em uso apenas no Paquistão e Índia, respectivamente. Com uma cobertura global de 39%, de fato, as vacinas tiveram um grande impacto na redução da morbidade e mortalidade principalmente em países de alta renda, reduzindo o número de hospitalizações e gravidade da doença (SADIQ et al., 2022).

Apesar da aprovação da vacina no ano de 2006, atualmente o RVA é considerado um dos maiores agentes causadores de gastroenterite não bacteriana em todo o mundo (sendo superado apenas pelo norovírus) provocando diarreias explosivas em bebês e crianças menores de cinco anos de idade, acarretando cerca de 25 milhões de consultas clínicas, 2 milhões de internações hospitalares e 180.000 a 450.000 mortes de crianças ao ano em todo o mundo (PARASHAR, NELSON, KANG, 2013). O NoV por sua vez, após o desenvolvimento da vacina RV se tornou o principal agente causador de gastroenterite aguda em crianças, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) acarretando cerca de 685 milhões de infecções anuais e 212.000 mortes por ano em todo o mundo.

Vigilância Epidemiológica

Devido ao dinamismo das cepas de RV fica clara a importância da vigilância epidemiológica tendo como pressuposto conhecer e monitorar a frequência de diarreia e internações em crianças menores de cinco anos de idade mesmo após o advento da vacina, identificar mudanças na prevalência de genótipos em decorrência da vacina, monitorar os sorotipos assim como suas características moleculares e antigênicas além de monitorar a eficácia da vacina oral e investigar casos de surtos (LUCHS et al., 2014). Em relação ao estado de São Paulo este importantíssimo papel é atribuído ao Núcleo de Doenças Entéricas (NDE) do Instituto Adolfo Lutz (IAL), Laboratório de Referência para Vigilância de RVA e referência estadual do Programa de Monitoramento de Doenças Diarreicas Agudas (PMDDA) e Programa de Intensificação da Vigilância Sentinela de rotavírus em menores de 5 anos. O presente trabalho teve como objetivo detectar e avaliar a frequência de RV e NoV em crianças menores de cinco anos de idade com quadro de GEA no estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho possui aprovação do Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz. O estudo foi conduzido utilizando 255 amostras fecais coletadas de crianças menores de 05 anos de idade com quadro de gastroenterite aguda, entre janeiro a outubro de 2022 e encaminhadas ao NDE, CV, do IAL para análise laboratorial.

As amostras fecais foram clarificadas utilizando 1g de fezes em 1ml de tampão TRIS-HCL 10% pH 7,4 a extração de RNA foi realizada no extrator automático Loccus, Kit-Extracta Fast 96, conforme instruções do fabricante.

Para detecção do antígeno de RVA foi empregado Kit imunoenzimático comercial RIDASCREEN Rotavírus, de acordo com as instruções do fabricante, seu perfil eletroforético foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), a caracterização dos genótipo G e P foi realizada pelas reações de RT-PCR para o gene 4 (VP4-proteína sensível à protease) e para o gene 9 (VP7-glicoproteína) (PEREIRA et al., 1983; GENTSCH et al., 1992; GOUVEA et al., 1990). O sequenciamento do genoma dos RVA foi realizado utilizando o sequenciador ABI Prism 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Inc) e para análise destas sequências utilizou-se o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corporation, Michigan, EUA). O site Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) foi utilizado como ferramenta para a comparação das sequências consenso geradas para cada amostra.

A detecção de NoV foi realizada por meio da reação TaqMan RT-PCR em tempo real (RT-qPCR). Para detecção do genogrupo GI utilizou-se as probes RING1A e RING1B, e primers COG1F e COG2R. Já para o GII utilizou-se a probe RING2 e primers COG2F e COG2R (ISHIDA et al., 2008). Os testes foram realizados utilizando-se a plataforma ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de janeiro a outubro de 2022, foram analisadas 255 amostras de fezes de crianças menores de cinco anos com quadro de gastroenterite aguda, provenientes do estado de São Paulo. Destas, 5,5% (14/255) foram positivas para RVA por ensaio imunoenzimático (ELISA) e RT-PCR. O perfil eletroforético das amostras positivas foi analisado por EGPA e 35,7% (5/14) apresentaram perfil longo e 28,5% (4/14) perfil curto. Nota-se que 35,7% (5/14) das amostras foram negativas para EGPA, isto porque, provavelmente a carga viral das mesmas era baixa, sendo impossível identificar seus perfis. As amostras foram sequenciadas para identificação dos genótipos: 35,7% (5/14) corresponderam ao G3P[8]; 57,1% (8/14) das amostras ao G6P[8] e 7,14% (1/14) GNT[NT] (tabela 1). Foi identificado 1 caso de coinfeção por RVA e NoV GI/GII em uma criança de 2 anos do sexo feminino.

Das 255 amostras analisadas, 34,9% (89/255) foram positivas para NoV por RT-qPCR, destas amostras 9,0% (8/89) foram identificadas como o genogrupo GI; 85,4% (76/89) para o genogrupo GII e 5,6% (5/89) correspondiam aos genogrupos GI/GII.

Tabela 1. Amostras positivas para RVA identificadas no estado de São Paulo de janeiro a outubro de 2022.

Caso	Idade	Sexo	Condição	ELISA	RT-PCR	EGPA	Sequenciamento
1	4 anos	F	Caso	Positivo	Positivo	Negativo	G6P[8]
2	2 anos	F	Surto	Positivo	Positivo	Negativo	GNTP[NT]
3	2 meses	M	Caso	Positivo	Positivo	Longo	G3P[8]
4	3 anos	F	Caso	Positivo	Positivo	Negativo	G6P[8]
5	3 anos	F	Caso	Positivo	Positivo	Longo	G3P[8]
6	2 anos	F	Caso	Positivo	Positivo	Curto	G6P[8]
7	9 meses	M	Caso	Positivo	Positivo	Longo	G3P[8]
8	10 meses	F	Caso	Positivo	Positivo	Negativo	G6P[8]
9	6 meses	M	Surto	Positivo	Positivo	Negativo	G6P[8]
10	3 anos	M	Caso	Positivo	Positivo	Longo	G3P[8]
11	7 meses	F	Caso	Positivo	Positivo	Longo	G3P[8]
12	5 anos	F	Caso	Positivo	Positivo	Curto	G6P[8]
13	5 anos	F	Surto	Positivo	Positivo	Curto	G6P[8]
14	1 ano	M	Caso	Positivo	Positivo	Curto	G6P[8]

Nota-se que a prevalência de casos de RVA em crianças menores de cinco anos foi menor em relação ao NoV. Sugere-se que este fato se deve a inclusão da vacina Rotarix atenuada no Programa de Vacinação em 2006 contra o genótipo G1P[8]. Dados de vacinação dos pacientes não foram obtidos para serem incluídos neste trabalho, porém a vacinação contra RVA têm prevenido casos graves de gastroenterite aguda, reduzindo consideravelmente casos de surtos em crianças e número de óbitos em todo o mundo (SADIQ *et al.*, 2022). Em contrapartida, os NoVs possuem grande destaque em casos de surtos de gastroenterite aguda em crianças, sendo as cepas GI e GII as mais prevalentes. Os dados apresentados neste trabalho corroboram também com estudos realizados em outros países (RONNELID *et al.*, 2020; BUCARDO *et al.*, 2014; MCATEE *et al.*, 2015; HEMMING *et al.*, 2013).

Um estudo transversal realizado no município de São Paulo entre os anos de 2010-2016 demonstrou que o NoV foi o principal agente etiológico causador de GEA em crianças menores de cinco anos de idade. Foram analisadas cerca de 1.565 amostras, cerca de 28,4% (444) foram positivas para NoV; 23,5% (368) positivos para RV e 753 (48,1%) casos foram descartados, o mesmo foi observado no Espírito Santo e Rio de Janeiro (KAMIOKA *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2008). Além disso, vários trabalhos demonstram que após a introdução da vacina monovalente G1P[8] RotarixTM houve uma modificação na distribuição de genótipos de RV aumentando a incidência de G2P[4]. É provável que a vacina tenha criado condições para que esta cepa pudesse adquirir vantagem seletiva sobre genótipos que compartilham a P[8] (MORILLO *et al.*, 2009). Atualmente, diversos genótipos têm sido detectados, como por exemplo, o genótipo G3P[8] (GUTIERREZ *et al.*, 2020; LUCHS, 2015). No estado de São Paulo, por exemplo, consegue-se perceber uma modificação na prevalência das cepas ao longo dos anos (GUTIERREZ *et al.*, 2020; CARMONA *et al.*, 2006; MORILLO *et al.*, 2009; CILLI *et al.*, 2011; LUCHS *et al.*, 2014).

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi observada uma significativa redução dos casos de GEA relacionados ao RVA (5,5%) e aumento dos casos de gastroenterites devido aos NoVs

(34,9%). A sobreposição dos casos de NoVs em relação aos RVA relacionados a GEA provavelmente estão atrelados à inclusão da vacina Rotarix™ no Plano Nacional de Imunização a partir de 2006. Não há dúvidas de que os casos de GEA causada por RVA, diminuíram consideravelmente após implantação da vacina, em contrapartida, os NoVs tornaram-se o principal causador de gastroenterite viral em crianças menores de cinco anos de idade, não só em algumas regiões do Brasil como em outros países do mundo. Por conta dessas mudanças o papel da vigilância epidemiológica se torna indispensável no rastreamento, identificação e monitoramento de casos de RV e NoV, buscando meios de mitigar possíveis impactos desses vírus na sociedade.

REFERÊNCIAS

1. FILHO, Hélio. Gastroenterites infecciosas. *JBM*, v. 101, ed. 2, p. 25-29, março de 2013. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0047-2077/2013/v101n2/a3986.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2022.
2. PARASHAR, Umesh; NELSON, Anthony; KANG, Gagandeep. Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children. **British Medical Journal**, 30 dez. 2013. Doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.f7204>.
3. BÁNYAI, Krisztián et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. **MEEGID**, v. 48, p. 19-26, 1 mar. 2017. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.002>.
4. SADIQ, Asma et al. Effect of rotavirus genetic diversity on vaccine impact. **Reviews in Medical Virology**, v. 32, p. 1, 7 jan. 2022. Doi: <https://doi.org/10.1002/rmv.2259>.
5. SADIQ, Asma et al. Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances, **Reviews in Medical Virology**, v. 28, ed. 6, 29 ago. 2018. Doi <https://doi.org/10.1002/rmv.2003>.
6. Centro de Vigilância Epidemiológica. Norovírus/Norovirose. Informe técnico, 2010. Disponível em: https://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/virus/2010informe_norovirus.pdf Acesso em 5 nov de 2022.
7. LIZASOAIN, A et al. Sewage surveillance reveals the presence of canine GVII norovirus and canine astrovirus in Uruguay. **Arquivos de Virologia**. v.167, ed. 11, p. 2938-2843, 18 ago de 2015. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2571-3>.
8. ROBILOTTI, Elizabeth; DERESINSKI, Stan; PINSKY, Benjamin. Norovirus. **ASM Journals Clin Microbiol Rev**. 01 jan de 2015. Doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-14>.
9. SILVA, Fábio. **Detecção molecular de vírus gastroentéricos em amostras de fezes conservadas em formol**. 2019. Tese (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade de Brasília. 2019. (SILVA, 2019)
10. LUCERO, Yalda et al. Norovirus: Facts and Reflections from Past, Present, and Future. **Viruses** 2021. 30 nov de 2021. Doi: <https://doi.org/10.3390/v13122399>.

- 11.LUCHS, Adriana et al. Detection of the emerging rotavirus G12P[8] genotype at high frequency in Brazil in 2014: Successive replacement of predominant strains after vaccine introduction. **Acta Tropica**, v. 156, p. 87-94, 04 jan de 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.008>.
- 12.PEREIRA, H.G et al. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. **J. Hyg. Camb.**, v.90, p.1172125, 1983.
- 13.GENTSCH, J.R et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, p. 1365-73, 1992
- 14.GOUVEA. V et al. Polymerase Chain Reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 276-282, 1990
- 15.ISHIDA, Setsuko et al. Sensitive and Rapid Detection of Norovirus using duplex TaqMan Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **J. Med Virol.** v. 80, p. 913-920. 2008
- 16.RONNELID, Y et al. Norovirus and rotavirus in children hospitalised with diarrhoea after rotavirus vaccine introduction in Burkina Faso. [Epidemiology & Infection](https://doi.org/10.1017/S0950268820002320), v. 148, 01 out de 2020. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0950268820002320>
- 17.BUCARDO, Filemon et al. Predominance of Norovirus and Sapovirus in Nicaragua after Implementation of Universal Rotavirus Vaccination. *PLoS One*, v.9, 21 mai de 2014. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098201>
- 18.MCATEE, Casey L et al. Burden of Norovirus and Rotavirus in Children After Rotavirus Vaccine Introduction, Cochabamba, Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*, v. 94, p. 212-217, 23 nov de 2015. Doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0203>.
- 19.HEMMING, Maria et al. Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. **Eur J Pediatr**, v. 172, p. 739-746, 30 jan de 2013. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00431-013-1945-3>
- 20.KAMIOKA, Gabriela et al. Norovirus in São Paulo city, Brazil, 2010-2016: a cross-sectional study of the leading cause of gastroenteritis in children. *Epidemiol. Serv. Saude*, 29 abr de 2019. Doi: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742019000200016>
- 21.FERREIRA, Mônica et al. Assessment of Gastroenteric Viruses Frequency in a Children's Day Care Center in Rio De Janeiro, Brazil: A Fifteen Year Study (1994–2008). *PLoS One*, 20 mar de 2012. Doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033754>
- 22.RIBEIRO, Leandro et al. Hospitalization due to norovirus and genotypes of rotavirus in pediatric patients, state of Espírito Santo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 18 fev de 2008. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000200013>

- 23.MORILLO, Simone et al. Characterization of rotavirus strains from day care centers: pre- and post-rotavirus vaccine era. **Jornal de Pediatria**, v. 86, p. 155-158, 21 set de 2009. Doi: <https://doi.10.2223/JPED.1981>.
- 24.GUTIERREZ, Meylin et al. Rotavírus A no Brasil: Epidemiologia Molecular e Vigilância durante 2018-2019. **Pathogens**, 27 jun. 2020. Doi: <https://doi.10.3390/pathogens9070515>.
- 25.LUCHS, Adriana et al. Group A rotavirus gastroenteritis: post-vaccine era, genotypes and zoonotic transmission. **Rev. Inst. Med. Trop São Paulo**, v. 57, p 305-313, Agosto de 2015. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082016RB3582>.
- 26.CARMONA, Rita de Cássia et al. Human Rotavirus Serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996–2003. **Emerg Infect Dis**, v. 12, p. 963-968, 21 jun. 2006. Doi: <https://doi.10.3201/eid1206.060307>.
- 27.CILLI, Audrey et al. Characterization of rotavirus and norovirus strains: a 6-year study (2004-2009). **Jornal de Pediatria**,v 87, p 445-449, 15 jun de 2011. Doi: <https://doi.10.2223/JPED.2122>.

IMPACTO DA PANDEMIA DA COVID-19 NA OCORRÊNCIA DE TUBERCULOSE NA REGIÃO DO VALE DO PARAÍBA E LITORAL NORTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

Douglas Tassinari Silva Colete

Renato Pereira de Souza

Estudante do Curso de Especialização de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública, Instituto Adolfo Lutz de Taubaté - CLR XII – IAL Taubaté E-mail:

douglastscolete@gmail.com

renatoefabi@gmail.com

RESUMO

Com o início da pandemia de COVID-19 em março de 2020, causada pelo vírus SARS-CoV-2 em março de 2020, resultou em uma crise global que afetou a saúde pública como um todo, assim como as áreas econômicas, sociais, políticos e culturais. Tendo em vista os impactos causados pela pandemia, o trabalho compara as diferenças na incidência de resultados positivos de Teste Rápido Molecular de Tuberculose (TRM-TB), bem como a quantidade de exames TRM-TB realizados pelo Instituto Adolfo Lutz de Taubaté, no período Pré-pandêmico (Março de 2018 a Fevereiro de 2020), e período Pandêmico (Março de 2020 a Fevereiro de 2022), a fim de verificar as possíveis diferenças.

Palavras-chave: COVID 19; TRM-TB; Tuberculose.

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019 foi registrado na cidade de Wuhan (China) casos de pneumonia. E em janeiro de 2020 autoridades chinesas confirmaram a identificação de um novo tipo de coronavírus denominado de SARS-CoV-2, responsável pelo COVID-19. No dia 30 de janeiro de 2020 a organização mundial da saúde, declarou que o surto de COVID-19 era uma emergência de importância internacional. E em 12 de março de 2020 foi caracterizado como uma pandemia (CIOTTI et al., 2020).

Com o surgimento do COVID-19 pouco se ouviu a respeito das demais doenças, pois por se tratar de uma doença desconhecida, com alta capacidade de transmissão, atingindo a maioria dos continentes em poucos meses, exigiu grandes esforços e subsídios para seu controle, desviando assim, a atenção sobre as demais doenças.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a tuberculose é uma das doenças infecciosas mais mortais do mundo. Antes do COVID-19, era a doença de agente único que mais matava, à frente até mesmo do Vírus da imunodeficiência humana (HIV). Dados da

OMS, estimam que cerca de 1,4 milhões de pessoas morreram de tuberculose em 2021, enquanto outros 10 milhões sofreram com a doença, principalmente nos países em desenvolvimento.

Tendo em vista todo o impacto causado pela pandemia e os perigos para saúde pública que a tuberculose representa, esse trabalho visa comparar a incidência de tuberculose a partir dos exames de TRM-TB que foram realizados no IAL de Taubaté, bem como verificar a quantidade de exames realizados no período pré-pandêmico e pandêmico, provenientes da região do Vale do Paraíba e do Litoral Norte.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo, levantou-se o número de exames Teste Rápido Molecular de Tuberculose (TRM-TB) realizados mensalmente no Instituto Adolfo Lutz (IAL) de Taubaté; retirados do sistema GAL. Todos os dados são anônimos, e apenas foram contabilizados resultados positivos e negativos, para os municípios da região do Vale do Paraíba e Litoral Norte, em relação ao período Pré-pandêmico (Março de 2018 a Fevereiro de 2020), com o período Pandêmico (Março de 2020 a Fevereiro de 2022).

Os dados foram tabulados em uma planilha Excel, e calculado para cada período amostral o valor da variância da frequência de resultados positivos e negativos para tuberculose. Para o presente estudo, o cálculo da variância populacional será obtido através da soma dos quadrados da diferença entre cada valor e a média aritmética, dividida pela quantidade de elementos observados. Desta forma será calculado também média aritmética e desvio padrão dos períodos amostrados. Esses parâmetros servirão como base comparativa entre os períodos.

Além disso, pretende-se observar a curva de dados gerada referente a cada período (pré-pandêmico e pandêmico) com o intuito de verificar as possíveis diferenças, calculando a média móvel dos casos positivos de ambos os períodos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os dados, pode-se notar que o número de exames realizados caiu de 5.588, referente ao período pré-pandêmico, para 3.768 no período pandêmico, uma queda de 1.820 exames realizados, quase 2 mil exames a menos em comparação ao período anterior, representando uma queda de 32,56% no número de exames realizados.

Em relação aos resultados positivos, não houve grande variação em termos de números, pois no período pré-pandêmico o número foi de 974 resultados positivos e no período pandêmico 921 positivos, uma diferença de 53 casos positivos de um período comparado ao outro, o que representa uma diminuição de 5,44% no número de casos positivos. Porém em termos de proporção, os resultados positivos aumentaram em 7% no período pandêmico em relação ao pré-pandêmico, pois no período pré-pandêmico os resultados positivos representavam 17,43% do total de exames realizados, já no período pandêmico os resultados positivos representam 24,44% do total de exames realizados. Pode-se observar também que o número de exames realizados começou a subir a partir do segundo semestre de 2021 até o fim do período Pandêmico.

Que a pandemia impactou a saúde como um todo é fato, muito precisou ser feito para se adaptar e combater a chegada da COVID-19, o que resultou em um foco intenso sobre a nova doença, contudo outras doenças continuaram presentes, e o desfoque causado pela

pandemia resultou em diversas consequências. (Maia et al. 2022), (Grosi, Minoda, Fonseca 2020), (Ornell et al. (2020)

Segundo a OMS, a tuberculose foi uma das doenças que regrediu no caminho rumo a sua erradicação por conta da pandemia de COVID-19. O presente estudo demonstra as mudanças que a pandemia gerou na região do Vale do Paraíba e Litoral Norte relacionado aos casos de tuberculose, referente aos dados obtidos do IAL de Taubaté-SP.

A quantidade de exames realizados caiu muito em relação ao período que antecedeu a pandemia, foi uma queda de 32,56%, o que representa um número de 1.820 exames a menos em comparação com o período anterior. Mas não foi só na região do Vale do Paraíba e Litoral Norte que houve tal decréscimo. Segundo Maia et al. (2022) durante a pandemia no Brasil os serviços essenciais para TB foram restringidos por conta da diminuição dos recursos e insumos, com o objetivo de priorizar a mitigação da COVID-19, o que resultou em uma menor notificação de novos casos de TB, bem como houve um aumento no número de pessoas que abandonaram o tratamento, o que prejudica ainda mais o controle da TB.

McQuaid et al. (2021) fala sobre o potencial impacto que a COVID-19 pode trazer referente a TB, entre eles estão: aumento de infecção domiciliar, atraso nos testes e tratamentos, diminuição da cobertura para vacina de BCG, aumento dos abandonos de tratamento, aumento dos casos de resistência por conta do abandono do tratamento, diminuição da cobertura de terapias preventivas, diminuição do acesso aos testes de TB, bem como aos testes de resistência a antibióticos, diminuição na demanda de testes de TB e testes de resistência, diminuição de novas matrículas para o tratamento de TB, falta de insumos.

Analisando a média móvel dos períodos é possível observar que após o segundo semestre de 2021 os exames de TRM-TB começaram a aumentar, e em 2022 voltou a ficar dentro média de exames realizados do no período anterior a pandemia.

Segundo Avedanho et al. (2022) fica evidente o sucesso da vacinação, tendo em vista a consequente redução dos casos graves e óbitos a partir de junho de 2021. Período esse que começou a aumentar a quantidade de exames realizados de tuberculose. O que reforça ainda mais a ideia de que a pandemia foi a causadora na diminuição dos exames realizados de TRM-TB, visto que assim que a situação começou a normalizar, o número de exames realizados também normalizou.

A pandemia de COVID-19 impactou significativamente no número de exames realizados de TRM-TB do Instituto Adolfo Lutz de Taubaté, visto que houve uma queda de 32,56% no número de exames realizados.

Já os números de casos positivos não variaram muito de um período para o outro, pois no período pandêmico a queda foi de 5,44% no número de casos positivos em relação ao período pré-pandêmico, mesmo com uma queda de 32,56% na quantidade de exames realizados, não houve uma queda expressiva no número de resultados positivos, sugerindo que a sensibilidade na abordagem da tuberculose aumentou durante esse período.

Segundo Sousa et al. (2020) é necessário uma análise minuciosa no diagnóstico de COVID-19, visto que a doença pode apresentar sintomas inespecíficos.

Imaginando um cenário onde os casos notificados de doença respiratória passem, após triagem, pela exclusão de COVID-19, provavelmente outras doenças de caráter respiratório foram identificadas, podendo assim ter contribuído para que os números de exames de TRM-TB positivos se mantivessem sem alterações, mesmo com uma queda no número de exames realizados.

CONCLUSÕES

O impacto da pandemia de COVID-19 na ocorrência de tuberculose na região do Vale do Paraíba e Litoral Norte ficam evidentes quando se percebe uma queda de 32,56% na quantidade de exames realizados referente ao período anterior. Essa queda demonstra que no período de pandemia a busca ativa pelo diagnóstico e controle da Tuberculose foi prejudicada, o que pode resultar na propagação da doença, visto que a função da busca ativa é diagnosticar e tratar o paciente precocemente, para que o mesmo não transmita para mais pessoas. (Muniz et al. 2005)

Assim, é possível que ocorra um aumento no número de casos de Tuberculose para os próximos anos, fruto da redução dos exames realizados durante o período abordado no presente estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e a minha família que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando a crescer como pessoa e como profissional.

Estendo meus agradecimentos ao Renato Pereira de Souza, que me orientou e me auxiliou com sua experiência na elaboração desse Trabalho de Conclusão de Curso.

Agradeço ainda, a Andrea de Rezende Leite, que através do seu conhecimento também me orientou na elaboração deste trabalho.

Agradeço também, ao Pablo Rafael Cursino dos Santos Barbosa por sua disposição e por me auxiliar na coleta dos dados, que serviram de base para esse trabalho.

Agradeço a todos os funcionários do Instituto Adolfo Lutz de Taubaté com quem tive a oportunidade e o prazer de conviver durante o curso, bem como aprender sobre cada área da instituição com esses excelentes profissionais.

REFERÊNCIAS

AVENDANHO, F. C. *et al.* **Desafios, respostas e resultados na vacinação contra o SARS-CoV-2 e a priorização dos trabalhadores da saúde no Brasil.** Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, ano 2022, v. 21, 22 out. 2022. Artigos Originais, DOI <https://doi.org/10.25761/anaisihmt.427>. Disponível em: <https://anaisihmt.com/index.php/ihmt/article/view/427>. Acesso em: 7 nov. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual de Recomendações Para o Controle da Tuberculose no Brasil.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, ed. 2, 2019a. Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_controle_tuberculose_brasil_2_ed.pdf. Acesso em: 10 ago. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. **OFÍCIO CIRCULAR N° 3/2019 - CGLAB/DAEVS/SVS/M, 2019b.**

BRASIL, Ministério da Saúde. **Tuberculose.** Brasília, DF: Ministério da Saúde, 24 nov. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/tuberculose>. Acesso em: 7 ago. 2022

CIOTTI, M; *et al.* The COVID-19 pandemic. **CRITICAL REVIEWS IN CLINICAL LABORATORY SCIENCES.** v. 57, n. 6, p. 365-388, 2020. DOI <https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1783198>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408363.2020.1783198>. Acesso em: 7 ago. 2022.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Região Metropolitana do Vale do Paraíba e Litoral Norte.** Empresa Metropolitana de Transportes Urbanos de São Paulo. Disponível em: [https://www.emtu.sp.gov.br/emtu/institucional/quem-somos/vale-do-paraiba-e-litoral-norte.fss#:~:text=%C3%89%20composto%20por%2039%20munic%C3%ADpios,dividem%20em%205%20sub%2Dregi%C3%B5es.&text=A%20regi%C3%A3o%20concentra%20mais%20de,\(PIB\)%20paulista%20em%202016](https://www.emtu.sp.gov.br/emtu/institucional/quem-somos/vale-do-paraiba-e-litoral-norte.fss#:~:text=%C3%89%20composto%20por%2039%20munic%C3%ADpios,dividem%20em%205%20sub%2Dregi%C3%B5es.&text=A%20regi%C3%A3o%20concentra%20mais%20de,(PIB)%20paulista%20em%202016). Acesso em: 1 ago. 2022.

GROSSI, M. G. R., Minoda, D. de S. M., & FONSECA, R. G. P. (2020). **IMPACTO DA PANDEMIA DO COVID-19 NA EDUCAÇÃO: REFLEXOS NA VIDA DAS FAMÍLIAS.** *Teoria E Prática Da Educação*, 23(3), 150-170. <https://doi.org/10.4025/tpe.v23i3.53672>

MAIA, C. M. F. *et al.* **Tuberculosis in Brazil: the impact of the COVID-19 pandemic.** *Jornal Brasileiro de Pneumologia* é a publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, ano 2022, v. 48, n. 2, Março/Abril 2022. Artigo, DOI <https://dx.doi.org/10.36416/1806-3756/e20220082>. Disponível em: <https://www.jornaldepneumologia.com.br/details/3676/en-US/tuberculose-no-brasil--o-impacto-da-pandemia-de-covid-19>. Acesso em: 1 nov. 2022.

MCQUAID, C. F. *et al.* **THE IMPACT of COVID-19 on TB: a review of the data.** *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, ano 2021, v. 25, n. 6, p. 436-446, 1 jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.5588/ijtld.21.0148>

MOUTINHO, I. L. D. Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. **Revista Médica de Minas Gerais.** Juiz de Fora v. 21, n. 1, p. 42-48, 2011. Disponível em: <http://rmmg.org/artigo/detalhes/289>. Acesso em: 1 ago. 2022.

MUNIZ, J. N. *et al.* **A incorporação da busca ativa de sintomáticos respiratórios para o controle da tuberculose na prática do agente comunitário de saúde.** *Ciência & Saúde Coletiva*, ABRASCO - Associação Brasileira de Saúde Coletiva, ano 2005, v. 10, n. 2, 11 jun. 2007. Artigo. DOI <https://doi.org/10.1590/S1413-81232005000200009>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/Ck97Btfxgq5zWVGnhb5tGfp/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 25 nov. 2022.

ORNELL, F., SCHUCH, J.B., SORDI, A.O., KESSLER, F.H.P. **Pandemia de medo e Covid-19: impacto na saúde mental e possíveis estratégias.** *Debates em Psiquiatria* [Internet]. 30º de junho de 2020 [citado 27º de novembro de 2022];10(2):12-6. Disponível em: <https://revistardp.org.br/revista/article/view/35>

SOUSA, F. C. B. *et al.* **PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO DE COVID-19**. REVISTA DA FAESF, FAESF - Faculdade de Floriano, ano 2020, v. 4, p. 35-39, jun. 2020. Disponível em: <https://www.faesfpi.com.br/revista/index.php/faesf/article/view/113>. Acesso em: 25 nov. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2017**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2021**. Geneva: World Health Organization, 2021.

PERFIL GENOTÍPICO DO HIV-1 NO CONTEXTO DA PROFILAXIA PRÉ-EXPOSIÇÃO (PREP) OU PROFILAXIA PÓS-EXPOSIÇÃO (PEP)

Luana Muniz dos Passos¹; Luís Fernando de Macedo Brígido²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - Centro de Virologia – Instituto Adolfo Lutz Central, e-mail: muniz_luana@outlook.com

²Docente do Depto de Doenças Sanguíneas e Sexuais – Centro de Virologia – Instituto Adolfo Lutz Central

Resumo: Grandes avanços foram realizados nos últimos anos para auxiliar no combate da transmissão do HIV, entre eles, a introdução da Profilaxia Pré-Exposição (PrEP) e Profilaxia Pós-Exposição (PEP) ao HIV têm auxiliado na prevenção de pessoas não infectadas, a fim de reduzir o risco de transmissão através das relações sexuais. O objetivo deste trabalho é descrever o perfil genotípico do HIV-1 em pacientes que fizeram uso de PrEP ou PEP. Foram incluídos no estudo 11 participantes que fizeram uso de PrEP e/ou PEP e um voluntário do Estudo Mosaico (submetido a vacina experimental anti-HIV) que tiveram amostras encaminhadas para o Laboratório de Genotipagem do HIV-1 do IAL Central. Foram avaliados exames de carga viral de HIV-1 e testes de genotipagem por PCR convencional das regiões *pol* e *int* do HIV-1. Observamos entre os 12 participantes a incidência de HIV-1 em 9/12 (75%) deles, sendo que 1 estava na fase aguda da infecção, no momento da inscrição na PrEP. Nos demais participantes (3/12, 25%) não foi evidenciado infecção por HIV. Foram sequenciadas 8/12 (67%) amostras na região *pol*, outras 4/12 (33%) não houve amplificação pelo protocolo de PCR. Das amostras sequenciadas, 6/8 (75%) apresentaram mutações e 2/8 (25%) não houve presença de mutações. Mutações associadas à resistência aos medicamentos de PrEP ou PEP de classe ITRN foram detectadas em 3/6 (50%) amostras (mutações K65R e M184V). Isso inclui dois casos de resistência de alto nível aos antirretrovirais Entricitabina (FTC) e Lamiduvina (3TC) e apenas um caso de resistência intermediária a alto nível aos ARVs de PrEP oral TDF/FTC. O monitoramento do perfil genotípico de resistência do HIV se mostra importante para detecção precoce de falha terapêutica em pacientes que usaram PrEP ou PEP e determinar a melhor escolha nos esquemas terapêuticos.

Palavras-chave: PrEP; PEP; terapia antirretroviral; resistência aos antirretrovirais; HIV.

INTRODUÇÃO

A Profilaxia Pré-Exposição (PrEP) tem auxiliado na prevenção de pessoas não infectadas, a fim de reduzir o risco de transmissão através das relações sexuais. Os estudos para comprovar a viabilidade da PrEP no Brasil começaram a partir de 2013, e em 2017, o Ministério da Saúde do Brasil iniciou a provisão da PrEP para o HIV em todo território nacional sendo disponibilizada pelo SUS^[1].

Outra alternativa incluída nas estratégias de prevenção combinada definido pelo Ministério da Saúde, é a Profilaxia Pós-Exposição (PEP) ao HIV, que consiste na administração combinada de medicamentos antirretrovirais, sendo dois de classes ITRN e

um INI (TDF/3TC/DLG), durante 28 dias^[3]. Seu início deve ocorrer em até 72h após a situação de exposição ao vírus. A distribuição ocorre de forma gratuita pelo SUS e está disponível desde 1999^[3]. Com o aumento na dispensação de profilaxia de prevenção há necessidade da caracterização de infecções que ocorrem durante o uso da PrEP ou PEP. Esse artigo busca descrever a incidência de infecção e o perfil genotípico do HIV-1 para detecção precoce de falha terapêutica em pacientes submetidos à PrEP e/ou PEP.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de Estudo

Foram incluídos no estudo 11 voluntários submetidos ao uso de PrEP e/ou PEP e 1 do estudo de regime experimental da vacina anti HIV-1, cujas amostras foram encaminhadas para diagnóstico e monitoramento do HIV-1 ao Laboratório de Genotipagem de HIV-1 do Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais (NDSS) do Centro de Virologia – Instituto Adolfo Lutz Central, no período de 2018 a 2022. Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos por meio da consulta direta aos laudos e ao SISCEL. Foram coletadas informações como: data do início do uso da profilaxia (PrEP ou PEP), a quais agentes ARVs foram expostos, ano do diagnóstico, exame de carga viral e uso de antirretrovirais. Estas informações obtidas foram armazenadas em um banco de dados (RedCap) para análise posteriormente. Informações que pudessem identificar o paciente foram mantidas em sigilo.

Metodologia Laboratorial

O processo de quantificação do RNA viral (Carga Viral - CV) foi realizado através do método Abbott Real Time HIV-1 (*Abbott M 2000rt*) utilizando aproximadamente 600 μ L de plasma. O resultado é expresso em número de cópias/mL e log₁₀/mL.

As extrações de RNA ou DNA foram realizadas manualmente utilizando kits comerciais disponíveis, seguindo as instruções do fabricante (QIAmp Viral RNA Mini Kit - QIAGEN, Alemanha) do qual usa-se plasma ou (QIAmp DNA Blood Mini Kit – QIAGEN, Alemanha) célula.

A amplificação das regiões genômicas *pol* e *int* para monitorar a prevalência de resistência aos medicamentos de classes Inibidores de Protease (IP), Inibidores de Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (ITRN), Inibidores de Transcriptase Reversa Não Análogos de Nucleosídeos (ITRNN) e Inibidores de Integrase (INI), a partir do material extraído do HIV-1 foram realizadas em duas etapas por metodologia de PCR *in house* (One Step RT-PCR). A primeira etapa consistiu na retrotranscrição e amplificação (RT-PCR) e a segunda etapa, da amplificação da sequência genômica de interesse (Nested PCR).

Após a etapa de PCR, foi realizada eletroforese para confirmação da amplificação das regiões alvo. O gel é preparado com tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) e 1% de agarose, onde é adicionado SYBER Safe DNA *Gel Stain* (*Invitrogen, USA*). A revelação das bandas presentes no gel é feita em luz ultravioleta e comparada ao padrão de peso molecular DNA Mass Ladder (*Invitrogen, USA*) para avaliar o tamanho dos fragmentos obtidos.

A reação de sequenciamento dos produtos amplificados foi realizada pela técnica de Sanger em equipamento automático ABI Prism 3130XL *Genetic Analyzer* (*Thermo Fisher, USA*). A edição dos cromatogramas obtidos pelo sequenciamento foi editada pelos *Softwares Sequencher 4.7* (*GeneCodes*) ou RECall beta v3.05 e, posteriormente, alinhadas no software BioEdit.

A avaliação do grau de suscetibilidade aos antirretrovirais (ARVs) foi feita por meio do algoritmo de *Stanford University HIV Drug Resistance Database – HIVdb* (Stanford HIVdb).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

População de estudo

Foram analisadas 11 amostras provenientes de indivíduos que fizeram uso de PrEP e/ou PEP e 1 de voluntário do estudo Mosaico, sendo 92% (n=11) do sexo masculino e 8% (n=1) do sexo feminino (mulher trans), com idade mediana de 31 anos (24-49). A distribuição de PrEP e PEP no Brasil é mais frequente entre os jovens adulto de 30 a 39 anos (41%), seguidos de adultos com idade entre 25 e 29 anos (24%), 40 a 49 anos (16%), 18 a 24 anos (12%) e 50+ anos (6%)^[3]. O quadro 1 detalha as características do grupo de estudado.

Quadro 1: Características dos participantes do estudo

Variáveis	Total
Número de participantes	12 (100%)
PrEP oral¹	8 (67%)
PrEP injetável²	1 (8%)
PEP³	1 (8%)
HPTN083⁴	1 (8%)
Estudo Mosaico⁵	1 (8%)
Sexo masculino	11 (92%)
Sexo feminino	1 (8%)
Esquema terapêutico em uso	
Primeiro esquema	7 (78%)
Troca do esquema terapêutico	2 (22%)
Combinações classes de ARV em uso	
2 ITRN + INI	8 (89%)
2 IP + INI	1 (11%)

Legenda: ¹Profilaxia Pré-Exposição ao HIV com Tenofovir e Emtricitabina (TDF/FTC) via oral; ²Profilaxia Pré-Exposição ao HIV com Cabotegravir injetável (CAB LA); ³Profilaxia Pós-Exposição ao HIV com Tenofovir/Lamivudina/Raltegravir durante 29 dias e PrEP oral TDF/FTC; ⁴Participante do Estudo HPTN083 que avalia eficácia do CAB LA e TDF/FTC, não se sabe qual ARV foi designado ao paciente; ⁵Participante do Estudo Mosaico com vacina experimental contra HIV-1; ARV: Antirretrovirais do HIV; ITRN: Inibidores de Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo; IP: Inibidores de Protease; INI: Inibidores de Integrase.

Dentre os participantes desse estudo temos voluntários de três grandes projetos: ImPrEP, HPTN083 e o estudo Mosaico. O ImPrEP é um projeto que avalia a viabilidade da implantação da PrEP na América Latina (Brasil, México e Peru) voltado para pessoas travestis, trans e HSH^[4]. Pensando no desenvolvimento de agentes alternativos seguros e eficazes de ação, o estudo HPTN083 é o primeiro a comparar a eficácia da injeção periódica de CAB LA com o TDF/FTC oral diário como PrEP do HIV^[5]. Os resultados do estudo mostraram que o CAB LA, administrado a cada oito semanas, apresentou alta eficácia em comparação ao TDF/FTC^[5]. Já o Mosaico é um grande estudo clínico para o desenvolvimento do regime experimental de vacina contra a infecção pelo HIV^[6]. A vacina a ser testada, apelidada de Ad26.Mos4.HIV, usa um vetor de adenovírus – um parente inofensivo do vírus do resfriado comum – para fornecer o chamado mosaico de imunógenos otimizados do HIV, ou antígenos que estimulam as respostas imunitárias^[6]. Em 2023, o

estudo Mosaico foi interrompido pela baixa eficácia na redução de novas infecções pelo HIV.

Incidência de infecção pelo HIV-1 em pacientes que fizeram uso de PrEP e/ou PEP

Dos 11 participantes que fizeram uso de PrEP e/ou PEP do HIV e mais o voluntário do estudo Mosaico, foram observados 9/12 (75%) casos de incidência de HIV-1, sendo 4 (id 18922, 6621, 9420 e 29822) durante a dispensação da PrEP, em um caso (id 39718) foi identificado que o paciente estava na fase aguda da infecção por HIV no momento da inscrição do Projeto ImPrEP, tendo dose de PrEP suspensa após 30 dias para uso de TARV. Já o paciente (id 25419) usou PEP e PrEP, após suspensão dos medicamentos teve sintomas e confirmação do diagnóstico por HIV-1. Os demais pacientes diagnosticados com HIV-1 se infectaram após interrupção do uso da PrEP (id 80421, 74621, 48622).

Tiveram 3/12 (25%) pacientes que fizeram uso de PrEP durante um período e não foram infectados por HIV (id 37219, 25922, 22920), o exame de Carga Viral desses pacientes tiveram resultado 'Não Detectado'. O tempo de uso de TDF/FTC oral das amostras 37219 e 25922 foram de 263 dias e 65 dias, respectivamente. Amostra 22920 usou CAB LA injetável durante 49 semanas. Tanto o paciente 25922 e 22920 tiveram suspeita de infecção por HIV-1 e interromperam a medicação de prevenção para dar início ao TARV. Durante o estudo foi observado com base em novos testes sorológicos e moleculares que o diagnóstico de ambos os pacientes se tratava de um falso-positivo, sendo assim, o TARV foi descontinuado segundo orientação dos médicos desses pacientes.

Apesar do presente estudo trazer casos de pacientes que usaram PrEP ou PEP e tiveram diagnóstico positivo para o HIV-1, o relatório geral de monitoramento dessas profilaxias demonstram o baixo percentual de soroconversão para o HIV em usuários que iniciaram PrEP/PEP reforçando a eficácia e importância desses métodos de prevenção^[3].

Identificar pacientes com infecção aguda por HIV-1 (IAH) é um desafio, principalmente porque os sintomas podem ser inespecíficos ou ausentes^[7]. É importante descartar o IAH antes de iniciar a PrEP, pois a dose diária de TDF/FTC em IAH não diagnosticado pode não controlar a viremia e acarretar em potencial de surgimento de resistência a medicamentos^[7].

A tabela 1 contém dados demográficos, período em PrEP/PEP, data de diagnóstico do HIV, exame de Carga Viral, contagem de linfócitos T CD4+ e início do tratamento com antirretroviral.

Tabela 1: Dados demográficos e laboratoriais de pacientes submetidos a PrEP e/ou PEP do HIV-1

ID	Idade (anos)	Sexo	Período em PrEP/PEP	Data diagnóstico HIV	CV IAL (Log ₁₀)	T CD4+ (mm ³ /mL)	Início TARV (M/ANO)	Esquema TARV	Supressão Viral após TARV (meses)
80421	45	M	22/11/2018 até 20/12/2018 01/08/2019 até 01/09/2019 05/02/2020 até 05/04/2020	08/11/2021	4,36	741	02/2022	TDF/3TC/D LG	7
74621	30	M	12/08/2019 até 11/11/2019	17/11/2021	2,70	1.041	01/2022	TDF/3TC/D LG	8
18922	38	M	15/12/2020 até 15/03/2022	15/03/2022	4,91	396	04/2022	TDF/3TC/D LG	3
6621	49	M	24/07/2018 até 23/02/2021	23/02/2021	2,24	776	02/2021	TDF/3TC/D LG	1
39718	25	M	#	04/07/2018	5,56	743	08/2018	TDF/3TC/D LG	10
9420	28	F	##	13/04/2020	3,73	906	04/2020	TDF/3TC/R TV/DRV	2
29822	34	M	###	11/05/2022	4,24	455	05/2022	TDF/3TC/D LG	2
25419*	31	M	PEP 13/05/2019 PrEP 11/06/2019 até 05/07/2019	05/07/2019	ND	429	07/2019	TDF/3TC/D LG	CV sempre indetectável
48622	31	M	09/07/2019 até 22/07/2021	16/09/2022	4,51	743	09/2022	TDF/3TC/D LG	Sem CV após TARV
37219	26	M	09/12/2020 até 29/08/2021	-	ND	-	-	Sem histórico de TARV	-
25922	25	M	28/08/2020 até 01/11/2020	-	ND	787	12/2020 até 05/2022	TDF/3TC/D LG	-
22920**	24	M	49 semanas de CAB LA	-	ND	879	10/2020 até 09/2021	TDF/3TC/R TV/DRV	-

Legenda: PrEP: profilaxia pré-exposição ao HIV; PEP: profilaxia pós-exposição ao HIV; CV: Carga Viral analisada no IAL; T CD4+: Contagem de Linfócitos TCD4+; Supressão Viral após TARV: quantos meses levou para a carga viral do paciente ficar indetectável após o início do tratamento; M: Masculino; F: Feminino; TDF: Tenofovir; 3TC: Lamivudina; DLG: Dolutegravir; RTV: Ritonavir; DRV: Darunavir; # Participante do Projeto ImPrEP com TDF/FTC, paciente estava na fase aguda da infecção; ## Participante do HPTN083 que avalia eficácia do CAB LA e TDF/FTC, não se sabe qual ARV foi designado ao paciente; ### Participante do Estudo Mosaico com vacina experimental contra HIV-1; *Paciente usou PEP (esquema TDF/3TC/RAL) por 29 dias, iniciou PrEP TDF/FTC em 11/06/2019 e teve diagnóstico positivo para HIV; **Paciente fez uso de PrEP injetável com CAB LA durante 49 semanas e usou PrEP oral TDF/FTC em 06/12/2021 e 18/07/2022.

Mutações de Resistência aos antirretrovirais

As 12 amostras foram testadas para avaliar a presença de mutações de resistências aos antirretrovirais das classes de Protease (IP), Inibidores de Transcriptase Reversa análogos de Nucleosídeo (ITRN), Inibidores de Transcriptase Reversa não análogos de Nucleosídeos (ITRNN) e Inibidores de Integrase (INI). A tabela 2 abaixo relata quais agentes antirretrovirais de profilaxia os pacientes foram expostos e os resultados do teste de genotipagem das regiões de Polimerase e Integrase.

Tabela 2: Perfil de resistência aos ARVs do HIV em pacientes expostos a PrEP e/ou PEP

Amostra	Exposição ARVs PrEP ¹	Polimerase (Pol)							Integrase (Int)			
		IP ³	ITRN ⁴	Resistência	ITRNN ⁵	Resistência (nível de resistência) ⁶	Subtipo	Material Extraído	INI ⁷	Resistência	Subtipo	Material Extraído
80421	TDF/FTC	AM	AM	-	K103N	EFV e NVP (a)	B	RNA	NA	-	-	DNA
74621	TDF/FTC	NA	NA	-	NA	-	-	DNA	NA	-	-	DNA
18922	TDF/FTC	AM	AM	-	E138A, V179VD	EFV, ETR, NVP, RPV (b)	C	DNA	AM	-	C	DNA
6621	TDF/FTC	AM	K65R, T69Deletion	ABC e TDF (a) FTC e 3TC (i)	Y181C, G190S	ETR (i); DOR, EFV, NVP, RPV (a)	B	RNA	NA	-	-	DNA
39718	TDF/FTC #	AM	M184V	ABC (b) FTC e 3TC (a)	K103Q	Suscetível aos ITRNN	C	RNA	***	-	-	DNA
9420	##	AM	AM	-	K103N	EFV e NVP (a)	B	DNA	NA	-	-	DNA
29822	###	AM	AM	-	AM	-	B	RNA	AM	-	F	DNA
25419*	TDF/3TC/RAL ² TDF/FTC	AM	M184V	ABC (b) FTC e 3TC (a)	K103N, V108I	DOR (b) EFV e NVP (a)	B	DNA	NA	-	-	DNA
48622	TDF/FTC	AM	AM	-	AM	-	B	RNA	AM	-	B	DNA
37219	TDF/FTC	NA	NA	-	NA	-	-	-	NA	-	-	DNA
25922	TDF/FTC	NA	NA	-	NA	-	-	DNA	NA	-	-	DNA
22920**	CAB LA	NA	NA	-	NA	-	-	DNA	NA	-	-	DNA

Legenda: ¹Antirretrovirais utilizados como PrEP; ²Antirretrovirais utilizados como PEP durante 29 dias; ³Mutações para classe dos Inibidores de Protease; ⁴Mutações para classe de Inibidores de Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeos; ⁵Mutação para Classe dos Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeos; ⁶Perfil de resistência aos ARVs: baixo (b), intermediário (i) e alto (a), de acordo com o Algoritmo de Interpretação de Resistência Genotípica do Programa (Stanford HIVdb); ⁷Mutações para Classe dos Inibidores de Integrase; AM: Ausência de Mutações de Resistência aos antirretrovirais; NA: Região Não Amplificada pelo protocolo de PCR; TDF: Tenofovir, FTC: Entricitabina; 3TC: Lamivudina; RAL: Raltegravir; ABC: Abacavir; EFV: Eferavinz; ETR: Etravirine; NVP: Nevirapine; RPV: Rilpivirine; # Participante do Estudo ImPrEP com TDF/FTC, paciente estava na fase aguda da infecção; ## Participante do Estudo HPTN083 que avalia eficácia do CAB LA e TDF/FTC, não se sabe qual ARV foi designado ao paciente; ### Participante do Estudo Mosaico com vacina experimental contra HIV-1; *Paciente usou PEP (esquema TDF/3TC/RAL) por 29 dias, iniciou PrEP TDF/FTC em 11/06/2019 e teve diagnóstico positivo para HIV após 24 dias de PrEP; **Paciente fez uso de PrEP injetável com Cabotegravir durante 49 semanas e usou PrEP oral TDF/FTC em 06/12/2021 e 18/07/2022. ***Não realizado genotipagem da região INT por falta de amostra biológica.

Os dados demonstraram que 8/12 (67%) amostras foram sequenciadas na região de polimerase utilizando plasma (RNA) ou célula (DNA) e em 4/12 (33%) não houve amplificação pelo protocolo de PCR, ainda que testadas pelo menos duas vezes. Das amostras sequenciadas, 6/8 (75%) apresentaram mutação e 2/8 (25%) não houve presença de mutações de acordo com o laudo de Stanford.

Mutações associadas à resistência aos medicamentos de PrEP ou PEP de classe ITRN foram detectadas em 3/6 (50%) amostras (mutações K65R e M184V) todas associadas a mutações também de classe ITRNN, aumentando a atenção quanto a limitação na TARV. Isso inclui dois casos de resistência de alto nível aos ARVs Entricitabina (FTC) e Lamiduvina (3TC) (administrados na PEP), o primeiro foi o voluntário do Projeto ImPrEP que teve infecção pelo HIV detectada na inscrição da PrEP (id 39718: mutação M184V) e o segundo é o paciente que fez uso de PEP e depois PrEP (id 25419: mutação M184V), a suspeita é que o paciente estava infectado antes do início da PEP. O terceiro caso (id 6621: mutação K65R) apresentou resistência intermediária a alto nível aos ARVs TDF/FTC.

Em um estudo similar foram encontrados 12 soroconvertidores para HIV, onde foi identificado resistência em 3 casos usando NGS (Sequenciamento de Nova Geração), isso inclui mutações K65R e M181I em dois casos de pacientes com infecção aguda do HIV na inscrição da PrEP e em um caso o participante estava em uso de PrEP; resistência aos ARVs de classe ITRNN foi detectado em outros 2 casos^[8]. Dois desses casos, os participantes com IAH não diagnosticada foram expostos apenas a 4 doses semanais de TDF/FTC; isso indica que mesmo uma exposição muito limitada à PrEP é suficiente para induzir resistência em indivíduos com infecção precoce/aguda pelo HIV^[8]. Sendo uma possível justificativa a resistência aos medicamentos entre os pacientes 39718 e 25419 que estavam na fase aguda da infecção e fizeram uso de PrEP/PEP.

Além disso, em nosso estudo foram encontrados 3/6 (50%) amostras com mutações somente à classe ITRNN. As mutações encontradas dessa classe foram: K103N, E138A, V179VD, Y181C, G190S, K103Q e V108I. Não houve presença de mutação para classe IP nas sequências analisadas.

As amostras sequenciadas na região de Integrase foram 3/11 (27%) utilizando célula (DNA). Em 8/11 (73%) não houve amplificação pela metodologia de PCR, ainda que testadas pelo menos duas vezes e 1 amostra não foi testada devido à falta de material biológico (id 39718). Nenhuma das amostras sequenciadas apresentou mutação de resistência aos medicamentos da classe Inibidores de Integrase.

CONCLUSÃO

Este trabalho conclui que o monitoramento das mutações é importante para detecção precoce de falha terapêutica em pacientes que usaram PrEP ou PEP devido a presença de mutações que podem prejudicar a ação dos medicamentos, favorecendo a evolução da doença, além de auxiliar na melhor escolha dos esquemas terapêuticos. Para tal, ensaios sensíveis para o diagnóstico do HIV e testes de resistência aos antirretrovirais são de suma importância.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Profilaxia Pré-Exposição (PrEP) de Risco à Infecção pelo HIV. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 52 p. : il. Acesso: Agosto, 2022.
2. AMARAL, G. Ministério da Saúde inicia hoje o lançamento da Profilaxia Pré-Exposição (PreP). FIOTEC, 2017. Disponível em: <<https://www.fiotec.fiocruz.br/noticias/projetos/4648-ministerio-da-saude-inicia-hoje-o-lancamento-da-profilaxia-pre-exposicao-prep>> Acesso: Agosto, 2022.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Relatório de monitoramento de Profilaxias do HIV – PrEP e PEP | 2021 [recurso eletrônico]. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 41 p.: il.
4. PrEP BRASIL. FIOCRUZ-RJ. CRT DTS/AIDS SP. USP-SP. Estudo PrEP Brasil. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<https://prepbrasil.com.br/pesquisa-prep-brasil/>> Acesso: Novembro, 2022.
5. LANDOVITZ R, et al. Cabotegravir para prevenção do HIV em homens cisgêneros e mulheres transgêneros [HPTN 083], NEJM, 2021
6. JANSSEN Vaccines & Prevention B.V., Mosaico. 2019. Disponível em: <<https://www.mosaicostudy.com/pt/>> Acesso: Novembro, 2022.
7. ELLIOT, T. et al. Challenges of HIV diagnosis and management in the context of pre-exposure prophylaxis (PrEP), post-exposure prophylaxis (PEP), test and start and acute HIV infection: a scoping review. J Intern AIDS Soc. 2019; 22(12):e25419. DOI: <https://doi.org/10.1002/jia2.25419>
8. SIVAY et al. Characterization of HIV Seroconverters in a TDF/FTC PrEP Study: HPTN 067/ADAPT. J Acquir Immune Defic Syndr. 2017 Jul 1;75(3):271-279. doi: 10.1097/QAI.0000000000001374

DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HIV: UM HISTÓRICO DA TÉCNICA E SUA IMPORTÂNCIA E APLICAÇÕES NO SISTEMA DE VIGILÂNCIA E MONITORAMENTO DA AIDS

Isabela Pelogia Humber¹
Renato Pereira de Souza²

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

²Orientador e pesquisador do Instituto Adolfo Lutz IAL;
E-mail: renatoefabi@gmail.com

Resumo: Desde que emergiu, a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana) tem atraído a preocupação mundial. Com a adesão do tratamento antirretroviral pela população que vive com HIV/AIDS, foi estabelecido um método chamado quantificação viral, que é utilizado para acompanhamento da carga viral de pessoas diagnosticadas com Vírus da Imunodeficiência Humana-1 (HIV-1) e é responsável pelo monitoramento da evolução clínica dos pacientes e efetividade do tratamento. Dessa forma, este trabalho se propôs a revisar historicamente as aplicações da Determinação da Carga Viral e sua importância para o sistema de vigilância e monitoramento do HIV/AIDS. Por meio da revisão, foi possível reunir informações que permitiram a construção de uma linha do tempo, as principais mudanças constatadas desde o uso do teste de carga viral no Brasil e como elas afetaram o quadro histórico de infecção do HIV.

Palavras-chave: HIV, Carga Viral HIV e PCR em tempo REAL.

INTRODUÇÃO

A AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) é motivo de alerta desde que, em meados de 1981, foram reconhecidos os primeiros casos da doença nos Estados Unidos da América (EUA) (PINTO et al, 2007). Até os dias atuais a erradicação da infecção pelo HIV ainda persiste como um problema de grande relevância para a saúde pública (POLO, 2017).

Para combate à mortalidade pela infecção por HIV um contribuinte de grande importância é a adesão ao TARV e acompanhamento dos que fazem tratamento. Para a vigilância e monitoramento do tratamento e evolução da epidemia utiliza-se da determinação quantitativa da carga viral nas decisões sobre o melhor tratamento a ser tomado por cada indivíduo em particular, suas condições clínicas e na adesão a essa terapia, sendo desta forma, possível reduzir a presença do vírus no sangue até níveis que garantem melhor sobrevida das pessoas que vivem com HIV (Abbott Real Time, 2022).

Portanto, esse trabalho se propõe a revisar historicamente as aplicações da Determinação da Carga Viral e sua importância para o sistema de vigilância e monitoramento da AIDS.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão histórica da literatura científica, com busca em textos publicados no período de 1996 a 2021. A busca foi realizada em artigos extraídos pela internet, através das bases de dados online Google Scholar e Pubmed. As variáveis para critério de seleção das informações foi feita pela escolha das palavras-chave: Carga Viral HIV; e PCR em tempo real HIV.

Após a seleção, os assuntos levantados puderam ser categorizados em 4 temas principais: Disponibilidade de laboratórios que realizam a Carga Viral em amarelo; Metodologias de PCR utilizadas em vermelho; Mudanças entre técnicas em verde e, Manipulação das amostras em azul.

Foi realizado, para melhor visualização, uma linha temporal de todos os acontecimentos em uma imagem que constam todas as datas disponibilizadas de forma crescente e, para se diferenciar os temas, cada um está separado em uma cor, cada inserção na linha possui sua respectiva referência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Disponibilidade de laboratórios que realizam a Carga Viral

Em 1996, a princípio, o exame de carga viral era realizado apenas em alguns laboratórios brasileiros, como o laboratório bioquímico Jardim Paulista, em São Paulo, e Hermes Pardini, em Belo Horizonte (Folha de Parreira, 1996). Atualmente, no ano de 2022 existem 81 laboratórios de carga viral integrantes da Rede Nacional de Carga Viral do Departamento Nacional de Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST)/AIDS e Hepatites Virais distribuídos em todo o país (Guimarães, 2018; Santos, 2019).

Metodologias de PCR utilizadas

Para realização do teste, os laboratórios da rede nacional do Ministério da Saúde responsável pela quantificação do HIV já utilizou os kits comerciais: Amplicor HIV-1 Monitor® Roche Diagnostic System, NASBA QR System® Organon Teknika e Nuclisens (Machado, Carlos, 1999).

A técnica de PCR utilizada inicialmente era chamada de NASBA (NUCLISENS), e, foi então substituída pela metodologia Real Time PCR (plataforma m2000rt) que garante que etapas antes manuais sejam automatizadas, dessa forma, reduzindo o tempo de preparo das amostras; além de permitir opções menores de volume de amostra (até 1 mililitro) e ter um intervalo linear de 40 a 10.000.000 cópias/mililitro (Luz, 2017).

A mudança das metodologias de PCR ocorre por diversos motivos, entre eles, a necessidade de diminuir o custo elevado que a quantificação da carga viral tem para os

laboratórios, e a atualização dos testes também é um exemplo disso, e pode representar uma vantagem para o sistema público de saúde de redução de gastos.

Também vale destacar que, uma vez que para ser realizado, o PCR necessita de equipamentos específicos, e por isso, a alteração dessas metodologias demonstra os avanços na área da biologia molecular, que garantem maior sensibilidade, precisão, especificidade, entre outros fatores que, diretamente alteram alguns princípios do exame e aperfeiçoam o processo de obtenção dos resultados.

Mudanças entre técnicas

A quantificação da carga viral é um determinante para a evolução da infecção, dessa forma, a sua detecção é baseada no número de em média de células infectadas encontradas por mililitros de plasma do paciente. Como exemplo, tem-se o parâmetro que uma alta carga viral é a que ultrapassa 500 cópias por mililitro. (Gonçalves, 2000).

A partir do momento em que a técnica de PCR-quantitativo para HIV foi utilizada para detectar a carga viral em crianças até dois anos, adaptações quanto a sua sensibilidade precisaram ser realizadas; o limite de detecção por mililitro de plasma infantil é maior que o detectado anteriormente em adultos, dessa forma, a sensibilidade se tornou ultrasensível, sendo capaz de detectar de 40-50 cópias/mililitro de plasma (Okay, Granato, 2000).

Manipulação das amostras

Essa última divisão cronológica mostra as alterações da manipulação das amostras, e, este, se mostrou um pouco mais tardio em mudanças relação as demais categorias, uma vez que esse estudo buscou relatar apenas diferenças apontadas somente no que foi apresentado pelos trabalhos selecionados, não se pode dizer quando exatamente tais ações foram praticadas.

Como relatam os resultados, a carga viral, desde 2000 começa a ser utilizada também para o diagnóstico de infecção por HIV no período perinatal, o que foi necessário, pois, ao se confirmar a transmissão vertical da mãe para o feto na gestação em 1997, intervenções foram criadas para prevenção dessa transmissão da qual a quantificação da carga viral tem uma função crucial.

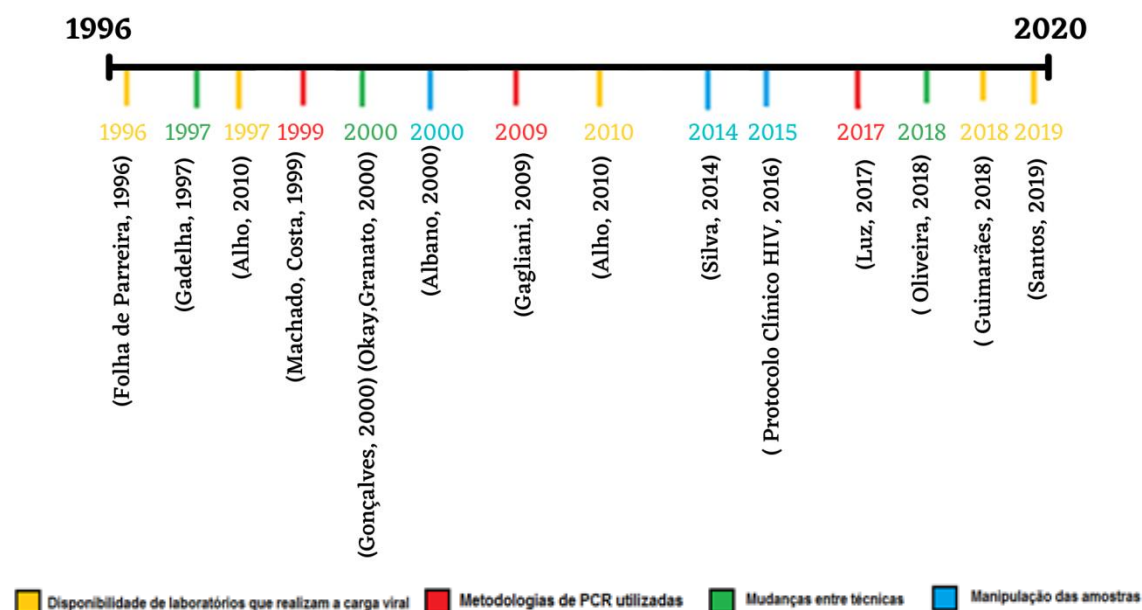


Figura 1 – Linha temporal dos eventos de Carga Viral.

CONCLUSÕES

Os resultados apontam a importância que, através dos anos as mudanças na determinação da carga viral desempenharam para a garantia de uma melhor qualidade no amparo da pessoa que vive com HIV; seja a implantação de um maior número de laboratórios que realizam esse exame diminuindo a chance de degradação da amostra; como a melhoria quanto à sensibilidade do teste conforme as técnicas de PCR eram substituídas por outras mais avançadas, por exemplo; cada ponto discutido significa uma melhoria no teste que ajuda em mais rapidez e confiabilidade de resultado para o paciente, e, por isso, estima-se que essas intervenções continuem no futuro e sejam cruciais para o desenvolvimento do monitoramento viral.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, pois sem Ele nada na minha vida seria possível.
 A minha mãe, que me incentivou e proporcionou todo o apoio necessário para minha formação profissional.
 Ao meu orientador, Renato Pereira de Souza, por todos os conselhos, ensinamentos e pela paciência com a qual guiaram meu processo de realização deste trabalho.
 Agradeço a Fernanda Auxiliadora Guimarães, por partilhar seu conhecimento para elaboração deste trabalho.
 Agradeço a todos os funcionários do Instituto Adolfo Lutz, que durante esse ano me ensinaram.

REFERÊNCIAS

ABBOTT LABORATÓRIOS DO BRASIL LTDA. *Manual Abbott RealTime HIV-1*. São Paulo: Abbott. 2016,13f.

ALBANO, L de A. **AIDS, uma epidemia do mundo atual**. 2000. 49f. Monografia (Licenciado em Ciências Biológicas) - Centro Universitário de Brasília, 2000.

ALHO, M. J. de O. **Validação de recursos de cargas viral do HIV-1 obtidos para insumos/kits/equipamentos de diferentes procedências**. 2010. 74f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2010.

BRASIL, Ministério Da Saúde. **Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais**. Disponível em: <www.aids.gov.br>. Acesso em: 15 ago. 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2013. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_infeccao_hiv.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 1.100, de 24 de maio de 1986. Relaciona as doenças de notificação compulsória. **Diário Oficial da União**, São Paulo, SP, 09 ago. 1996. Seção 1, p. 15131 - Republicada.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de DST e AIDS**. AIDS Boletim epidemiológico, Brasília, ed. especial, Dez. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2021/boletim-epidemiologico-especial-hiv-aids-2021.pdf/view>> . Acesso em: 20 ago.2022

BRASIL. Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul – Coordenação Estadual de DST/AIDS Universidade Federal do Rio Grande do Sul – TelessaúdeRS/UFRGS . **Protocolo Clínico para acompanhamento e tratamento de pessoas com HIV/AIDS na Atenção Primária à Saúde** . Porto Alegre. 2016. 25 p. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/telessauders/documentos/protocolos_resumos/protocolos_clinico_hiv_TSRs.pdf> . Acesso em: 22 set. 2022

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**, v. 34, n. 2, p. 207-217, 2001 . Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/zBSKHBDyfvfz7cLQp7fsSBg/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 22 set. 2022

CARGA viral já pode ser medida no Brasil. **Folha de Parreira**, Curitiba, Paraná, ago. 1996. Disponível em: <https://repositoriointeragir.c3sl.ufpr.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/72/29%20ed_

Folha%20de%20Parreira_watermark.pdf?sequence=1&isAllowed=y> . Acesso em: 10 ago. 2022

DAVARO, R.E.; LOSSO, M.H. Avances em el tratamento antirretroviral. **Revista Medicina**. v. n.57 p.1 87-94, 1997.

GADELHA, A.M.J. **Casos Notificados De Aids No Município Do Rio De Janeiro, 1983-1993: Análise De Sobrevida**. 1997. 177f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1997.

GAGLIANI, L. H.. **Estudo da resistência genotípica primária aos antirretrovirais em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV – 1) no Município de Santos / SP – Brasil**. 2009.175 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

GONÇALVES, M.X. **AIDS e vulnerabilidade feminina: compreensão a partir de discursos de mulheres soropositivas**. 2000. 156f. Dissertação (Pós Graduação em Enfermagem) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

GUIMARÃES, M. D. C. et al. Mortalidade por HIV/Aids no Brasil, 2000-2015: motivos para preocupação?. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, n.1, p. 182-190, 2017.

GUIMARÃES, P.L.S. **Comparação do desempenho da metodologia Real Time PCR para quantificação da carga viral do HIV-1 em amostras de sangue aplicadas em papel de filtro (DBS) e plasma**. 2018. 84f. Dissertação (Mestrado em Infecção HIV/AIDS e Hepatites Virais na área de HIV) - Universidade Federal Do Estado Do Rio De Janeiro. Rio de Janeiro, 2018.

LUZ, A.J.B. **Quantificação da carga viral do HIV-1 no líquido : comparação entre os ensaios Abbott m2000rt e COBAS TaqMan v2.0**. 2017. 53f. Tese (Doutorado em Medicina: Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2017.

MACHADO AA, COSTA JC da. Métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). **Medicina (Ribeirão Preto)** [Internet]. 30 de junho de 1998, 32(2):138-46.

OKAY, T.S.; GRANATO,C.F.H. O diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) em crianças entre dois e 24 meses. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.46. n.4, 2000.

OLIVEIRA, MI de. **Perfil Genotípico Do HIV-1 Na Primeira Falha Viroológica à Terapia Antirretroviral Em Pacientes Atendidos Na Região Metropolitana Do Recife Entre 2006 E 2016**. 2018. 106f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2018.

PASSOS, D.F. **Comparação Entre BDna E Pcr Na Detecção Da Carga Viral Do HIV-1.** 2013. 89f. Dissertação. (Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2013.

PEREIRA, J.M. et al. Avaliação de ensaio molecular para determinação de carga viral em indivíduos sorologicamente negativos para o HIV-1. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**; v. 38, n.1, 2002.

PINTO , Agnes Caroline S et al. Compreensão da pandemia da aids nos últimos 25 anos. **DST - Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis** , Fortaleza Ceará, 2007, v. 19, n. 1, p. 45-50, 2007.

POLO, T.A. **A Influência de Polimorfismos de Fatores de Restrição na Suscetibilidade ao HIV e na Progressão à AIDS.**2017. 64f. Dissertação (Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2017.

SANTOS, G.S. dos. **Monitoramento Imunológico Na História Da Infecção pelo HIV-1.** 2019. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública) - Instituto Adolfo Lutz. São Paulo, 2019.

SILVA, G. A. R. da. **Deficiência de vitamina D em indivíduos HIV-positivos expostos ou não a esquemas antirretroviraisum estudo transversal.** 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

SOUZA, H. Da C et al . Contagem de linfócitos tcd4 + e carga viral em pacientes HIV+ de um laboratório de referência. **REVISTA BRASILEIRA MILITAR DE CIÊNCIAS**, v. 6, n. 15, 5 ago. 2020.

VILLARINHO, M. V. et al. Políticas públicas de saúde face à epidemia da aids e a assistência às pessoas com a doença. **Revista Brasileira de Enfermagem**;v. 66, n.2,p. 271-277, 2013.

PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA E FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Escherichia coli* ISOLADOS DE ÁGUAS PARA CONSUMO HUMANO

Gabriele Lopes Socossiuc¹; Erika Kushikawa Saeki²

¹Estudante do Curso de Especialização Vigilância Laboratorial em Saúde Pública do Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente;

E-mail: gabrielesocossiuc@hotmail.com

²Docente/Pesquisador Científico do Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente.

Resumo: A qualidade da água fornecida para a população deve atender os requisitos da Portaria GM/MS Nº 888, de 04 de maio de 2021. O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de motilidade *Swarming*, formação de biofilmes e avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana em isolados de *E. coli*. Os 66 isolados testados foram obtidos do sistema de abastecimento público, águas de poços artesianos ou semi-artesianos e minas. O isolamento de *E. coli* foi realizado a partir do substrato cromogênico a 35 °C/ 24 h com crescimento em ágar eosina azul de metileno a 37 °C/ 24 h. Foram realizados os ensaios de motilidade *Swarming*, formação de biofilmes em placas de poliestireno e teste de sensibilidade antimicrobiana. Dos isolados testados, 46 (69,7%) foram obtidos de águas de abastecimento público, 17 (25,8%) de poços artesianos ou semi-artesianos e 3 (4,5%) de minas. Quanto à motilidade *Swarming* 58 (87,9%) foram fracamente móveis, sete (10,6%) moderadamente móveis e, um (1,5%) altamente móvel. Todos os isolados com motilidade *Swarming* moderado e alto foram obtidos do sistema de abastecimento público. Em relação à formação de biofilmes, três (4,5%) foram produtores fortes de biofilmes, dois (3,0%) moderados produtores, 50 (75,8%) fracos produtores e 11 (16,7%) não produtores. No teste de sensibilidade antimicrobiana, 13 (19,7%) apresentaram multirresistência. Os isolados com formação de biofilmes fortes e moderados apresentaram multirresistência antimicrobiana e foram obtidos de abastecimento público e poços. Destacamos o possível risco à Saúde Pública devido ao consumo de água proveniente do sistema de abastecimento público e poços contendo *E. coli* que apresentam alta motilidade *Swarming*, capacidade de formação de biofilmes e resistência a importantes antibióticos. Por isso, toda água para consumo humano deve apresentar um processo de desinfecção para garantir a qualidade da água a toda população.

Palavras-chave: biofilme; motilidade swarming; resistência antimicrobiana; qualidade da água

INTRODUÇÃO

A água é o componente mais abundante nos sistemas vivos, constituindo cerca de 70% do peso da maioria dos organismos. É considerada necessidade primordial para a vida e o recurso natural indispensável ao ser humano e aos ecossistemas (DA SILVA *et al.*, 2019).

A qualidade da água que é fornecida para a população deve passar por um processo no qual haja controle e cuidado desde a captação até sua distribuição (SPECIAN *et al.*, 2021), atendendo os requisitos estabelecidos na Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021

(BRASIL, 2021) responsável por estabelecer os procedimentos de vigilância, controle de qualidade e padrão de potabilidade da água para consumo humano, que define como critério microbiológico a ausência de *Escherichia coli* em 100 mL de água. (ODONKOR; ADDO, 2018; GURGEL *et al.*, 2020).

Os parâmetros microbiológicos são características importantes da água para consumo humano, pois a presença de patógenos está diretamente ligada a doenças de veiculação hídrica, responsáveis pelas altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (DA SILVA *et al.*, 2019; GURGEL *et al.*, 2020), o que a torna uma questão indispensável para a saúde pública (FRIAS *et al.*, 2020).

Dentre os fatores de virulência de *E. coli*, destacam-se a capacidade de formação de biofilmes, relacionado com a resistência a antimicrobianos e a geração de infecções graves; a motilidade *swarming* através de flagelos; a presença de fímbrias; a formação de pili e a capacidade da bactéria em codificar antígenos capsulares K1 e K5 (COSTA *et al.*, 2019).

O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de amostras de água para consumo humano.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 66 isolados de *E. coli* obtidos de águas do sistema de abastecimento público, águas de poços artesianos ou semi-artesianos e minas recebidos pelo CLR IAL Presidente Prudente através do Programa Proágua durante os anos de 2018 a 2020. O isolamento das bactérias foi realizado a partir da técnica de presença e ausência com o substrato cromogênico Colilert® (IDEXX, Brasil) a 35 °C/ 24 horas, seguido de crescimento em ágar eosina azul de metileno (EMB) a 37 °C/ 24 horas e confirmados pelo crescimento em meio Rugai com lisina a 37°C por 24 horas.

Para a realização do teste de motilidade *Swarming*, os isolados testados foram incubados em caldo Luria Bertani (LB) a 37°C por 24 horas, seguida por semeadura em ágar triptona de soja (TSA) a 37°C por 24 horas. Posteriormente, transferiu-se as colônias para um tubo contendo 3 mL de solução salina estéril 0,85 % para a obtenção da escala de McFarland 0,5 (concentração de 5×10^8 UFC/mL). Suspendeu-se 10 µL do inóculo no centro do Ágar *Swarming* (glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,2% e ágar 0,5%) em triplicata. A zona de motilidade (mm) foi medida após incubação a 37°C por 24 horas. As médias dos diâmetros dos halos formados foram calculadas e caracterizadas em: não móvel ou fracamente móvel $d < 20\text{mm}$; moderadamente móvel $20\text{ mm} \leq d < 40\text{ mm}$ e altamente móvel $d \geq 40\text{ mm}$ (ABDOUCHAKOUR *et al.*, 2018).

Os ensaios para a formação de biofilmes seguiram a metodologia proposta por Ramos-Vivas *et al.* (2019) com algumas adaptações. Primeiramente, cada cepa foi crescida em caldo LB a 37°C por 24 horas, seguida de semeadura em ágar TSA a 37°C por 24 horas. Realizou-se uma suspensão bacteriana em solução salina estéril 0,85 % para obter 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, foi testada a produção de biofilmes em placas de microtitulação de polietileno com fundo chato de 96 poços por meio da coloração com cristal violeta. A leitura foi realizada em leitor de ELISA a 620 nm. Os isolados foram classificados em: não produtor de biofilmes ($DO \leq DOc$); produtores fracos ($DOc < DO \leq 2x$); produtores moderados ($2x DOc < DO \leq 4x$) e produtores fortes ($4x DOc < DO$).

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos e a interpretação foram realizados pela técnica da difusão do antimicrobiano em ágar Mueller-Hinton a 35°C por 24 horas, de acordo

com o BRCast (2021;2022). A resistência antimicrobiana foi determinada de conforme descrito por Migiorakos *et al.* (2012).

Os antimicrobianos avaliados foram: Cefoxitina 30 µg (FOX); Cloranfenicol 30 µg (C); Sulfametoxazol-trimetoprim 25 µg (SXT); Levofloxacina 5 µg (LEV); Norfloxacina 10 µg (NOR); Amoxicilina-ácido clavulânico 30 µg (AMC); Cefepime 30 µg (FEP); Aztreonam 30 µg (ATM); Cefotaxima 5 µg (CTX); Ceftazidima 10 µg (CAZ); Ciprofloxacina 5 µg (CIP); Ertapenem 10 µg (ETP); Gentamicina 10 µg (CN); Imipenem 10 µg (IPM); Meropenem 10 µg (MEM); Piperacilina-tazobactam 36 µg (TZP); Tobramicina 10 µg (TOB); Amicacina 30 µg (AK); Ampicilina 10 µg (AMP) e Ampicilina-sulbactam 20 µg (SAM).

Os resultados foram avaliados em planilhas Excel (Microsoft Excel) e os gráficos elaborados em software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto aos isolados de *E. coli* que foram testados, 46 (69,7%) foram obtidos de águas de abastecimento público, 17 (25,8%) obtidos de poços artesianos ou semi-artesianos e 3 (4,5%) de minas.

A bactéria *E. coli* possui uma capacidade de sobrevivência e crescimento em diversas condições ambientais, favorecida pela sua versatilidade metabólica e fisiológica, possuindo flagelos que permitem o seu deslocamento em ambientes líquidos, em especial nas águas para consumo humano. De acordo com Ruan *et al.* (2021), a motilidade é uma característica do patógeno necessária para o processo de colonização, adesão e potencialização da infecção.

Considerando a classificação apresentada por Abdouchakour *et al.* (2018), dos 66 isolados pesquisados, 58 (87,9%) foram consideradas fracamente móveis, 7 (10,6%) moderadamente móveis e, 1 (1,5%) altamente móvel, obtendo uma área de motilidade que variou de 07 a 62 mm (Gráfico 1).

Todos os isolados que apresentaram motilidade *Swarming* moderado e alto foram obtidos do sistema de abastecimento público.

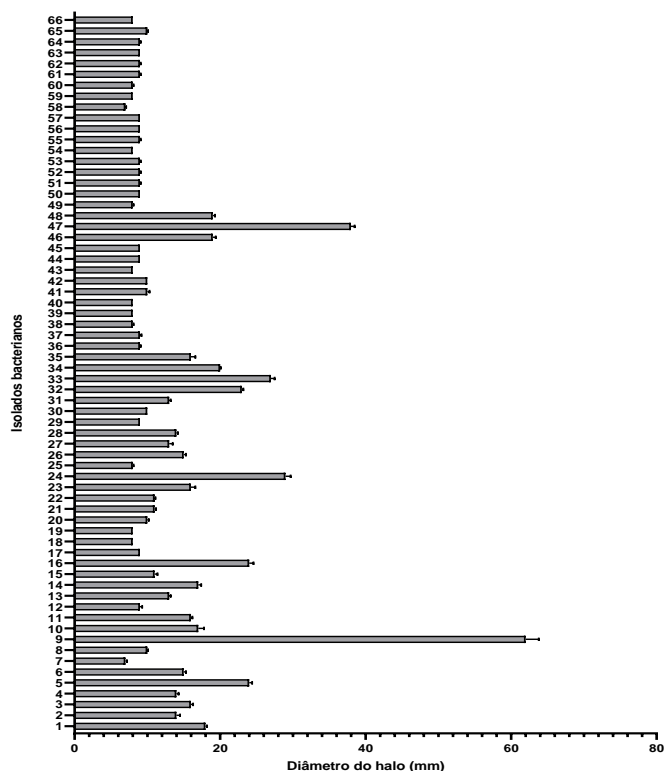


Gráfico 1 – Medida do diâmetro do halo formado em milímetros (mm) dos isolados bacterianos de *Escherichia coli* a partir do teste de motilidade em ágar *Swarming*.

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 1 – Resultados da formação de biofilmes para isolados de *E. coli*.

Classificação	<i>Escherichia coli</i> n (%)
Forte	3 (4,5%)
Moderada	2 (3,0%)
Fraca	50 (45,8%)
Não produtor	11 (16,7%)
Total	66 (100,0%)

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A formação de biofilmes pela bactéria *E. coli* é um processo complexo que compreende a colonização, acumulação, maturação, descamação e replantação (RUAN *et al.*, 2021), sendo mais favorável a formar biofilmes com maior intensidade quando encontradas em meio aquático (MACEDO *et al.*, 2020).

Dos 66 isolados de *Escherichia coli* analisados, três (4,5%) foram considerados produtores fortes de biofilmes, dois (3%) produtores moderados, 50 (75,8%) produtores fracos, e 11 (16,7%) não produziram biofilmes (Tabela 1). Macedo *et al.* (2020) verificaram que 74,12% dos isolados de *E. coli* obtidos de águas *in natura* (minas e poços) apresentaram capacidade de formação de biofilmes.

Conforme apresentado por Guerra *et al.* (2006), a presença de biofilmes nas redes de distribuição formados a partir da matéria orgânica na água está relacionada com a demanda e uso de diferentes desinfetantes, que diferem em como agem nos microrganismos e influenciam na barreira de desinfecção. Enquanto que, os autores O’Toole; Kolter (1998) relataram que os fatores associados à superfície bacteriana, como os flagelos e pili tipo IV, são as estruturas essenciais para o processo de desenvolvimento dos biofilmes.

Dentre os três isolados fortes produtores de biofilme, todos apresentaram multirresistência no teste de sensibilidade antimicrobiana, sendo que dois isolados foram obtidos de poços e um do sistema de abastecimento público. Os dois isolados com produção moderada de biofilmes foram obtidos do sistema de abastecimento público, e também apresentaram multirresistência aos antibióticos testados.

Quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, CTX, CAZ, CIP e MEM, apresentaram eficiência de 100% sobre os isolados. Entretanto, os antibióticos FOX, AMC, CN, TOB e AMP indicaram 12 ou mais isolados resistentes (Gráfico 2).

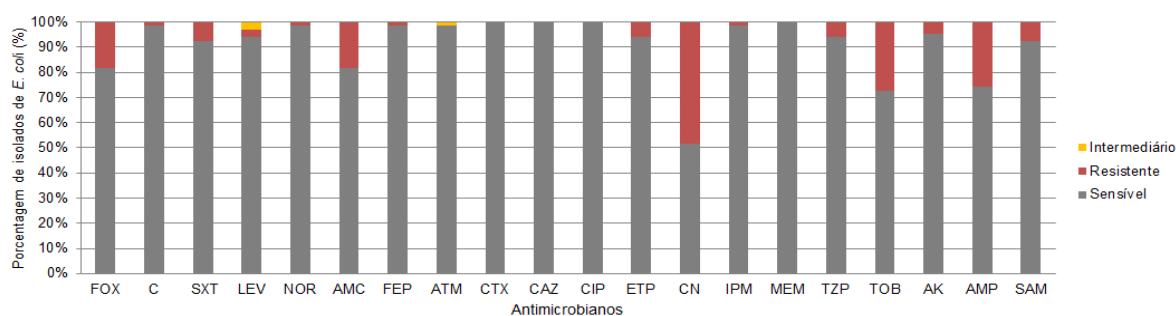


Gráfico 2 – Resultados em porcentagem (%) dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *E. coli*.

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com a classificação apresentada por Magiorakos *et al.* (2012), dos 66 isolados, 13 (19,69%) apresentaram multirresistência, sendo 7 de abastecimento público, 5 de poços e 1 de mina.

De acordo com Szekeres *et al.* (2017), os perfis de sensibilidade de *E. coli* em ambientes aquáticos são influenciados pela alta taxa de consumo de medicamentos sem prescrição médica, aos efluentes hospitalares sem tratamento adequado e às altas concentrações de resíduos de antibióticos lançados em diversos corpos d'água. Silva *et al.* (2022) destaca que a possibilidade de exposição de pessoas por bactérias resistentes durante a utilização de água para consumo fortalece a necessidade de estratégias de saúde, sanitárias e ambientais como melhoria do saneamento, com o objetivo de garantir a saúde da população.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados destacamos o possível risco à saúde pública devido ao consumo de água proveniente do sistema de abastecimento público e poços contendo *Escherichia coli* que apresentam alta motilidade, capacidade de formação de biofilmes e resistência a importantes antibióticos. Especialmente, causa preocupação às águas de poços que são utilizadas para consumo humano sem tratamento prévio. Por isso, conforme a legislação vigente é importante que toda água para consumo humano passe por processo de desinfecção para garantir a qualidade da água a toda população.

REFERÊNCIAS

ABDOUCHAKOUR, Fátima *et al.* Intraclonal variation of resistance and phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clone ST308: A key to success with in a hospital. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 2, p. 279-289, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria Nº 888, de 04 de maio de 2021. 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.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, BrCAST. Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos Versão 9.0, janeiro de 2021 do EUCAST. Versão para o português em 24/6/2021-<http://brcast.org.br/>.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, BRCast. Tabelas de Pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halo. Versão 12.0, de 2022.

COSTA, Igor Augusto et al. Infecção do trato urinário causada por *Escherichia coli*: revisão de literatura. **Salusvita**, v. 38, n. 1, p. 155-193, 2019.

DA SILVA, Aldeni Barbosa et al. Análise microbiológica da água de bebedouros nas escolas públicas da cidade de Esperança/PB. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, n. 1, 2019.

FRIAS, Danila Fernanda Rodrigues et al. Variação espaço-temporal da concentração de *Escherichia coli* em águas superficiais e a saúde pública. **Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades**, v. 8, n. 60, p. 77-86, 2020.

GUERRA, Natália Maria Maciel *et al.* Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 13-18, 2006.

GURGEL, Raiana Silveira; DA SILVA, Lirna Salvioni; SILVA, Luciete Almeida. Investigação de coliformes totais e *Escherichia coli* em água de consumo da comunidade Lago do limão, Município de Iranduba-AM. **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 4, p. 2512-2529, 2020.

MACEDO, Kawana Hiromori *et al.* Caracterização de *Escherichia coli* diarreiogênica isolada de água subterrânea para consumo humano em um assentamento rural. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 41, n. 2, p. 263-272, 2020.

MAGIORAKOS, AP *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n.3, p.268-281.

ODONKOR, Stephen T.; ADDO, Kennedy K. Prevalência de *Escherichia coli* multirresistente isolada de fontes de água potável. **Revista Internacional de Microbiologia**, v. 2018, 2018.

O'TOOLE, George A; KOLTER, R Roberto. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 449-461, 1998.

RAMOS-VIVAS, José et al. Biofilm formation by multi drug resistant Enterobacteriaceae strains isolated from solid organ transplant recipients. **Scientific Reports**, v.9, p. 8928, 2019.

RUAN, Xiangchun *et al.* In vitro antibiofilm activity of resveratrol against avian pathogenic *Escherichia coli*. **BMC Veterinary Research**, v.17, n.1, p.249, 2021.

SILVA, Taíssa de Souza Menezes da *et al.* Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de águas superficiais do Rio Carioca-RJ, Brasil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 27, p. 673-682, 2022.

SPECIAN, Angie Mendes *et al.* Ocorrência de bactérias heterotróficas, coliformes totais e *Escherichia coli* em amostras de água de abastecimento público de dois municípios do Estado de São Paulo. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 18, n. 205, 2021.

SZEKERES, Edina *et al.* Abundance of antibiotics, antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wastewater effluents from different Romanian hospitals. **Environmental Pollution**, v. 225, p. 304-315, 2017.

DETERMINAÇÃO DE EDULCORANTES EM REFRIGERANTES DIETÉTICOS

Milene Ribeiro da Silva; Mahyara Markievicz Mancio Kus- Yamashita²; Cristiane Bonaldi Cano³

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CEFOR-SES– IAL ; E-mail: mily.ribeiro2016@gmail.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Químico-físicas e Sensorial de Alimentos – CALI – IAL

³Docente/pesquisador do Núcleo de Químico-físicas e Sensorial de Alimentos – CALI – IAL

Resumo: Os edulcorantes são bastante utilizados em bebidas com o intuito de atender as necessidades da população diabética, indivíduos que possuem desequilíbrio fisiológico no metabolismo dos açúcares. Também tem se observado cada vez mais o uso destes produtos como forma de reduzir e controlar o consumo de caloria pela população, que tem optado por bebidas nas versões diet e light. Nos últimos anos houve um aumento no consumo aparente de bebidas dietéticas o que torna um atrativo para as indústrias criarem novas formulações. O objetivo do trabalho foi verificar a composição e determinar a quantidade de edulcorantes em refrigerantes para o Programa Nacional de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes Foram coletadas 10 amostras de refrigerantes (diet e light) de diversos sabores pela Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo, para análise de sacarina e acessulfame-k. A análise de edulcorantes foi realizada conforme o método cromatográfico - 257/IV livro de Métodos físico-químicos para análise de alimentos (BRASIL, 2008). Nos resultados observou-se que metade das amostras continham sacarina, na maioria das vezes, associada ao ciclamato, além disso, observou-se diferentes combinações de edulcorantes nas demais amostras. Em relação aos sabores, era de laranja, dois limão, seis de guaraná e uma amostra cola. Na quantificação obteve-se um intervalo de sacarina de 1,89 a 11,89 mg.100mL⁻¹ e para acessulfame-k de 2,37 a 8,01 mg.100mL⁻¹. Os resultados da quantificação dos edulcorantes nos refrigerantes estavam com teores abaixo do limite máximo de uso permitido pela legislação vigente.

Palavras-chave: Bebida gasosa; Substituto açúcar; sacarina, acessulfame-k; CLAE

INTRODUÇÃO

O refrigerante é caracterizado como uma “bebida gaseificada, originada a partir da dissolução, em água potável, de ingrediente vegetal, adicionada de açúcar, devendo ser obrigatoriamente saturado de dióxido de carbono, industrialmente puro”. De acordo com a Portaria nº 123, de 13 de Maio de 2021, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2021).

A Resolução nº.18, DE 24 DE MARÇO DE 2008, autoriza o uso de aditivos e edulcorantes em alimentos, desde que sejam considerados os respectivos limites máximos,

estando de acordo com a ingestão diária aceitável (IDA), e referências estabelecidas pelo *Codex Alimentarius* (ANVISA, 2008).

O consumo de bebidas dietéticas tem aumentado, fazendo com que as indústrias utilizem no processo produtivo cada vez mais ingredientes capazes de oferecer poder de doçura, semelhante ou ainda maior que a sacarose, como os edulcorantes, que têm sido usados como substitutos dos açúcares. (ABIAD, 2017)

Nos últimos anos as bebidas dietéticas estão ganhando cada vez mais espaço entre os consumidores, visto que a proposta dos alimentos para fins especiais era atender as necessidades dos indivíduos que apresentavam algum desequilíbrio fisiológico, como por exemplo, os diabéticos. No entanto, observa-se uma expansão no consumo entre pessoas que desejam apenas consumir alimentos e bebidas com restrição ou redução calórica, com outros objetivos, por exemplo, “melhorar” os hábitos alimentares, ou até mesmo visando emagrecimento. (ABIAD, 2022)

A partir do aumento do consumo de bebidas dietéticas, caracterizadas pela adição de edulcorantes, é recomendado que sejam considerados os limites de ingestão diária aceitável (IDA), e referências estabelecidas pelo *Codex Alimentarius*, a fim de garantir a segurança dos consumidores. (NICOLUCI; TAKEHARA; BRAGOTTO, 2022)

O Programa Nacional de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes em Alimentos (PROMAC) é responsável em avaliar a exposição dos aditivos nos alimentos e bebidas, por meio da verificação do cumprimento de boas práticas de fabricação, e das legislações vigentes (BRASIL, 2021).

Portanto objetivo deste trabalho é avaliar a composição e as quantidades dos edulcorantes nos refrigerantes, vinculados ao Programa Nacional de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes (PROMAC).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas pela Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo, 10 amostras de refrigerantes dietéticos, de diferentes marcas e sabores, analisadas pelo instituto Adolfo Lutz (IAL), no período de 2022.

O método utilizado foi 257/IV-Determinação de acesulfame-k, sacarina e aspartame, ácidos benzóico e sórbico e cafeína por cromatografia líquida de alta eficiência do Livro de Métodos físico-químicos para análise de alimentos. (SECRETARIA DO ESTADO)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando a amostragem foi possível observar que houve predominância nos sabores de guaraná, representando 60% (n=6) das amostras, enquanto 20% (n=2) era sabor limão, 10% (n=1) laranja e 10% (n=1) de cola, conforme demonstrado na (Figura 1).

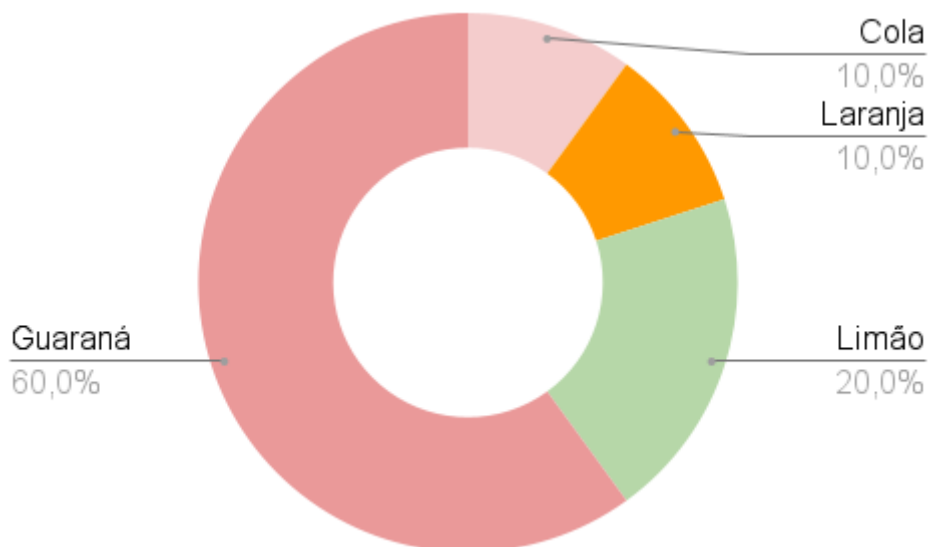


Figura 1. Sabores das amostras de refrigerantes
 Fonte: Dados da pesquisa

Na rotulagem de seis amostras de refrigerantes a declaração era zero açúcar, em outras três amostras havia informação de teor de redução de açúcares, e em uma amostra não declarava nenhuma informação.

Na avaliação dos rótulos dos refrigerantes indicavam a presença da combinação de edulcorantes, como acessulfame-k, aspartame, sucralose, ciclamato e a sacarina, conforme a Figura 2. Sendo que se observou em quatro amostras a mistura entre sacarina e ciclamato, em uma amostra a sacarina esteve sozinha, sem combinações, o mesmo também ocorreu em outra amostra com sucralose; em outras duas amostras, o acessulfame-k esteve misturado ao aspartame. Além disso, somente duas amostras tinham como declaração a mistura de quatro ou mais edulcorantes, sendo: sucralose, acessulfame-k, aspartame, sacarina, ciclamato, ocorrências que podem ser fundamentadas por questões tecnológicas, que envolvem o processo produtivo de cada fabricante.

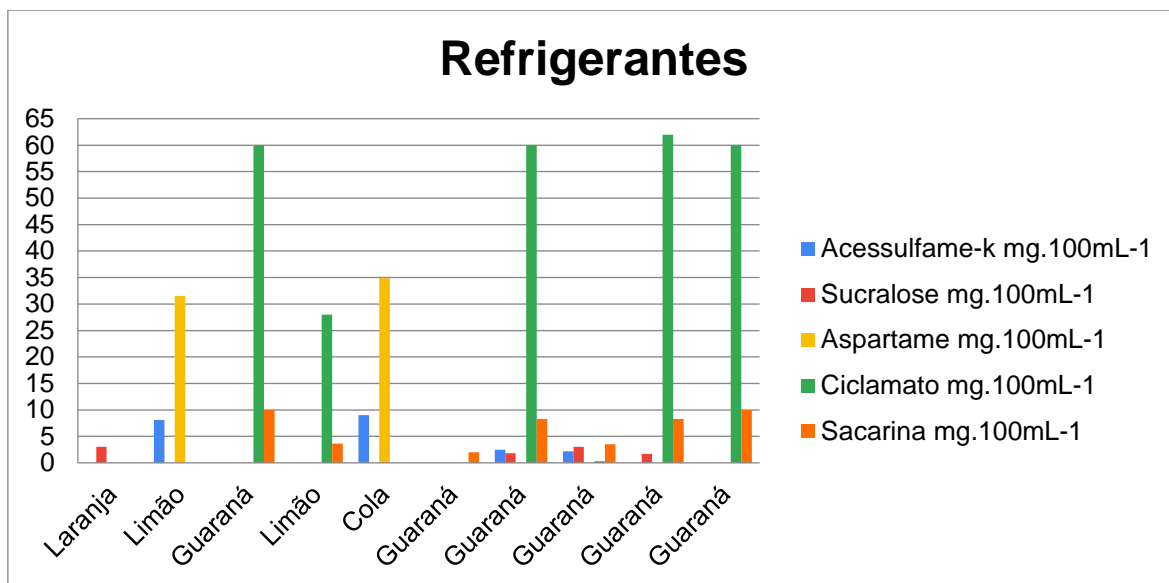


Figura 2. Combinação de edulcorantes nas amostras de refrigerantes
 Fonte: Dados da pesquisa

Nas amostras em que a sacarina foi observada na composição, ela esteve associada ao ciclamato de sódio. Essa ocorrência já foi relatada por outros autores, onde dizia que o uso concomitante desses dois edulcorantes está relacionado ao fato do ciclamato apresentar um poder de doçura menor, quando comparado aos outros edulcorantes, além de apresentar lenta percepção de doçura ao paladar, bem como diminuição do sabor residual quando combinado a sacarina nas formulações. Apresentam então, sinergismo, contribuindo com as características sensoriais e com aspectos econômicos envolvidos na produção. (GOMES, 2022)

De quatro amostras que continham acessulfame-k, ele esteve associado ao aspartame em duas delas, essa combinação é bastante empregada pelas indústrias alimentares, visto que o sabor residual do acessulfame-k é minimizado quando combinado ao aspartame. Além disso, há um equilíbrio no poder de doçura dos refrigerantes, visto que o acessulfame-k compensa o sabor, mesmo diante da degradação do aspartame durante o período de armazenamento. (GOMES, 2022)

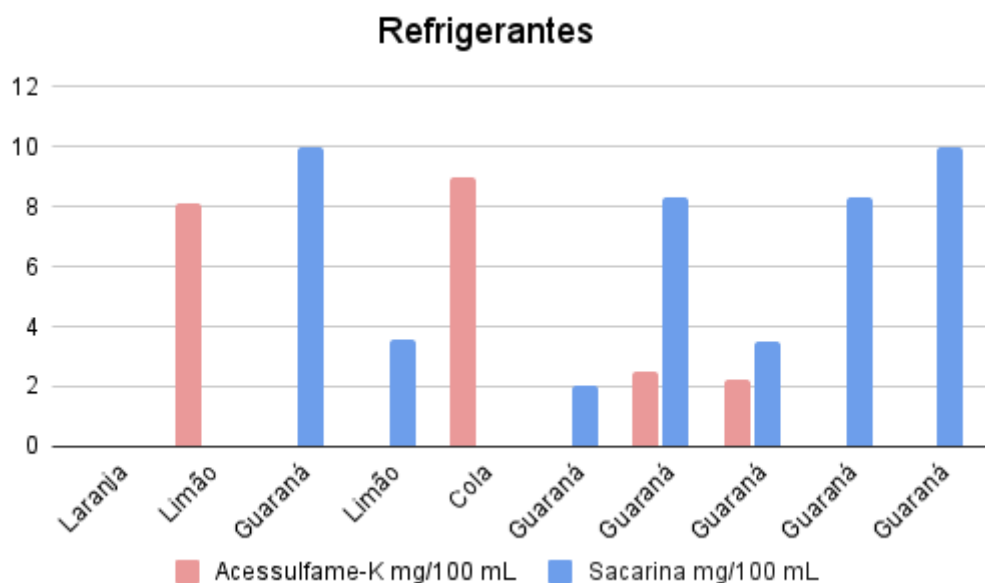


Figura 3. Edulcorantes quantificados nas amostras de refrigerante.
Fonte: Dados da pesquisa

Na determinação dos edulcorantes neste estudo foram analisados somente o acessulfame-k e a sacarina pelo método cromatográfico CLAE-UV. O conjunto da amostragem dos refrigerantes, conforme Figura 3, indicou quantitativamente que em quatro amostras foram encontrados diferentes níveis de acessulfame-k, que variaram na faixa de 2,37 a 8,01 $\text{mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$. E em sete amostras foi observada a presença da sacarina, na faixa de concentração de 1,89 a 11,89 $\text{mg} \cdot 100\text{mL}^{-1}$. Pode se observar, que todas as amostras analisadas, estão de acordo com os limites estabelecidos, sendo o limite máximo de uso para acessulfame-k é de 0,035 $\text{g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ e de sacarina é de 0,015 $\text{g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$, conforme descrito na RDC 18 de março de 2008.

Os resultados sugerem que tanto acessulfame-K como a sacarina tem uma ampla faixa de variação, pois os valores estão diretamente relacionados ao tipo mistura e também da quantidade empregada de outros edulcorantes nas formulações de cada fabricante. (NICOLUCI; TAKEHARA; BRAGOTTO, 2022).

CONCLUSÕES

Nas amostras coletadas, observou-se uma predominância de refrigerantes do sabor guaraná, em relação aos demais sabores, que pode estar relacionado aos tipos de refrigerantes comercializados nos municípios do estado de São Paulo.

Conforme os resultados apresentados, todas as amostras de refrigerantes analisadas estavam com teores abaixo do limite máximo de uso permitido pela legislação vigente, sendo então seguras para o consumo desde que sejam respeitados os limites de ingestão diária (IDA).

Diante das observações é possível estabelecer que há uma tendência na combinação dos edulcorantes empregados no processo produtivo dos refrigerantes, com o intuito de manter a palatabilidade e as características sensoriais agradáveis ao consumo, mesmo com redução ou ausência de açúcares.

REFERÊNCIAS

ABIAD - Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais e Congêneres. Adoçantes. Plataforma Abiad. Disponível em: <https://abiad.org.br/wp-content/uploads/2017/02/cartilha-adoçantes-abiad.pdf>. Acesso em: 01 dez de 2022.

ABIAD - Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais e Congêneres. Adoçantes. Plataforma Abiad. Disponível em: <https://abiad.org.br/consumo-de-bebidas-dieteticas-aumentou-12-no-pais-revista-suplementacao-15-09-2022/>. Acesso em: 10 dez de 2022.

ABIR- Associação Brasileira das Indústrias de refrigerantes e de Bebidas não Alcoólicas. Plataforma Abir. Disponível em: <https://abir.org.br/o-setor/dados/refrigerantes/>. Acesso em: 25 nov 2022.

ANVISA. Programas Nacionais de Monitoramento de Alimentos. [Internet], 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/programas-nacionais-de-monitoramento-de-alimentos/monitoramento-de-aditivos-e-contaminantes-em-alimentos/promac-2021-categorias-e-ensaios-site-pronamas.pdf/view>. Acesso em: 20 dez 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC no 18, de 24 de Março de 2008, Dispõe sobre o Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 25 de Março de 2008.

BRASIL. Portaria MAPA nº 123, de 13 de Maio de 2021. Dispõe em estabelecer os padrões de identidade e qualidade para bebida composta, chá, refresco, refrigerante, soda e, quando couber, os respectivos preparados sólidos e líquidos. Diário Oficial da União Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Gabinete da Ministra. seção 1, p. 5, de 14 de Maio de 2021.

GOMES , Paula *et al.* Edulcorantes: sob a ótica dos consumidores. Research, Society and Development, [s. l.], v. 11, ed. 3, 3 mar. 2022. DOI <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26543>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/26543>. Acesso em: 29 nov. 2022.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE (São Paulo). Instituto Adolfo Lutz *et al.*, (org.). Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. 4a Edição. ed. atual. BRASIL: [s. n.], 2008. p. 1020 p.

NICOLUCI, I. G.; TAKEHARA, C. T.; BRAGOTTO, A. P. A. Edulcorantes de alta intensidade: tendências de uso em alimentos e avanços em técnicas analíticas. Química Nova, Campinas, v. 45, n. 2, p. 207-217, 2022.

QUALIDADE DO MEL EM RELAÇÃO À DETERMINAÇÃO DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL

Juliana Martins Ferreira¹; Mahyara Markievicz Mancio Kus Yamashita²; Cristiane Bonaldi Cano³

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CEFOR-SES – IAL; E-mail: julianamarti.f@hotmail.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Química, Física e Sensorial de Alimentos – CALI – IAL.

³Docente/pesquisador do Núcleo de Química, Físicas e Sensorial de Alimentos – CALI – IAL.

Resumo: Alcançar a qualidade alimentar é uma preocupação constante de qualquer produtor de alimento. Alimentos como mel, em que seu desenvolvimento se dá em ambiente externo, ter controle sobre fatores que podem impactar o produto final é um desafio da apicultura. Dentre uma série de parâmetros que indicam a qualidade do mel encontra-se o 5-hidroximetilfurfural (HMF), que é um composto que se forma naturalmente no decorrer do seu envelhecimento, porém há fatores que aceleram sua produção, e saber como preveni-lo é uma garantia de um produto com maior tempo de prateleira, e de maior qualidade. O objetivo deste trabalho foi quantificar o 5-hidroximetilfurfural presente em amostras de méis que foram coletados no Estado de São Paulo através do Programa Paulista de 2022, a fim de avaliar a qualidade dos produtos hoje disponíveis nos comércios. Foram analisadas 26 amostras de méis empregando o método oficial Determinação de Hidroximetilfurfural-175/IV, descrito no Livro de Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2005). Os resultados demonstraram que das 26 amostras de méis analisadas, 31% continham níveis de HMF acima do aceito pela legislação brasileira (máx de 60 mg.kg⁻¹). Sugere-se que amostras reprovadas estejam envelhecidas, ou relacionada com as práticas de apicultura adotadas durante o processamento do mel; esses fatos podem influenciar nas condições de comercialização e consumo. Por isso a análise de HMF é um parâmetro que deve ser associado às demais determinações físico-químicas para complementar a avaliação da qualidade do mel.

Palavras-chave: espectrofotometria ultravioleta; hidroximetilfurfural; mel; qualidade dos Alimentos;

INTRODUÇÃO

O mel é um alimento natural produzido pelas abelhas, que têm em sua composição inúmeras composição, tais como minerais, ácidos orgânicos, enzimas, aminoácidos, e grãos de pólen, entretanto é composto predominantemente por carboidratos. Através dos carboidratos glicose e frutose em decorrência de uma série de reações químicas deriva-se um composto denominado 5-hidroximetilfurfural (HMF) que é um importante parâmetro indicador das condições de deterioração do mel (BRASIL, 2000).

O HMF é um composto orgânico heterocíclico de seis carbonos contendo uma estrutura em anel central em porções de furano e grupos funcionais aldeído e álcool (hidroximetil) (Figura 1), formado durante a desidratação das hexoses em meio ácido (SHAPLA *et al.*,2018).

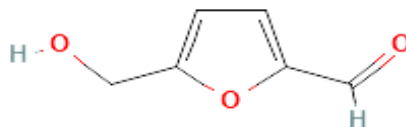


Figura 1. Estrutura do 5-hidroximetilfurfural
Fonte: National Center for Biotechnology (NCBI, 2005)

A formação do HMF está envolvida numa série de reações complexas que ainda não foram totalmente elucidadas na literatura. Sabe-se que sua presença depende do equilíbrio da formação de seus precursores e reações de oxidação (SHAPLA *et al.*,2018; FALLICO, 2008); porém já é bem estabelecido que seu desenvolvimento tem relação direta com tempo e temperatura, pois o aquecimento é um importante catalisador para sua produção (ISLAM *e al.*, 2013).

Como o HMF é gerado naturalmente no mel espera-se que seu teor aumente gradativamente durante o período de estocagem, por isso é utilizado como um parâmetro para determinar o grau de frescor/envelhecimento do mel (SHAPLA *et al.*,2018).

Alguns outros fatores podem ocasionar a formação do HMF no mel, desde a elaboração até o seu processamento final. A região onde o mel é cultivado colabora com o aumento da formação de HMF, devido o Brasil ser um país onde seu clima é predominantemente tropical, torna possível a formação do HMF desde o acondicionamento do mel ainda na colmeia. Essa condição é relevante, pois os países com condições climáticas tropicais e subtropicais passaram a ter limites diferenciados de HMF recomendados pelos padrões alimentares internacionais, como o *Codex Alimentarius* - FAO (*Food and agriculture Organization of the United Nations*) (FALLICO, 2008; ISLAM *e al.*, 2022).

Outro fator que resulta a formação do HMF é durante o processamento quando o mel se encontra cristalizado, esta passa por um processo de aquecimento, neste momento há uma mudança reológica em sua estrutura melhorando sua viscosidade, e contribuindo para inibir fermentação. Caso o apicultor não respeitar o binômio tempo e temperatura fica suscetível a formação Hidroximetilfurfural (SHAPLA *et al.*,2018).

Devido a essas condições foi instituído pela legislação através da Instrução Normativa-MAPA n° 11 de 2000, a determinação de HMF como análise obrigatória para os parâmetros de deterioração do mel, o que implica em sua a qualidade e seu tempo de vida de prateleira para o consumo humano (BRASIL, 2000).

O objetivo deste trabalho, portanto, é quantificar o teor de HMF em amostras de méis, coletadas pelo Programa Paulista no primeiro semestre de 2022, visando avaliar a qualidade dos méis ofertados nos estabelecimentos comerciais do Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODO

Foram coletadas 26 amostras de méis pela Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo para o Programa Paulista 2022, analisadas no Núcleo de Química, Física e Sensorial, Centro de Alimentos, do Instituto Adolfo Lutz. A determinação do 5-hidroximetilfurfural foi realizada utilizando o método espectrofotométrico 175/IV conforme descrito no Livro de Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008). Os dados foram tratados com o uso do software Microsoft Excel, versão 2019, para calcular o valor da média e desvio padrão, os resultados representam a média de análises feitas em duplicatas e a interpretação dos dados na forma de gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme representado em Figura 2, foram analisadas 26 amostras onde o menor valor de HMF observado foi de 14,57 mg.kg⁻¹ e maior de 605,73 mg.kg⁻¹. As amostras 1 e 19 apresentaram valores muito discrepantes em relação às demais, o comportamento destas amostras pode estar relacionado a diversos fatores que não são possíveis de serem identificadas através deste trabalho. O valor médio das amostras de méis foi de 43,67 mg.kg⁻¹ desconsiderando essas duas amostras com alto valor de HMF.

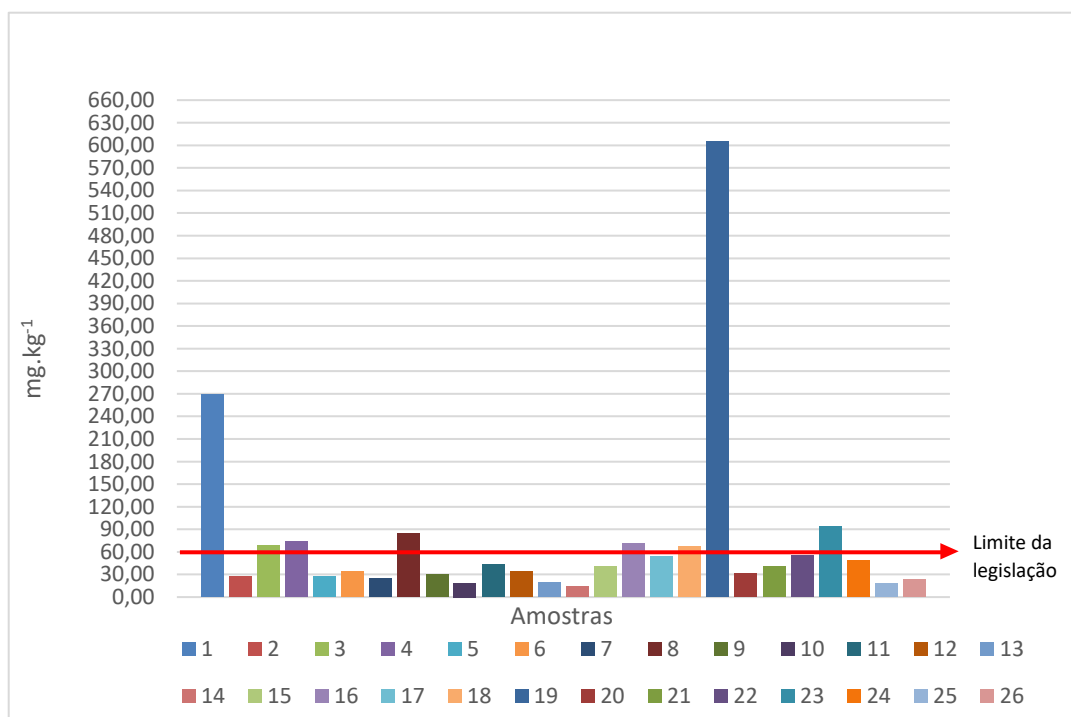


Figura 2. Teor de Hidroximetilfurfural
Fonte: Dados da análise

Conforme preconizado pela legislação brasileira determinado na Instrução Normativa-MAPA n° 11 os méis não devem exceder a 60 mg.kg^{-1} de HMF (BRASIL, 2000). Como observados na Figura 2 e na Figura 3 o HMF esteve acima do limite recomendado em 8 das 26 amostras. Em 18 amostras apresentaram teores de até 60 mg.kg^{-1} de HMF, estando dentro do limite recomendado, e classificadas como qualificadas para consumo humano; 4 amostras apresentaram teor de HMF entre $60,00$ e $80,00 \text{ mg.kg}^{-1}$, e 2 amostras apresentaram teor entre $80,00$ a $90,00 \text{ mg.kg}^{-1}$, sugerindo que estão em processo de envelhecimento/deterioração, fermentação, ou que ocorreram erros durante o processamento da amostra, essas amostras portando estão desqualificadas para o consumo.

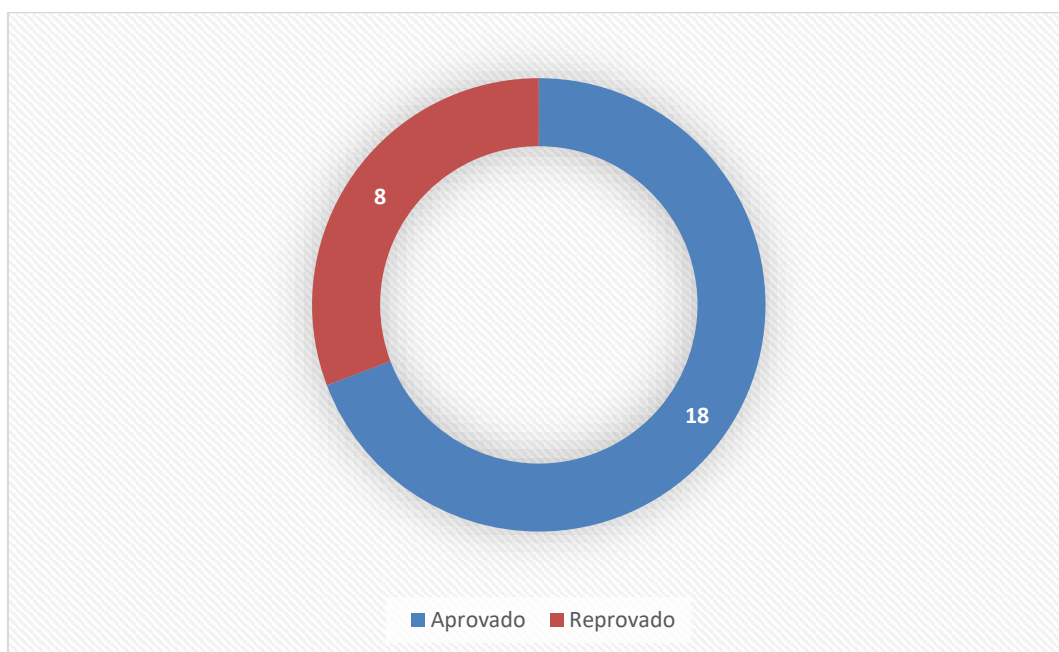


Figura 3. Quantidade de amostras aprovadas e reprovadas
Fonte: Dados da análise

Outros estudos publicados apresentaram resultados semelhantes a este trabalho, um estudo conduzido no Rio Grande do Norte (RN) em 2017, (MARINHO, 2018) de 10 amostras, 4 estavam com valor de HMF acima do limite estabelecido pela legislação com índices de HMF entre $9,60$ a $88,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ de HMF. Em outro estudo conduzido em Goiás (ANANIAS, 2010) das 35 amostras 4 estavam acima da legislação sendo o menor valor de $0,49$ e o maior de $79,27 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Para o *Codex Alimentarius* o limite recomendado de HMF em mel é de 40 mg.kg^{-1} , entretanto para países tropicais o limite aumenta para 80 mg.kg^{-1} (CXS, 2019). Conforme a Figura 4, com os resultados obtidos de HMF pode se observar que ao comparar as legislações, quatro amostras estariam aptas para consumo em países que adotam os limites recomendados pelo *Codex Alimentarius*, enquanto que no Brasil as mesmas foram condenadas. Essas diferenças de limites impactam na exportação do mel, este fato sugere que a legislação brasileira poderia estar revendo seus limites para a adequação internacional, visto que sua recomendação está considerando o fator climático sobre a produção do mel dos países tropicais como o Brasil.

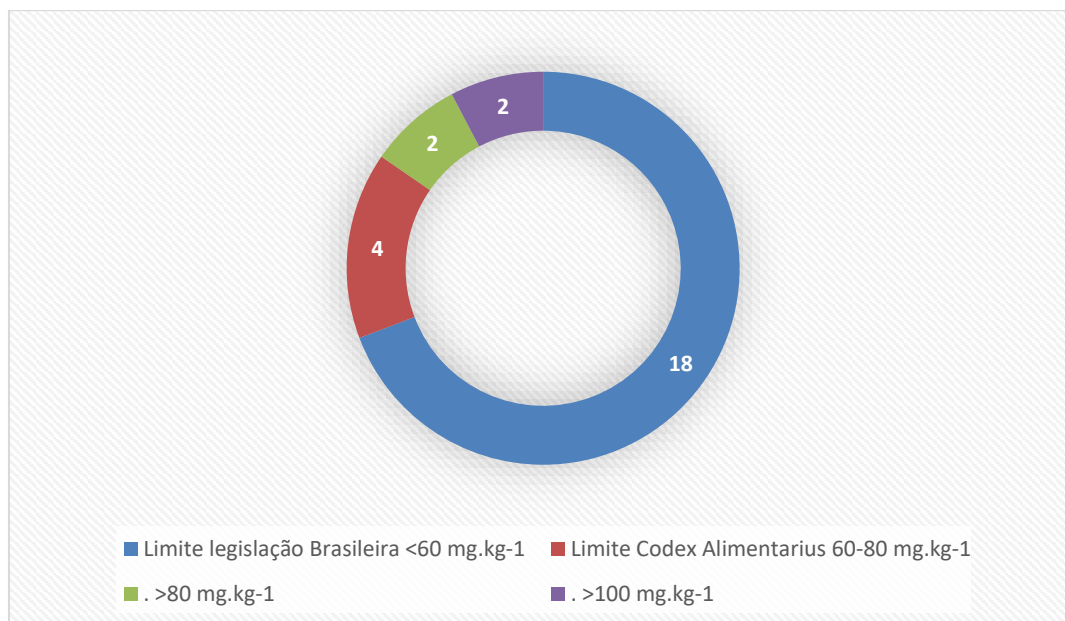


Figura 4. Limite de HMF por legislações nacional e internacional
Fonte: Dados da análise

CONCLUSÕES

Conforme os resultados apresentados observou-se que 31% das amostras comercializadas no Estado de São Paulo estão reprovadas em relação aos limites estabelecidos pela legislação brasileira, conseqüentemente desqualificada para o consumo; portanto foi possível então responder ao Programa Paulista quais amostras estavam qualificadas e aptas para a comercialização.

Foi observado que o teor aceito de HMF em méis, varia de acordo com as comissões e órgãos internacionais, bem como a empregabilidade dos países para essa recomendação; o que deixa em aberto novas considerações e estudo sobre seu limite.

Considera-se que o HMF contribui como um importante parâmetro físico-químico, porém deve ser associado a demais análises como um conjunto amplo e interconectados para que haja um maior panorama dos fatores que impactam a qualidade do mel.

REFERÊNCIAS

ANVISA (BRASIL). Instituto Adolfo Lutz (org.). Métodos físico-químicos para análise de Alimentos. IV. ed. [S. l.: s. n.], 2005. ISBN 85-334-1038-7.

ANANIAS, K. Avaliação das condições de produção e qualidade de mel de abelhas (*Apis Mellifera* L.) produzido na microrregião de Pires do Rio, no Estado de Goiás. 2010

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. Instrução Normativa n° 11, de 20 de Outubro de 2000. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Diário Oficial da República do Brasil, seção 1, p. 16-17, Brasília, DF, 23 out. 2000.

CXS, STANDARD for honey: CXS 12-1981. *Codex Alimentarius*, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcod>

ex%252FStandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012e.pdf Acesso em: 05 dez. 2022.

FALLICO, B; ARENA, E; ZAPPALA, M. Degradation of 5-hydroxymethylfurfural in honey. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 9, p.n C625-C631, 2008.

ISLAM, N; KHALIL, I; ISLAM, A; GAN, S. Toxic compounds in honey. *Journal of Applied Toxicology*, v. 34, n. 7, p. 733-742, 2013.

MARINHO, J; MOREIRA, C; FERREIRA, L; DAMASCENO, K; SANTOS, J. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de méis comercializados em Natal, RN. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 77, p. 1-6, 2018.

National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information, 26 mar. 2005. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/237332>. Acesso em: 29 set. 2022.

SHAPLA, U; ALAM, N; KHALIL, I; GAN, S. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. *Chemistry Central Journal*, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2018.

A IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DE NITRATO EM ÁGUAS DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO

Ellen Carvalho Teixeira¹; Rosângela Aguilar da Silva²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública. - NQBM - IAL; E-mail: ellenct@outlook.com.br

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

Resumo: A quantidade das águas, assim como a qualidade, é de vital importância para todos os organismos vivos e o funcionamento adequado de ecossistemas, comunidades e economias. Nos últimos anos as atividades industriais e agrícolas têm resultado em um aumento de poluentes tóxicos, tais como ânions inorgânicos, íons metálicos, substâncias químicas e orgânicas sintéticas e um grande número de ânions inorgânicos têm sido encontrados em concentrações potencialmente nocivas em inúmeras fontes de água potável. Desses, o nitrato (NO_3^-) é uma preocupação ambiental em escala global. O consumo de água com concentração de nitrato superior a 10 mg/L NO_3^- -N pode levar ao desenvolvimento de doenças como a metahemoglobinemia e alguns tipos de câncer. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura sobre a ocorrência de nitrato em águas, níveis de contaminação e riscos à saúde. Este estudo apresenta a contaminação das águas por nitrato e a importância do monitoramento das concentrações de nitrato em amostras de água destinadas ao consumo humano. A persistência do nitrato nas águas e a evolução da contaminação são muito preocupantes, pois poderá restringir no futuro o uso das águas de abastecimento. A contaminação das águas por nitrato é um sério problema à saúde pública e para o enfrentamento do problema há a necessidade de continuidade das pesquisas para identificar as fontes de contaminação, avaliar os efeitos do consumo das águas contaminadas sobre a saúde, além do estabelecimento de políticas públicas que contemplem ações corretivas e preventivas garantindo à população água com qualidade.

Palavras-chave: água; fontes de contaminação; nitrato; riscos à saúde

INTRODUÇÃO

A água é o mais importante recurso natural do mundo e sem ela a vida não poderia existir. Apesar de todos os esforços para armazenar e diminuir seu consumo, a água está se tornando um bem escasso e sua qualidade se deteriora cada vez mais rápido.

As águas subterrâneas se constituem em soluções alternativas para o abastecimento de comunidades rurais e urbanas, tanto para uso agrícola como industrial e público (COLVARA; LIMA; SILVA, 2009).

No Brasil, as águas subterrâneas abastecem mais de 82 milhões de brasileiros (51% da população urbana), através da rede pública, cerca de 52 % dos municípios brasileiros (HIRATA; FERNANDES; BERTOLO, 2016).

As águas subterrâneas no Brasil, de maneira geral são de boa qualidade, com propriedades microbiológicas e físico-químicas adequadas a diversos usos, incluindo o consumo humano. Entretanto, algumas atividades desenvolvidas pelo homem têm comprometido significativamente alguns aquíferos.

Nos últimos anos as atividades industriais e agrícolas têm resultado em um aumento de poluentes tóxicos, tais como ânions inorgânicos, íons metálicos, substâncias químicas e orgânicas sintéticas e um grande número de ânions inorgânicos têm sido encontrados em concentrações potencialmente nocivas em inúmeras fontes de água potável. Desses, o nitrato (NO_3^-) é uma preocupação ambiental em escala global. Devido à sua alta solubilidade em água é possivelmente o contaminante mais difundido em mananciais subterrâneos, resultando em séria ameaça para o abastecimento de água potável em diversas regiões do planeta (COSTA; KEMPKA; SKORONSKI, 2016).

A legislação vigente, Portaria 888, de 04 de maio de 2021, do Ministério da Saúde, estabelece 10 mg/L NO_3^- -N como valor máximo permitido para águas destinadas ao consumo humano (BRASIL, 2021) e a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) estabelece que a partir de 5 mg/L NO_3^- -N (valor de prevenção), sejam adotadas medidas de prevenção e controle devido a possível ação antrópica sobre a qualidade das águas subterrâneas (CETESB, 2016).

O risco para a saúde humana ao consumir água com concentrações elevadas de nitrato decorre de sua transformação em nitrito no sistema digestivo. O nitrito oxida o ferro na hemoglobina dos glóbulos vermelhos e forma a metahemoglobina, que não possui a mesma capacidade de transporte de oxigênio da hemoglobina (STRADIOTO; TERAMOTO; CHANG, 2019).

O consumo de água com concentração de nitrato superior a 10 mg/L NO_3^- -N pode levar ao desenvolvimento de doenças como a metahemoglobinemia e câncer (WARD *et al.*, 2018). A metahemoglobinemia ou síndrome do bebê azul consiste em uma doença perigosa para bebês menores de seis meses de idade, em que a criança se apresenta azulada devido ao desenvolvimento de um quadro de anaerobiose provocado pela ineficiência no transporte de oxigênio (COSTA; KEMPKA; SKORONSKI, 2016).

Muitas pesquisas têm sido realizadas no Brasil (SILVA, SANTOS, FERREIRA, 2019; DOVIDAUSKAS; OKADA; IHA; CAVALLINI, 2019; MENDONÇA *et al.*, 2019; TAVARES *et al.*, 2017) e no mundo (WARD *et al.*, 2018; ANGELOVIČOVÁ; SZABÓOVÁ; TKÁČOVÁ; ANGELOVIČ, 2017; BIAN *et al.*, 2016) em virtude dos impactos ambientais causados na qualidade das águas e os órgãos públicos ambientais e de saúde pública têm buscado ferramentas como os programas de monitoramento da qualidade das águas com objetivo de tomar medidas corretivas e mitigadoras.

O monitoramento da qualidade das águas subterrâneas no estado de São Paulo é uma exigência legal atribuída à CETESB desde os anos 1970 e a partir de 1992 o Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (PROAGUA) tem avaliado a qualidade das águas destinadas ao consumo humano (CETESB, 2016). Esse programa teve início no ano de 1992, por meio da Resolução Estadual SS 45 e é considerado um programa pioneiro no país por estabelecer um conjunto de ações sistemáticas de vigilância sanitária da qualidade da água, hoje implementado em todos os municípios do estado (VALENTIM; ELMEC; JUIOR; BATAIERO, 2012).

O PROÁGUA tem por objetivo principal a promoção e proteção da saúde da população por meio da garantia da potabilidade da água destinada ao consumo humano no estado de São Paulo e desenvolve ações, identificando e intervindo em situações de risco à saúde dos consumidores (CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2018).

Diante da ocorrência de nitrato e do avanço da contaminação das águas, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura sobre a ocorrência de nitrato em águas, níveis de contaminação e riscos à saúde.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo realizou uma revisão de literatura baseada na pesquisa de artigos publicados e disponíveis nos bancos de dados da internet, tais como, Biblioteca Virtual da Saúde (BVS), onde foram usados artigos e dissertações publicados na biblioteca virtual Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline) e Scientific Electronic Library Online (SciELO). Para a busca utilizou-se dos seguintes descritores (em português/inglês): nitrogênio, nitrato, águas, contaminação, consumo humano, efeitos à saúde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho apresenta a importância da avaliação e do monitoramento das concentrações de nitrato em amostras de água destinadas ao consumo humano.

Por ser o contaminante de maior ocorrência em aquíferos, no Brasil e no mundo, o nitrato tem sido utilizado como indicador de contaminação das águas subterrâneas devido à sua alta mobilidade podendo atingir extensas áreas.

As publicações citadas neste trabalho e muitas outras disponíveis na literatura mostram a contaminação das águas por nitrato e apontam para a necessidade de monitoramento contínuo para a identificação e controle das fontes de contaminação.

A persistência do nitrato nas águas e a evolução da contaminação são muito preocupantes, uma vez que poderá restringir no futuro o uso das águas de abastecimento, tanto público quanto privado.

Além dos trabalhos para avaliar a contaminação das águas por nitrato, muitas pesquisas têm sido direcionadas para identificar as fontes de contaminação. Embora a ocorrência de nitrato seja tanto natural quanto antrópica, o foco maior tem sido as atividades antrópicas tanto em áreas rurais quanto urbanas. Em regiões agrícolas as principais fontes de contaminação são as atividades agrícolas e nas áreas urbanas, as principais fontes responsáveis pelas concentrações de nitrato acima do padrão de potabilidade estão associadas à disposição inadequada de resíduos sólidos (lixões e aterros sanitários mal construídos, em locais impróprios) e, principalmente, aos sistemas de saneamento, dos quais se destacam as fossas sépticas e negras, bem como os vazamentos das redes de esgoto. A identificação das fontes de contaminação para cada localidade é um grande desafio para a proposição de medidas de gestão dos recursos hídricos.

Estudos sobre o consumo de água contaminada por nitrato e os efeitos sobre a saúde têm sido amplamente conduzidos e a maioria dos trabalhos associam o consumo de água contaminada por nitrato ao desenvolvimento da doença metahemoglobinemia e também ao surgimento de alguns tipos de câncer, entre eles o gástrico e o linfático. Embora esses sejam os efeitos mais expressivos, a literatura também relata que a ingestão de altas concentrações de nitrato pode também resultar no quadro de intoxicação crônica em animais, refletindo em baixa produtividade, redução no ganho de peso, quedas da eficiência reprodutiva, deficiência de vitamina A e abortos, sendo os ruminantes os mais suscetíveis (WHO, 2011). Outras pesquisas associaram ainda o consumo de nitrato ao aumento dos riscos de infecções respiratórias, hipertensão, má formação congênita, nascimento de bebês prematuros e abortos espontâneos em seres humanos. Contudo, apesar de inúmeros estudos na área, os resultados obtidos são pouco conclusivos (SÃO PAULO, 2019).

Diante do exposto é evidente que a contaminação das águas por nitrato é um sério problema à saúde pública e para o enfrentamento do problema são necessárias ações corretivas e preventivas por órgãos gestores dos recursos hídricos e de saúde para evitar maiores impactos à disponibilidade de água, à saúde e à economia.

A contaminação por nitrato normalmente se estende por grandes áreas e as técnicas de tratamento são pouco eficientes e assim as ações preventivas são as que apresentam melhor custo-benefício. Entre as ações preventivas estão: instalação de rede de esgoto antes da ocupação urbana e uso da água subterrânea; instalação de poços de abastecimento público fora das áreas urbana e rural, com uso intensivo de agrotóxicos e fertilizantes; e aplicação do conceito de áreas de proteção ao redor do poço e controle do uso do terreno. Já entre as ações corretivas estão: a diluição das águas com altas concentrações de nitrato; utilização de água subterrânea proveniente de estratos mais profundos; tratamento da água pós-extração; aumento da recarga do aquífero com águas limpas, associadas a um programa de uso de água subterrânea contaminada para usos não nobres; locação de novos poços urbanos dentro de áreas verdes preservadas permitindo que as áreas de captura de poços situem-se em área de recarga, sem influência antrópica (SÃO PAULO, 2019).

Em relação aos monitoramentos realizados pela CETESB no estado de São Paulo desde 1990 tem sido detectado um aumento sistemático das concentrações de nitrato ao longo dos anos.

Os dados referentes ao triênio 2010-2012, mostraram que 08 poços ultrapassaram o padrão de potabilidade e 22 apresentaram pelo menos uma amostra com resultado entre 5 e 10 mg/L N-, ou seja, respectivamente, 3% e 9% dos poços monitorados (CETESB, 2013).

Em outro período compreendido entre 2013 e 2015, as concentrações elevadas de nitrato foram observadas em 11% dos poços monitorados, similar ao triênio anterior. Valores acima de 10 mg/L N- foram encontrados em 08 poços do SAB, enquanto as concentrações acima de 5 mg/L N- foram detectadas no SAB, SAG, SASG e no Sistema Aquífero e Pré Cambriano (CETESB, 2016). Contudo, cabe salientar que a evolução nas concentrações de nitrato foi observada apenas nas áreas urbanas.

No monitoramento realizado em 2017, um total de 617 amostras foram analisadas O número de amostras com resultados acima do padrão de potabilidade foi de 1% do total de amostras analisadas, enquanto concentrações entre 5 e 10 mg N L-1 foram verificadas em 7%. Esses percentuais são semelhantes aos dois últimos períodos trienais (2010-2012 e 2013-2015) (CETESB, 2017).

CONCLUSÕES

Este estudo mostra a contaminação de águas por nitrato em diferentes regiões do país e o levantamento bibliográfico realizado apresentou resultados de concentração acima do valor máximo permitido e o avanço da contaminação.

Os monitoramentos das concentrações de nitrato são importantes, para a obtenção informações de maneira sistemática e frequente sobre a qualidade das águas.

A alta mobilidade do nitrato associada à sua persistência e ao volume de carga contaminante pode atingir grandes extensões dos aquíferos e, portanto, é de relevância a ampliação da rede de monitoramento para avaliar os níveis de contaminação em outras localidades, principalmente em áreas rurais cujos dados são poucos ou inexistentes.

O conhecimento das áreas contaminadas é necessário, pois permite a intensificação de ações pelos órgãos gestores e de fiscalização para controlar e conter a contaminação das águas.

Medidas preventivas e corretivas devem ser implementadas para garantir a qualidade das águas e evitar riscos à saúde dos consumidores.

REFERÊNCIAS

ANGELOVIČOVÁ, M.; SZABÓOVÁ, Z.; TKÁČOVÁ, J.; ANGELOVIČ, M. Nitrate and nitrite contents in the private ground water wells. **Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences**, [S.I.], v. 11, n. 1, p. 344-354, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5219/757>.

BIAN, J. *et al.* Hydro-geochemical characteristics and health risk evaluation of nitrate in groundwater. **Pol J Environ Stud.**, v. 25, n. 2, p. 521-527, 2016. DOI: <https://doi.org/10.15244/pjoes/61113>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 888, de 04 de maio de 2021. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**: seção I, Brasília, DF, n. 85, p. 127, 07 maio 2021.

CENTRO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Água para consumo humano - PROÁGUA**. 2018. Disponível em: <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/prog.asp?te_codigo=13>. Acesso em: 17 jan. 2022.

COLVARA, J. G.; LIMA, A. S.; SILVA, W. P. Avaliação da contaminação de água subterrânea em poços artesianos no sul do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, II SSA, 2009.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB. **Qualidade das Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo Boletim - 2017**. São Paulo: CETESB, 2018. 81 p.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB. **Qualidade das Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo 2010-2012**. São Paulo: CETESB, 2013. 222 p.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB. **Qualidade das Águas Subterrâneas do Estado de São Paulo 2013-2015**. São Paulo: CETESB, 2016. 311 p.

COSTA, D. D.; KEMPKA, A. P.; SKORONSKI, E. A contaminação de mananciais de abastecimento pelo nitrato: o panorama do problema no Brasil, suas consequências e as soluções potenciais. **Rede: Revista Eletrônica do Prodepa**, v. 10, n. 2, p. 49-61, 2016.

DOVIDAUSKAS, S.; OKADA, I. A.; IHA, M. H.; CAVALLINI, A. G. Concentrações de nitrato em águas de abastecimento público de 88 municípios da Rede Regional de Atenção à Saúde 13 do estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 78, e 1765, 2019.

HIRATA, R.; FERNANDES, A. J.; BERTOLO, R. As águas subterrâneas: longe dos olhos, longe do coração e das ações para sua proteção. **Acta Paul. Enferm.** São Paulo, v. 29, n. 6, São Paulo, nov./dez. 2016.

MENDONÇA *et al.* Avaliação da qualidade das águas em poços destinados ao abastecimento público no noroeste do Rio Grande do Sul. **Revista AIDIS de ingeniería y ciencias ambientales: investigación, desarrollo y práctica**, [S.I.], v. 12, n. 3, p. 552-570, 2019. DOI: 10.22201/iingen.0718378xe.2019.12.3.6343.

SÃO PAULO. Conselho Estadual de Recursos Hídricos. Câmara Técnica de Águas Subterrâneas. **Nitrato nas águas subterrâneas: desafios frente ao panorama atual.** Conselho Estadual de Recursos Hídricos, Câmara Técnica de Águas Subterrâneas; Claudia Varnier (coord.) - São Paulo: SIMA / IG, 2019. 128 p.

SILVA, R. A.; SANTOS, R. C. FERREIRA, L. O. Avaliação da concentração de nitrato em águas subterrâneas de poços das regiões de Assis e Marília. **Vigil. Sanit. Debate**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 102-106, 2019.

STRADIOTO, M. R.; TERAMOTO, E H.; CHANG, H. K. Nitrato em águas subterrâneas do estado de São Paulo. **Revista do Instituto Geológico**, São Paulo, v. 40, n. 3, 2019. DOI: 10.33958/revig. v40i3.672.

TAVARES, M. *et al.* Avaliação físico-química e microbiológica de águas procedentes de soluções alternativas de abastecimento na região metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo, Brasil. **Vigil. Sanit. Debate**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 1, p. 97-105, 2017. DOI: 10.22239/2317-269X.00805.

VALENTIM, L. S. O.; ELMEC, A. M.; JUNIOR, R. J. M.; BATAIERO, M. O. Novos cenários de produção e de vigilância da qualidade da água para consumo humano – 20 anos de Proágua no Estado de São Paulo – Parte I. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 9, n. 100, p. 29–39, 2012. Disponível em: <<https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/38366>>. Acesso em: 16 nov. 2022.

WARD *et al.* Drinking Water Nitrate and Human Health: Na Updated Review. **Int. J. Environ Res. Public Health**, v. 15, n. 7, p. 1557, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Guidelines for Drinking Water Quality. 4 ed. Genebra: WHO; 2011. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/>. Acesso em: 16 nov. 2022.

PREVALÊNCIA E PERFIL DOS ISOLADOS BACTERIANOS PROVENIENTES DE CASOS DE MENINGITE BACTERIANA NOTIFICADOS NA ÁREA DE ABRANGÊNCIA DO DRS DE ARAÇATUBA NO PERÍODO DE 2017 A 2021

Giovanna Bertaglia dos Santos Scarpin¹; Tatiane Ferreira Petroni²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CLR IAL Araçatuba;
e-mail: gi_scarpin@hotmail.com

²Docente do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública- CLR IAL Araçatuba

Resumo: A meningite, episódio de inflamação das meninges, pode ser causada por agentes infecciosos como fungos, vírus, bactérias, como por substâncias químicas, tumores e traumas. As de causa infecciosa são as mais importantes para a Saúde Pública, devido a sua ocorrência e capacidade de originar surtos. Sua transmissão ocorre através da propagação de gotículas de saliva entre um indivíduo contaminado e outro sadio, comumente por meio de compartilhamento de alimentos, bebidas, beijo, tosse ou espirro. O objetivo do presente estudo foi realizar o levantamento dos casos de meningite bacteriana notificados na área de abrangência do Departamento Regional de Saúde de Araçatuba (DRS II) no período de cinco anos (2017-2021). Foi realizada uma revisão bibliográfica narrativa de artigos científicos, entre 2001 e 2021, analisados através dos indexadores SCIELO e BVS, bases de dados Google Acadêmico e PubMed, guias de vigilância epidemiológica e em saúde. Na DRS II foram notificados 155 casos de meningite bacteriana nos últimos cinco anos, predominando as meningites bacterianas não especificadas (n=138), seguida por meningite pneumocócica (n=16) e meningite por complexo *Mycobacterium tuberculosis* (n=1). Houve predomínio dos casos no sexo masculino e letalidade de 7,71%. Considerando que 89% dos casos de meningite bacteriana não tiveram o agente etiológico determinado, faz necessário compreender se há dificuldades por parte dos laboratórios locais quanto à identificação do agente bacteriano ou se há dificuldade quanto ao preenchimento correto da ficha de notificação. Sem o devido conhecimento sobre os agentes bacterianos verdadeiramente envolvidos nos quadros de meningite, as ações de vigilância epidemiológica dos casos de meningite ficam comprometidas.

Palavras-chave: diagnóstico laboratorial; estudo epidemiológico; meningite bacteriana

INTRODUÇÃO

Meningite refere-se ao episódio de inflamação das meninges, membrana que circunda o cérebro e é responsável por nutrir e excretar metabólitos. A meningite pode ser causada por fatores infecciosos como fungos, vírus, bactérias, como por substâncias químicas, tumores e traumas. As de causa infecciosa são mais importantes para a Saúde Pública, devido a sua ocorrência e capacidade de originar surtos (BRASIL, 2009). Dentre estas, as meningites bacterianas são as mais relevantes epidemiologicamente em consequência das altas taxas de morbidade e mortalidade (SILVA *et al*, 2021). Sua transmissão ocorre através da propagação de gotículas de saliva entre um indivíduo contaminado e outro sadio, comumente por meio de compartilhamento de alimentos,

bebidas, beijo, tosse ou espirro (LIPHAUS *et al*, 2021). Qualquer bactéria que alcance as meninges pode causar infecção, porém as mais recorrentes na comunidade são *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Segundo o SIREVA (2021), meningite bacteriana causada por *Streptococcus pneumoniae* foi a mais prevalente (117 casos confirmados), sendo importante causa de mortalidade em todas as faixas etárias.

O diagnóstico laboratorial de meningite bacteriana tem início a partir da suspeita clínica do médico, mediante a punção do líquido cefalorraquidiano (líquor) do paciente, podendo ser realizados ensaios como exame quimiocitológico, bacterioscopia direta, cultura, reação em cadeia da polimerase (PCR) e aglutinação pelo látex (BRASIL, 2021). Dentre esses, a cultura, a bacterioscopia direta e o multiplex-PCR são realizados no Instituto Adolfo Lutz.

A cultura é o exame padrão ouro (*gold standard*) para o diagnóstico da meningite bacteriana, pois permite a identificação de sorotipos bem como caracterização genética e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. O método se inicia com o cultivo do líquido em ágar chocolate ou ágar sangue com incubação a 37°C por 18 a 48 horas em atmosfera de 5% CO₂. A conclusão do exame pode ser obtida após 72 horas e para a vigilância epidemiológica isso permite constatar o agente bacteriano, detectando um provável surto. Se houver uso prévio de antibióticos à coleta do líquido, poderá ocorrer inibição do crescimento em cultura, não confirmando os casos suspeitos ou prolongando o tempo para o resultado (ALBUQUERQUE, 2019; BATISTA, 2022; BRASIL, 2010; LEVY, 2004; SALGADO, 2013).

No que diz respeito aos principais agentes bacterianos, *Neisseria meningitidis*, agente etiológico da doença meningocócica, pertence à família *Neisseriaceae*, é um diplococo Gram-negativo aeróbico, visto no exame de bacterioscopia direta com formato de rins ou grãos de feijão unidos. As colônias têm aspecto brilhante e convexo no meio de cultura, catalase e coagulase positivas, sendo mucoide nos sorotipos A e C. É reconhecida por ocasionar meningites graves, todavia ainda é bastante sensível aos antimicrobianos disponíveis (ALBUQUERQUE, 2019; BATISTA, 2022; BRASIL, 2010, 2020 e 2021; LEVY, 2004; SALGADO, 2013; SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, 2001).

Outro agente bacteriano muito frequente é *Streptococcus pneumoniae*, o qual tem a capacidade de causar doença pneumocócica em todas as faixas etárias e está presente mundialmente. É uma bactéria Gram-positiva, encapsulada, com morfologia esférica aos pares conhecida como diplococos lanceolados, mais precisamente, “chama de vela” de coloração roxa ao Gram. É um alfa-hemolítico, isto significa que ocorre uma hemólise parcial das hemácias presente no meio de cultura, caracterizando-se pela coloração cinza-esverdeado ao redor da colônia. Além de catalase negativa, apresenta sensibilidade à optoquina quando há formação de um halo maior ou igual a quatorze milímetros. Foi o segundo agente mais prevalente nos casos de meningite bacteriana no ano de 2019 (ALBUQUERQUE, 2019; ANVISA, 2008; BATISTA, 2022; BRASIL, 2010 e 2021; LEVY, 2004; SALGADO, 2013).

Haemophilus influenzae, cocobacilo gram-negativo, podendo ser tanto anaeróbio quanto aeróbio, é catalase e oxidase positivas, não hemolítico com bom crescimento no meio de cultura ágar chocolate e nenhum crescimento em ágar sangue, já que seu crescimento necessita do Fator V ou X. Sua incidência era a maior de todas as bactérias capazes de infectar a meninge, contudo após a implantação da vacina em 1999 no Brasil, houve uma diminuição de 90% nos casos (BATISTA, 2022; BD, 2010; BRASIL, 2010; SALGADO, 2013).

A reação em cadeia da polimerase multiplex (multiplex-PCR), implantada no Instituto Adolfo Lutz (IAL) em 2007, detecta simultaneamente *Neisseria meningitidis*,

Streptococcus pneumoniae e *Haemophilus influenzae* em amostras de líquido, através da localização dos genes *ctrA*, *lytA* e *bexA*, respectivamente. Apresenta alta sensibilidade e especificidade, porém se não for nenhum dos três agentes citados, é necessário aguardar o resultado da cultura para confirmação do gênero bacteriano envolvido. Possui como diferencial a drástica redução do tempo para obtenção de resultado e a capacidade de detectar o microrganismo sem um cultivo prévio; além disso, detecta o microrganismo mesmo com a utilização prévia de antibiótico, já que identifica o seu material genético, e por ser um sistema fechado há menores riscos de contaminação da amostra (BATISTA, 2022; GOLÇALVES, 2022; SALGADO, 2013).

A análise epidemiológica retrospectiva dos casos de meningite bacteriana ocorridos na Região de Saúde de Araçatuba nos últimos cinco anos é importante para conhecer os agentes bacterianos mais prevalentes, bem como as potencialidades e limitações da rede de diagnóstico da meningite, possibilitando propor estratégias para melhoria dos serviços prestados. Com isso, o objetivo do estudo foi realizar o levantamento dos casos de meningite bacteriana notificados na área de abrangência do Departamento Regional de Saúde de Araçatuba (DRS II) no período de cinco anos (2017-2021) e identificar os gêneros bacterianos mais prevalentes conforme sexo e faixa etária dos pacientes, exames laboratoriais utilizados para critério de confirmação e taxas de mortalidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão bibliográfica narrativa de artigos científicos, entre 2001 e 2021, analisados através dos indexadores SciELO e BVS, bases de dados Google Acadêmico e PubMed, guias de vigilância epidemiológica e em saúde. Utilizou-se dados públicos do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde e do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde através do Tabnet com enfoque nos últimos cinco anos (2017 a 2021). Os artigos foram pesquisados nos idiomas português e inglês utilizando os descritores: “meningite bacteriana”, “estudo epidemiológico” e “diagnóstico laboratorial”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil, entre os anos de 2017 e 2021, houve 64.995 casos confirmados de meningite, dos quais 30.505 de etiologia viral (46,9%); 19.296 casos de meningite bacteriana (29,68%), incluindo meningite meningocócica, meningite por Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, meningite bacteriana não especificada e meningite pneumocócica; 10.776 por meningite não especificada (16,57% meningite sem agente etiológico determinado) e 3.320 de meningite de outras etiologias (5,10%). Em números absolutos, a região sudeste é a que apresenta maior número de notificações (n=34.561) seguido da Região Sul (n=15.130). Entretanto, a proporção de casos por 100.000 habitantes faz com que a Região Sul seja a que possui maior incidência (7,2/100.000) (ANDRADE *et al*, 2019).

Segundo o DATASUS, o Departamento Regional de Saúde de Araçatuba (DRS II) notificou 415 casos de meningite nos últimos cinco anos, dos quais 232 (55,9%) são de etiologia viral e 155 (37,34%) de etiologia bacteriana. Dos casos de meningite bacteriana, 138 são não especificadas, 1 do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* e 16 casos por meningite pneumocócica, não havendo relato de meningite meningocócica e por *Haemophilus influenzae* nesse período, muito embora estes dois agentes tenham sido notificados na Unidade Federativa de São Paulo, com 599 e 209 casos respectivamente.

Em relação ao número de casos confirmados e o sexo, o masculino prevaleceu com 236 casos (56,86%), enquanto o feminino computou 179 (43,13%). No que diz respeito à faixa etária, as meningites bacterianas não especificadas prevaleceram entre 40-59 anos,

enquanto a meningite pneumocócica está entre 20-39 anos. Fontaneli e colaboradores (2006), também observaram maior ocorrência no sexo masculino em estudo realizado na Região Metropolitana de Goiânia. De acordo com o SIREVA (2021), há também predomínio do sexo masculino nas três principais bactérias causadoras da meningite. Todavia, não há uma predisposição de gênero à meningite bacteriana reconhecida na literatura.

No que diz respeito à meningite pneumocócica, conforme um estudo de vigilância ocorrido em *Louisville, Kentucky*, os mais afetados foram a população menor de dois anos, corroborando com os dados do Boletim Epidemiológico (2021), que afirma que os menores de cinco anos são os mais afetados, embora tenha havido drástica redução nos casos após a implantação da vacina pneumocócica 10-Valente em 2010 (0,2 caso/100.000 habitantes em 2020). De acordo com o SIREVA (2021), a bactéria *Haemophilus influenzae* prevaleceu na faixa etária de 24-59 anos; *Neisseria meningitidis* em menores de 12 meses e entre 24-59 anos; enquanto *Streptococcus pneumoniae* predominou na faixa etária dos 30-49 anos.

Com relação ao critério utilizado para diagnóstico laboratorial das meningites, o quimiocitológico aparece em primeiro lugar (76,62%), seguido da cultura (11,56%) e bacterioscopia (6,74%). Estes dados justificam o porquê de quase 90% das notificações de meningite bacteriana serem “não especificadas”; pois se a cultura representa apenas 11,56% e o quimiocitológico 76,62%, a realização deste último não permite de fato especificar qual a bactéria envolvida no caso. Frasson e colaboradores (2021), levantaram dados coincidindo com este estudo, em que o exame quimiocitológico é o mais realizado, seguido da cultura. No Boletim Epidemiológico (2021), nota-se a prevalência da cultura, já que ela é o diagnóstico “padrão ouro” da meningite bacteriana seguida do exame PCR, este muito utilizado atualmente devido sua agilidade diagnóstica.

De acordo com trabalho de Araujo e Penha (2020), a meningite bacteriana apresentou nos últimos anos uma letalidade de 20%, aumentando para 50% em casos graves de doença meningocócica. Similarmente, Davis (2018) cita que as meningites pneumocócicas possuem uma letalidade de 10% a 20% em países desenvolvidos, aumentando para 30% a 40% nos países em desenvolvimento. Para a mesma doença, o Boletim Epidemiológico menciona que após a implantação da vacina, entre os anos de 2017 e 2020, o índice de mortalidade reduziu para 0,12 óbito/100.000 habitantes, enquanto no período pré-vacina era 0,19 óbito/100.000 habitantes. Dada circunstância, o estudo em questão mostra que a ocorrência de alta (n=101; 24,33%) predominou em relação ao óbito (n=23; 5,54%) por meningite bacteriana, ignorando outras etiologias, os índices em branco e óbitos por outras causas.

CONCLUSÕES

Foram notificados 155 casos de meningite bacteriana no Departamento Regional de Saúde de Araçatuba, sendo 138 casos de meningite bacteriana não especificada, 16 casos de meningite pneumocócica e 1 caso por Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Estes dados emitem um alerta, pois sem a especificação do gênero bacteriano; tanto o tratamento do paciente, quanto a vigilância epidemiológica dos sorotipos circulantes ficam comprometidos. Houve discreto predomínio do sexo masculino (56,86%) e as faixas etárias variaram conforme o gênero bacteriano. O exame quimiocitológico foi o mais utilizado para fins de diagnóstico e isso justifica o porquê de tantos casos de meningites bacterianas “não especificadas”. Com relação ao desfecho clínico do paciente, satisfatoriamente as altas prevaleceram (24,33%) em relação aos óbitos (5,54%). Apesar disso, faz necessário o entendimento das dificuldades dos laboratórios locais quanto à identificação do agente bacteriano e/ou preenchimento correto da ficha de notificação a fim de que possamos ter maior conhecimento sobre os agentes bacterianos verdadeiramente envolvidos nos quadros de meningite para que ações de vigilância possam ser desenvolvidas.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, R. C. *et al.* Multiplex-PCR for diagnosis of bacterial meningitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 435-443, abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007%2Fs42770-019-00055-9>. Acesso em: 17 ago. 2022.

ANDRADE, A. P. B. *et al.* Meningite no Brasil segundo região, sexo e faixa etária. **Revista Educação em Saúde**, Anápolis, v. 7, n. 1, p. 41-44. 2019. Disponível em: <http://periodicos.unievangelica.edu.br/index.php/educacaoemsaude/article/view/3825> Acesso em: 26 set. 2022.

ANVISA. **Módulo 4 – Gram-positivos**. Brasil, 2008. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/INTR_stre.htm. Acesso em: 12 set. 2022.

ARAÚJO, P. Q.; PENHA, R. A importância epidemiológica da meningite bacteriana no Brasil. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 10, p. 87-100, maio 2020. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/meningite-bacteriana>. Acesso em: 13 jul. 2022.

BATISTA, L. F.; BARBOSA, S. M.; DIAS, F. M. MENINGITE BACTERIANA: UMA REVISÃO. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 26, n. 2, p. 135-145, maio-ago. 2022. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1372966>. Acesso em: 4 jul. 2022.

BD. **BBL Strips para Diferenciação das Espécies de *Haemophilus***. 2010. Disponível em: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=20127#:~:text=2%20O%20Haemophilus%20influenzae%2C%20que,preparado%20com%20sangue%20de%20ovelha>. Acesso em: 12 dez. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso**, Brasília, 8. Ed., p. 1-444. 2010. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-contenido/publicacoes/publicacoes-svs/doencas-diarreicas-agudas/doencas-infecciosas-e-parasitarias_-guia-de-bolso.pdf/view. Acesso em: 6 set. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 2009. Disponível em: <https://portolivre.fiocruz.br/guia-de-vigil%C3%A2ncia-epidemiol%C3%B3gica>. Acesso: 21 jul. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe Técnico – Orientações técnico-operacionais para a Vacinação dos Adolescentes com a Vacina Meningocócica ACWY (conjugada)**. Brasília, 2020. Disponível em: https://saude.es.gov.br/Media/sesa/PEI/Informe%20T%C3%A9cnico%20Informe_ACWY____Adolescente_02_03_2020.pdf. Acesso em: 14 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Panorama da meningite pneumocócica no Brasil, 2007-2020. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, v. 52, n. 25, p. 21-34, jul. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de->

conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim-epidemiologico-25_svs.pdf/view. Acesso em: 12 set. 2022.

DAVIS, L. E. Acute Bacterial Meningitis. **American Academy of Neurology**, v. 24, n. 5, p. 1264-1283. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30273239/>. Acesso em: 4 out. 2022.

FONTANELI, C. R. *et al.* Incidência de Meningite na Região Metropolitana de Goiânia. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 25-27. 2006. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/REF/article/view/2100/2035>. Acesso em: 28 set. 2022.

FRASSON, L. R. *et al.* Perfil epidemiológico da meningite bacteriana no estado do Rio Grande do Sul. **Revista Ciência & Humanização**, v. 1, n. 2, p. 96-110, jul.-dez. 2021. Disponível em: <https://rechhc.com.br/index.php/rechhc/article/view/54>. Acesso em: 4 jul. 2022.

GOLÇALVES, M. G. *et al.* Evolução na vigilância laboratorial do *Haemophilus influenzae* nas meningites e pneumonias bacterianas, por PCR em tempo real, no Estado de São Paulo (2010-2019). **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 19, n. 217, p. 1-18, jan. 2022. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/37293>. Acesso em: 11 ago. 2022.

LEVY, C. E. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília. 2004. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/microbiologia/introducao.pdf>. Acesso em: 14 set. 2022.

LIPHAUS, B. L. *et al.* Meningites Bacterianas: Diagnóstico e Caracterização Laboratorial dos Agentes Etiológicos. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 18, n. 215, p. 69-86, nov. 2021. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/37236>. Acesso em: 11 ago. 2022.

REDE DE SISTEMA DE VIGILÂNCIA DE AGENTES RESPONSÁVEIS POR PNEUMONIA BACTERIANA E MENINGITE. **Informação da vigilância das pneumonias e meningites bacterianas**. São Paulo, 2021.

SALGADO, M. M. *et al.* Evolution of bacterial meningitis diagnosis in São Paulo State-Brazil and future challenges. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 71, n. 9B, p. 672-676, set. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0004-282X20130148>. Acesso em: 17 ago. 2022.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. **Doença Meningocócica e Outras Meningites Bacterianas – Texto para profissionais da saúde**. Campinas, 2001. Disponível em: https://saude.campinas.sp.gov.br/boletins/meningite/texto_profissio.htm. Acesso em: 12 set. 2022.

SILVA, A. F. T. *et al.* Estudo epidemiológico sobre meningite bacteriana no Brasil no período entre 2009 a 2018. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 100, n. 3, p. 220-228,

maio/jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v100i3p220-228>.
Acesso em: 4 jul. 2022.

SARS-CoV-2 e COVID-19: Revisão sobre as vacinas disponíveis no Brasil

Otton Hiro Ywata Orilhana¹; Fabio Hiroto Shimabukuro²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública do Instituto Adolfo Lutz - IAL de Sorocaba; E-mail: ottonhyorilhana@gmail.com

²Pesquisador Científico do IAL de Sorocaba

RESUMO

Introdução: O *SARS-CoV-2* é um novo coronavírus, responsável por causar a doença infecciosa COVID-19, que se espalhou por todo o globo e, em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou oficialmente como pandemia. Em 11 de janeiro de 2020 foi divulgada a sequência genética do *SARS-CoV-2*, que levou a uma intensa busca para o desenvolvimento de vacinas contra o vírus. **Objetivo:** realizar uma revisão bibliográfica sobre os tipos de vacinas disponíveis no Brasil para COVID-19, abordando as tecnologias utilizadas na fabricação e analisando o impacto na população. **Materiais e métodos:** revisão bibliográfica, não sistemática, sobre as vacinas para a COVID-19 disponíveis no Brasil (até novembro de 2022). As fontes foram retiradas de artigos científicos, bulas, notas técnicas e boletins epidemiológicos encontrados em bancos de dados científicos e em portais digitais oficiais de instituições de saúde. **Resultados e Conclusões:** A eficácia das vacinas disponíveis no Brasil ficou entre 59 e 95%, já a efetividade ficou entre 42 e 97,9%. Foi possível concluir que todas as vacinas disponíveis no Brasil, até novembro de 2022, são eficazes no combate ao vírus da COVID-19. As vacinas foram, e ainda são, uma peça fundamental no controle da doença, sendo capazes de diminuir significativamente as internações e mortes por COVID-19. Embora muitas variantes tenham surgido ao longo da pandemia, as vacinas foram capazes de controlá-las e impedir o seu espalhamento. As vacinas foram capazes de gerar imunidade, embora reduzida, contra quase todas as variantes do *SARS-CoV-2*. A utilização de doses mistas (heterólogas) se mostrou benéfica, gerando títulos de anticorpos significativamente altos e duradouros contra o vírus e suas variantes.

Palavras-chave: COVID-19; *SARS-CoV-2*; vacinas

INTRODUÇÃO

O *SARS-CoV-2* é um novo coronavírus, responsável por causar a doença infecciosa COVID-19. O vírus foi identificado pela primeira vez na cidade de Wuhan, localizada na China, em dezembro de 2019. Logo se espalhou por todo o mundo e, em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou oficialmente como pandemia (CAMARGO et al, 2021).

Até o dia 5 de novembro de 2022, o mundo já havia registrado 632.334.249 casos de Covid-19 e 6.599.916 óbitos pela doença. No Brasil foram 34.850.373 casos confirmados, sendo que 34.070.030 se recuperaram e 688.342 foram a óbitos pela doença. A taxa de

incidência acumulada foi de 16.457,8 casos por 100.000 habitantes e a taxa de mortalidade acumulada foi de 325,1 óbitos por 100.000 habitantes (Ministério da Saúde, 2022a).

No Brasil as vacinas disponíveis e aprovadas pela ANVISA são a CoronaVac (Butantan/Sinovac), AstraZeneca (Fiocruz/Oxford), Johnson & Johnson's/Janssen-Cilag e a Comirnaty (Pfizer/BioNTech) (CAVILHA et al, 2022).

Vacina de vetor viral (Janssen e AstraZeneca): um adenovírus é utilizado para transportar para as células humanas a informação para a produção da proteína S do *SARS-CoV-2*, sendo assim o organismo produzira anticorpos contra essa proteína sem causar a doença em si (CAVILHA et al, 2022).

Vacina genética (Pfizer): essa vacina utiliza fitas de RNA mensageiro, que ao chegarem nas células irão ser utilizadas para produzir antígenos virais que se espalham pela superfície da célula, e então reconhecidos pelo sistema imune, produzindo anticorpos contra eles (CAVILHA et al, 2022).

Vacina viral (CoronaVac): o vírus é inativado através de substâncias químicas, seu material genético é destruído, impossibilitando o vírus de se replicar. O vírus inativado (sem seu material genético funcional) é utilizado pelo organismo para produção de anticorpos (CAVILHA et al, 2022).

As medidas de isolamento e proteção individual (uso de máscaras) serviram para ajudar na diminuição no número de infectados e os poucos tratamentos paliativos existentes auxiliaram na recuperação de indivíduos internados pela COVID-19, entretanto, a forma mais eficiente de combater a pandemia foi através da vacinação.

Esse trabalho busca levantar dados para a melhor compreensão da eficácia e eficiência das vacinas, suas tecnologias e seu impacto na pandemia de COVID-19. Entender como cada vacina funciona e quais os efeitos produzidos por diferentes esquemas de vacinação pode ser útil na elaboração de novas vacinas, esquemas vacinais e estratégias de combate a variantes possivelmente letais.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo trata-se de uma revisão bibliográfica sobre as vacinas para a COVID-19 disponíveis no Brasil (até novembro de 2022). As informações foram coletadas de artigos científicos, bulas, notas técnicas e boletins epidemiológicos encontrados em bancos de dados científicos (BVS, PUBMED, e SCIELO) e em portais digitais oficiais de instituições de saúde (Ministério da Saúde, OMS, Butantan, Fiocruz e CDC).

As bulas das vacinas utilizadas para descrever dados de eficácia e esquema vacinal foram disponibilizadas no próprio site do Ministério da Saúde. Dados sobre a epidemiologia da COVID-19 e sobre a vacinação da população foram obtidos em boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde e em artigos científicos.

A eficácia/eficiência das vacinas foi observada em artigos científicos e notas técnicas de entidades de saúde.

RESULTADOS

Em 11 de janeiro de 2020 foi divulgada a sequência genética do vírus *SARS-CoV-2*, que levou a uma intensa busca para o desenvolvimento de vacinas contra o vírus (LIMA et al, 2021). No Brasil as vacinas disponíveis e aprovadas pela ANVISA são a CoronaVac (Butantan/Sinovac), AstraZeneca (Fiocruz/Oxford), Johnson & Johnson's/Janssen-Cilag e a Comirnaty (Pfizer/BioNTech) (CAVILHA et al, 2022).

A CoronaVac é uma vacina que usa a tecnologia de vírus inativado, ela foi uma das primeiras vacinas a serem desenvolvidas e passou por testes rigorosos de eficácia. Estudos em diversos países confirmam a eficácia e efetividade da CoronaVac, tanto para casos mais leves de COVID-19 quanto para casos graves (Butantan, 2022).

No estudo com a CoronaVac foi mostrado que ela possui baixa eficácia contra casos leves, mas alta contra casos moderados e graves. A vacina foi a primeira a ser distribuída em massa para indivíduos em grupos de risco para a COVID-19. A CoronaVac atingiu uma eficácia global de mais de 80% e uma efetividade acima de 90% (Butantan, 2022).

A vacina AstraZeneca (ChAdOx1 nCoV-19) é uma vacina de vetor viral desenvolvida na Inglaterra na Universidade de Oxford em parceria com o laboratório AstraZeneca. Ela utiliza como vetor um adenovírus de chimpanzé (não replicante) que induz uma resposta imune através da expressão da proteína S do SARS-CoV-2, gerando uma robusta resposta imune e celular (LIMA et al, 2021).

Os estudos iniciais da vacina Astrazeneca foram planejados com dose única, mas foi percebido um aumento de anticorpos neutralizantes após uma segunda dose. Um estudo provisório apontou uma eficácia contra casos sintomáticos de 64,1% após uma dose e de 70,4% após duas doses. Outro estudo apontou que a Astrazeneca possui uma eficácia de 67% na redução do risco relativo da doença (FRANCIS et al, 2022).

A vacina da Janssen é uma vacina de vetor viral, semelhante a AstraZeneca, fabricada pela empresa americana Johnson e Johnson. A vacina, assim como a AstraZeneca, também utiliza como vetor viral um adenovírus para induzir uma resposta imune através da produção da proteína S do SARS-CoV-2 em nossas células (LIMA et al, 2021).

Um estudo foi realizado nos Estados Unidos com a vacina Janssen entre 1 de março de 2020 e 31 de agosto de 2021. Durante a realização do estudo a variante *Delta* surgiu e começou a circular no mundo, atingindo a população do estudo e possibilitando dados sobre a eficácia da vacina sob a variante. A população utilizada no estudo foi de pessoas de 18 anos ou mais, sem registro de vacinação e que não haviam contraído Covid-19 (POLINSKI et al, 2022).

A vacina Pfizer (BNT162b2) é uma vacina genética produzida pelo laboratório americano Pfizer em parceria com a empresa de biotecnologia alemã BioNTech. As vacinas genéticas utilizam de RNA mensageiro, envolto em camada lipídica que evita sua degradação até chegar na célula, para levar a informação da fabricação da proteína S do SARS-CoV-2 para as nossas células, gerando uma resposta imune e celular elevada (LIMA et al, 2021).

O estudo com a vacina **Pfizer**, realizado entre 27 de julho de 2020 a 14 de novembro de 2020, utilizou 43.548 participantes. Os participantes foram divididos em 2 grupos, um recebendo placebo e outro a vacina, a eficácia estimada foi de 95% (IC 95% de 90,3 a 97,6) (POLACK et al, 2020).

DISCUSSÃO

Quando o SARS-CoV-2 espalhou-se pelo mundo, dando início a pandemia de COVID-19, diversos laboratórios em conjunto com governos e faculdades iniciaram pesquisas para a produção de vacinas capazes de combater o vírus. Mesmo que tenha gerado na população uma desconfiança nas vacinas, devido sua produção ter sido realizada em tempo recorde, todas passaram por testes clínicos que comprovaram uma eficácia e segurança, sendo então liberadas para uso emergencial.

Com o avanço da vacinação diversos estudos surgiram buscando avaliar os seus efeitos na população, onde foi possível observar uma queda significativa nos casos sintomáticos, internações e óbitos pela COVID-19 em diversas faixas etárias.

Com o avanço da vacinação eventualmente houve uma escassez das vacinas devido a problemas logísticos e diplomáticos, levando as entidades de saúde a completarem os esquemas de vacinação com doses mistas (doses heterólogas). Diversos estudos então surgiram buscando compreender como seria a resposta imune de um organismo que recebeu doses de fabricantes diferentes.

Para a surpresa dos pesquisadores, as doses heterólogas muitas vezes geravam uma resposta imune mais duradoura e com maiores títulos de anticorpos, inclusive contra as variantes, sendo então mais eficazes do que um esquema de vacinação homologa.

A vacina CoronaVac mostrou muito efetiva no combate da pandemia, pois foi uma das primeira a serem disponibilizadas para a população brasileira, auxiliando no alívio do sistema de saúde num período complicado da pandemia. Embora a CoronaVac tenha sido uma peça fundamental no combate à pandemia, em comparação com as outras vacinas, a resposta imune gerada por ela é baixa e por esse motivo o uso de dose de reforço e adicional por uma vacina diferente mostra-se bem vinda para complementar a imunidade daqueles vacinados por ela.

Com o decorrer da pandemia, diversas variantes do *SARS-CoV-2* surgiram e trouxeram consigo dúvidas em relação à efetividade das vacinas perante elas. Diversos estudos que buscaram compreender a efetividade das vacinas foram realizados em populações afetadas pelas variantes.

Para a maioria das variantes (*Alfa, Beta, Gama e Delta*) foi observada uma diminuição na efetividade das vacinas, com a diminuição da resposta imune conferida por elas, mas que foram superadas através das doses de reforço. A única variante que, segundo alguns estudos, apresenta uma evasão parcial ou completa da imunidade conferida pelas vacinas é a variante *Omicron*, contudo vacinas bivalentes, que possuem como alvo principal não só a cepa original do *SARS-CoV-2* como também a cepa da *Omicron*, já estão em desenvolvimento.

CONCLUSÕES

- As vacinas CoronaVac, AstraZeneca, Pfizer e Janssen tiveram um impacto significativamente positivo no Brasil e no mundo, sendo essenciais na diminuição do número de casos graves, internações e da letalidade, auxiliando no alívio do sistema de saúde e peça fundamental no combate a pandemia;
- Embora a vacinação homóloga ainda seja recomendada para o primeiro esquema vacinal, a vacinação heteróloga mostrou-se efetiva na produção de uma imunidade forte e duradoura, inclusive contra as variantes;
- A vacinação heteróloga deve ser incentivada como dose de reforço e adicional para gerar na população, principalmente para aqueles que se imunizaram primeiramente com a CoronaVac, uma resposta imune mais duradoura;
- Embora as vacinas tenham apresentado uma redução de sua efetividade contra as variantes ainda assim conferem uma proteção significativa contra elas. A variante *Omicron* apresenta um escape vacinal parcial, ou em alguns casos completo, entretanto, já estão sendo pesquisadas vacinas que tem como alvo essa variante.
- A vacinação ainda é a melhor forma de combate à pandemia e ela deve ser cada vez mais expandida, através de campanhas do governo, para que seja possível imunizar a maioria

da população, evitando o espalhamento do vírus e de suas variantes, diminuindo as chances do surgimento de mais variantes com escape vacinal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto Adolfo Lutz, pela oportunidade de me aprimorar academicamente e profissionalmente. Os ensinamentos que obtive na instituição irei levar para toda a vida. Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Fabio Hiroto Shimabukuro, por me instruir e guiar nas práticas laboratoriais e na elaboração do TCC. Agradeço a todos os funcionários do Instituto Adolf Lutz de Sorocaba, pela paciência, carinho e dedicação que tiveram comigo durante o tempo que passei no laboratório.

REFERÊNCIAS

CAMARGO, Carlos e et al. **Um ano de pandemia da COVID-19: diversidade genética do SARS-CoV-2 no Brasil**. BEPA, 18, 207, 12-33, 2021.

CAVILHA, L. G.; BECHTOLD, C. **Vacinas e vacinação contra COVID-19: estado da arte: COVID-19 vaccines and vaccination: state of the art**. Brazilian Journal of Development, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 58082–58105, 2022.

CORONAVAC PROVOU SUA EFICÁCIA CONTRA COVID-19 NO ESTUDO CLÍNICO MAIS CRITERIOSO, FEITO COM PROFISSIONAIS DE SAÚDE DURANTE PICO DE CASOS. **Butantan**, 2022, disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/coronavac-provou-sua-eficacia-contracovid-19-no-estudo-clinico-mais-criterioso-feito-com-profissionais-de-saude-durante-pico-de-casos>>. Acesso em 20 out, 2022.

Francis AI, Ghany S, Gilkes T, et al. **Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions**. Postgraduate Medical Journal 2022; 98: 389-394.

LIMA, Eduardo; ALMEIDA, Amalia; KFOURI, Renato. **Vacinas para COVID-19 - o estado da arte**. Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife, 21 (Supl. 1): S21-S27, fev., 2021

Ministério da Saúde – Acesse as bulas das vacinas contra a covid-19. **Ministério da Saúde**, 2022. Disponível em <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/acesse-as-bulas-das-vacinas-contracovid-19>>. Acesso em: 16 de outubro de 2022.

POLACK, Fernando, et al. **Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine**. The New England Journal of Medicine (NEJM). 383, 27, 2603-2615, dez, 2020.

POLINSKI JM, WECKSTEIN AR, BATECH M, et al. **Durability of the Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine in the Prevention of COVID-19 Infections and Hospitalizations in the US Before and During the Delta Variant Surge.** *JAMA Netw Open.* 2022;5(3):e222959.

FREQUÊNCIA DE LESÕES INTRAEPITELIAIS ESCAMOSAS POR REGIÃO DO BRASIL ENTRE JULHO DE 2021 E JUNHO DE 2022

Jéssica Estrutti do Prado¹; Daniela Etlinger-Colonelli²

¹Estudante do curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública com Ênfase em Citologia Oncótica - Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Anatomia Patológica; e-mail: jessicaebiomed@gmail.com

²Biomédica, docente e pesquisadora científica VI - Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Anatomia Patológica.

Resumo: O rastreamento de lesões precursoras do câncer de colo uterino brasileiro é recomendado a mulheres entre 25 e 64 anos, por meio da realização periódica do exame citopatológico, sendo a incidência do câncer heterogênea, com diferenças regionais. O objetivo deste estudo foi descrever a frequência de lesões intraepiteliais escamosas do colo uterino detectadas no exame citopatológico, nas cinco regiões brasileiras entre julho/2021 e junho/2022. Os dados foram obtidos a partir dos dados do Sistema de Informação do Câncer (SISCAN). Para a análise foram calculadas as frequências de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e carcinoma escamoso nas diferentes regiões, o índice de positividade nacional e regional e a frequência de representatividade da junção escamocolunar (JEC). No período, foram registrados 6.939.223 exames citopatológicos, sendo o índice de positividade nacional de 3,1%. O índice de positividade, frequência de LSIL, HSIL e carcinoma escamoso observados foram respectivamente: região Norte (3,83%; 1,01%; 0,54%; 0,03%), Nordeste (2,83%; 0,65%; 0,36%; 0,01%), Sudeste (2,88%; 0,66%; 0,31%; 0,01%), Sul (3,29%; 0,68%; 0,36%; 0,01%) e Centro-Oeste (4,09%; 0,78%; 0,51%; 0,02%). Do total de exames, a representatividade da JEC foi de 55,2%, sendo que as regiões com representatividade da JEC acima da frequência nacional apresentaram mais exames alterados. A região Norte apresentou maior incidência de lesões, seguida da região Centro-Oeste. Foi demonstrada correlação entre a representatividade da JEC e maior frequência de exames alterados, corroborando dados que reforçam a importância da adequada representatividade celular para melhoria da qualidade do exame.

Palavras-chave: programas de rastreamento, neoplasias do colo do útero, lesões intraepiteliais escamosas, grupos etários, Brasil.

INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é considerado um problema de saúde pública global. Apesar de ser uma doença prevenível que pode ser detectada e tratada precocemente, ainda representa uma das principais causas de morte em mulheres (FERREIRA et al., 2022; OLUSOLA et al., 2019). A desigualdade social relacionada ao câncer do colo uterino fica evidente, sobretudo, em estudos que demonstram o maior percentual de mortes em países de baixa e média renda (CLARO; LIMA; ALMEIDA, 2021).

No Brasil, com exceção do câncer de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o terceiro mais incidente entre as mulheres. O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima 16,35 novos casos a cada 100 mil mulheres para cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2019). A incidência do câncer do colo do útero no Brasil é heterogênea entre as regiões, sendo mais incidente no Norte e Nordeste (INCA, 2022a).

O colo uterino é revestido pelo epitélio colunar simples no canal endocervical e pelo epitélio escamoso estratificado não queratinizado na ectocérvice. O câncer pode se originar de ambos os epitélios, mas o carcinoma escamoso é mais frequente. A junção entre os dois epitélios é conhecida como junção escamocolunar (JEC) (OLUSOLA et al., 2019; SCHIFFMAN et al., 2016).

A história natural da doença é de lenta evolução, dependente de fatores de risco, sendo a infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco o principal deles. O HPV infecta as camadas basais do epitélio cervical por meio de micro traumas. Nessas camadas são expressos genes precoces, que iniciam a replicação viral e nas camadas superiores ocorre a expressão de genes tardios que completam a formação de novos vírions. Com a descamação das células ocorre a liberação de vírus recém-formados, que podem ou não iniciar uma nova infecção. A associação entre a expressão gênica do HPV e fatores de risco podem resultar em lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), ou ainda evoluir para lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e se não tratada, devido ao aumento de mutações no DNA das células infectadas, progridem para neoplasia invasiva (WOODMAN; COLLINS; YOUNG, 2007).

A infecção persistente pelo HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo do útero. Transmitido sexualmente, o vírus é capaz de infectar mucosas e tecidos cutâneos, causando alterações no genoma das células. Dentre os HPVs de alto risco oncogênico, os tipos 16 e 18 são os mais prevalentes e, conseqüentemente, os mais associados ao desenvolvimento desse câncer (OLUSOLA et al., 2019). Outros fatores frequentemente relacionados ao câncer de colo uterino são o tabagismo, atividade sexual precoce, múltiplos parceiros sexuais, uso prolongado de anticoncepcionais, multiparidade e infecções por alguns outros agentes (INCA, 2019). Condições socioeconômicas precárias e dificuldade no acesso aos serviços de saúde também são constantemente apontadas como importantes barreiras no controle do câncer de colo de útero (CLARO; LIMA; ALMEIDA, 2021; LOPES; RIBEIRO, 2019).

A realização periódica do exame citopatológico para a detecção precoce de lesões intraepiteliais é uma das ferramentas utilizadas para reduzir a mortalidade pelo câncer de colo uterino, a partir de programas de rastreamento. O exame citopatológico, ou exame de Papanicolau, consiste na análise morfológica de células esfoliadas do colo uterino, que permite a identificação de lesões pré-neoplásicas e o diagnóstico do câncer. No Brasil, o programa de rastreamento teve início na década de 1990 e atualmente é preconizada a realização periódica do exame para mulheres entre 25 e 64 anos que já iniciaram a atividade sexual. Apesar da cobertura populacional atual, o impacto na mortalidade desejado ainda não foi atingido pelo país (INCA, 2016a; SILVA et al., 2022).

Sabendo que as regiões brasileiras apresentam variações de incidência de câncer do colo do útero, principalmente devido às diferenças sociais, econômicas e comportamentais, o presente estudo teve como objetivo conhecer a frequência das lesões precursoras do câncer de colo uterino detectadas no exame citopatológico, nas diferentes regiões brasileiras, além de avaliar a adequabilidade da representatividade celular dos exames.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo observacional realizado a partir de dados do Sistema de Informação do Câncer (SISCAN), referentes ao rastreamento do câncer do colo de útero no Brasil e regiões, entre julho de 2021 e junho de 2022. Todos os dados utilizados neste artigo são de acesso público e se encontram disponíveis online no site do Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Foram coletados dados de exames citopatológicos de colo de útero relativos à representatividade celular, diagnóstico e unidade federativa de realização do exame.

Os dados coletados foram tabulados em Microsoft Excel 365 e estratificados por região. Foram realizados os seguintes cálculos: soma para obtenção do total de cada variável pesquisada; cálculo de porcentagens para as categorias; correlação de Spearman para representatividade da JEC e lesão intraepitelial; índice de positividade nacional e regional (total de exames alterados/total de exames satisfatórios x 100).

Para a revisão da literatura e discussão dos resultados foi realizada a busca dos termos “programas de rastreamento”, “epidemiologia do câncer de colo de útero”, “papilomavírus humano”, “acesso aos serviços de saúde” e “desigualdade em saúde nas regiões brasileiras”, nas bases de dados PubMed, SciELO e Biblioteca Virtual de Saúde (BVS). Após filtrar artigos em inglês e português e realizar a leitura do título, resumo e texto na íntegra, foram selecionadas 20 referências que melhor se adequaram ao tema.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo foi desenvolvido a partir dos dados disponíveis no DATASUS referente aos exames registrados no SISCAN. Vale destacar que parte dos laboratórios no Brasil ainda utiliza a plataforma Sistema de Informação do Câncer do Colo do Útero (SISCOLO) (DATASUS, 2022). Deste modo, nossos resultados foram referentes aos exames cadastrados no SISCAN no período estudado. Entre julho de 2021 e junho de 2022 foram registrados 6.939.223 exames citopatológicos de colo uterino no Brasil. Deste total, 0,29% (20.268) foram rejeitados na fase pré-analítica e 1,04% (72.289) foram classificados como insatisfatórios para avaliação.

As maiores frequências de lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma escamoso foram encontradas nas regiões Norte (1,01%; 0,54%; 0,03%) e Centro-Oeste (0,78%; 0,51%; 0,02%) (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das frequências de lesões intraepiteliais escamosas e carcinoma, por região brasileira, registrados no SISCAN entre junho de 2021 e julho de 2022.

Região	LSIL		HSIL		Carcinoma		Total de exames satisfatórios
	n	%	n	%	n	%	n
Norte	5.533	1,01	2.977	0,54	157	0,03	549.618
Nordeste	14.482	0,65	8.073	0,36	221	0,01	2.213.462
Sudeste	13.809	0,66	6.408	0,31	209	0,01	2.093.995
Sul	10.327	0,68	5.390	0,36	173	0,01	1.516.068
Centro-Oeste	3.671	0,78	2.435	0,51	74	0,02	473.523

LSIL: lesão intraepitelial de baixo grau.

HSIL: lesão intraepitelial de alto grau.

Estudos expressam que a desigualdade regional no país é notável e com impacto direto no controle do câncer do colo do útero, apontando a não captação de todas as mulheres

da população de risco, principalmente aquelas que se encontram em situações socioeconomicamente precárias (SILVA et al., 2022). No Brasil, os serviços de saúde são garantidos de forma pública pelo Sistema Único de Saúde (SUS), com cobertura para toda população, porém, observa-se que residentes de certas regiões, como o Norte e o Nordeste, encontram maiores problemas na utilização desses serviços, principalmente pela dificuldade no acesso. Outros pontos destacados são a prevalência da infecção pelo HPV, a falta de conhecimento, divulgação e conscientização da importância do exame (BARBOSA et al., 2016; CLARO; LIMA; ALMEIDA, 2021).

A representatividade da JEC foi descrita em 55,18% dos exames satisfatórios realizados no território nacional; na análise regional, a região Norte demonstrou maior representatividade (62,39%) e a região Nordeste menor representatividade (49,84%) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das frequências de representatividade da JEC e a presença de exames alterados, por região brasileira, registrados no SISCAN entre junho de 2021 e julho de 2022.

Região	JEC presente		Exames alterados	
	n	%	n	%
Norte	342.892	62,39	21.069	3,83
Nordeste	1.103.164	49,84*	62.695	2,83*
Sudeste	1.148.828	54,86*	60.343	2,88*
Sul	911.009	60,09	49.936	3,29
Centro-Oeste	271.935	57,43	19.386	4,09
BRASIL	3.777.828	55,18	213.429	3,12

* representatividade da JEC e total de exames alterados abaixo na média nacional

Dentre os exames satisfatórios, o índice de positividade brasileiro foi de 3,12%. As regiões com representatividade da JEC abaixo da média nacional tiveram o índice de positividade inferior a 3% e as regiões com representatividade superior mostraram índice de positividade acima de 3%, sendo demonstrada correlação moderada entre as variáveis ($r = 0,68$). A JEC é a região do colo do útero na qual há uma grande quantidade de células jovens em processo de replicação e diferenciação, portanto, é uma área exposta a maior possibilidade de infecção pelo vírus do HPV (SANTOS; RIBEIRO, 2020). Por esse motivo, a presença da JEC na amostra é considerada um indicador de qualidade, visto que o risco de ocorrerem lesões precursoras do câncer nessa região é maior (NAYAR; WILBUR, 2015).

As análises realizadas neste estudo foram desenvolvidas a partir do SISCAN e ponderamos que nem todos os laboratórios que realizam exames na rede pública o utilizam, temos conhecimento de que as bases de dados dos sistemas de informações do SUS nem sempre são adequadamente alimentadas, podendo ocasionar perda de informações (SILVA et al., 2022). Entretanto, o volume de exames avaliados nos permite estimar um panorama nacional da ocorrência de lesões e nos auxiliam na identificação de tendências regionais e temporais, permitindo que ações de melhorias sejam realizadas e que os profissionais responsáveis pela alimentação destas bases de dados se conscientizem da importância da comunicação adequada de seus resultados para que estudos como este tragam benefícios ao rastreamento e detecção precoce do câncer de colo do útero.

CONCLUSÕES

A maior ocorrência de LSIL, HSIL e carcinomas escamosos estão em consonância com os dados da literatura, sendo as regiões Norte e Centro-Oeste as com maiores frequências.

Foi demonstrada correlação entre a representatividade da JEC e a identificação de lesões, corroborando dados que reforçam a necessidade de adequada representatividade da JEC para aumento da qualidade do exame citopatológico.

A educação continuada dos profissionais que trabalham na fase pré-analítica é fundamental para que a falta de representatividade da JEC e exames insatisfatórios sejam evitados.

Ainda, em algumas regiões, há a necessidade de melhoria no acesso aos serviços de saúde, para que o rastreamento seja realizado com maior qualidade, além da elaboração de ações voltadas à conscientização da população e de profissionais sobre a importância do rastreamento no controle do câncer do colo uterino.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, I. R. et al. Desigualdades regionais na mortalidade por câncer de colo de útero no Brasil: Tendências e projeções até o ano 2030. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 21, n. 1, p. 253–262, 2016.

CLARO, I. B.; LIMA, L. D. DE; ALMEIDA, P. F. DE. Diretrizes, estratégias de prevenção e rastreamento do câncer do colo do útero: as experiências do Brasil e do Chile. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 26, n. 10, p. 4497–4509, 2021.

DATASUS. **Sistema de Informação do Câncer - SISCAN (colo do útero e mama)**. Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <<https://datasus.saude.gov.br/aceso-a-informacao/sistema-de-informacao-do-cancer-siscan-colo-do-utero-e-mama/>>. Acesso em: 14 out. 2022

FERREIRA, M. DE C. M. et al. Detecção precoce e prevenção do câncer do colo do útero: conhecimentos, atitudes e práticas de profissionais da ESF. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 27, n. 6, p. 2291–2302, 2022.

INCA. **Diretrizes Brasileiras para o rastreamento Do Câncer Do Colo Do Útero**. 2º ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2016a. v. XXXIII

INCA. **Manual de Gestão da Qualidade para Laboratório de Citopatologia**. 2º ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2016b.

INCA. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2019.

INCA. **Monitoramento das Ações de Controle do Câncer do Colo do Útero**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2022a.

INCA. **Dados e Números Sobre Câncer do Colo do Útero - Relatório Anual 2022**. Rio de Janeiro: set. 2022b.

INCA. **Incidência**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/incidencia>>. Acesso em: 28 nov. 2022c.

LOPES, V. A. S.; RIBEIRO, J. M. Fatores limitadores e facilitadores para o controle do câncer de colo de útero: uma revisão de literatura. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 24, n. 9, p. 3431–3442, 2019.

NAYAR, R.; WILBUR, D. C. **The Bethesda system for reporting cervical cytology**. 3. ed. [s.l.] Springer, 2015.

OLUSOLA, P. et al. Human papilloma virus-associated cervical cancer and health disparities. **Cells**, v. 8, n. 6, p. 14–16, 2019.

SANTOS, M. J. S.; RIBEIRO, A. A. Estratégias Utilizadas para Melhorar a Qualidade dos Exames Citopatológicos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 66, n. 1, 2020.

SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 2016.

SILVA, G. A. et al. Avaliação das ações de controle do câncer de colo do útero no Brasil e regiões a partir dos dados registrados no Sistema Único de Saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 38, n. 7, p. 1–15, 2022.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007a.

MÉTODOS INDIRETOS PARA DETECÇÃO DE MICOPLASMAS EM LINHAGENS CELULARES

Gabriela Marques Silva¹; Tamiko Ichikawa Ikeda²; Ana Cristina Scarparo de Miranda²

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

²Docente/ Pesquisador do Núcleo de Cultura de Células – NCC- IAL

Resumo: As técnicas de cultura de células são amplamente utilizadas nas mais diversas áreas científicas tradicionais e de inovação tecnológica, mas é essencial garantir a sua autenticidade e ausência de contaminantes para que os resultados obtidos não sejam invalidados. Os contaminantes mais comuns encontrados nas linhagens celulares são os micoplasmas, que causam diversas alterações nas células, não podem ser visualizados ao microscópio óptico e nem induzem turvação do meio de cultura, porém podem alterar o seu pH, dificultando a detecção. Com isso, o controle periódico para comprovar sua ausência é essencial e requer a utilização de metodologias específicas, como a cultura em ágar e caldo, biologia molecular, técnicas de coloração fluorescente, entre outras. O objetivo desta revisão é discutir as metodologias rápidas e indiretas para detecção de contaminação por micoplasmas, por serem de fácil implantação, ter reprodutibilidade e não necessitarem de complexa infraestrutura de laboratório. A técnica de coloração por Hoechst ou DAPI marca o material genético, permitindo identificar os micoplasmas no microscópio de fluorescência, como pequenos pontos no espaço extracelular e superfície da membrana. O ensaio de bioluminescência com o kit comercial MycoAlert™ é uma prova bioquímica para micoplasmas onde há detecção da produção de ATP, pelas enzimas acetato quinase e carbamato quinase, revelado pela luciferase, antes e após a adição de substrato. Além dessas, há kits comerciais utilizando outras metodologias, que podem ser uma opção na verificação da ausência de micoplasmas na rotina de laboratórios que trabalham com cultura de células. Todos esses métodos têm vantagens e limitações que devem ser consideradas na escolha do teste.

Palavras-chave: linhagem celular, técnicas de cultura de células, mycoplasma e *Mollicutes*

INTRODUÇÃO

As técnicas de culturas celulares começaram a ser desenvolvidas no final do século XIX e possibilitaram enorme crescimento do conhecimento científico. Essas evoluíram muito e se tornaram essenciais para várias áreas, como virologia, biologia celular, farmacologia, medicina regenerativa, toxicologia, parasitologia e outras. São também amplamente utilizadas como base na inovação tecnológica em metodologias como cultura tridimensional e de células-tronco, engenharia de tecidos e bioimpressão, além de órgãos-em-chips (Rebello, 2014; Costa et al., 2018).

As culturas celulares devem ser autênticas e livres de contaminantes microbiológicos para garantir a reprodutibilidade e validade dos resultados de estudos científicos em que são utilizadas (ATCC, 2010). Os micoplasmas são um grupo de bactérias

da classe *Mollicutes* e representam os contaminantes mais comuns nas linhagens celulares. Eles não possuem parede celular rígida, o que lhes dá flexibilidade. Também são muito pequenos, com aproximadamente 0,15 a 0,3 μm , sendo considerados os menores organismos de vida livre. Essas características possibilitam que passem por sistemas de filtragem, como as membranas com poros de 0,45 ou 0,22 μm , que são utilizadas na esterilização de soluções e meios de cultura (Drexler; Uphoff, 2002; Razin; Hayflick, 2010; Wilder; Reid, 2022).

São conhecidas aproximadamente 190 espécies que estão distribuídas entre humanos, animais, insetos e plantas (Wilder; Reid, 2022). Dentre essas, 20 espécies já foram encontradas em culturas celulares, sendo 8 as mais frequentes, responsáveis por aproximadamente 95% das contaminações: *M. arginini* e *Acholeplasma laidlawii* (origem bovina), *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. orale*, *M. pirum*, *M. salivarium* (humanos), *M. hyorhinis* (suínos) (Drexler; Uphoff, 2002; ATCC, 2022).

Esses micro-organismos possuem um genoma pequeno, o que dificulta sua capacidade biossintética. Com isso, precisam de fontes exógenas para garantir o suprimento de colesterol, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e outros metabólitos, que são obtidos das células hospedeiras ou do ambiente (Wilder; Reid, 2022).

Os micoplasmas têm um crescimento mais demorado em relação a outras bactérias, fazendo com que sinais de sua contaminação não sejam percebidos precocemente, mesmo sob condições adequadas (Drexler; Uphoff, 2002). Eles não causam turvação do meio de cultura, mas pode ocorrer mudança do pH. Apesar de não poderem ser vistos em microscópio óptico, a presença de micoplasmas pode causar diversos danos às células, como alterações cromossômicas e da expressão gênica, interrupção da síntese de ácidos nucleicos, mudanças na composição da membrana celular (antígenos de superfície e expressão de receptores), inibição da proliferação e metabolismo, redução das taxas de transfecção, indução de efeitos citopáticos, senescência e morte celular, entre outros (ATCC, 2022). A espécie de micoplasma infectante, tipo celular afetado, condições de cultura, intensidade e tempo de contaminação são fatores que influenciam nos efeitos que podem ser causados nas células e também na sua gravidade (Drexler; Uphoff, 2002).

Muitos desses micro-organismos ficam aderidos extracelularmente na membrana da célula hospedeira para poder colonizar e causar infecções, mas há relatos de sua presença intracelular (Drexler; Uphoff, 2002).

A contaminação das culturas celulares pode ocorrer por falta de técnicas assépticas adequadas, produção de aerossóis durante os procedimentos, além da manipulação de culturas ou insumos contaminados. Por isso é importante a implementação de técnicas assépticas rígidas e não utilizar antibióticos nas culturas, exceto quando for realmente necessário. Esse conjunto de boas práticas inclui o uso de equipamentos de proteção individual (EPI), como avental, luvas, toucas, máscaras, além de equipamentos de proteção coletiva (EPC), como cabine de segurança biológica. As áreas assépticas devem ser desinfetadas antes do uso e as mãos higienizadas constantemente. Bancadas e as cabines biológicas devem ser limpas com álcool 70%, antes e após manipular cada cultura, assim como a superfície externa dos materiais que serão utilizados. Nunca pipetar com a boca, evitar conversar nas áreas limpas e reduzir a produção de aerossóis. Sempre trabalhar com cada linhagem separadamente e manter frascos de meios e soluções para cada cultura manipulada. Trabalhar de acordo com nível de biossegurança que a linhagem exige (Geraghty et al., 2014; OECD, 2018).

A manipulação de linhagens contaminadas no laboratório é uma fonte importante para a disseminação de micoplasmas para outras culturas. Por isso, além de realizar o controle periódico das linhagens em rotina, é recomendado que células recém-recebidas sejam mantidas em quarentena, manipuladas preferencialmente em área limpa separada, até

que seja comprovada a ausência desse contaminante pela realização de testes adequados (ATCC, 2010). As linhagens celulares devem ser sempre adquiridas de coleções de cultura reconhecidas, evitando a troca delas entre laboratórios parceiros, devido ao maior risco de introduzir contaminações no ambiente (OECD, 2018).

Ao identificar a presença de micoplasmas, é necessário o descarte da cultura contaminada e todos os insumos que foram utilizados na manipulação, além da desinfecção do laboratório. Se a linhagem celular não puder ser substituída, pode ser feito o tratamento com antibióticos adequados, como os grupos dos macrolídeos, tetraciclina e quinolonas. Os macrolídeos e tetraciclina atuam na inibição da síntese proteica, ligando-se nas subunidades do ribossomo e incluem Tiamulina (BM-cyclin 1) e Minociclina (BM-cyclin 2). As quinolonas inibem a replicação da DNA-girase da bactéria, sendo exemplos Plasmocin, ciprofloxacina e enrofloxacin (Uphoff; Drexler, 2011; Nikfarjam; Farzaneh, 2012).

O objetivo desta revisão é discutir as metodologias rápidas e indiretas para detecção de contaminação por micoplasmas, por serem de fácil implantação, ter reprodutibilidade e não necessitarem de complexa infraestrutura de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho utilizou fontes como Pubmed, sites de Centros de Recursos Biológicos Internacionais como ATCC (*American Type Culture Collection*) e ECCAC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*), além do comitê ICLAC (*International Cell Line Authentication Committee*), buscando as seguintes palavras chaves: *cell line*, *contamination in cell culture*, *mycoplasmas*, *mycoplasma detection*, *mycoplasma kit* e MycoAlert™. A busca foi realizada com o objetivo de fazer uma revisão na literatura sobre os micoplasmas e sua detecção em culturas celulares, especialmente por métodos rápidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A detecção de contaminação por micoplasmas em culturas celulares utilizando metodologias padronizadas é essencial para garantir a confiabilidade dos resultados produzidos. Pode ser feita por diferentes técnicas, como: cultivo em meios seletivos, coloração fluorescente (Hoechst ou DAPI), PCR (reação em cadeia pela polimerase) e alguns kits disponíveis comercialmente (Drexler; Uphoff, 2002, Young et al., 2010). Cada uma tem suas vantagens e limitações que precisam ser consideradas, além da infraestrutura disponível no laboratório.

A cultura em meios seletivos (caldo e ágar) é considerada padrão-ouro para identificação das colônias. O método é sensível para detecção de contaminação, mas não identifica a espécie presente. É uma técnica mais demorada, sendo necessários aproximadamente 28 dias para visualização das colônias com formato de “ovo frito” (ATCC, 1992; Wilder; Reid, 2022).

A utilização de técnicas moleculares para detecção de micoplasmas é mais recente e há protocolos para os diversos tipos de PCRs, geralmente buscando a presença do gene 16S rRNA. Esta é uma região conservada do seu genoma, que permite a identificação das principais espécies que contaminam as linhagens celulares, mas não está presente em eucariotos nem em outros gêneros de bactérias. Essas metodologias são ferramentas relativamente rápidas, mas sua eficiência depende da qualidade da amostra em teste, da sensibilidade do protocolo escolhido e especificidade dos *primers*, sendo necessária a otimização do ensaio em laboratório (Young et al., 2010).

A técnica indireta de coloração fluorescente por Hoechst ou DAPI (4',6'-diamino-2-fenilindol) possibilita a detecção pela marcação do material genético (DNA). É recomendada a utilização de células indicadoras para facilitar a visualização desses microrganismos (Figura 1), o que diminui a possibilidade de erros (Chen, 1977). Elas formam um suporte para o crescimento das bactérias na membrana celular e podem ser utilizadas linhagens celulares como Vero (rim de macaco verde africano), NHI 3T3 ou 3T6 (fibroblastos de camundongo), que apresentam uma quantidade de DNA homogênea nos núcleos (ATCC, 1992; Young et al., 2010; Nikfarjam; Farzaneh, 2012). Essa é uma metodologia relativamente rápida (cerca de 4 dias), com baixo custo e sensível para detecção dos micoplasmas (Wilder; Reid, 2022). No entanto, a interpretação dos resultados pode ser dificultada se a contaminação estiver presente em pequena quantidade, houver DNA de outras bactérias ou degradado das próprias culturas, artefatos e sujidades nas lâminas e lamínulas ou alterações na fluorescência dos corantes (ATCC, 1992; Young et al., 2010).

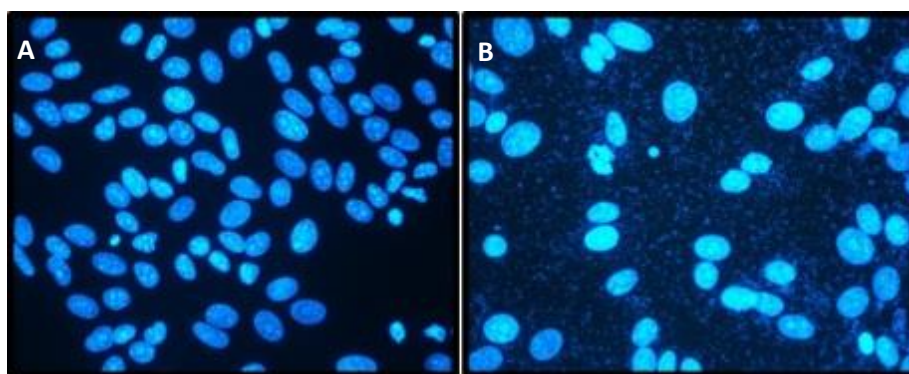


Figura 1 - Fotomicrografias da coloração de Hoechst 33258, em aumento de 400 X. (A) Controle negativo, com monocamada de células indicadoras Vero, mostrando os núcleos corados. (B) Controle positivo, com presença dos micoplasmas como pontos fluorescentes aderidos a membrana das células. Fonte: NCC - IAL.

Outro método possível é o ensaio por bioluminescência, para o qual há o kit MycoAlert™ (Lonza). Este se baseia na detecção de enzimas específicas produzidas pelos micoplasmas, como acetato quinase e carbamato quinase. Elas realizam a conversão de ADP (adenosina difosfato) em ATP (adenosina trifosfato) na presença dos substratos acetil ou carbamil fosfato. Pela ação da luciferase, a produção de ATP gera sinal de bioluminescência, que é captado pelo equipamento luminômetro. Se há presença dessas enzimas na amostra, ocorre elevação de produção de ATP entre as leituras, com consequente aumento da emissão de luz. Essa metodologia é rápida, tem baixo custo e não há necessidade de complexa infraestrutura do laboratório (Volkhov et al., 2011).

Ensaio colorimétricos são outra opção rápida de detecção, para a qual há kits comerciais. Os micoplasmas possuem lipoproteínas altamente imunogênicas localizadas na membrana plasmática, que são reconhecidas pelo receptor Toll-Like2 (TLR2), com indução de Fator Nuclear Kappa B (NF-κB) e outros fatores de transcrição. Esse princípio é utilizado no kit Plasmotest™ (InvivoGen), que possui uma linhagem celular recombinante (denominada HEK-Blue™2 cells). Se houver contaminação, as lipoproteínas se ligam ao TLR2 das células HEK-Blue™2 e começa a sinalização do fator NF-κB. Este induz o gene reporter SEAP (fosfatase alcalina embriônica secretada) a secretar fosfatase alcalina, que causa mudança da cor do meio de detecção HEK-Blue™ de rosa para roxo/azul. A detecção pode ser apenas visual ou em leitor de microplacas a 625 - 655 nm (Huang et al., 2009; Volkhov et al., 2011). Uma desvantagem dessa técnica é que pode ter falsos positivos pela identificação de outros contaminantes, como bactérias e leveduras (Volkhov et al., 2011).

Com o método de ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática), o kit MycoProbe™ (R&D Systems) faz a detecção do 16S rRNA dos micoplasmas com sondas de oligonucleotídeos (Geraghty et al., 2014; R&D Systems, 2016). As amostras das linhagens celulares são lisadas e colocadas em microplaca de hibridização do kit. Após várias etapas, a leitura deve ser feita em espectrofotômetro a 490 nm. A sensibilidade é comparada aos ensaios de PCRs, mas interferências nas várias fases do protocolo podem afetar o resultado (Geraghty et al., 2014; R&D Systems, 2016).

A maioria das metodologias não permite a identificação da espécie contaminante, mas apenas da presença ou ausência desses micro-organismos nas culturas celulares, para qual são necessárias técnicas, como imunologia ou PCR. No entanto, para o laboratório de cultura de células geralmente é mais importante comprovar periodicamente a ausência desses contaminantes, permitindo a rápida detecção e descarte de materiais ou linhagens, evitando a disseminação de micoplasmas (Drexler; Uphoff, 2002).

CONCLUSÕES

As metodologias rápidas e indiretas mostram-se uma opção ideal para a verificação de contaminação por micoplasmas. Além de serem de baixo custo, podem ser implantadas sem a necessidade de grandes adequações na infraestrutura e possuem reprodutibilidade nos seus resultados. Sempre que possível, é indicado utilizar mais de um tipo de teste, já que todos possuem limitações, aumentando a segurança na comprovação da ausência desses contaminantes. Também é essencial que os laboratórios utilizem as técnicas assépticas de forma rigorosa em todos os procedimentos da manutenção das culturas celulares, o que minimiza o risco de introduzir contaminantes, assim como adquirir novas linhagens apenas de coleções de cultura reconhecidas.

REFERÊNCIAS

- COSTA, M. C.; BARROS, A. P. D. N.; LOUBACK, R. A.; ROSSI, M. I. D. Modelos tridimensionais de cultura de células: aproximando o in vitro do in vivo. **Vigil. Sanit. Debate, Rio de Janeiro**, v. 6, n. 1, p. 72–83, 2018. doi: 10.22239/2317-269X.01047.
- REBELLO, M. A. **Fundamentos da Cultura de Tecidos e Células Animais**. 1 ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2014.
- ATCC. American Type Culture Collection. Maintaining High Standards in Cell Cultures, Rockville: ATCC, p. 1-12, 2010. Disponível em: <https://www.cedarlanelabs.com/contents/files?filePath=Suppliers/Links/CellBiologyStandards.pdf>. Acesso em: 26 out 2022.
- 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. doi: 10.1023/A:1022913015916.
- RAZIN, S., HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research -- an historical perspective. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 183-190, 2010. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.11.008.
- WILDER, C. N.; REID, Y. Mycoplasma quality control of cell substrates and biopharmaceuticals. 2002. Disponível em: <https://www.atcc.org/resources/white-papers/mycoplasma-quality-control-of-cell-substrates-and-biopharmaceuticals>. Acesso em: 26 out. 2022.
- ATCC. American Type Culture Collection. United States, 2022. Disponível em: <https://www.atcc.org/the-science/authentication/mycoplasma-contamination>. Acesso em: 26 out. 2022.

GERAGHTY, R. J.; CAPES-DAVIS, A.; DAVIS J. M.; DOWNWARD, J.; FRESHNEY, R. I.; KNEZEVIC, I.; LOVELL-BADGE, R.; MASTERS, J. R.; MEREDITH, J.; STACEY, G. N.; THRAVES, P.; VIAS, M. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. **Br. J. Cancer**, v. 111, n. 6, p. 1021–1046, 2014. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.166>.

OECD. Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP), OECD Series on Testing and Assessment, No. 286, OECD Publishing, Paris, 2018, <https://doi.org/10.1787/9789264304796-en>.

UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Elimination of mycoplasmas from infected cell lines using antibiotics. **Methods Mol. Biol.**, v. 731, p. 105-114, 2011. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_9.

NIKFARJAM, L.; FARZANEH, P. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. **Cell J.**, v. 13, n. 4, p. 203-212, 2012.

YOUNG, L.; SUNG, J.; STACEY, G.; MASTERS, J. R. Detection of Mycoplasma in cell cultures. **Nat. Protoc.**, v. 5, n. 5, p. 929-934, 2010. doi: 10.1038/nprot.2010.43.

ATCC. American Type Culture Collection. Quality control methods for cell lines. 2nd ed., Rockville: ATCC, 1992.

CHEN, T. R. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp. Cell Res.*, v. 104, n. 2, p. 255-262, 1977. doi: 10.1016/0014-4827(77)90089-1.

Lonza. MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit. 2012. Disponível em: https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/download/product/asset/27672.

VOLOKHOV, D. V.; GRAHAM, L. J.; BRORSON, K. A.; CHIZHIKOV, V. E. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. **Mol. Cell. Probes**, v. 25, n. 2-3, p. 69- 77, 2011. doi: 10.1016/j.mcp.2011.01.002.

HUANG, LY; DUMONTELE, J. L.; ZOLODZ, M.; DEORA, A.; MOZIER N.M.; GOLDING, B. Use of toll-like receptor assays to detect and identify microbial contaminants in biological products. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 11, p. 3427-3434, 2009. doi: 10.1128/JCM.00373-09.

Invivo Gen. Plasmotest™ Mycoplasma Detection Kit. 2022. Disponível em: <https://www.invivogen.com/plasmotest>.

Molecular Probes. MycoFluor Mycoplasma Detection Kit (M-7006). 2001. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/br/pt/M7006>.

O IMPACTO DA PANDEMIA DE COVID-19 NO DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR: PERSPECTIVAS E DESAFIOS

Lorena Pilla Portela Ormonde¹; Sérgio Schnoor Fogaça²

¹ Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – Instituto Adolfo Lutz; E-mail: lorenaormonde@hotmail.com

² Assistente Técnico de Pesquisa Científica e Tecnológica - Núcleo de Ciências Biomédicas do Centro de Laboratório Regional de Marília

Resumo

Introdução: A tuberculose é uma chaga milenar causada principalmente pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*. Apesar de ser curável e evitável, a doença persiste como um grave problema de saúde pública e está entre as maiores causas de mortes no mundo. Agravando este cenário, a pandemia da COVID-19, infecção respiratória aguda provocada pelo vírus SARS-CoV-2, gerou efeitos negativos no controle e atenção à doença. **Objetivos:** Demonstrar o impacto da pandemia nos indicadores epidemiológicos da tuberculose no âmbito global e nacional e os possíveis fatores para o estabelecimento dessa condição. **Metodologia:** Foi realizada revisão de literatura sobre o tema nas plataformas eletrônicas Google Acadêmico, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), SciELO e PubMed. Foram coletados dados de boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde e relatórios da Organização Mundial da Saúde, os quais foram transformados em gráficos e tabelas. **Resultados:** No Brasil e no mundo, houve uma grande redução no diagnóstico e notificação da tuberculose em 2020, o que levou a um aumento de pessoas não tratadas para a doença. Globalmente, a consequência disso refletiu em 2021, com o aumento da incidência e óbitos, porém o mesmo ainda não foi observado no Brasil. **Conclusões:** A pandemia afetou substancialmente os serviços de diagnóstico, tratamento e prevenção da tuberculose, retrocedendo anos de progresso no enfrentamento da doença. São inúmeros os fatores que levaram a essa condição, sendo fundamental mais estudos acerca do tema. É urgente a necessidade de restaurar o acesso e a prestação de serviços essenciais à tuberculose.

Palavras-chave: impactos na saúde pública; pandemia por COVID-19; tuberculose pulmonar

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma chaga milenar causada por espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo a *M. tuberculosis* a mais importante em saúde pública, conhecida também por bacilo de Koch (BK). A TB geralmente acomete os pulmões, sendo denominada TB pulmonar, porém pode atingir vários outros órgãos (TB extrapulmonar) (BRASIL, 2019). Qualquer indivíduo pode ser infectado pelo bacilo, porém algumas populações são mais vulneráveis a desenvolver a doença, como aquelas em situação de pobreza, desnutrição, infecção por HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), tabagismo e diabetes (WHO, 2022). Casos suspeitos de TB pulmonar ou extrapulmonar precisam ser confirmados por critério laboratorial, para isso, devem apresentar ao menos uma amostra positiva em exame de baciloscopia, teste rápido molecular ou cultura (BRASIL, 2022a). Em

2015, a tuberculose se tornou a principal causa de morte por doenças infecciosas no mundo (SILVA, D. R. et al., 2021). Neste mesmo ano, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs acabar a epidemia da doença através da Estratégia pelo Fim da Tuberculose, reduzindo o número de óbitos pela doença em 95% e a incidência em 90%, até 2035 (WHO,2022).

A COVID-19 é causada por um coronavírus, o SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2), surgiu em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China, quando foram relatados os primeiros casos de uma pneumonia até então de origem desconhecida que rapidamente se alastrou pelo mundo, sendo declarada pandemia pela OMS em 11 de março de 2020 (COSTA, et al., 2022). Frente à essa emergência pandêmica e as altas taxas de mortalidade, os sistemas de saúde do Brasil e do mundo precisaram se adaptar, sendo necessário reorganizar os serviços, o que incluiu o desvio de recursos humanos, financeiros, equipamentos e insumos da TB para a COVID-19, comprometendo a assistência aos pacientes acometidos pelo bacilo de Koch (HINO, et al., 2021; SOUZA, et al., 2022) Além disso, por não haver tratamento e nem vacinas para a nova doença, medidas como intensificação da higiene, uso de máscara e distanciamento social foram adotadas em âmbito mundial. As restrições de circulação geraram dificuldade de acesso a serviços de tratamento e diagnóstico da TB (SILVA; GARRIDO, 2021).

Não é a primeira vez que o atendimento à tuberculose é comprometido, o mesmo ocorreu durante desastres naturais, guerras e grandes surtos de doenças virais, tal como o Ebola na África Ocidental e o MERS-CoV (Síndrome respiratória do Oriente Médio) na Arábia Saudita, o que aumentou a carga da doença nos anos subsequentes (ALENE; WANGDI; CLEMENTS, 2020).

Apesar de ser uma doença curável e evitável, a tuberculose ainda é um dos principais problemas de saúde pública e uma das principais causas de morte em todo o mundo (WHO, 2022). A pandemia de COVID-19 provocou um atraso no combate à TB, retrocedendo anos de progresso no enfrentamento da doença, assim como consequências significativas no seu diagnóstico, tratamento e prevenção. O objetivo deste trabalho é demonstrar o impacto da pandemia nos indicadores epidemiológicos da tuberculose na esfera global e nacional, buscando identificar os possíveis fatores para o estabelecimento dessa condição e estratégias que possam minimizar os percalços gerados pela COVID-19.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho trata-se de uma revisão de literatura baseada em artigos e outras bibliografias científicas disponíveis nas plataformas eletrônicas BVS – Biblioteca Virtual em Saúde, PubMed, SciELO – Scientific Electronic Library Online e Google Acadêmico. Os descritores utilizados foram: Tuberculose, Impacto e COVID-19, assim como suas respectivas traduções em inglês. Os trabalhos selecionados compreendem o período de 2020 a 2022. Também foram levantados dados de boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde, relatórios da Organização Mundial da Saúde (OMS), manuais, além de outras publicações oficiais. Tais informações foram analisadas e transformadas em gráficos e tabelas para melhor visualização e interpretação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A nível mundial, o impacto mais importante da pandemia foi a redução no número de pessoas recém diagnosticadas e relatadas (notificadas) com TB. Observa-se na Tabela 1 uma queda acentuada no ano onde foi declarada pandemia em relação a 2019, com uma breve recuperação em 2021. Os 5,8 milhões de casos notificados em 2020 fez com que o mundo voltasse ao patamar de 2012. Nota-se também a discrepância entre as mais de 10 milhões de pessoas que adoeceram em 2020 e 2021 e quantas dessas foram notificadas, totalizando uma diferença de mais de 4 milhões de indivíduos que, portanto, não foram diagnosticados e tratados para TB (WHO, 2022).

Tabela 1: Tuberculose no mundo

	2019	2020	2021
Pessoas que adoeceram por TB (milhões)	10,3	10,1	10,6
Casos notificados (milhões)	7,1	5,8	6,4
Óbitos (milhões)	1,2	1,3	1,4
Incidência /100 mil hab.	134	129	134
Casos de TB pulmonar (%) *	-	59	63
Cobertura de tratamento (%)	69	58	61
Pessoas tratadas para TB resistente	181.533	150.469	161.746
Tratamento preventivo (milhões)	3,6	3,2	3,5
Pessoas com TB resistente	-	437.000	450.000
Gastos (bilhões)	US\$ 6,0	US\$ 5,5	US\$ 5,4

Fonte: World Health Organization 2022.

* confirmados bacteriologicamente

A primeira consequência disso é um aumento no número de óbitos uma vez que sem o devido tratamento a doença apresenta alta mortalidade. Houve um acréscimo no número de mortes após 2019, o que não acontecia há mais de uma década. Outro efeito é uma maior transmissão comunitária do bacilo, já que muitos indivíduos não estão sendo tratados. Aqueles que são infectados podem demorar de semanas a décadas para desenvolver a doença, sendo assim, o impacto na incidência é mais tardio. Tal fenômeno não foi percebido em 2020, pelo contrário, houve uma queda na incidência neste ano, porém em 2021, com um ano a mais para que a doença se manifestasse, já se observa uma elevação desse indicador, indo contra a tendência de declínio de 2% ao ano como ocorreu na maior parte das últimas duas décadas. A perspectiva é que os óbitos e a incidência de TB continuem aumentando (WHO, 2022).

Sobre a cobertura do tratamento, observa-se que houve uma recuperação dos números, mas sem atingir àqueles anteriores a pandemia. O tratamento preventivo, que visa prevenir a progressão da infecção para a doença ativa, também mostrou melhoria em 2021.

O número de pessoas que desenvolveram TB resistente a medicamentos (TB-DR) aumentou em 2021, após manter estabilidade desde 2015. Por outro lado, o número de pessoas tratadas para TB resistente em 2021 foi maior do que em 2020 (WHO, 2022).

Sabe-se que para o controle da tuberculose é necessário muito investimento em serviços de diagnóstico, tratamento e prevenção da doença, entretanto o baixo financiamento anual ainda é um obstáculo. Os US\$ 5,4 bilhões gastos em 2021 correspondem a apenas 42% da meta global anual de US\$ 13 bilhões (WHO,2022).

No Brasil, seguindo o que foi visto mundialmente, observa-se na Tabela 2 um declínio na notificação de casos de TB (novos ou retratamento). Em maio de 2020 tal parâmetro caiu 34% em relação ao mesmo período de 2019. Já em 2021, a maior queda em relação ao ano anterior foi de 29,3% e ocorreu em dezembro. A diminuição da notificação dos casos refletiu na queda do coeficiente de incidência da doença após 2019. (BRASIL, 2021,2022b).

Tabela 2: Tuberculose no Brasil

	2019	2020	2021
Incidência /100 mil hab.	37,1	32,6	32,0
Notificações de casos de TB (novos e retratamentos)	93.208	83.741	82.680
Casos novos de TB pulmonar (%) *	73,6	73,0	72,3
Abandono (%) **	12,4	12,9	-
Cura (%) **	73,3	68,4	-
Coeficiente de mortalidade por TB/100 mil hab.	2,2	2,1	-

Fonte: Boletim Epidemiológico 2022.

* confirmados por critério laboratorial, ou seja, com pelo menos um resultado positivo nos exames de baciloscopia de escarro, TRM-TB ou cultura.

**entre os casos novos de TB pulmonar confirmados por critério laboratorial.

Em relação aos desfechos da doença, 68,4% dos casos novos de TB pulmonar confirmados por critério laboratorial encerraram o tratamento como cura e 12,9% dos casos como abandono. Ambos os desfechos apresentaram piora em relação a 2019. Ainda assim, 2019 também não atingiu o percentual de cura superior a 85% e o abandono inferior a 5%, estabelecido pela OMS. Quanto ao coeficiente de mortalidade no Brasil, ele permaneceu inalterado nos últimos anos, variando de 2,1 a 2,3. Apesar disso, esse fato gera preocupação já que uma menor detecção de casos novos e a perda de seguimento do tratamento poderá gerar um aumento da mortalidade pela doença nos próximos anos (BRASIL, 2017,2022b).

O cenário descrito até agora pode ser justificado por alguns fatores. Um dos obstáculos é a semelhança entre a tuberculose e a COVID-19. Ambas se manifestam com febre e sintomas respiratórios, dificultando o diagnóstico diferencial, além de poderem ocorrer simultaneamente (SILVA, D. R. et al., 2021).

A fim de conter o Sars-Cov-2, medidas de enfrentamento à pandemia foram adotadas como o distanciamento social, quarentena e o uso de máscaras faciais. Não propositalmente, isso contribuiu para a redução da transmissão da tuberculose, a qual é semelhante a da

COVID-19. Por outro lado, as pessoas passaram mais tempo em casa, o que constitui um fator importante para a propagação da doença, o contato domiciliar. A longo prazo isso poderá levar a um aumento no número de casos pela doença (MIGLIORI et al., 2022; ALENE; WANGDI; CLEMENTS, 2020)

As restrições dificultaram o acesso aos serviços de saúde juntamente com o medo de infecção pelo Sars-cov-2 e o estigma associado a semelhança dos sintomas da TB e COVID-19, tudo isso comprometeu não só o diagnóstico como também a adesão e continuidade do tratamento (WHO, 2022; ALENE; WANGDI; CLEMENTS, 2020). O diagnóstico tardio, tratamento irregular ou abandono favorecem o desenvolvimento de resistência e nos próximos anos pode ocorrer um aumento da carga de tuberculose multirresistente (TBMR) (SILVA, D. R. et al., 2021).

Em 2020, muitos países relataram realocação de recursos humanos e financeiros da TB para a COVID-19 (WHO, 2020). O mau rastreamento da doença e a não notificação de casos também é um possível problema gerado pela COVID-19 (SOUZA, et al., 2022). Além disso, outros determinantes da TB foram afetados com a pandemia, como desnutrição, pobreza e renda per capita o que já pode estar influenciando tanto a incidência quanto a mortalidade por TB, uma vez que esses são reconhecidamente fatores de risco para o desenvolvimento da doença (WHO, 2022).

CONCLUSÕES

A pandemia afetou substancialmente os serviços de diagnóstico, tratamento e prevenção da tuberculose, retrocedendo anos de progresso no enfrentamento da doença. As metas globais para a sua eliminação encontram-se fora do caminho. São inúmeros os fatores que levaram a essa condição, sendo fundamental mais estudos acerca do tema. Há grande necessidade de restaurar o acesso e a prestação de serviços essenciais à TB, intensificando investimentos, principalmente em pesquisa, a fim de encontrar novos produtos e estratégias para o controle da doença.

REFERÊNCIAS

ALENE, K.A.; WANGDI, K.; CLEMENTS, A.C.A. Impact of the COVID-19 Pandemic on Tuberculosis Control: An Overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 123, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim Epidemiológico de Tuberculose**. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim Epidemiológico de Tuberculose**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022b.

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: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Manual de Recomendações para o**

Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil. Brasília : Ministério da Saúde, 2022a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Brasil Livre da Tuberculose : Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose como Problema de Saúde Pública.** Brasília : Ministério da Saúde, 2017.

COSTA, A. G. R. et al. Análise geral do Mycobacterium Tuberculosis e sua repercussão na pandemia da COVID-19: Uma Revisão Bibliográfica. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. e8111426758, 2022.

HINO, P. et al. Impacto da COVID-19 no controle e reorganização da atenção à tuberculose. **Acta Paul Enferm**, [S. l.], v. 34, p. eAPE002115, 2021.

MIGLIORI, G. B. et al. Medidas de confinamento específicas de cada país em resposta à pandemia de COVID-19 e seu impacto no controle da tuberculose: um estudo global. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. e20220087, 2022.

SILVA, D. R. et al. Tuberculose e COVID-19, o novo dueto maldito: quais as diferenças entre Brasil e Europa? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S. l.], vol. 47, n. 2, p. e20210044, 2021.

SILVA, L. L. M. ; GARRIDO, R. G. Interação COVID-19/tuberculose: como a persistência de uma doença milenar impacta na gravidade de uma pandemia emergente. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. e305101119754, 2021.

SOUZA, C. E. A. et al. COVID-19 e a incidência de tuberculose no nordeste: Uma análise transversal. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. e59411932162, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global tuberculosis report 2020.** Geneva: WHO, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global tuberculosis report 2022.** Geneva: WHO, 2022.

GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE ÁGUAS DESTINADAS AO CONSUMO HUMANO

Natália Roberto Faria da Silva¹; Ruth Estela Gravato Rowlands²; Cecília Geraldine Martins²; Christiane Asturiano Ristori Costa²

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

²Pesquisador do Núcleo de Microbiologia – IAL Central

Resumo: A resistência antimicrobiana representa uma ameaça sanitária global crescente e deve ser abordada com urgência e de forma integrada (saúde humana, animal e meio ambiente) em virtude do risco de tratamento ineficaz de infecções causadas por microrganismos, resultando em enfermidades mais prolongadas e com maior mortalidade. Existem dois mecanismos capazes de atribuir resistência, por mutações no cromossomo ou transferência horizontal entre bactérias de genes presentes em plasmídeos, integrons ou transposons. O integron de classe 1 é um dos mecanismos mais comuns que confere resistência aos antibióticos como β -lactâmicos, cloranfenicol, sulfonamidas, aminoglicosídeos, entre outros. Atualmente, as cepas de *Escherichia coli* são consideradas importantes reservatórios de genes de resistência. O objetivo do presente estudo foi pesquisar genes de resistência aos antimicrobianos (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-23}, *erm*(B), *sull*, *tetA* e *tetB*) e o integron de classe 1 (*intl1*), pela técnica de reação em cadeia da polimerase, em cepas de *E. coli* isoladas de amostras de água para consumo humano, no estado de São Paulo. Do total de cepas analisadas (n=50), 10% apresentou ao menos um dos seis genes de resistência, sendo *tetA* (6%) o de maior ocorrência seguido do *tetB* (4%) e *sull* (2%). Uma cepa (2%) isolada de água de poço apresentou positividade, simultaneamente, para os genes *tetB* e *sull*. Os genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-23} e *erm*(B) não foram detectados. O gene do elemento genético móvel *intl1* foi encontrado em um isolado (2%). Os resultados encontrados demonstram que *E. coli* isoladas de água de fontes alternativas podem disseminar genes de resistência e elementos genéticos associados à expressão de resistência aos antimicrobianos.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, Resistência a antibióticos, Integrons, Água para consumo humano.

INTRODUÇÃO

O acesso à água limpa e segura é considerado um recurso essencial para a vida, entretanto, no Brasil, 15,9% da população não tem acesso à água tratada (SNIS, 2020). Em regiões sem acesso ao sistema de abastecimento público é comum o uso de poços, minas e nascentes, porém tais fontes podem representar risco à população, uma vez que pode haver a contaminação pelo escoamento de águas de terras agrícolas e depósito de efluentes sem tratamento (CABRAL, 2010; FAYER; MORGAN; UPTON, 2000).

No Brasil, a avaliação da qualidade microbiológica da água é realizada por meio da pesquisa de *Escherichia coli* (BRASIL, 2021). A bactéria é amplamente utilizada como indicador de contaminação fecal em amostras de água e sua presença pode estar associada à presença de microrganismos patogênicos (NAVAB-DANESHMAND *et. al.*, 2018).

A resistência antimicrobiana (RAM) representa uma das maiores ameaças à saúde global e deve ser abordada de forma integrada (saúde humana, animal e meio ambiente) como conceito de Saúde Única ou One Health (WHO, 2021). Estima-se que 1,27 milhão de mortes ocorreram em decorrência da RAM e as bactérias responsáveis pela maioria das infecções foram: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (MURRAY *et al.*, 2022).

E. coli têm sido descritas como reservatórios de genes de resistência e, em ambientes aquáticos, desempenham papel importante na disseminação de resistência entre bactérias patogênicas e comensais, o que gera preocupação para a saúde pública. Considerando a escassez de dados sobre o tema em cepas isoladas de água de consumo e a importância epidemiológica de cepas resistentes aos antimicrobianos, o presente estudo teve como objetivo pesquisar genes de resistência aos antimicrobianos e o integron de classe 1 em cepas de *E. coli* isoladas de amostras de água para o consumo humano.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas

Foram analisadas 50 cepas de *E. coli* provenientes de 50 amostras de água para o consumo humano, sendo 32 de água de poço, 13 de mina, 3 de nascente e 2 de abastecimento público. As amostras foram coletadas no Estado de São Paulo, no período de 2010 a 2011 e analisadas para avaliação da potabilidade no Núcleo de Microbiologia, do Instituto Adolfo Lutz.

O isolamento de *E. coli* foi realizado a partir dos métodos de presença-ausência ou substrato enzimático cromogênico e fluorogênico e a identificação bioquímica da espécie realizada por meio do IMViC (APHA, 2005). Os 50 isolados de *E. coli* foram testados pela técnica de reação em cadeia de polimerase para detecção de cepas diarreio gênicas e apenas uma, proveniente de água de poço, foi identificada como *E. coli* enteropatogênica (EPEC) típica (DE MELLO, 2014). As cepas foram armazenadas em *Brain Heart Infusion* (BHI) com glicerol, a -20°C.

Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A extração de DNA foi efetuada utilizando kit de extração QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen™, USA), seguindo as instruções do fabricante. Os extraídos de DNA foram armazenados a -20°C até o momento de uso. A pesquisa dos genes de resistência *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-23}, *erm*(B), *tetA*, *tetB* e do integron da classe 1 *int1* foi realizada pela PCR. Os genes *tetA* e *tetB*, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-23}, *erm*(B) e *int1* foram pesquisados segundo metodologias descritas na literatura (Randall *et al.*, 2004; Liaqat *et al.*, 2022; Pajand *et al.*, 2013; Knapp *et al.*, 2010; Barraud *et al.*, 2010), com modificações. Como controle positivo foram utilizadas cepas positivas para os genes estudados e como controle negativo água ultrapura livre de DNases e RNases. Os produtos amplificados foram revelados em gel de agarose (Ultrapure™, Invitrogen™, EUA) a 1,5% em tampão TBE 1x, contendo 0,5 µL de brometo de etídio. A eletroforese foi realizada a 100V/ 60 minutos em cuba horizontal contendo TBE 1x e o gel foi visualizado em transiluminador de luz UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 50 cepas analisadas de *E. coli* isoladas de água para consumo humano, cinco (10%) apresentaram pelo menos um dos genes de resistência estudados. Dentre estas,

a maior ocorrência foi observada em cepas isoladas de amostras de água de nascente (66,7%), seguido de poço (12,5%) e mina (7,69%). Nas amostras de água de abastecimento público nenhum gene foi detectado (Tabela 1). A cepa de *E. coli* diarreiogênica, EPEC, avaliada não apresentou nenhum dos genes de resistência e nem do integron, provavelmente porque a resistência antimicrobiana está significativamente associada à ausência de genes de virulência (SUKUMARAN; MOHAMED HATHA, 2015).

Uma cepa (2%) isolada de água de poço apresentou positividade, simultaneamente, para os genes *tetB* e *sul1*. A presença de *E. coli* multirresistente em ambiente aquático pode favorecer a disseminação de genes de resistência para diferentes ambientes e microrganismos e dificultar o tratamento de infecções no homem e nos animais (TALUKDAR *et al.*, 2013).

Tabela 1. Distribuição dos genes de resistência e do integron de classe 1 nas cepas de *E. coli* provenientes de água para o consumo humano.

Genes	Origem				Total (n=50)
	Abastecimento público (n=2)	Mina (n=13)	Nascente (n=3)	Poço (n=32)	
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	0	0	0	0	0
<i>bla_{OXA-23}</i>	0	0	0	0	0
<i>erm(B)</i>	0	0	0	0	0
<i>sul1</i>	0	0	0	1	1
<i>tetA</i>	0	1	1	1	3
<i>tetB</i>	0	0	0	2	2
<i>intl1</i>	0	0	1	0	1

Os genes de resistência à tetraciclina, *tetA* e *tetB* foram os de maior ocorrência com 6% e 4% , respectivamente. A resistência à tetraciclina é amplamente observada em ambientes naturais e também em água potável (ARAÚJO *et al.*, 2017; CHATURVEDI *et al.*, 2021; FALGENHAUER *et al.*, 2021). Na medicina veterinária, as tetraciclinas são amplamente utilizadas e o contato próximo de ambiente aquáticos com o solo contaminado com estrume dos animais pode favorecer alta pressão seletiva exercida sobre o desenvolvimento de resistência e a disseminação mediada por elementos móveis na água (AGERSØ; SANDVANG, 2005; WOAHA, 2020).

Com relação ao gene *sul1*, a ocorrência observada foi de 2%, a menor entre os genes detectados no presente estudo. Resultado semelhante foi encontrado em amostras de água coletadas de torneiras de residências na Escócia, em que 5,4% das cepas continham o gene (KHAN; KNAPP; BEATTIE, 2016). Por outro lado, uma alta ocorrência (95,8%) foi relatada por Amarasiri *et al.* (2022), em amostras de água de poços e nascentes do Nepal, possivelmente pelos locais de coleta serem próximos de efluentes de farmácias e açougues.

Quanto à pesquisa do gene *intl1*, que codifica o integron de classe 1, 2% das cepas analisadas carregavam o gene. Ozgumus *et al.* (2007) obteve percentual similar, detectando *intl1* em 2,5% dos isolados de *E. coli*. Resultados diferentes foram relatados por Ramalho *et al.* (2022), que não detectaram o gene em amostras de água potável pós tratamento no sul do Brasil e Amarasiri *et al.* (2022) que observaram uma ocorrência significativa de 87,5% nas amostras de água de poços e nascentes no Nepal.

Vale ressaltar, que a cepa que carregava o gene *int11* também apresentava o gene *tetA*, entretanto, dentro dos limites do estudo, não foi possível afirmar que o isolado tenha adquirido o gene de resistência à tetraciclina por meio do integron. Mas, diversos estudos tem demonstrado que *int11* pode desempenhar papel fundamental na disseminação de genes de resistência em água potável (KOCZURA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2001).

Na presente pesquisa não foi observada a presença simultânea do gene *sul1* com o *int11*, sugerindo que o integron de classe 1 encontrado em uma das amostras se trata, possivelmente, de um não clássico, forma em que a presença do gene de resistência à sulfonamida não é obrigatória (SU *et al.*, 2012).

Nenhuma cepa de *E. coli* analisada apresentou os genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{OXA-23} que codificam a resistência à β -lactâmicos. Talukdar *et al.* (2013) obtiveram resultado distinto ao analisar isolados de *E. coli* de amostras de água de torneiras de uma comunidade em Bangladesh, sendo que dos 22 isolados positivos para ESBL, 20 apresentaram o gene *bla*_{CTX-M-15}. Estudos vêm indicando o aumento de β -lactamases do tipo CTX-M em *Enterobacteriaceae* e, em algumas regiões, já é predominante (EJAZ *et al.*, 2021; FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009; PAVEZ *et al.*, 2019) portanto, a pesquisa desses genes se faz necessária.

Não foram encontrados estudos sobre a pesquisa do gene *bla*_{OXA-23} em água para consumo humano, apenas em amostras de água de rios e águas residuais, nos quais não foi detectado (AZAM *et al.*, 2018; SHAMSIZADEH *et al.*, 2021), demonstrando a baixa ocorrência em ambiente aquático.

O gene *erm*(B) também não foi detectado entre as cepas estudadas, o que corrobora com os resultados de outros estudos com cepas isoladas de água para o consumo humano (BERGERON *et al.*, 2015; RAMALHO *et al.*, 2022).

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados demonstram que *E. coli* isoladas de água de fontes alternativas podem disseminar genes de resistência e elementos genéticos associados à expressão de resistência aos antimicrobianos. Portanto, o monitoramento do perfil de resistência em microrganismos oriundos de ambientes aquáticos é fundamental para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência e na sua disseminação, além de poder contribuir para a implementação de estratégias de prevenção e controle com foco no conceito de Saúde Única (saúde humana, animal e meio ambiente).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos pesquisadores Dr. Carlos Henrique Camargo e Dr. Luis Fernando dos Santos, do Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por patógenos Especiais, do Centro de Bacteriologia e Dra. Tânia Sueli de Andrade, do Núcleo de Coleção de Microrganismos, do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio na obtenção das cepas utilizadas como controle positivo para os genes estudados.

REFERÊNCIAS

AGERSØ, Y.; SANDVANG, D. Class 1 Integrons and Tetracycline Resistance Genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. Isolated from Pigsties and Manured Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 7941-7947, 2005.

AMARASIRI, M. *et al.* Prevalence of antibiotic resistance genes in drinking and environmental water sources of the Kathmandu Valley, Nepal. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 2.ed. New York: American Public Health Association, 2005.

ARAÚJO, S. *et al.* Characterization of antibiotic resistant and pathogenic *Escherichia coli* in irrigation water and vegetables in household farms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 192-200, 2017.

AZAM, M. *et al.* Study of pandrug and heavy metal resistance among *E. coli* from anthropogenically influenced Delhi stretch of river Yamuna. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 471-480, 2018.

BARRAUD, O. *et al.* Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1642-1645, 2010.

BERGERON, S. *et al.* Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 102, p. 370-374, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Portaria nº 888, de 04 de maio de 2021. **Portaria GM/MS Nº 888**. Brasília, 2021.

CABRAL, J.P.S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 10, p. 3657-3703, 2010.

CHATURVEDI, P. *et al.* Occurrence of emerging sulfonamide resistance (*sul1* and *sul2*) associated with mobile integrons-integrase (*intI1* and *intI2*) in riverine systems. **Science of the Total Environment**, v. 751, e 142217 2021.

DE MELLO, L.S.R. **Qualidade bacteriológica e ocorrência de *Escherichia coli* patogênicas em amostras de água para o consumo humano**. Trabalho de Conclusão de Curso (Programa de Aprimoramento Profissional) - IAL, São Paulo, 2014.

EJAZ, H. *et al.* Molecular analysis of *bla*SHV, *bla*TEM, and *bla*CTX-M in extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* recovered from fecal specimens of animals. **PLoS One**, v. 16, n. 1, e0245126, 2021.

FALAGAS, M.E.; KARAGEORGOPOULOS, D.E. Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 4, p. 345-354, 2009.

FALGENHAUER, L. *et al.* Clonal CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* ST-949 Are Present in German Surface Water. **Frontiers In Microbiology**, v. 12, e 617349, 2021.

FAYER, R.; MORGAN, U.; UPTON, S.J. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1305-1322, 2000.

KHAN, S.; KNAPP, C.W.; BEATTIE, T.K. Antibiotic Resistant Bacteria Found in Municipal Drinking Water. **Environmental Processes**, v. 3, n. 3, p. 541-552, 2016.

KNAPP, C.W. *et al.* Differential fate of erythromycin and beta-lactam resistance genes from swine lagoon waste under different aquatic conditions. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1506-1512, 2010.

KOCZURA, R. *et al.* Abundance of Class 1 Integron-Integrase and Sulfonamide Resistance Genes in River Water and Sediment Is Affected by Anthropogenic Pressure and Environmental Factors. **Microbial Ecology**, v. 72, n. 4, p. 909-916, 2016.

LIAQAT, Z. *et al.* Isolation and molecular characterization of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* from chicken meat in Pakistan. **Plos One**, v. 17, n. 6, e0269194, 2022.

MURRAY, C.J.L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629-655, 2022.

NAVAB-DANESHMAND, T. *et al.* *Escherichia coli* Contamination across Multiple Environmental Compartments (Soil, Hands, Drinking Water, and Handwashing Water) in Urban Harare: correlations and risk factors. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 803-813, 2018.

OZGUMUS, O.B. *et al.* Molecular Characterization of Antibiotic Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Tap and Spring Waters in a Coastal Region in Turkey. **Journal of Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 379-387, 2007.

PAJAND, O. *et al.* Study of the carbapenem resistance mechanisms in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: comparison of burn and non-burn strains. **Burns**, v. 39, n. 7, p. 1414-1419, 2013.

PAVEZ, M. *et al.* High prevalence of CTX-M-1 group in ESBL-producing enterobacteriaceae infection in intensive care units in southern Chile. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 102-110, 2019.

RAMALHO, R. *et al.* The occurrence of antimicrobial residues and antimicrobial resistance genes in urban drinking water and sewage in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1483-1489, 2022.

RANDALL, L.P. *et al.* Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 208-216, 2004.

SHAMSIZADEH, Z. *et al.* Tracking antibiotic resistance genes and class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from wastewater and agricultural fields. **Water Science and Technology**, v. 84, n. 5, p. 1182-1189, 2021.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO (SNIS). **Abastecimento de Água**: 2020. 2020. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/painel-informacoes-saneamento-brasil/web/painel-abastecimento-agua>. Acesso em: 11 out. 2022.

SU, H. *et al.* Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China. **Environmental Pollution**, v. 169, p. 42-49, 2012.

SUKUMARAN, D.; MOHAMED HATHA, A.A. Antibiotic resistance and virulence genes of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from tropical estuary. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9; n. 5, p. 496-504, 2015.

TALUKDAR, P.K. *et al.* Antimicrobial Resistance, Virulence Factors and Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolates from Household Water Supply in Dhaka, Bangladesh. **Plos One**, v. 8, n. 4, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS)**: report 2021. Geneva, 2021.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). 2020. **OIE annual report on antimicrobial agents intended for use in animals - fourth report**. Paris, 2020.

ZHANG, K. *et al.* Antibiotic Resistance Genes in drinking water of China: occurrence, distribution and influencing factors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 188, e109837, 2020.

ZHAO, S. *et al.* Identification and Characterization of Integron-Mediated Antibiotic Resistance among Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1558-1564, 2001.

POLIOMIELITE NO BRASIL: POSSÍVEL REINTRODUÇÃO?

Bianca Pereira dos Santos

Estudante do curso de especialização de vigilância epidemiológica em saúde pública pelo IAL
IAL de Sorocaba; E-mail: biancapereirasantos95@gmail.com
Fabio Hiroto Shimabukuro, pesquisador do Depto de virologia – IAL de Sorocaba.

RESUMO

A poliomielite é uma doença antiga altamente infecciosa que afeta principalmente crianças menores de cinco anos. É de transmissão fecal oral, cuja infecção pode gerar desde casos assintomáticos a PFA com sequelas e risco de morte. Não possui tratamento específico e o principal meio de prevenção é a vacinação. O presente trabalho possui como objetivo verificar as possibilidades de reintrodução da poliomielite no Brasil realizando uma revisão bibliográfica não sistemática por meio de pesquisa com palavras-chave e termos descritores: Paralisia-infantil, Poliomielite, Vacina Oral poliomielite, Vacina Salk, Cobertura de vacinação, em diversas bases de dados, além de notificações e informes oficiais como do Ministério da Saúde, sites oficiais e a base DATASUS. A baixa taxa de vacinação é o principal risco para reintrodução em áreas que apresentem erradicação da pólio, e outros fatores que podem agravá-lo são os intensos fluxos de viagens internacionais e falta de um sistema de investigação epidemiológica ativo. No Brasil, as taxas de vacinação em todas as regiões apresentam tendência de queda e mantem-se abaixo de 95% desde 2016 e tiveram um agravamento durante o período de pandemia pelo *SarsCoV-2*. A baixa cobertura vacinal para a poliomielite levou a classificação do Brasil com muito alto risco de reintrodução da poliomielite.

Palavras Chave: cobertura de vacinação; poliomielite

INTRODUÇÃO

A poliomielite também conhecida como “paralisia infantil” trata-se de uma doença aguda causada pela infecção por poliovírus, podendo apresentar desde casos clínicos inaparentes a clássica paralisia flácida aguda de forma assimétrica, em pessoas de qualquer faixa etária, mas principalmente em crianças abaixo dos cinco anos (MIN DA SAÚDE, 2021). Os poliovírus pertencem ao gênero dos enterovírus, são pequenos com cerca de 30 nanômetros de diâmetro e RNA fita simples sentido positivo, não são envelopados e possuem capsídeo em formato icosaédrico. Apresentam sorotipos 1, 2 e 3 (CVE, 2022;

MEHNDIRATTA, 2014). Presentes no ambiente ou em seres humanos podem ser divididos em diferentes categorias: Selvagem, Vírus da Vacina e Vírus derivados vacinais. (CVE, 2022; OMS, OPAS, 2022 a).

Poliovírus selvagens não apresentam correlação com a cepa utilizada na vacina oral contra a poliomielite e são os vírus em sua forma natural, Vírus de vacina são poliovírus atenuados utilizados na vacina oral contra a poliomielite e poliovírus derivados da vacina podem ser categorizados em circulantes cVDPV), associado a imunodeficiência e ambíguos (CVE, 2022; OMS, OPAS, 2022 a).

Na utilização da vacina oral contra a poliomielite o vírus enfraquecido passa a replicar-se no intestino por um período de tempo, durante este período o vírus enfraquecido também é eliminado nas fezes, porém, quando o vírus circula no ambiente por um período longo de tempo pode sofrer mutações que lhe conferem novamente capacidade patogênica, e esses são os cVDPV, ocorrendo por exemplo em regiões que apresentem baixa cobertura vacinal (DIVE, 2022).

A via fecal-oral é a principal forma de transmissão, o período de incubação é de 7 a 10 dias, porém pode variar de 4 a 35 dias (DOURADO, 2022; MEHNDIRATTA, 2014). As formas da doença são: Assintomática, Abortiva, Meningite asséptica e Formas paralíticas, nas formas mais graves ocorre paralisia dos músculos que auxiliam a respiração e deglutição, havendo risco de morte. Não há tratamento específico, pode haver tratamento sintomático e que busque a melhora de sequelas (MIN DA SAÚDE, 2021).

O objetivo deste trabalho é descrever sobre a Poliomielite e revisar na literatura disponível as possibilidades de sua reintrodução no Brasil por meio da descrição das ações de vigilância das paralisias flácidas e avaliação da cobertura vacinal contra a poliomielite no Brasil no período de 2012 a 2022, além de verificar o cenário epidemiológico atual da poliomielite mundialmente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um trabalho de revisão de literatura, não sistemático, utilizando informações em bases de dados como: Biblioteca virtual em saúde (BVS), Scielo e Pubmed, além de notificações e informes oficiais como do Ministério da Saúde, Sociedade Brasileira de imunizações (Sbim) e da Organização Panamericana da saúde (OPAS), sites oficiais como o do Instituto Butantan e a base DATASUS. Na base DATASUS, do Ministério da Saúde, foram obtidos dados de 2012 a 2022, sendo os dados de 2022 parciais. Para as demais fontes não foi especificado um período de tempo desde que possuíssem informações relevantes ao tema. Foram utilizados termos descritores: Paralisia infantil, Poliomielite, Vacina Oral poliomielite, Vacina Salk, Cobertura de vacinação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente Afeganistão e Paquistão são países em que ainda ocorre a transmissão endêmica do poliovírus selvagem tipo 1. Em outros países, o que pode ocorrer são surtos de casos epidêmicos, em que viajantes reintroduzem o vírus de origem de países endêmicos ou casos de origem vacinal (CVE, 2022).

Em novembro de 2021 um caso de paralisia flácida aguda em uma criança menor de 5 anos causada por poliovírus selvagem tipo 1 ocorreu em Malawi, a África não teve seu título de região livre de poliovírus selvagem retirado, isso ocorreu devido a análise

laboratorial indicar que tratava-se de um poliovírus selvagem de origem no Paquistão em 2019 (OMS, OPAS, 2022 b).

Em Julho de 2022 no condado de Rockland, Nova Iorque, foi confirmado um caso de poliomielite paralisante com sequelas causada por poliovírus derivado vacinal tipo 2 em um adulto não vacinado (CDC, 2022). Na América, em resposta a estes ocorridos, a OPAS sugere que os países mantenham uma boa taxa de vacinação, vigilância e um plano de resposta a surtos de poliomielite atualizado (OMS, OPAS, 2022 c, 2022 d).

Pólio no Brasil

Já ocorriam casos esporádicos, mas o primeiro surto de poliomielite no Brasil ocorreu em 1911. Em 1955, a vacina criada por SALK começou a ser utilizada em pequenas proporções, em 1960 ocorreu a V Conferência Internacional da Poliomielite, e um dos assuntos tratados era a eficácia da vacina oral, que foi adotada no Brasil em 1961, em experiências de vacinação em massa (CAMPOS, 2003). Até 1974 não havia vigilância e investigação, os estados apenas notificavam os casos, então, foi implementado o sistema nacional de vigilância epidemiológica. No Brasil, o último caso de pólio por vírus selvagem ocorreu em 1989.

No Pará uma criança de três anos apresentou PFA dois dias após receber uma dose de vacina atenuada, o que torna supostamente atribuível a vacina. Ela teve uma boa evolução e recuperação. Segundo o Ministério da Saúde, desde 1989 até 2012, com as aplicações da vacina oral ocorreram 50 casos de pólio vacinal no Brasil, e a partir de 2012 com a introdução da vacina inativada não ocorreu mais nenhum caso, o caso de PFA no Pará não altera o cenário epidemiológico no país de certificação de eliminação da pólio (MIN DA SAÚDE, 2022 a).

O monitoramento da poliomielite é realizado através de um sistema de vigilância das paralisias flácidas agudas de acordo com critérios estabelecidos pela OMS (CVE, 2022). Todo caso de PFA em menores de 15 anos e suspeita de poliomielite em qualquer idade é de notificação compulsória imediata em todo o país, a notificação deve ser realizada no SINAN com o preenchimento e envio de uma ficha específica (CVE, 2022).

Deve ocorrer investigação imediata de todos os casos de PFA, idealmente em até 48 horas após conhecimento e notificação de casos suspeitos. Outras medidas são notificação semanal negativa e busca ativa de casos para identificação de casos de subnotificação (CVE, 2022).

Faz parte do programa nacional de imunizações as vacinas do tipo inativada via intramuscular e atenuada via oral, com um público alvo de crianças menores dos 5 anos de idade e o objetivo é alcançar uma cobertura vacinal de 95% (MIN DA SAÚDE, 2022 b). (MIN DA SAÚDE, 2022 b).

Quadro 2. Coberturas vacinais poliomielite por região no Brasil, 2012-2022

Região	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Total	96,55	100,71	96,76	98,29	84,43	84,74	89,54	84,19	76,17	70,00	41,45
Norte	96,00	96,47	90,05	88,16	72,28	75,67	77,06	79,59	65,16	61,30	38,22
Nordeste	95,63	100,44	96,50	100,44	81,55	81,92	90,04	82,73	71,97	66,72	41,69

Sudest e	97,40	100,18	97,15	100,52	86,31	87,56	92,66	84,54	77,83	70,76	40,24
Sul	94,82	101,47	97,18	95,57	87,50	89,82	89,91	89,04	86,22	79,52	44,42
Centro Oeste	99,44	109,00	104,05	97,88	96,15	84,44	88,59	85,40	80,12	73,59	45,58

Fonte: Tabnet DATASUS, 2022

Quadro 1. Coberturas vacinais de pólio no Brasil 2012-2022

ANO	Vacinação poliomielite
2012	96.55%
2013	100.71%
2014	96.76%
2015	98.29%
2016	84.43%
2017	84.74%
2018	89.54%
2019	84.19%
2020	76.15%
2021	70%
2022	41.32%

Fonte: Tabnet DATASUS, 2022

A taxa de cobertura vacinal nacional atingiu um valor abaixo dos 95% recomendado em 2016 e desde então é observada a tendência de queda chegando aos 70% em 2021. Há também disparidades de acordo com as regiões do país, em 2014, a região Norte foi a primeira a atingir uma cobertura abaixo dos 95% e, em 2021, a cobertura vacinal na região Norte foi a menor do país (BEZERRA, 2022). OPAS alerta que a cobertura vacinal contra a poliomielite caiu para abaixo dos 80% em grande parte dos países da América, sendo quatro países com muito alto risco de reintrodução: Peru, Haiti, República Dominicana e o Brasil.

A pandemia causada pelo *SARS-CoV-2* teve importante impacto em doenças que podem ser prevenidas por meio da vacinação, várias doenças e tratamentos foram negligenciados. (DENNIS, 2022). Com o “desaparecimento” das doenças, por meio de controle por imunização, a importância da vacinação pode passar a não ser mais percebida (CONASS, 2017). Segundo Dennis Minoru, 2022, a pandemia não foi a causa da queda da cobertura vacinal que teve início nos últimos 6 anos, porém como pode ser observado no estudo de PROCIANOY, 2022 sobre o impacto da pandemia na imunização de crianças menores de um ano de idade diversas vacinas obtiveram os menores valores históricos de cobertura vacinal nessa população, é possível retirar destes dados a conclusão de que a pandemia não causou, porém agravou tal queda.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Enquanto houver transmissão de poliovírus, todos os países ainda apresentam risco de casos importados. Principalmente em regiões de baixa cobertura vacinal, um fluxo intenso de pessoas com viagens internacionais e relações econômicas pode favorecer tais importações.

A vacinação é o meio mais importante de prevenção a poliomielite, e a OMS recomenda uma cobertura vacinal acima de 95% para evitar o risco de reintrodução. A baixa cobertura vacinal é o maior fator de risco para propagação de poliovírus selvagens e abre brechas para que o vírus enfraquecido vacinal fique circulando no ambiente por longos períodos e recupere sua virulência. De acordo com os dados obtidos no DATASUS no Brasil, a cobertura vacinal nacional vem apresentando tendência de queda e está abaixo do recomendado desde 2016 em todas as regiões do país. A pandemia pode ter tido importante impacto para o agravamento de tal queda.

REFERÊNCIAS

CAMPOS, André Luiz Vieira de; NASCIMENTO, Dilene Raimundo do; MARANHÃO, Eduardo. A história da poliomielite no Brasil e seu controle por imunização. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*. 2003, v.10. pp 573-600.

DENNIS MINORU, Fujita; et al. *The continuous decrease in Poliomyelitis vaccine coverage in Brazil*. *Travel Med Infect Dis*. 2022 JulAug;48:102352. Epub 2022 May 5

MEHNDIRATTA, Man Mohan; et al. POLIOMYELITIS *Historical facts, epidemiology, and current challenges in eradication*. *Neurohospitalist*. 4 Out 2014; v. 4; p. 223-229.

PROCIANOY, Guilherme Silveira; et al. Impacto da pandemia do COVID-19 na vacinação de crianças de até um ano de idade: um estudo ecológico. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2022, v. 27, n.3 Disponível em: <https://doi.org/10.1590/141381232022273.20082021>. Acesso em: 25 nov 2022.

b) Livro e/ou folheto

CVE- Centro de vigilância epidemiológica professor Alexandre Vranjac. Documento técnico da vigilância epidemiológica das paralisias flácidas agudas/poliomielite. 29 mar 2022. SP

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. – 5. Ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Procedimentos operacionais padrão: Resposta a um evento ou surto de poliovírus. Mar de 2022(a), DF: OPAS.

CONASS- Conselho nacional de secretários de saúde. A queda da imunização no Brasil. CONSESUS. Nov 2017. Disponível em: <<https://www.conass.org.br/consensus/queda-da-imunizacao-brasil/>>. Acesso em: 24 Nov 2022.

DOURADO, Péricles; et al. Pólio: baixa cobertura vacinal e o risco iminente de novas infecções. SES. Subsecretária de saúde. 18 de julho de 2022.

OMS-World Health Organization; OPAS. *Disease Outbreak News; Wild poliovirus type 1 (WPV1) –Malawi*. 3 Mar 2022 (d). Disponível em: <[https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/wild-poliovirustype-1\(WPV1\)-malaw](https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/wild-poliovirustype-1(WPV1)-malaw)>. Acesso em: 24 Out 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. O Maláui reforça a sua resposta depois da detecção de poliovírus selvagem. 3 Mar 2022 (b). Disponível em: <<https://www.afro.who.int/pt/countries/malawi/news/o-malau-reforca-suaresposta-depoisda-deteccao-de-poliovirus-selvagem>>. Acesso em: 15 Nov 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Atualização epidemiológica detecção de um poliovírus tipo 2 derivado de vacina circulante (VDPV2) nos Estados Unidos: Considerações para a região das américas. 13 de setembro de 2022 (c).

a) Documentos eletrônicos:

BEZERRA, Antônio L M. Assembleia Legislativa do Estado do Piauí. Cobertura vacinal da pólio despenca em 5 anos no Brasil; novos casos em Israel e no Maláui acendem alerta. 10 Mar 2022. Disponível em: <<https://www.al.pi.leg.br/tv/noticias-tv-1/cobertura-vacinal-da-polio-despenca-em5-anosno-brasil-novos-casos-em-israel-e-no-malau-acendem-alerta>>. Acesso em: 24 Nov 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION(CDC). Public health response to a case of paralytic poliomyelitis in na unvaccinated person and detection of poliovirus in wastewater. Weekly. 71(33); p. 1065-1068.

DIVE-DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA; SUPERINTENDÊNCIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; .Detecção de poliovírus circulante derivado da vacina (cvdpv) nas américas e risco de reintrodução da poliomielite no território catarinense. Alerta n 16/2022. 23 set 2022.

SBim-SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNIZAÇÕES. MS publica Nota Técnica sobre vacinação contra a pólio de viajantes internacionais. 2021. Disponível em: < <https://sbim.org.br/noticias/1623-ms-publica-nota-tecnica-sobrevacinacao-contr-a-poliode-viajantes-internacionais> >. Acesso em: 24 de nov de 2022.

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA GENOTÍPICA DE PACIENTES VIVENDO COM HIV-1 COM VIREMIA BAIXA PERSISTENTE

Tainá Xavier de Jesus¹; Luís Fernando de Macedo Brígido²

¹Estudante do Curso de Especialização - NDSS – IAL; E-mail: tainaxavierjesus@gmail.com

²Docente/pesquisador do Depto. de Doenças Sanguíneas e Sexuais. – Centro de Virologia – IAL

RESUMO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) continua pandêmica, e no final da década de 80 foi iniciado o uso da terapia antirretroviral (TARV) com o objetivo de elevar a expectativa de vida de pessoas vivendo com HIV (PVHIV). A falha virológica (FV) é a falta de supressão da carga viral (CV-HIV), sendo a principal consequência da má adesão, caracterizada pela CV-HIV >1000 cópias em PVHIV em uso da TARV. Diferentes definições de viremia baixa persistente (VBP) são observadas na literatura, e sua origem permanece incerta. O objetivo desse estudo foi descrever o perfil de resistência genotípica de pacientes com FV, em especial com VBP a partir de sequências virais de PVHIV encaminhados para genotipagem no Instituto Adolfo Lutz durante Janeiro de 2016 à Dezembro de 2018. A metodologia aplicada foi com base na extração de RNA do plasma de PVHIV, com avaliação do grau de susceptibilidade genética (GSS) à antirretrovirais no *Stanford University HIV Drug Resistance Database*. Foi observado que 271/341 sequências foram classificadas como VBP e 40/341 classificadas como FV. O grupo VBP apresentou maior exposição aos inibidores de protease e maior resistência genotípica a atazanavir e efavirenz. Concluímos que entender a VBP como uma forma de pré falha é de extrema importância. Esse trabalho enfatiza a necessidade da atenção à pacientes com quadro de VBP, reforçando a necessidade da periodicidade da realização dos testes dosagem da CV-HIV para o acompanhamento da evolução da infecção, e testes de genotipagem para avaliação da efetividade do esquema terapêutico.

Palavras-chave: falha virológica; HIV; mutações de resistência; viremia baixa persistente

INTRODUÇÃO

Pertencente à família *retroviridae* e gênero *lentivirus* o HIV possui cópias de RNA cadeia simples e enzimas como transcriptase reversa (TR), integrase (INT) e protease (PR) (BRASIL, 2018). O ciclo de replicação começa na adsorção do HIV à célula hospedeira devido a interação entre proteínas presentes no envelope viral (gp 120) e receptores (CD4) ou correceptores (CCR5 ou CXCR4) da célula hospedeira. No final da década de 80 foi

iniciado o uso da terapia antirretroviral (TARV) com o objetivo de aumentar a expectativa e melhorar a qualidade de vida de pessoas vivendo com HIV (PVHIV) (BRASIL, 2018). No Brasil, a TARV é distribuída de forma gratuita, foi adotada como estratégia para prevenção de novas infecções e o início imediato é recomendado para todas PVHIV (MATSUDA et al., 2018). Os medicamentos são divididos em classes como inibidores da TR nucleosídeos (ITRN) e não nucleosídeos (ITRNN), inibidores da PR (IPs), inibidores da INT (INI), inibidores de fusão (IF) e entrada (IE). De acordo com o Ministério da Saúde, a falha virológica (FV) é caracterizada pela falta de supressão da carga viral (CV-HIV) em pacientes que mantiveram a mesma indetectável durante o uso da TARV ou reaparecimento após 6 meses de tratamento (BRASIL, 2018). A FV é uma consequência da baixa adesão ao esquema de TARV (MCCLUSKEY et al., 2019) e pode levar a progressão para síndrome da imunodeficiência humana (AIDS). A viremia baixa persistente (VBP) pode ser uma forma da FV e estudos associam a sua origem a liberação de cópias de DNA proviral de reservatórios virais (HANNERS et al., 2022). Mutações que conferem resistência podem persistir ao longo do tempo e dar origem a cepas resistentes (YEO et al., 2020), podendo ser classificadas como mutações principais e acessórias, e são responsáveis pelo desenvolvimento de resistência (BANDERA et al., 2019). O objetivo desse estudo é descrever o perfil de resistência genotípica de pacientes com FV, em especial com VBP a partir de sequências virais de PVHIV encaminhados para genotipagem durante Janeiro de 2016 à Dezembro de 2018.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídas nesse estudo amostras de PVHIV expostas à TARV que foram encaminhadas para genotipagem do HIV-1 no laboratório de Carga Viral e Genotipagem do HIV-1 do Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais do Instituto Adolfo Lutz. Amostras sem informação, com tempo menor que 6 meses de exposição à TARV foram excluídas do estudo. Dados demográficos foram obtidos no Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (SISCEL) e pelo sistema *Research Electronic Data Capture* (REDCap). A extração e quantificação da viremia plasmática foram realizadas seguindo protocolo do fabricante em equipamento automático (Abbott, M2000, Abbott; *QIAmp Viral RNA Mini*, Qiagen), a amplificação da região da polimerase foi realizada via *NestedPCR in house*. O sequenciamento foi realizado seguindo a técnica de Sanger em equipamento automático (ABI Prism), e cromatogramas foram editados pelo software Sequencher 4.7 (Gene Codes) e/ou RECall Beta v3.05 e alinhados no software BioEdit. A avaliação do grau de suscetibilidade aos antirretrovirais foi feita via algoritmo da universidade de Stanford e a determinação de subtipos foi realizada via softwares *REGA HIV-1 Subtyping Tool* v3.0 (Universidade de Stanford), *COntext-based Modeling For Expeditious Typing* (COMET, Instituto de Saúde de Luxemburgo), subtipos recombinantes foram confirmados pelo *Jumping Profile Hidden Markov Model* (jpHMM, Universidade de Gottingen).

RESULTADOS

Foram analisadas 341 sequências sendo 271 classificadas como grupo VBP e 70 como grupo FV. A figura 1 indica a taxa de exposição aos ARVs, onde 192 (71%) do grupo VBP e 40 (57%) do grupo FV foram expostos a inibidores de protease (IPs). Em relação a inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos (ITRNNs), 86 (31%) do grupo VBP e

30 (43%) do grupo FV foram expostos, e 341 (100%) das sequências foram expostas à inibidores de transcriptase reversa nucleosídeos (ITRNs).

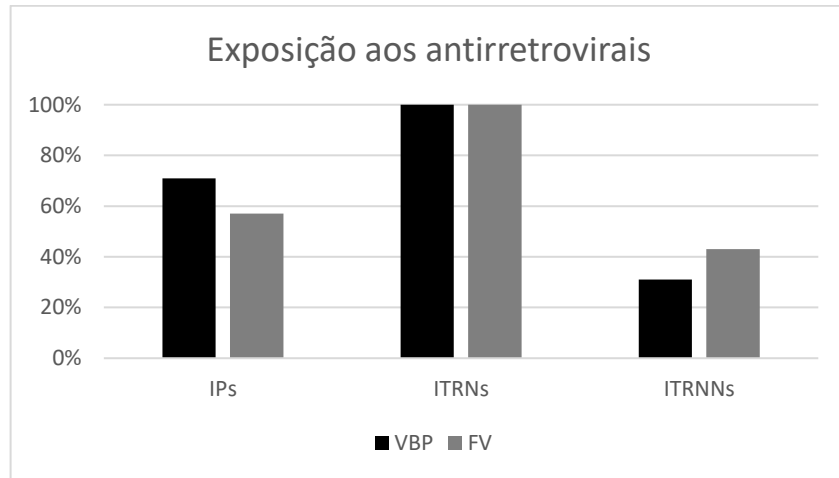


Figura 1: Exposição a antirretrovirais.

As figuras 2, 3 e 4 apresentam a frequência e o total de mutações entre os grupos analisados. As mutações com mais frequentes foram M46 e I54 para expostos aos IPs, M184 para indivíduos expostos aos ITRNs e K103 para expostos aos ITRNNs.

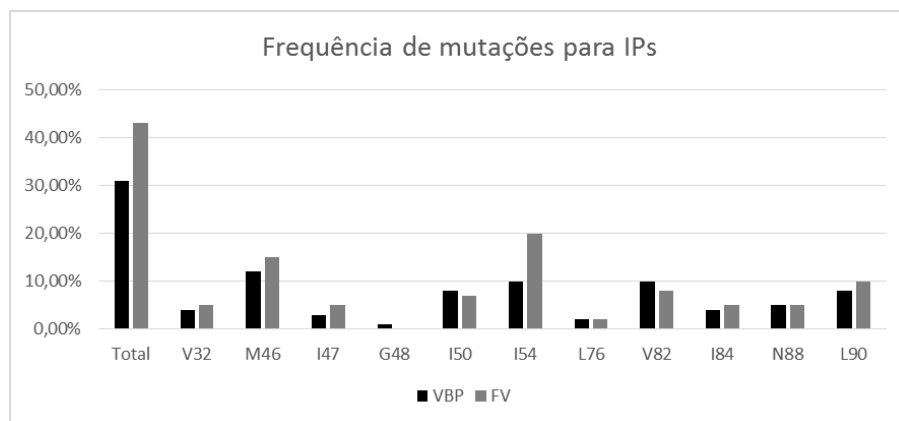


Figura 2: Frequência de mutações para IPs

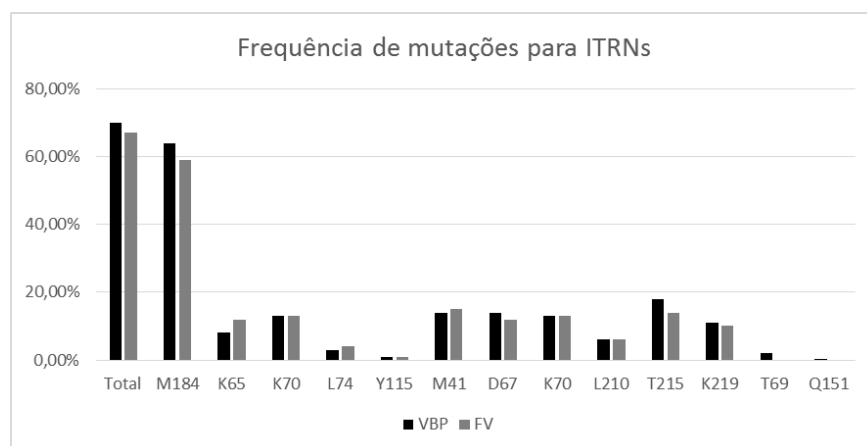


Figura 3: Frequência de mutações para ITRNs

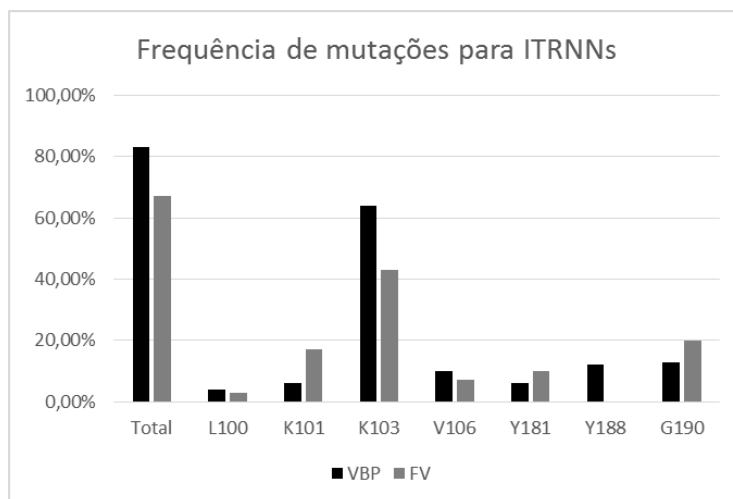


Figura 4: Frequência de mutações para ITRNNs

As figuras 5, 6 e 7 descrevem o grau de resistência genotípica categorizados entre classes, para os ARVs mais utilizados atualmente. Atazanavir e efavirenz apresentaram maior taxa de resistência genotípica de alto nível.

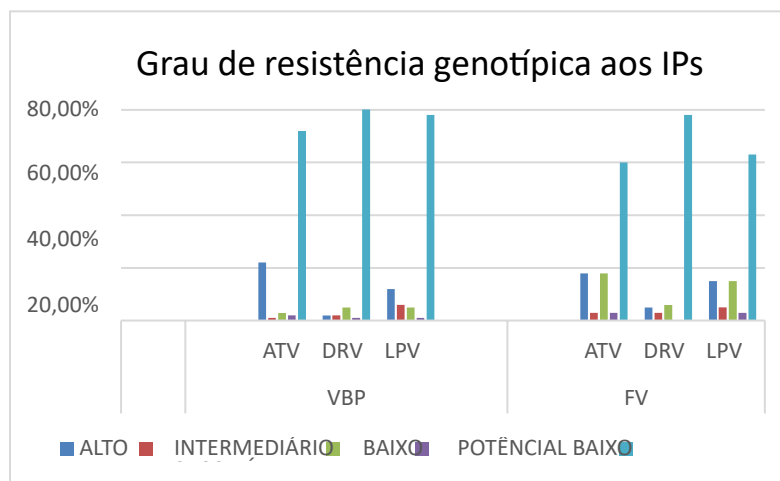


Figura 5: Grau de resistência genotípica aos IPs

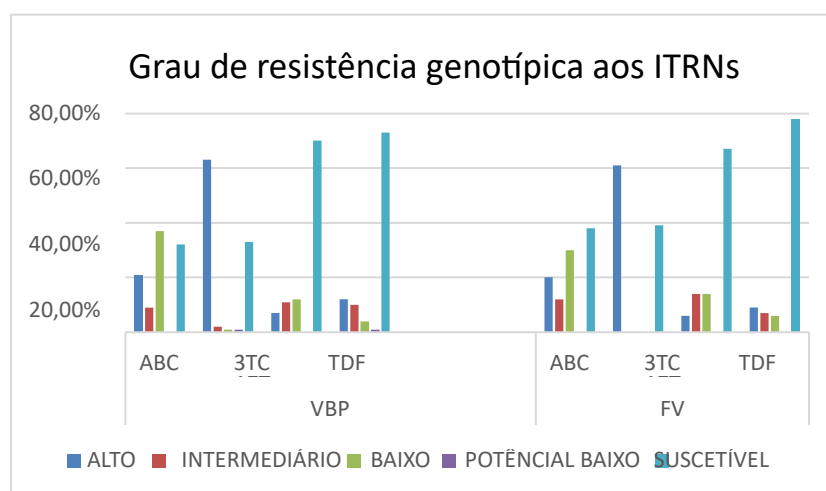


Figura 6: Grau de resistência genotípica aos ITRNs

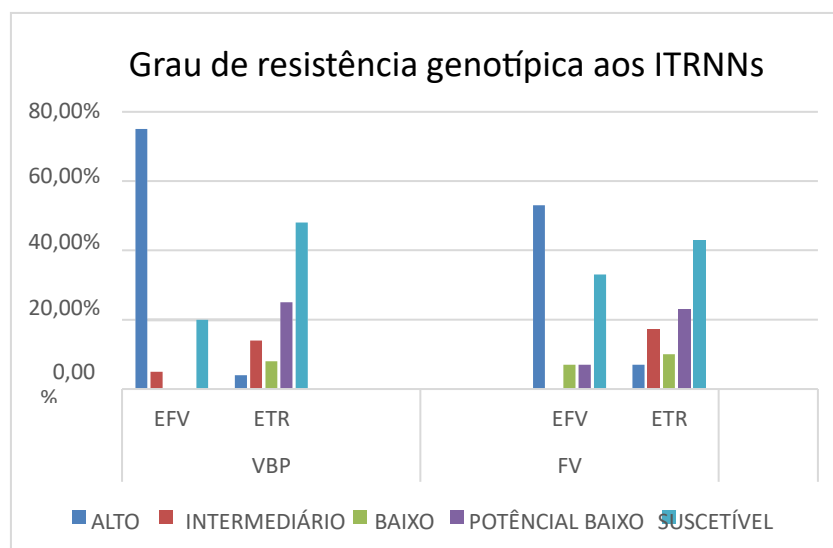


Figura 7: Grau de resistência genotípica aos ITRNNs

DISCUSSÃO

Foi observado que o grupo VBP apresentou maior taxa de exposição para IPs, de acordo com o estudo de Wiesmann et al., e em relação a taxa de mutações e grau de suscetibilidade genotípica, foi observado que apesar da presença de mutações de resistência, a maioria das sequências continua suscetível à IPs, devido à alta barreira genética da classe, comprovado no estudo de Rosenbloom et al. Ambos os grupos apresentaram alta exposição para ITRNs e perfil de resistência similar. Em relação a resistência genotípica para ITRNNs, o grupo VBP apresentou mais resistência de alto nível, em especial à EFV, isso pode ser relacionado à propensão do desenvolvimento de resistência devido à baixa barreira genética, de acordo com Arruda et al. A emergência de mutações de resistência na VBP pode ocasionar o desenvolvimento de novas cepas resistentes, o que pode levar futuramente ao desenvolvimento da FV.

CONCLUSÕES

Esse estudo reforça a necessidade da atenção à pacientes com quadro de VBP, reforçando a necessidade da periodicidade da realização dos de dosagem da carga viral para o acompanhamento da evolução da infecção, e testes de genotipagem para avaliação da efetividade do esquema terapêutico e se necessário, avaliação do perfil de mutações caso seja preciso a troca de esquema terapêutico atual.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2018 Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/protocolo-clinico-e->

- diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos. Acesso em: 15 ago 2022.
2. MATSUDA E. M., COELHO L. P. O., AHAGON, C. M., et al. **Immediate start of antirretroviral, why not?** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, v. 22, n. 3, p. 250-251, maio 2018.
 3. MCCLUSKEY S. M., SIEDNER M. J., MARCONI V., C. Management of Virologic Failure and HIV Drug Resistance. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 33, n. 3, p. 707-742, set 2019
 4. HANNERS E. K., BRUKE J. B., et al., 2022 **HIV: How to manage Low-Level Viraemia in People living with HIV**. *Drugs in Context*, v. 11, p.1-26, jan 2022.
 5. YEO J. Y., GOH G. R. SU C. T. T., et al., **The Determination of HIV-1 RT Mutation Rate, Its Possible Allosteric Effects, and Its Implications on Drug Resistance**. *Viruses*, v. 12, n. 3, 9 mar. 2020.
 6. BANDERA, A., GORI, A. CLERECI, M. et al., Phylogenies in ART: HIV reservoirs, HIV latency and drug resistance. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 48, p. 24-32, out. 2019.
 7. WIESMANN F., BRAUN P., KNICKMANN M., et al., **Low level HIV viremia is more frequent under protease-inhibitor containing firstline therapy than under NNRTI-regiments**. *J Int AIDS Soc*. 2014.
 8. ROSENBLOOM, D., HILL, A., RABI, S. et al. **Antiretroviral dynamics determines HIV evolution and predicts therapy outcome**. *Nat Med* **18**, 1378–1385 (2012). <https://doi.org/10.1038/nm.2892>
 9. ARRUDA MB, BOULLOSA LT, CARDOSO CC, et al., **HIV-BResNet. Brazilian network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BresNet): a survey of**

treatment-naive individuals. J Int AIDS Soc. 2018 Mar;21(3):e25032. doi:
10.1002/jia2.25032. PMID: 29504269; PMCID: PMC5835841.

ANÁLISE ESPAÇO TEMPORAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL HUMANA E CANINA EM MUNICÍPIOS PRIORITÁRIOS DO OESTE PAULISTA

Luciana Kimie Shimabukuro¹; Gabriela Sumico Afonso Hanamoto¹; Mayla Lopes Beneti¹; Lourdes Aparecida Zampieri D'Andrea²

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

²Docente/pesquisador do Laboratório de Parasitologia – CRPP – IAL.

Resumo: A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose de grande importância em saúde pública no Brasil. Diante da situação epidemiológica da LV, o Ministério da Saúde implantou o “Plano de Ação” para municípios considerados prioritários, visando à redução da letalidade e incidência. O objetivo do estudo foi avaliar a distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral humana e canina em quatro (4) municípios prioritários da região de saúde de Presidente Prudente, Estado de São Paulo. A área de estudo foram Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio, todos pertencentes à Rede Regional de Atenção a Saúde 11 de Presidente Prudente, no período de janeiro de 2018 a dezembro de 2020. Os dados de LV humana (LVH) foram fornecidos pelo Centro de Vigilância Epidemiológica e secretarias municipais; LV canina (LVC) no Sistema de Informação e Gestão Hospitalar e Unidades de Vigilância em Zoonoses municipais. Para o mapeamento dos casos de LVC e LVH foi utilizado o software ArcGIS. O padrão de distribuição espaço-temporal da LV no período de 2018 a 2020 demonstrou ampla disseminação da doença diagnosticada pelo território dos municípios prioritários, com exceção de Presidente Epitácio. Há um alto grau de proximidade entre o local de moradia do indivíduo com LVH e a presença de cães infectados e quando o serviço público não consegue realizar as atividades de vigilância e controle de forma eficiente, o parasita se mantém no ambiente e alimenta o ciclo da doença.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; plano de ação; análise espaço-temporal

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença zoonótica de origem parasitária que apresenta evolução crônica e sistêmica, e, quando não tratada, evolui para óbito em mais de 90% dos casos. É uma doença de notificação compulsória de grande importância para a saúde pública, além de integrar o grupo de doenças tropicais negligenciadas (DTN) (BRASIL, 2014; 2022).

O agente etiológico da LV pertence ao gênero *Leishmania*, um protozoário flagelado cuja espécie mais comum nas Américas é a *Leishmania (Leishmania) infantum*, sinônimo *Leishmania (Leishmania) chagasi* (BRASIL, 2014; 2022).

Atualmente, a doença se apresenta adaptada ao ambiente urbano. Na área urbana, o principal reservatório do parasita são os cães domésticos (*Canis familiaris*), que são infectados a partir do repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas dos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. A principal espécie associada à transmissão de

LV no Brasil é a *L. longipalpis*, que se apresenta amplamente distribuída pelo território (BRASIL, 2014; 2020; 2022; SAPATERA *et al.*, 2022).

O geoprocessamento é uma ferramenta útil para a manipulação e apresentação de dados espaciais, contribuindo na área da saúde para a criação e abastecimento de sistemas de informações geográficas. Essas análises espaço-temporais possibilitam observar a expansão de uma determinada doença, sua sazonalidade, fatores de risco ambientais, além de propiciar a criação e implantação de ações de saúde específicas para uma determinada população em uma determinada região, contribuindo com a diminuição da incidência e mortalidade do agravo (FURTADO *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2016).

O Ministério da Saúde (MS) implantou o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV), visando reduzir a letalidade e morbidade da doença através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos, redução do risco de transmissão pelo controle da população de reservatórios e do agente transmissor. A Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) instituiu o Plano de Ações de Leishmanioses para as Américas 2017-2022, cuja meta é reduzir a letalidade e incidência por LV em 50% até 2022 de acordo com os cenários epidemiológicos na região (BRASIL, 2014; OMS, 2016).

Na área de abrangência de atendimento do Centro de Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente (CRPP), possuem quatro (4) municípios considerados prioritários para as ações de vigilância e controle da LV (Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio), dentre os 14 elencados do Estado de São Paulo (ESP), pertencentes à Rede Regional de Atenção à Saúde (RRAS) 11 de Presidente Prudente, Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE) XXII de Presidente Venceslau. As ações estratégicas de vigilância em saúde têm sido monitoradas desde janeiro de 2018, através da execução do “Plano de Ação”, elaborado pela OPAS, compactuado com o MS, ESP e Município, com o objetivo de reduzir a incidência e a letalidade da LV em 50% até o ano de 2022. O objetivo do estudo foi avaliar a distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral humana e canina em quatro (4) municípios prioritários da região de saúde de Presidente Prudente/SP.

MATERIAL E MÉTODOS

A área de estudo compreendeu quatro (4) municípios considerados prioritários para as ações de controle e vigilância de LV pertencentes ao GVE XXII de Presidente Venceslau RRAS 11 de Presidente Prudente: Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio.

Os dados de LVH (casos e óbito) foram levantados juntamente ao Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE/SES-SP e nas secretarias municipais de saúde de cada município de estudo. Os dados de LVC (eixo de controle e vigilância do reservatório canino) foram obtidos com o auxílio do Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (SIGH), plataforma na qual os exames são cadastrados, recepcionados e os laudos são emitidos pelo CRPP, com emissão de boletins informativos, que são elaborados, nos quais consta o resultado do teste confirmatório Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) para LVC dos cães triados com Teste Rápido Dual Path Platform (TR DPP) reagentes nas Unidades de Vigilância em Zoonoses (UVZs), além de relatórios online informados mensalmente pelos municípios. Foi realizado um levantamento dos casos confirmados com LVC (Teste Rápido DPP e ELISA reagentes) durante o período de janeiro de 2018 a dezembro 2020. Com o auxílio do software Excel 2016 foram confeccionadas planilhas referentes a cada ano de estudo, nas quais o número de cães LVC confirmados foram

contabilizados, e separados por quadras, uma vez que todo cão é cadastrado com um endereço, composto por área, setor e quadra.

Para a identificação dos padrões de distribuição espacial, foram utilizados o mapeamento temático e a estatística descritiva de dados coletados em inquérito sorológico. Foi utilizado o software ArcGIS, desenvolvido pela Environmental Systems Research Institute (ESRI). Os mapas utilizados foram obtidos através de bases do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE) e com atualizações das quadras pelo extinto órgão de Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). A partir desse software foi possível realizar agrupamentos dos casos LVC e LVH, construir uma base de dados e elaborar mapas coroplético para a área urbana dos municípios prioritários: Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio, com base numa classificação de cães com LVC diagnosticados com TR DPP e ELISA reagentes, por quadra da área urbana de estudo, além dos casos de LVH, que foram plotados pelo endereço de residência no período entre janeiro de 2018 a dezembro de 2020.

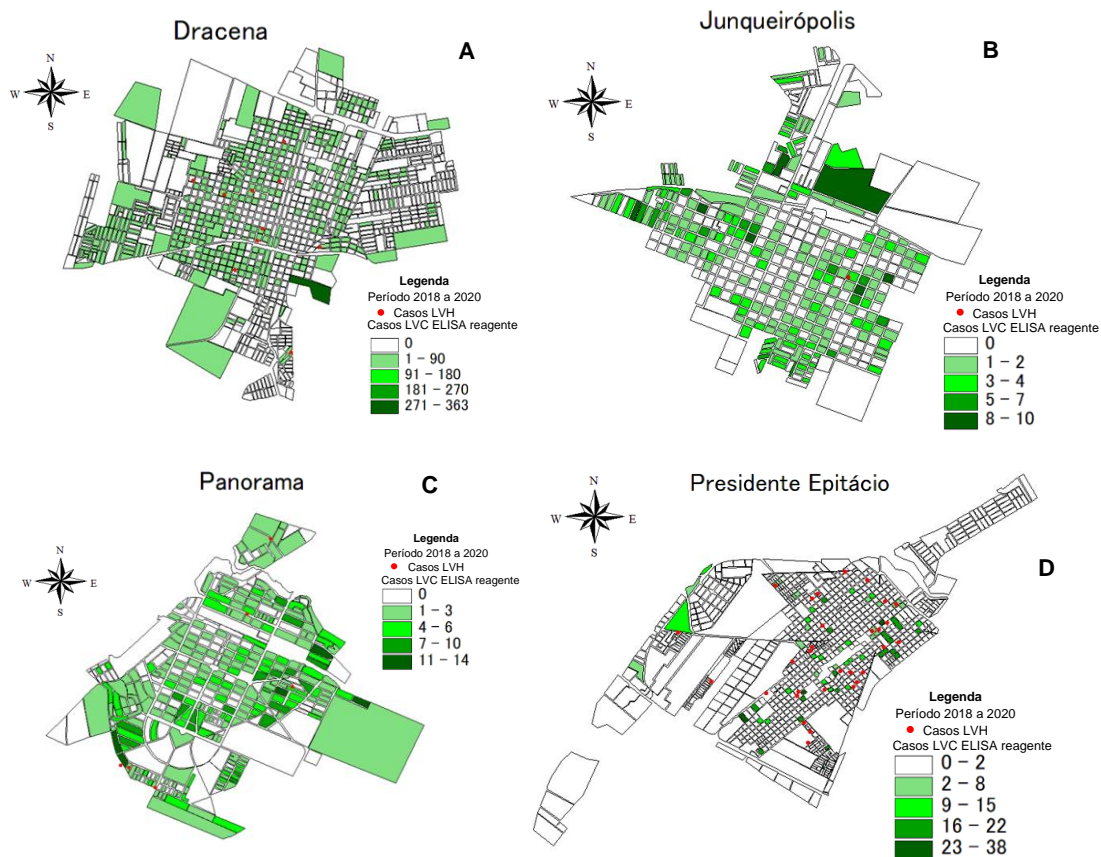
Os dados apresentados obedecem aos aspectos éticos e legais da pesquisa envolvendo seres humanos preconizados pela resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e fazem parte de resultados parciais obtidos com o estudo aprovado pelo Comitê Técnico Científico (CTC) do IAL – CTC 49L/2019 de 21/02/2020 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IAL – (CEPIAL), CAAE: 30367620.2.0000.0059, parecer Nº. 3975.808 de 16/04/2020.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A LV se apresenta em ampla expansão pelo oeste do ESP, região representada pelo território da RRAS 11 de Presidente Prudente, no qual faz parte a GVE XXI de Presidente Prudente e GVE XXII de Presidente Venceslau. Essa região é considerada endêmica para LV, onde foi identificada a circulação da espécie *Leishmania infantum*, caracterizada por apresentar padrões de dispersão distintos (D'ANDREA, 2017).

A gestão pública tem na distribuição espacial de uma determinada doença no território uma importante ferramenta, que pode auxiliar na tomada de decisão. A distribuição espaço-temporal por quadra dos cães confirmados com ELISA reagente para LVC e casos notificados de LVH segundo endereço de moradia da área urbana dos municípios de Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio no período estudado de janeiro de 2018 a dezembro de 2020 estão representados na Figura 1A, 1B, 1C, 1D, respectivamente.

Figura 1 - Distribuição espaço-temporal dos cães confirmados com ELISA reagente para LVC e casos de LVH da área urbana dos municípios de Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio. Período de janeiro de 2018 a dezembro de 2020



1A - Dracena (dois casos de LVH localizavam-se no mesmo endereço), 1B - Junqueirópolis (um caso de LVH na área rural), 1C - Panorama e 1D - Presidente Epitácio (dois casos de LVH localizam-se no mesmo endereço). Fonte: Unidades de Vigilância em Zoonoses e Secretarias Municipais de Saúde de Dracena, Junqueirópolis, Panorama e Presidente Epitácio e SIGH-IAL. Elaboração: FLORES E. F., 2021.

O município de Dracena notificou no período analisado um total de 11 casos de LVH e dois (2) óbitos. Com uma população canina estimada em 4.400 animais, a UVZ de Dracena testou um total de 3.651 deles, com positividade média de cães confirmados por ELISA para LVC de 30,46% (1.112) e destes, 68,35% (760) foram recolhidos e eutanasiados durante os três anos de estudo. Analisando o mapa de distribuição espaço-temporal dos casos de LVC e LVH no município de Dracena no período, observamos que todos os casos humanos ocorreram em quadras com a presença de animais identificados como infectados (Figura 1A). Diante desse cenário, acredita-se que estes cães podem ter atuado como reservatórios da doença e fonte de infecção para flebotomíneos. Observa-se uma ampla distribuição da doença por todo o território, com destaque para a quadra onde se localiza a UVZ de Dracena, por apresentar maior concentração de casos caninos. Isso se deve, ao fato de que até 2020, segundo os técnicos municipais, os cães que não se conhecia o endereço eram todos cadastrados na quadra onde se localiza a UVZ, assim como os cães de rua sem endereço. De forma geral, os resultados do monitoramento com o plano de ação voltado ao combate da

LV foram efetivos, pois a classificação epidemiológica do município passou de transmissão intensa para moderada (ainda permanece prioritário segundo Rangel *et al.*, 2020), isto é, houve redução no número de casos notificados no triênio, em comparação com os anteriores.

O município de Junqueirópolis apresentou ampla distribuição espacial da LV pelo seu território nos três anos de monitoramento. Entretanto, notificou apenas dois (2) casos de LVH e um óbito no período estudado, localizado na região centro-leste em quadra com animais confirmados pelo ELISA para LVC, assim como seus arredores (Figura 1B). A UVZ municipal registrou uma população de 3.000 cães, conseguiu testar um total de 4.174 animais, obtendo uma positividade média para LVC de 17,90% (747) e foram eutanasiados 48,73% (364) animais doentes no período de estudo. Como já descrito por Hanamoto (2022) até o ano de 2019, o serviço público municipal coletava a amostra canina para triagem sorológica para LVC juntamente com a vacinação antirrábica nos períodos de campanha e acabava por testar grande número de animais com essa metodologia. A partir de 2020, a vacinação antirrábica passou a ser realizada durante todo o ano e não apenas em curto período de campanha. Desse modo, a coleta de material canino para triagem de LVC passou a ser realizado apenas por demanda espontânea, o que impactou negativamente no número de animais testados no município. Segundo relatado pelos técnicos responsáveis, houve falta de recursos humanos e condições para ser realizado inquérito sorológico censitário, mas com a ajuda de agentes de saúde que atuam no território, os animais sintomáticos eram identificados, os agentes comunicavam a UVZ, que por sua vez realizavam as ações de investigação, diagnóstico e recolhimento dos cães infectados do ambiente. Mesmo diante das dificuldades enfrentadas, percebe-se pelo padrão de distribuição espacial da doença no território, que houve intensa atuação do serviço público municipal e o resultado desse trabalho foi a redução dos casos de LVH no período, onde o município mudou sua classificação epidemiológica de transmissão moderada para esporádica.

O município de Panorama notificou um total seis (6) casos de LVH e um (1) óbito no período avaliado, todos localizados em quadras com presença de animais confirmados no ELISA para LVC, assim como seu entorno (Figura 1C). Foram testados no município um total de 3.119 cães, de uma população de 2.500 animais, apresentando positividade média para LVC de 27,41% (855) e, destes foram eutanasiados 67,25% (575) animais infectados. Esses dados aqui apresentados demonstram que a UVZ de Panorama realiza inquérito sorológico censitário, pelo menos a cada dois anos, fechando o ciclo. Os dados apresentados corroboram com estudos anteriores descrito por Hanamoto (2022) quanto a realização do inquérito sorológico censitário no município e que não houve impacto da pandemia de covid-19 sobre a realização dessa atividade. Na totalidade de análise dos dados, observa-se que houve alteração no cenário de transmissão da doença no município de Panorama, assim como Dracena e Junqueirópolis, devido à mudança de classificação de transmissão moderada, passou-se a esporádica.

Já o município de Presidente Epitácio notificou um total de 31 casos de LVH e um (1) óbito, durante os três anos de estudo, observou-se um padrão de distribuição espaço-temporal aleatória pelo território, com maior concentração de casos na região central (Figura 1D), identificado como áreas de maior risco de transmissão de LV a qual denominamos área de trabalho local (ATL). Com uma população estimada de mais de 4.000 cães, foram testados apenas 2.122 animais, registrando positividade média para LVC pelo ELISA de 46,28% (982) e destes, foram recolhidos e eutanasiados 52,14% (512). Observa-se que os casos de LVC estão distribuídos pelo território com diversas quadras apresentando alta concentração de animais infectados (Figura 1D). No entanto, observam-se no território, alguns locais sem nenhum registro de animais com LVC, justificado pelo fato do serviço municipal não ter realizado as ações de vigilância voltadas ao reservatório canino, deixando de identificar

animais infectados com a *Leishmania infantum*. Segundo Hanamoto (2022), em 2019, foram realizadas reuniões técnicas periódicas com os responsáveis pelas equipes de vigilância em saúde do município de Presidente Epitácio, para esclarecimento da importância da ampliação das atividades de inquérito sorológico, no sentido de intensificar as medidas de manejo dos cães com LVC. Dessa forma, observa-se nos três anos de estudo (Figura 1D), que a falta de cobertura do inquérito canino em algumas áreas, conseqüentemente a não realização do manejo dos cães com a doença, impactou sobremaneira o padrão de distribuição espaço-temporal da LV no município, sendo que, entre os municípios monitorados da região de saúde de Presidente Prudente, Presidente Epitácio foi o que demonstrou o pior cenário epidemiológico, permanecendo classificado de transmissão intensa.

Por não ter alcançado a meta estabelecida de redução de 50% de LV, Em 2021, segundo a NOTA TÉCNICA Nº 5/2021-CGZV/DEIDT/SVS/MS, o município de Presidente Epitácio, passou a ser considerado prioritário para as ações de vigilância controle da LV juntamente com Nova Guataporanga. Em razão disso, o MS ofereceu a incorporação de uma nova ferramenta para o controle da doença com o uso de coleiras impregnadas com inseticida (deltametrina a 4%). A partir de então, esses dois municípios elaboraram um plano de ação para o encoleiramento de cães em seus territórios no período entre 2023 e 2026 e passarão a ser monitorados (BRASIL, 2021).

CONCLUSÃO

As ações desenvolvidas no período de estudo de janeiro de 2018 a dezembro de 2020 com o “Plano de Ação” voltado a vigilância e ao controle da LV nos municípios prioritários da região de saúde de Presidente Prudente demonstraram maior impacto epidemiológico em Dracena, Junqueirópolis e Panorama, porém Presidente Epitácio não obteve bons resultados. A área com maior concentração de casos de LVH em Presidente Epitácio foi considerada como área prioritária para vigilância e controle pelo MS, sendo implementada a aplicação de coleiras repelentes nos cães, sistematicamente por quatro anos (2023-2026). Esse trabalho será desenvolvido pelas equipes municipais e monitorado tanto pelo ESP como pelo MS com o objetivo de reduzir a letalidade da doença. A partir dos resultados desse estudo, constatou-se uma ampla disseminação da doença pelo território nos municípios de Dracena, Junqueirópolis e Panorama, porém em Presidente Epitácio o padrão de distribuição da LV se apresentou esporso com identificação de ATL. Observou-se um alto grau de proximidade entre o local de moradia do indivíduo notificado com LVH e a presença de cães infectados. Este fato demonstra que o animal atua como reservatório da doença, sendo que quando o serviço municipal não consegue realizar de forma sistemática a medida de inquérito sorológico canino e manejo dos animais infectados, a permanência dos mesmos nos territórios endêmicos apresenta alto risco de transmissão da LVH, pois infectam flebotomíneos e mantém o ciclo da doença no ambiente.

REFERÊNCIAS

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde, 2014.** Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2022.

BRASIL. **Guia de Bolso Leishmaniose Visceral. Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2020.** 1 ed., – Brasília - DF: CFMV, 2020. 194 p.: il.

BRASIL. **Nota Técnica Conjunta Nº 5/2021-CGZV/DEIDT/SVS/MS**. Trata-se da proposta de incorporação das coleiras impregnadas com inseticida (deltametrina a 4%) para o controle da leishmaniose visceral em municípios prioritários. **2021**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/maio/27/sei_ms-nota-tecnica-n-5_leishpdf.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2022.

BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, 2022**. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed_rev_atual.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2022.

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**.

FURTADO, A. S. *et al.* Análise espaço-temporal da leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, 20(12):3935-3942, **2015**.

GONÇALVES, N. V. *et al.* Distribuição espaço-temporal da leptospirose e fatores de risco em Belém, Pará, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, 21(12):3947-3955, **2016**.

HANAMOTO, G. S. A. 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 – Presidente Prudente, **2022**. 52 f. il.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Programa Regional de Leishmanioses nas Américas 2010 – 2017. 2016**. Disponível em: <<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-cha-prog-reg-leish-america-pt.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2022.

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)**, v. 17, n. 204, p. 13–20, **2020**.

SAPATERA, N. S. *et al.* Leishmaniose visceral em canídeos silvestres – revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, **2022**.

ISBN 978-659996582-1



9 786599 965821

