



ESPECIALIZAÇÃO
VIGILÂNCIA LABORATORIAL EM SAÚDE PÚBLICA

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

ORGANIZADORES:

**CRISTIANE BONALDI CANO
ELAINE LOPES DE OLIVEIRA**



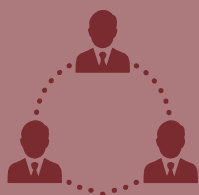
AGRON FOOD
ACADEMY



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)

V Mostra dos Trabalhos de Conclusão de Curso [LIVRO ELETRÔNICO]: Livro da V Mostra dos Trabalhos de Conclusão de Curso da Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública / ORGANIZAÇÃO Cristiane Bonaldi Cano & Elaine Lopes de Oliveira--- JARDIM DO SERIDÓ, RN: AGRON FOOD ACADEMY, 2024.

PDF.

VÁRIOS AUTORES.

BIBLIOGRAFIA.

ISBN: 978-65-85062-11-4

1. SAÚDE PÚBLICA 2. VIGILÂNCIA SANITÁRIA 3. TECNOLOGIAS 4. CONTROLE EPIDEMIOLÓGICO I. CANO, CRISTIANE BONALDI II. OLIVEIRA, ELAINE LOPES.

CDD:614.09813

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

ISBN: 978-65-85062-11-4

DOI: 10.53934/20242

COMISSÃO AVALIADORA

ADRIANA LUCHS
ADRIANA PARISE COMPRI
ALLECINEIA BISPO DA CRUZ
ANA CAROLINA CHIOU NASCIMENTO
ANA CRISTINA SCARPARO DE MIRANDA
ANDRÉIA MOREIRA DOS SANTOS CARMO
AUDREY CILLI CHIRELLI
BEATRIZ GOMES CARREIRA SARTORI
CARLOS HENRIQUE CAMARGO
CESAR CILENTO PONCE
CRISTINA DA SILVA MEIRA STREJEVITCH
DANIELA BERNARDES BORGES DA SILVA
ELAINE CRISTINA DE MATTOS
ELISABETE CARDIGA ALVES
ELIANA DELLA COLETTA YUDICE
ELIZABETH NATAL DE GASPARI
ELLEN GAMEIRO HILINSKI
ÉRIKA FABIANE FURLAN
FERNANDA TOLENTINO
GABRIELA BASTOS CABRAL
GABRIELA CABRAL DOS SANTOS
GABRIELA MOTOIE
HELENA MIYOCO YANO
JACQUELINE TANURY MACRUZ PERESI

JAQUELINE OTERO SILVA
JOÃO LEANDRO DE PAULA FERREIRA
LAIS FERNANDA DE PAULI YAMADA
LEYVA CECILIA DE MELO
LUCIANA DA SILVA LUIZ MENEZES
LUCILDES PITA MERCURI
LUÍS FERNANDO DE MACEDO BRÍGIDO
MARIA APARECIDA MORAES MARCIANO
MARIA GISELE GONÇALVES
MARIA ISABEL ANDREKOWISK FIORAVANTI
MARIA ISABEL DE OLIVEIRA
MARINA VON ATZINGEN DOS REIS
MARISA AILIN HONG
MÁRCIA JORGE CASTEJON
MÁRCIA HELENA BRAGA CATROXO
MILENA POLOTTO DE SANTI
MONIQUE RIBEIRO TIBAS CASAS
RITA DE CÁSSIA COMPAGNOLI CARMONA
ROBERTO MITSUYOSHI HIRAMOTO
RUTE DE COL
SIMONE ALVES DA SILVA
TANIA SUELI DE ANDRADE
TOMÁS ZECCHINE BARRESE
VALÉRIA ADRIANA PEREIRA MARTINS
VINICIUS PACCOLA BLANCO
VIRGÍNIA BODELAO RICHINI PEREIRA



SUMÁRIO

Capítulo 01	4
DOI: 10.53934/20242-01	5
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS DE CULTURA CELULAR: BIDIMENSIONAL VERSUS TRIDIMENSIONAL, ESTAMOS DIANTE DE UMA NOVA ERA?	5
Capítulo 02	12
DOI: 10.53934/20242-02	12
CRITÉRIOS DE QUALIDADE PARA AVALIAÇÃO DE DOSES FLEXÍVEIS EM COMPRIMIDOS E MEDICAMENTOS LÍQUIDOS.....	12
Capítulo 03	17
DOI: 10.53934/20242-03	17
PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS DE MENINGITE BACTERIANA NO ESTADO DE SÃO PAULO ENTRE 2017 E 2022	17
Capítulo 04	24
DOI: 10.53934/20242-04	24
PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA EM <i>ESCHERICHIA COLI</i> ISOLADAS DE LEITE PASTEURIZADO INTEGRAL.....	24
Capítulo 05	30
DOI: 10.53934/20242-05	30
ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE ÁLCOOL EM GEL COMERCIALIZADAS NO CENÁRIO PÓS-PANDEMIA ..	30
Capítulo 06	37
DOI: 10.53934/20242-06	37
AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS PORTADORAS DE GENES CODIFICADORES DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS NO NÚCLEO DE COLEÇÃO DE MICRO- ORGANISMOS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ	37



Capítulo 07	43
DOI: 10.53934/20242-07	43
USO DE IMUNOGLOBULINAS E SUBCLASSES COMO MARCADORES IMUNOLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA NEUROANGIOSTRONGILÍASE: revisão integrativa	43
Capítulo 08	50
DOI: 10.53934/20242-08.....	50
OCORRÊNCIA DE MENINGITE PNEUMOCÓCICA NA REDE REGIONAL DE ATENÇÃO À SAÚDE 13, NO PERÍODO ENTRE 2015 A 2020.	50
Capítulo 09	56
DOI: 10.53934/20242-09.....	56
ANÁLISE COMPARATIVA DE TRÊS METODOLOGIAS DE BASES VOLÁTEIS TOTAIS EM PESCADO.....	56
Capítulo 10	63
DOI: 10.53934/20242-10.....	63
ESPOROTRICOSE HUMANA NO BRASIL: ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E EPIDEMIOLÓGICOS	63
Capítulo 11	69
DOI: 10.53934/20242-11.....	69
PROTOCOLOS MOLECULARES APLICADOS A ISOLADOS DE <i>Plasmodium</i> EM PROGRAMA DE PROFICIÊNCIA LABORATORIAL: AVALIAÇÃO DOS TESTES qPCR E <i>NESTED</i> PCR.....	69
Capítulo 12	76
DOI: 10.53934/20242-12.....	76
INFLUENZA AVIÁRIA: O POTENCIAL PANDÊMICO DO VÍRUS H5N1	76
Capítulo 13	83
DOI: 10.53934/20242-13.....	83
UTILIZAÇÃO CENTENÁRIA DA VACINA BCG E PERSPECTIVAS VACINAIS	83
Capítulo 14	89
DOI: 10.53934/20242-14.....	89
NOROVÍRUS: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E MEDIDAS PREVENTIVAS 	89



Capítulo 15	96
DOI: 10.53934/20242-15.....	96
CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS MELANIZADOS PRESENTES NO ACERVO DO NÚCLEO DE COLEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ – CENTRAL	96
Capítulo 16	103
DOI: 10.53934/20242-16.....	103
FUNÇÕES DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EM PARASITAS UNICELULARES	103
Capítulo 17	110
DOI: 10.53934/20242-17	110
COMPARAÇÃO DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DE CARGA VIRAL - HIV, ANTES DURANTE E APÓS A PANDEMIA DO COVID-19.....	110
Capítulo 18	119
DOI: 10.53934/20242-18.....	119
USO DA METODOLOGIA RT-qPCR SYBR <i>GREEN</i> PARA DETECÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS.....	119
Capítulo 19	126
DOI: 10.53934/20242-19.....	126
PADRÕES HISTOLÓGICOS DE FRUTAS TÍPICAS BRASILEIRAS.....	126
Capítulo 20	132
DOI: 10.53934/20242-20.....	132
IDENTIFICAÇÃO DE MATÉRIAS ESTRANHAS EM ALIMENTOS À BASE DE PROTEÍNA VEGETAL (<i>PLANT-BASED</i>)	132
Capítulo 21	138
DOI: 10.53934/20242-21.....	138
HISTÓRICO DA TUBERCULOSE E EVOLUÇÃO DIAGNÓSTICA LABORATORIAL	138
Capítulo 22	144
DOI: 10.53934/20242-22.....	144
IMPORTÂNCIA DA ESCOLHA DO FIXADOR IDEAL PARA MICROSCOPIA DE LUZ	144



Capítulo 23	150
DOI: 10.53934/20242-23.....	150
A IMPORTÂNCIA DO CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO NO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA A PESQUISA DE AGENTES INFECCIOSOS	150
Capítulo 24	157
DOI: 10.53934/20242-24.....	157
VIGILÂNCIA DO VÍRUS INFLUENZA: IMPORTÂNCIA DO ENSAIO FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA VIRAL	157
Capítulo 25	164
DOI: 10.53934/20242-25	164
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS TRANS EM ÓLEOS DE SOJA.....	164
Capítulo 26	170
DOI: 10.53934/20242-26.....	170
MÉTODOS UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA CISTICERCOSE HUMANA	170
Capítulo 27	176
DOI: 10.53934/20242-27.....	176
AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA A REGIÃO LTR DO HIV-1.	176



Capítulo 01

DOI: 10.53934/20242-01

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS DE CULTURA CELULAR: BIDIMENSIONAL VERSUS TRIDIMENSIONAL, ESTAMOS DIANTE DE UMA NOVA ERA?

Vitória Luiza Batalhoti Brogiato¹; Tamiko Ichikawa Ikeda²; Aurea Silveira Cruz Garçon²

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

²Docente/Pesquisador do Núcleo de Cultura de Células – IAL.

Resumo: As culturas celulares bidimensionais (2D) são amplamente utilizadas, mas a complexidade dos organismos vivos não é encontrada neste modelo. Para que essa limitação seja superada, técnicas como as culturas celulares tridimensionais (3D) vêm sendo retomadas e desenvolvidas. O objetivo deste trabalho foi comparar as técnicas de cultura (2D X 3D) em relação às vantagens, desvantagens e suas aplicabilidades. Esta revisão foi baseada na consulta de artigos indexados, no período de 2013 a 2023, capítulos de livros e informações complementares. O crescimento das culturas *in vitro* deve ser o mais próximo do ambiente *in vivo*, mas as culturas 2D geralmente crescem em monocamada, não reproduzem as interações célula-célula e célula-matriz extracelular, que são encontradas nos modelos 3D, dentre eles as culturas organotípicas, os esferoides e os organoides. Essa comunicação é importante, pois cria gradientes físicos e químicos que controlam funções celulares essenciais, demonstrando que os modelos 3D têm maior proximidade com a fisiologia *in vivo*. Atualmente, milhares de linhagens celulares 2D com protocolos padronizados estão disponíveis, fazendo com que este modelo o mais utilizado em testes *in vitro* até o momento. Avanços significativos no cultivo 3D, fornecem uma abordagem que preenche a lacuna entre a cultura 2D e os modelos animais, sendo o mais biologicamente relevante. Ainda assim, são necessários mais estudos, adaptações e padronizações acerca da técnica 3D, que devem seguir ocorrendo, levando as culturas celulares para uma nova era.

Palavras-chave: cultura celular tridimensional; esferoides celulares; linhagens celulares; organoides; técnicas de cultura celular

INTRODUÇÃO

Cultura celular é o termo usado quando o tecido é desde o princípio desagregado em células individuais. Teve seu início em 1907, mas somente na década de 40, algumas linhagens celulares foram isoladas, sendo a primeira de origem humana, conhecida como HeLa, derivada de células de câncer de colo de útero, coletadas de uma paciente chamada Henrietta Lacks, em 1951 (SILVA, GOUVEIA e DONATO, 2020).

A técnica de cultura celular é amplamente utilizada em estudos com micro-organismos, citotoxicidade, testes de fármacos, diagnósticos e na substituição dos ensaios em animais (BIJU, PRIYA e FRANCIS, 2023; SÁNCHEZ-ROMERO et al, 2016).

A maioria das culturas celulares, com morfologia bidimensional (2D), crescem em monocamada onde as interações são célula-célula e célula-superfícies planas rígidas, e não refletem com fidelidade o ambiente *in vivo*. Dessa maneira, outras técnicas de cultura de células têm sido retomadas e aprimoradas, com o propósito de produzir modelos mais



semelhantes aos sistemas *in vivo*, onde as interações são célula-célula e célula-matriz extracelular, estes métodos de cultivo são denominados tridimensional (3D) (SÁNCHEZ-ROMERO et al, 2016; SHAH et al, 2023).

Portanto, essa revisão visa comparar as técnicas 2D e 3D, em relação às vantagens, desvantagens e aplicabilidade, pontuando metodologias atualmente disponíveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão bibliográfica realizada por consulta à base de dados PubMed, com o uso das seguintes palavras chaves: "3d cell culture" and "cell culture models" and "2d cell culture", de artigos dos últimos 10 anos em inglês, português e espanhol, visando a captação de referências recentes que englobem a evolução histórica. Além disso, foram utilizados livros e informações complementares.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As técnicas de cultura de células originam modelos 2D ou 3D, cuja a definição e a comparação entre suas características, encontram-se no quadro 1 (SHAH et al, 2023; SILVA, DONATO e GONÇALVES, 2020).

Quadro 1 - Comparação entre as características dos modelos de culturas 2D e 3D.

CARACTERÍSTICAS	BIDIMENSIONAL (2D)	TRIDIMENSIONAL (3D)
DEFINIÇÃO	As células formam uma única camada, sem muitas interações em todo seu arredor.	Células crescem em matriz artificial e interagem com todo seu entorno.
SUPERFÍCIE DE CRESCIMENTO	Superfícies planas e rígidas. Exemplos: garrafas de poliestireno e placas de petri.	Matriz artificial que mimetizam o microambiente <i>in vivo</i> . Exemplo: Hidrogéis.
CARACTERÍSTICAS DA MORFOLOGIA	Células planas e esticadas, em forma de monocamada.	Células em sua forma natural, que por meio de ligações criam agregados celulares.
MODO DE PROLIFERAÇÃO	Taxas mais elevadas, em relação a velocidade.	Taxas similares ao que ocorre <i>in vivo</i> . Porém, depende do tipo celular e/ou técnica selecionada.
FORMA DE INTERAÇÃO	Limitada. Interação somente célula-célula.	Semelhante ao que ocorre <i>in vivo</i> . Interação célula-célula e célula-MEC.
CICLO CELULAR	Células que normalmente, estão no mesmo momento do ciclo celular.	Células em diferentes estágios do ciclo celular.
FATOR DE DISTRIBUIÇÃO	Homogêneo. As células neste modelo ficam expostas de forma igual a distribuição de nutrientes e oxigênio.	Heterogêneo. Alguns compostos não possuem capacidade de penetração para chegar as estruturas mais centrais.
EXPRESSÃO DE GENES E PROTEÍNAS	Níveis diferentes de expressão, comparado ao que ocorre <i>in vivo</i> .	Níveis mais semelhantes de expressão, comparado ao que ocorre <i>in vivo</i> .
REPRODUTIBILIDADE	Fácil. Possui manutenção e manipulação simples.	Difícil. Metodologias mais complexas.
DISPONIBILIDADE COMERCIAL	Existem várias coleções disponíveis de diferentes linhagens celulares autenticadas.	Possui um número limitado de modelos disponíveis.
CUSTO	Baixo.	Elevado.

Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Em todas as interações celulares *in vivo*, a estrutura que tem maior influência é a matriz extracelular (MEC), que é composta principalmente por colágeno, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas. Esta interação, também ocorre *in vitro*, mas variam entre culturas 2D e 3D (GOPALAKRISHNAN, 2022).



Nos cultivos *in vitro*, com o objetivo de mimetizar os efeitos da MEC, polímeros naturais, sintéticos e mistos são incluídos como arcabouços. Eles visam fornecer suporte para bioatividade celular, influenciando nas respostas fisiológicas semelhantes às *in vivo*. Os primeiros a serem usados foram os hidrogéis, dentre outros polímeros e suas aplicações variam conforme a técnica de cultura que será utilizada, tais como: engenharia de tecidos, regeneração tecidual, terapêutica de medicamentos, estudos aplicados à resposta virológica, entre outros (BRACCINI et al, 2022; DILLER e TABOR, 2022; DUVAL et al, 2017; VANTANGOLI et al, 2016).

As culturas de células 2D, crescem formando uma monocamada, aderidas a substratos planos e rígidos, como garrafas ou placas de Petri de diferentes materiais, como de poliestireno (OLIVEIRA et al, 2021; SILVA, DONATO, GOLÇALVES, 2020).

Esse modelo de cultura possui características parecidas ao tecido original e são comumente utilizadas na produção de insumos, diagnósticos e pesquisas. Existem milhares de linhagens celulares disponíveis, com protocolos bem padronizados. Estudos mostram que cerca de 70% das pesquisas dependem de resultados positivos antes de avançar para testes *in vivo* (FITZGERALD et al, 2016; FONTOURA et al, 2019).

A cultura 2D não replica com fidelidade o ambiente *in vivo*, as células se adaptam às mudanças em seu microambiente, afetando a proliferação, viabilidade, diferenciação, estrutura e função celular o que gera modificação na síntese de proteínas e expressão gênica (ANTHON e VALENTE, 2022; CAPES-DAVIS e FRESHNEY, 2021).

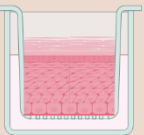

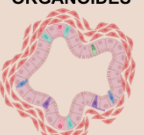
A cultura de células 3D foi desenvolvida, como um modelo que busca uma maior semelhança com o ambiente *in vivo*, por possuir uma melhor interação entre biomoléculas e uma maior capacidade de imitar as complexas comunicações entre as células, que interagem em três dimensões, facilitando à auto-organização, polarização e diferenciação (EDWARDS et al, 2022; SAKALEM et al, 2021; SHAH et al, 2023).

No modelo de culturas 3D, as células podem ser cultivadas de duas formas: livres de andaimes e dependentes de andaimes. Na primeira, os agregados celulares são formados devido à influência da superfície não aderente ou ao fluxo gerado pelo meio de cultura. Na segunda, as células são semeadas diretamente em um polímero ou dispersas em uma matriz líquida para tornar o arranjo mais próximo possível da fisiologia *in vivo* (ANTHON e VALENTE, 2022; GANJIBAKHSH et al, 2019).

O cultivo 3D baseia-se na formação de agregados celulares, que diferem em: tamanho, forma, densidade e número de células. Os modelos citados na literatura são: culturas organotípicas, esferoides e organoides (ANTHON e VALENTE, 2022). Estes modelos possuem diferentes aplicações, conforme observado no quadro 2, e suas formas de cultura serão discutidas a seguir.



Quadro 2 – Principais aplicações dos modelos de cultura 3D.

MODELO DE CULTURA	EXEMPLOS DE APLICAÇÕES NAS DIFERENTES TÉCNICAS
<p>ORGANOTÍPICAS</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Estudos de barreiras biológicas; • Engenharia de tecidos - Regeneração de tecidos e órgãos danificados; • Substituição de testes em animais na avaliação de toxicidade com medicamentos e cosméticos; • Investigação de respostas imunes para modelagem de infecções humanas.
<p>ESFEROIDES</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Estudos de resistência a medicamentos como avaliação de terapias combinadas e imunoterapias; • Modelagem de microambientes tumorais; • Estudos de comportamento e resistência viral avaliando a forma de infecção e patogênese; • Pesquisas e terapias antivirais e microbiológicas avançadas; • Substituição de testes em animais.
<p>ORGANOIDES</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Modelagem de doenças genéticas, principalmente virais hereditárias; • Estudos de desenvolvimento embrionário; • Pesquisas e terapias antivirais avançadas; • Avaliação de medicamentos e respostas imunológicas; • Estudos pré-clínicos, pesquisas médicas e microbiologia; • Pesquisas de vacinas de próxima geração; • Substituição de testes em animais

Fonte: elaborado pelo autor (2023)

As culturas organotípicas, ou co-culturas, envolvem o cultivo de diferentes tipos celulares em conjunto com proteínas da MEC. Essa técnica é usada para simular "tecidos equivalentes" *in vitro*, ou produzir tecidos destinados a substituir ou restaurar certos danos físicos, como queimaduras (CAPES-DAVIS e FRESHNEY, 2021; COSTA et al, 2018).

Os esferoides possuem características necróticas no centro e altamente proliferativas em sua periferia. Esse modelo oferece uma vantagem notável, pois reflete a heterogeneidade do crescimento tumoral (BADR-ELDIN et al, 2022; BIAŁKOWSKA et al, 2020; COSTA et al, 2016; FITZGERALD et al, 2015).

Os organoides são cultivados a partir de células-tronco derivadas de tecido primário adulto, células embrionárias ou pluripotentes induzidas. Eles reproduzem pelo menos uma função e a estrutura histológica de órgãos. Atualmente, já existem modelos de organoides disponíveis para aquisição. Apesar de suas vantagens, possuem desafios, como a capacidade limitada de vascularização e interações complexas com o sistema imunológico (ATCC, 2023; ANTONELLI, 2023; BADR-ELDIN et al, 2022; SHYAM, REDDY e PALANIAPPAN, 2023; TUVESON e CLEVERS, 2019).

Na literatura existem diversas técnicas para a construção destes modelos, que variam conforme o meio em que as células são cultivadas, tipo de célula utilizada, microambiente do tecido de interesse, investimento possível, finalidade e aplicação da cultura. Entre as mais citadas temos: a gota suspensa ou gota pendente, a levitação magnética, a cultura rotativa, a bioimpressão e os sistemas microfluídicos. Todas possuem vantagens e desvantagens distintas, como exemplo de vantagens, a técnica de gota suspensa e de levitação magnética mantém as funções celulares, a cultura de célula rotativa possui simples execução, a bioimpressão fornece arquiteturas precisas e a microfluídica permite uma avaliação sistêmica. Como desvantagens, as técnicas respectivamente citadas carecem de moldagem, requerem equipamentos especiais, podem causar danos celulares, possuem custo elevado e limitações com alguns tipos celulares (BADR-ELDIN et al, 2022; BIAŁKOWSKA et al, 2020; HARB et al, 2021; MARQUES et al, 2022).

CONCLUSÃO

Nesta revisão, fica claro os avanços do cultivo 3D, pois ele mimetiza com mais fidelidade a reprodução *in vitro* de órgãos e tecidos, contribuindo para pesquisas translacionais. No entanto, o cultivo 3D também apresenta desafios, como a complexidade da cultura, dificuldades de interpretação, falta de padronização e reprodutibilidade. Apesar



dos avanços recentes, a cultura celular 3D requer mais estudos, para suprir todas as complexidades encontradas e substituir definitivamente as linhagens celulares 2D, amplamente padronizadas e disponíveis. Esse avanço deve seguir ocorrendo, levando o cultivo celular para uma nova era.

REFERÊNCIAS

AMERICAN Type Culture Collection (ATCC). **ATCC: The Global Center**. Disponível em: <https://www.atcc.org/> Acesso: 27 de Setembro de 2023.

ANTHON SG, VALENTE KP. Vascularization Strategies in 3D Cell Culture Models: From Scaffold-Free Models to 3D Bioprinting. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022; 23(23):14582.doi:10.3390/ijms232314582. PMID: 36498908.

ANTONELLI, FRANCESCA. 2023. "3D Cell Models in Radiobiology: Improving the Predictive Value of In Vitro Research" **International Journal of Molecular Sciences** 24, no. 13: 10620. <https://doi.org/10.3390/ijms241310620>

BADR-ELDIN SM, ALDAWSARI HM, KOTTA S, DEB PK, VENUGOPALA KN. Three-Dimensional In Vitro Cell Culture Models for Efficient Drug Discovery: Progress So Far and Future Prospects. **Pharmaceuticals**. 2022; 15(8):926. <https://doi.org/10.3390/ph15080926>

BIAŁKOWSKA K, KOMOROWSKI P, BRYSZEWSKA M, MIŁOWSKA K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. **International Journal of Molecular Sciences**. 2020; 21(17):6225. <https://doi.org/10.3390/ijms21176225>

BIJU TS, PRIYA VV, FRANCIS AP. Role of three-dimensional cell culture in therapeutics and diagnostics: an updated review. **Drug Deliv Transl Res**. 2023 Sep;13(9):2239-2253. doi: 10.1007/s13346-023-01327-6. Epub 2023 Mar 27.

BRACCINI S, TACCHINI C, CHIELLINI F, PUPPI D. Polymeric Hydrogels for In Vitro 3D Ovarian Cancer Modeling. **Int J Mol Sci**. 2022 Mar 17;23(6):3265. doi: 10.3390/ijms23063265. PMID: 35328686; PMCID: PMC8954571.

CAPES-DAVIS A, FRESHNEY RI. Three-Dimensional Culture. In: Capes-Davis A; Freshney RI. **Freshney's Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. John Wiley e Sons Ltd by John Wiley e Sons Ltd by, 2021. p. 641-668.

COSTA EC, MOREIRA AF, DE MELO-DIOGO D, GASPAR VM, CARVALHO MP, CORREIA IJ. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. **Biotechnol Adv**. 2016 Dec;34(8):1427-1441. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.11.002. Epub 2016 Nov 11. PMID: 27845258.

COSTA MC; BARROS, APDN; LOUBACK, RA; ROSSI, MID. Modelos tridimensionais de cultura de células: aproximando o in vitro do in vivo. **Vigil Sanit Debate**. Rio de Janeiro, "Rio de Janeiro, Brasil", v. 6, n. 1, p. 72–83, 2018. DOI: 10.22239/2317-269X.01047. Disponível em: <https://visaemdebate.incqs.fiocruz.br/index.php/visaemdebate/article/view/1047>. Acesso em: 22 set. 2023.

DILLER RB, TABOR AJ. The Role of the Extracellular Matrix (ECM) in Wound Healing: A Review. **Biomimetics**. 2022; 7(3):87. <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030087>



DUVAL K, GROVER H, HAN LH, MOU Y, PEGORARO AF, FREDBERG J, CHEN Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. **Physiology (Bethesda)**. 2017 Jul;32(4):266-277. doi: 10.1152/physiol.00036.2016.

EDWARDS VL, MCCOMB E, GLEGHORN JP, FORNEY L, BAVOIL PM, RAVEL J. Three-dimensional models of the cervicovaginal epithelia to study host-microbiome interactions and sexually transmitted infections. **Pathog Dis**. 2022 Aug 27;80(1):ftac026. doi: 10.1093/femspd/ftac026.

FITZGERALD KA, MALHOTRA M, CURTIN CM, O' BRIEN FJ, O' DRISCOLL CM. Life in 3D is never flat: 3D models to optimise drug delivery. **J Control Release**. 2015 Oct 10;215:39-54. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.07.020. Epub 2015 Jul 26. PMID: 26220617.

FONTOURA JC, VIEZZER C, DOS SANTOS FG, LIGABUE RA, WEINLICH R, PUGA RD, ANTONOW D, SEVERINO P, BONORINO C. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. 2020 Feb;107:110264. doi: 10.1016/j.msec.2019.110264.

GANJIBAKHSH M, MEHRAEIN F, KORUJI M, AFLATOONIAN R, FARZANEH P. Three-dimensional decellularized amnion membrane scaffold as a novel tool for cancer research; cell behavior, drug resistance and cancer stem cell content. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. 2019 Jul;100:330-340. doi: 10.1016/j.msec.2019.02.090.

GOPALAKRISHNAN S, GUPTA A, MATUWANA D, AMANTE JJ, KEARNEY CJ, ROTELLO VM. In vitro cell culture models for ultrasound treatments using collagen-based scaffolds. **MethodsX**. 2022 Nov 4;9:101909. doi: 10.1016/j.mex.2022.101909. PMID: 36385920; PMCID: PMC9661430

HARB A, FAKHREDDINE M, ZARAKET H, SALEH FA. Three-Dimensional Cell Culture Models to Study Respiratory Virus Infections Including COVID-19. **Biomimetics (Basel)**. 2021 Dec 25;7(1):3. doi: 10.3390/biomimetics7010003. PMID: 35076456; PMCID: PMC8788432.

MARQUES IA, FERNANDES C, TAVARES NT, PIRES AS, ABRANTES AM, BOTELHO MF. Magnetic-Based Human Tissue 3D Cell Culture: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022; 23(20):12681. <https://doi.org/10.3390/ijms232012681>

OLIVEIRA M, CONCEIÇÃO P, KANT K, AINLA A, DIÉGUEZ L. Electrochemical Sensing in 3D Cell Culture Models: New Tools for Developing Better Cancer Diagnostics and Treatments. **Cancers (Basel)**. 2021 Mar 18;13(6):1381. doi: 10.3390/cancers13061381. PMID: 33803738; PMCID: PMC8003119.

SAKALEM ME, DE SIBIO MT, DA COSTA FADS, DE OLIVEIRA M. Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine. **Biotechnol J**. 2021 May;16(5):e2000463. doi: 10.1002/biot.202000463. Epub 2021.

SÁNCHEZ-ROMERO N, SCHOPHUIZEN CM, GIMÉNEZ I, MASEREEUW R. In vitro systems to study nephrotoxicology: 2D versus 3D models. **Eur J Pharmacol**. 2016 Nov 5;790:36-45. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.07.010. Epub 2016 Jul 7. PMID: 27395797.

SHAH, D.D., RAGHANI, N.R., CHORAWALA, M.R. et al. Harnessing threedimensional (3D) cell culture models for pulmonary infections: State of the art and future directions. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** (2023). doi: 10.1007/s00210-023-02541-2.



SHYAM R, REDDY LVK, PALANIAPPAN A. Fabrication and Characterization Techniques of In Vitro 3D Tissue Models. **International Journal of Molecular Sciences**. 2023; 24(3):1912. <https://doi.org/10.3390/ijms24031912>

SILVA, D.K.F; DONATO, M.K; GONÇALVES, J.C.R. Tipos de culturas celulares. In: GONÇALVES, J.C.R; SOBRAL, M.V(Org.). **Cultivo de células da teoria a bancada**. João Pessoa: UFPB; 2020.p. 20-32.

SILVA, D.K.F; GOUVEIA, G.R; DONATO, M.K. Fundamento do cultivo de células. In: GONÇALVES, J.C.R; SOBRAL, M.V(Org.). **Cultivo de células da teoria a bancada**. João Pessoa: UFPB; 2020.p.10-19.

TUVESON D, CLEVERS H. Cancer modeling meets human organoid technology. **Science**. 2019 Jun 7;364(6444):952-955. doi: 10.1126/science.aaw6985.

VANTANGOLI MM, WILSON S, MADNICK SJ, HUSE SM, BOEKELHEIDE K. Morphologic effects of estrogen stimulation on 3D MCF-7 microtissues. **Toxicol Lett**. 2016 Apr 25;248:1-8. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.02.012.



Capítulo 02

DOI: 10.53934/20242-02

CRITÉRIOS DE QUALIDADE PARA AVALIAÇÃO DE DOSES FLEXÍVEIS EM COMPRIMIDOS E MEDICAMENTOS LÍQUIDOS

Amy Alves Furquim¹; Jaqueline Kalleian Eserian²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CMCS/NFQM – IAL;
E-mail: amyalves2@gmail.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos – CMCS/NFQM – IAL

Resumo: Comprimidos divididos ou medicamentos líquidos são utilizados principalmente com fins de obtenção de doses flexíveis. O objetivo deste estudo foi discutir sobre os meios de obtenção de doses flexíveis e seus critérios de qualidade vigentes. Foi realizado um levantamento sobre os métodos e especificações para avaliação da qualidade de doses flexíveis obtidas por meio da subdivisão de comprimidos e acessórios para administração de formas líquidas. Com base nas Farmacopeias Brasileira, Americana e Europeia foi realizada uma pesquisa bibliográfica utilizando dados científicos e legislação nacional e internacional. Existem alguns riscos relacionados com a prática de dividir comprimidos e medir os medicamentos líquidos com acessórios, principalmente a variação nas doses, o que pode ocasionar uma dosagem subterapêutica e/ou até superdosagens. O levantamento bibliográfico realizado neste estudo mostrou que ainda são poucos os critérios para avaliação da qualidade de doses flexíveis. Além disso, quando existentes, os critérios focam em sua maioria em ensaios que envolvem apenas determinação de peso, e não determinação do conteúdo de substância ativa de forma específica. Desta forma, faz-se necessária a indicação de ensaios e critérios mais detalhados para a avaliação da qualidade de doses flexíveis por parte dos órgãos oficiais.

Palavras-chave: controle de qualidade; divisão de comprimidos; doses flexíveis; medicamentos líquidos.

INTRODUÇÃO

Existem vários tipos de formas farmacêuticas fabricadas na indústria como as sólidas (comprimidos, cápsulas), líquidas (xaropes, suspensões), semissólidas (pomadas), spray, entre outras. A forma farmacêutica é o estado final do medicamento, ou seja, é a forma como este se apresenta para administração, em que passa por uma ou mais operações farmacêuticas, podendo ou não existir a adição de excipientes apropriados. Esta diversidade de formas farmacêuticas tem por objetivo alcançar todos os tipos de público e obter o efeito terapêutico desejado para os pacientes (ANVISA, 2011).

Os comprimidos são formas farmacêuticas sólidas contendo uma dose única de um ou mais princípio ativo, com ou sem excipientes, obtidas pela compressão de volumes uniformes de partículas, podendo ser revestidos ou não. Possuem uma ampla variedade de tamanhos e formatos, podendo apresentar marcações na superfície (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

A divisão de comprimidos é uma prática bem comum entre pacientes e enfermeiros, principalmente em tratamentos com crianças e idosos. Essa prática é frequentemente



realizada para ajustar a dose, facilitar a ingestão do medicamento ou para economizar o custo do tratamento (TEIXEIRA *et al.*, 2016).

As formas farmacêuticas líquidas são apresentadas como suspensão, solução e xarope. Essas formas apresentam algumas vantagens, como por exemplo, a administração da dosagem em pacientes pediátricos e idosos que não têm capacidade de deglutir comprimidos ou que estão internados. Podem ser administradas em doses únicas ou múltiplas, sendo necessária a utilização de um dispositivo adequado (acessório) para medir o volume corretamente (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

Existem muitos problemas relacionados a erros de medicação, ineficácia terapêutica e intoxicação com a administração de comprimidos divididos e de medicamentos líquidos dispensados com acessórios (gotejadores, copos medida, seringas dosadoras). No entanto, não há critérios de qualidade em compêndios oficiais (farmacopeias) para a avaliação desses acessórios, apenas o ensaio de gotejamento na Farmacopeia Brasileira.

Desta forma, o objetivo deste estudo é discutir sobre os meios de obtenção de doses flexíveis (utilização de acessórios para medicamentos líquidos e divisão de comprimidos) e seus critérios de qualidade vigentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um levantamento sobre a situação de métodos e especificações oficiais para avaliação da qualidade de comprimidos e doses flexíveis obtidas por meio da subdivisão de comprimidos (manual, mecânica/cortador e mecânica/faca) e de acessórios para administração de formas líquidas (gotejador em vidro, gotejador em PVC, copo medida e seringa dosadora).

Os seguintes compêndios oficiais vigentes foram analisados: Farmacopeias Brasileira, Americana e Europeia.

O levantamento contou também com busca ativa na legislação brasileira, por meio eletrônico no Sistema de Legislação da Saúde (SLEGIS), (<http://saudelegis.saude.gov.br/saudelegis/secure/norma/listPublic.xhtml>) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (<https://www.gov.br/anvisa/pt-br>) e na legislação americana, por meio eletrônico no *U.S. Food & Drug Administration* (<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents>).

Além disso, foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados *Scielo*, *Lilacs* e *Pubmed* com os seguintes descritores nos idiomas português e inglês: “divisão de comprimidos”, “partição de comprimidos”, “cortadores de comprimidos”, “acessórios para administração de formulações líquidas”, “gotejador em vidro”, “gotejador em PVC”, “copo medida” e “seringa dosadora”, isolados e em combinação, por meio dos operadores booleanos AND e OR.

O título e o resumo das publicações foram analisados. Como critério de inclusão serão recuperados artigos originais, artigos de revisão, relatos de caso, cartas ao editor e notas científicas diretamente relacionados ao tema, nos idiomas português e inglês, delimitados ao período dos últimos 10 anos (2012 a 2022). As publicações que não tratassem do tema proposto, publicadas em outro idioma que não seja português e inglês e fora do período delimitado foram excluídas.

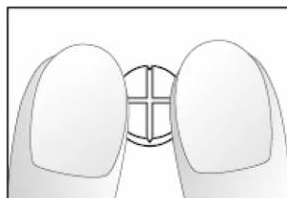
RESULTADOS E DISCUSSÃO



Existem muitas formas de se dividir comprimidos ao meio (Figura 1). No entanto, observam-se alguns riscos relacionados com a prática de dividir comprimidos, como por exemplo, a variação na dose, pois ao partir o comprimido ao meio, além de ser uma prática difícil a certos pacientes, pode ocorrer o esfarelamento ocorrendo uma imprecisão na dose ao ser administrada, fazendo com que o paciente não obtenha a quantidade exata do medicamento (TEIXEIRA *et al.*, 2016).



Cortador de comprimidos



Manual



Faca caseira

Figura 1 - Métodos de divisão de comprimidos.

Fonte: www.ortoponto.com.br, www.consultaremedios.com.br.

O FDA disponibilizou alguns documentos contendo informações e orientações para pacientes, profissionais da saúde e indústria sobre a prática de divisão de comprimidos (FDA, 2013). Algumas recomendações citadas em um dos seus documentos são sobre a possibilidade do paciente ou profissional de realizar a divisão de comprimido. Se o FDA aprovar um comprimido para ser dividido, essa informação deve constar tanto na bula do paciente quanto na bula do profissional, e o comprimido deve ser marcado indicando onde pode dividi-lo (FDA, 2013). Recomendam que o melhor método para divisão é por meio da utilização de um divisor de comprimidos. Como critério, as porções devem cumprir o estipulado no ensaio de uniformidade de doses unitárias para comprimidos inteiros, podendo apresentar perda de massa no máximo em até 3% do peso do comprimido inteiro (FDA, 2013).

Ainda não existem documentos regulatórios para a divisão de comprimidos na Farmacopeia Brasileira. Esta dispõe apenas de critérios para comprimidos inteiros relacionados à uniformidade de peso e de conteúdo.

A Farmacopeia Americana publicou em 2009 apenas um artigo em um fórum sobre a divisão de comprimidos. Atualmente, conta com um capítulo sobre atributos de qualidade de comprimidos que apresentam vinco funcional. É indicada a realização do teste de determinação de peso, no qual apenas 1 porção do comprimido dividido pode estar fora do limite de 75 a 125% do peso teórico para a porção. As porções devem passar também pelo teste de dissolução, devendo liberar quantidade de substância ativa de acordo com as monografias individuais para cada produto (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2023).

Já a Farmacopeia Europeia apresenta um capítulo sobre uniformidade de peso para comprimidos divididos. O compêndio indica para que os comprimidos sejam divididos com as mãos e que as porções sejam pesadas, sendo que não mais de uma porção deve estar fora do limite de 85 a 115% e nenhuma fora do limite de 75 a 125% do peso médio das porções (EUROPEAN PHARMACOPEIA COMMISSION, 2008).



Os medicamentos de uso oral na forma líquida são prescritos para pacientes adultos e pediátricos que possuem dificuldades de engolir cápsulas ou comprimidos, possibilitando a obtenção de doses individualizadas (RUY & LEE, 2012). Para a administração de medicamentos líquidos utilizam-se acessórios (Figura 2) que tem como finalidade medir as doses e executar a administração do medicamento ao paciente (ANVISA, 2011).

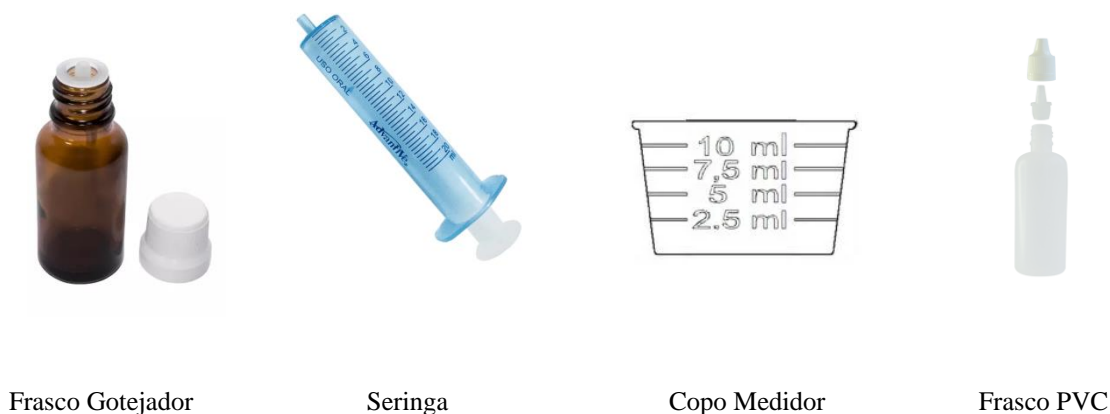


Figura 2 - Acessórios para administração de medicamentos líquidos.

Fonte: www.nobbli.com.br, www.consultaremedios.com.br, www.lojapiresempalagens.com.br/, www.casadopaciente.com.br.

Existem muitos erros de dosagens de administração de medicamentos líquidos, principalmente em crianças e idosos utilizando acessórios, o que pode gerar consideravelmente erros de dosagens, como, a falta de efeito terapêutico e a superdosagem (RUY & LEE, 2012). O FDA em 2011, publicou um Guia com recomendações e orientações relacionadas aos dispositivos utilizados para a administração de medicamentos líquidos de uso oral. Esses medicamentos devem ser acompanhados de acessórios para a administração das doses, os quais devem ter as unidades de medidas calibradas, cuja essas sejam as mesmas unidades apresentadas na embalagem externa. Os dispositivos não devem conter marcações de medição estranhas ou que cause confusão, entre outras orientações (FDA, 2011).

A Farmacopeia Americana apresentava um capítulo específico para a colher de medida, o qual recomendava a utilização de seringas dosadoras ou gotejadores quando houvesse necessidade de administração de doses exatas, mas este capítulo foi excluído do compêndio (UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2006).

A Farmacopeia Europeia apresenta um teste para avaliação de doses de medicamentos líquidos. O teste envolve determinação do peso individual das doses e comparação com seu peso médio, sendo que não mais que duas medidas individuais podem desviar mais de 10% e nenhuma mais de 20% do peso médio das doses (EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2008). Na Farmacopeia Brasileira, existe um capítulo para o teste de gotejamento, o qual determina a relação do número de gotas por mililitro e a quantidade de fármaco por gota em formas farmacêuticas líquidas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).



CONCLUSÃO

A prática de divisão de comprimidos e utilização de acessórios para a administração de medicamentos líquidos está associada a diversos problemas, podendo comprometer o tratamento farmacoterapêutico devido à variação das doses obtidas.

Algumas recomendações são disponibilizadas pelos documentos avaliados, como utilização de cortadores de comprimidos para a divisão de comprimidos e de seringas dosadoras ou gotejadores quando houver necessidade de administração de doses exatas de medicamentos líquidos.

O levantamento bibliográfico realizado neste estudo mostrou que ainda são poucos os critérios para avaliação da qualidade de doses flexíveis. Além disso, quando existentes, os critérios focam em sua maioria em ensaios que envolvem apenas determinação de peso, e não determinação do conteúdo de substância ativa de forma específica. Desta forma, se faz necessária a indicação de ensaios e critérios mais detalhados para a avaliação da qualidade de doses flexíveis por parte dos órgãos oficiais.

REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Vocabulário controlado de formas farmacêuticas, vias de administração e embalagens de medicamentos. 1ª ed. 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/vocabulario-controlado.pdf/@@download/file>. Acesso em 04 set 2023.
- European Pharmacopoeia Commission. Monograph 0478. Tablets. European Pharmacopoeia Supplement (Suppl. 64). Strasbourg: Council of Europe; 2008.
- Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 6ª ed. Brasília: Anvisa; 2019.
- Food and Drug Administration - FDA. Guidance for Industry Dosage Delivery Devices for Orally Ingested OTC Liquid Drug Products; 2011. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM188992.pdf>. Acesso 04 set 2023.
- Food and Drug Administration - FDA. Guidance for Industry Tablet Scoring: Nomenclature, Labeling, and Data for Evaluation; 2013. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM269921.pdf>. Acesso 04 set 2023.
- RYU GS, LEE YJ. Analysis of liquid medication dose errors made by patients and caregivers using alternative measuring devices. **J Manag Care Pharm.** 18, 6, 439-445, 2012.
- TEIXEIRA MT, SÁ-BARRETO LCL, SILVA DLM, CUNHA-FILHO MSS. Panorama dos aspectos regulatórios que norteiam a partição de comprimidos. **Rev Panam Salud Publica.** 39, 6, 372-377, 2016.
- United States Pharmacopoeia. US Pharmacopoeial Convention. Rockville: US Pharmacopoeial Convention; 2006.
- United States Pharmacopoeia. US Pharmacopoeial Convention. Rockville: US Pharmacopoeial Convention; 2023.



Capítulo 03

DOI: 10.53934/20242-03

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS DE MENINGITE BACTERIANA NO ESTADO DE SÃO PAULO ENTRE 2017 E 2022

Marcos Fernando Sobrinho¹; Tatiane Ferreira Petroni²; Matheus Janeck Araujo³

¹Estudante do Curso de Especialização do Instituto Adolfo Lutz - CLR – Araçatuba; E-mail: marcos.fernando.sobrinho@gmail.com

²Docente do Curso de Especialização do Instituto Adolfo Lutz- CLR – Araçatuba; E-mail: tatiane.petroni@ial.sp.gov.br

³Biomédico do Instituto Adolfo Lutz - CLR – Araçatuba; E-mail: mathjaneck@hotmail.com

Resumo: A meningite é um quadro de inflamação grave das meninges, conjunto de membranas que revestem o sistema nervoso central, em que circula o líquido. As meningites bacterianas (MB) possuem alto potencial de morbidade e mortalidade, sendo um problema para os sistemas de saúde. O objetivo desse trabalho é realizar o levantamento epidemiológico dos casos de MB notificados no estado de São Paulo de 2017 a 2022, identificando os principais gêneros bacterianos envolvidos, e descrevendo os dados epidemiológicos das MB. Foram tabulados e analisados dados públicos relacionados a casos de MB no estado de São Paulo no período de 2017 a 2022, a partir deles foi observada e discutida a ocorrência da doença. No estado de São Paulo, de 2017 a 2022, 8.346 casos de MB foram notificados, dos quais 50,5% foram de MB não especificada (n=4.211), 22,6% de meningite pneumocócica (n=1.887), 20,4% de meningite meningocócica associada ou não com meningococemia (n=1.705), 3,3% causada por *Mycobacterium tuberculosis* (n=275) e 3,2% por *Haemophilus influenzae* (n=268). O monitoramento constante dos casos de MB permite não somente prever um cenário futuro do perfil epidemiológico da doença, como também orientar quanto à adoção de estratégias para controle da MB.

Palavras-chave: diagnóstico laboratorial; vigilância epidemiológica; meningite bacteriana

INTRODUÇÃO

A meningite é definida como um quadro de inflamação grave das meninges, conjunto de membranas que revestem o sistema nervoso central (SNC), onde circula o líquido cefalorraquidiano, também chamado de líquido (AGUIAR et al., 2022). Pode ocorrer a partir de uma série de etiologias diferentes, como por exemplo, infecções por bactérias, vírus, fungos e micobactérias; entretanto as de etiologias viral e bacteriana são as mais prevalentes, respectivamente (AGUIAR et al., 2022; LIPHAUS et al., 2021; PUTZ et al., 2013).

As meningites bacterianas (MB) possuem um alto potencial de morbidade e mortalidade, sendo um problema significativo para os sistemas de saúde. Os principais agentes etiológicos relacionados à MB são *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo), *Neisseria meningitidis* (meningococo) e *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). A transmissão se dá principalmente de pessoa a pessoa, através de partículas expelidas pelas vias respiratórias, uma vez que essas bactérias podem colonizar a garganta ou a nasofaringe de indivíduos saudáveis (CALDAS & BEREZIN, 2020; LUCENA et al., 2021; MANTESE et al., 2002; ZUNT et al., 2018).



Apesar da forma como grande parte dos patógenos atravessa a barreira hematoencefálica e atinge as meninges ainda não ter sido totalmente elucidada, sabe-se que um estado de bacteremia aumenta as chances de haver essa passagem. Os mecanismos incluem a migração paracelular, que ocorre entre as junções das células endoteliais da barreira, a transcelular, que ocorre através do interior das células endoteliais e a migração que ocorre através de fagócitos infectados, conhecida como “Mecanismo de Cavalo de Tróia” (HECKENBERG et al., 2014; KIM, 2010).

Em adultos, há predomínio de MB por *S. pneumoniae* e *N. meningitidis*, enquanto em crianças há prevalência de *Streptococcus* do grupo B (*S. agalactiae*), *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Estudos sobre meningite neonatal apontam diversas espécies de bactérias ligadas à Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) isoladas de culturas de recém-nascidos, dentre elas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* (HECKENBERG et al., 2014; KREBS & TARICCO, 2004; LIPHAUS et al., 2018).

A MB aguda é considerada um quadro de emergência, exigindo tratamento médico imediato. O líquido é o material ideal para o diagnóstico, e a cultura dele é o método padrão ouro no diagnóstico de MB, por permitir a execução de testes de sensibilidade a antimicrobianos, biologia molecular, sorotipagem, e preservação do microrganismo. De modo paralelo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR ou PCR-TR) em tempo real é uma técnica molecular adotada pelo Instituto Adolfo Lutz, e demonstra ótimos resultados para o diagnóstico de MB, detectando simultaneamente (PCR *multiplex*): *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *N. meningitidis* (GONÇALVES et al., 2023; PUTZ et al., 2013; SALGADO et al., 2013; SCARPIN & PETRONI, 2023; TEIXEIRA et al., 2020).

O início imediato do tratamento em caso de suspeita de MB é recomendável mesmo que o diagnóstico ainda não esteja disponível, com os antibióticos escolhidos de maneira empírica. Medidas que previnam a dispersão de partículas respiratórias do paciente, como o uso de máscaras, têm sua adoção recomendada, visando minimizar a transmissão da doença. (ALAMARAT & HASBUN, 2020; HOFFMAN & WEBER, 2009; KIM, 2010).

Outra forma de prevenção é a vacinação, alguns exemplos são as vacinas contra Hib e a meningocócica C, e vacinas incluídas mais recentemente no calendário de vacinação da criança pelo Programa Nacional de Imunização, como a pneumocócica conjugada 10-valente (PCV10) e a vacina meningocócica ACWY conjugada (CRUZ et al., 2022; GRANDO et al., 2015; PARELLADA et al., 2023).

O objetivo desse trabalho foi realizar o levantamento epidemiológico dos casos de MB notificados no estado de São Paulo no período de 2017 a 2022, identificando os principais gêneros bacterianos envolvidos, e descrevendo os dados epidemiológicos relacionados à MB no que diz respeito à etiologia, sexo, faixa etária, critério de confirmação e mortalidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão bibliográfica narrativa de artigos científicos, entre 2018 e 2023, analisados através dos indexadores SCIELO – Scientific Electronic Library Online, 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, SEADE - Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados e do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) através do aplicativo Tabnet, com enfoque nos anos de 2017 a 2022. Os artigos foram pesquisados nos idiomas português e



inglês, conforme sugestões de termos da plataforma Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) foram utilizadas diferentes combinações dos seguintes descritores: “Meningite bacteriana”, “Epidemiologia”, “Diagnóstico laboratorial”, “Técnicas de Laboratório Clínico” e “Brasil”. Os artigos foram selecionados por meio da leitura de seus resumos e, em seguida, através da leitura dos artigos na íntegra. A tabulação e transformação de dados foi realizada utilizando o Microsoft Office Excel 2019.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados do DATASUS obtidos através do Tabnet, a MB no estado de São Paulo, entre os anos de 2017 a 2022, houve um total aproximado de 8.346 casos confirmados. Esse total contemplou dados cadastrados no DataSUS até o momento da consulta, em julho de 2023. Do total de casos de MB, 4.211 casos (50,5%) foram de etiologia bacteriana não especificada, 1.887 casos (22,6%) de meningite pneumocócica, 1.705 casos (20,4%) de meningite meningocócica isolada ou associada a meningococemia, 275 casos (3,3%) de meningite causada por complexo de *Mycobacterium tuberculosis* e 268 casos (3,2%) de meningite por *Haemophilus influenzae*. Essas proporções vão de acordo com o que é exposto pelo Ministério da Saúde em BRASIL (2022) ao avaliar os casos de meningite no Brasil durante o mesmo período.

As doenças meningocócicas são o segundo grupo mais prevalente das meningites com agente identificado, mas apenas 952 casos foram sorogrupo, sendo identificados os sorogrupos: C (n=447 casos), B (n=431), W135 (n=40), Y (n=31), X (n=2) e A (n=1); indo de acordo com os estudos como de PARIKH et al. (2020) e YU et al. (2023) dizem, sobre esses serem os seis grupos mais prevalentes, responsáveis por quase todos os casos de doença por *N. meningitidis*. O sorogrupo C lidera o número de casos e ao longo dos anos 2000 demonstrou potencial para causar surtos, como citam CRUZ et al. (2022), isso estimulou a implementação da vacina meningocócica C conjugada, e da vacina meningocócica ACWY conjugada no calendário vacinal do país, e como apontam FERRO et al. (2023), levando à redução no número de casos no Brasil e em outros países adeptos desse mesmo esquema vacinal.

Com relação ao perfil dos pacientes com MB, foi possível observar um predomínio do sexo masculino, com 4.729 casos (56,7%), contra 3.615 casos (43,3%) no feminino. Com relação à faixa etária, o maior número de casos de MB foi em pacientes de 40 a 59 anos, com 1.770 casos confirmados (21,2%); seguido da faixa de 20 a 39 anos, com 1.498 casos (17,9%). Houve 1.317 casos (15,8%) em pacientes menores que 1 ano; e por fim, na faixa de 1 a 4 anos houve 1.163 casos confirmados (13,9%). Se considerados juntos, os casos em crianças abaixo de 5 anos compõem a maioria, com aproximadamente 2.480 casos (29,7%). Segundo LUCENA et al. (2021), esse grupo é um dos mais atingidos pela meningite pneumocócica, isso também é observado por ALAMARAT e HASBUN (2020) no cenário global. A incidência de meningite por pneumococos apresentou quedas desde a introdução da PCV10, indo de acordo com o observado por PARELLADA et al. (2023) e YU et al. (2023). Em 2020 e 2021, houve uma queda expressiva, passando para um aumento em 2022 de volta a valores próximos dos anos anteriores, padrão esse que não foi exclusivo da meningite pneumocócica, e ocorreu em todas as etiologias de meningite.

A cultura das bactérias causadoras da MB foi método mais utilizado no estado de São Paulo como critério de confirmação (30,6% dos casos), demonstrando um cenário positivo, já que é o método de diagnóstico padrão ouro. O exame quimiocitológico foi o segundo método mais realizado (29,2%), e a técnica de PCR o terceiro mais comum (23,7%), que



apesar de ser uma técnica de custo mais elevado e não disponível em todos os laboratórios, tem como principal vantagem a rapidez nos resultados.

Esse cenário de diagnóstico pode se alterar bastante quando se analisa individualmente cada região do estado de São Paulo, SCARPIN e PETRONI (2023) observaram na área do Departamento Regional de Saúde de Araçatuba (DRS II), de 2017 a 2021, onde praticamente 90% dos casos foram de MB não especificada. Isso foi explicada como sendo potencialmente causado pelo exame quimiocitológico ter sido o método de diagnóstico prevalente na DRS II (mais de 75% dos resultados), não sendo possível realizar a identificação bacteriana através desse método. Esses fatos podem ajudar a explicar por que mais da metade dos casos no estado (50,5%) são de MB não especificada, e porque a sorotipagem foi feita em apenas pouco mais da metade dos diagnósticos de doença meningocócica (952 de 1.705 casos).

Por outro lado, TEIXEIRA et al. (2020) destacam que a ocorrência de diagnósticos tardios de MB, seja por sinais clínicos inespecíficos, atrasos em exames ou pouco tempo para diagnóstico, aumentam as taxas de morbidade e mortalidade da doença. Dessa forma, quanto ao desfecho clínico, a maioria dos casos de MB no período de 2017 a 2022 evoluiu para alta hospitalar, 5.288 casos (63,4%), enquanto 1.621 casos (19,4%) evoluíram para óbito em decorrência da meningite. O ano de 2022 foi, proporcionalmente, o ano com maior número de casos que evoluíram para mortes por meningite, com 315 casos (22,2% dos casos daquele ano), indo de acordo com o que citam FERRO et al. (2023), sobre as ainda altas taxas de mortalidade da doença no Brasil.

É válido citar que dados referentes a casos de morbidade da MB são escassos, uma vez que não existem ações nem programas específicos de vigilância para acompanhamento dos pacientes após a alta hospitalar. Tendo isso em mente, e falando da prevalência de meningite pneumocócica, PARELLADA et al. (2023) indicam que a troca do sorotipo predominante de um local é uma tendência mundial, que pode ser afetada pelos sorotipos cobertos no esquema vacinal que estiver em vigor. Desta forma, é importante o monitoramento dos sorotipos circulantes, e a implementação de vacinas para estes novos grupos.

CONCLUSÕES

A maioria dos casos com etiologia confirmada envolvem os três agentes principais citados pela literatura, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*, mas não é possível ignorar o fato de pouco mais da metade dos casos de MB no estado serem de etiologia não especificada, pois impactam no conhecimento dos reais agentes etiológicos envolvidos nos casos de MB. Estudos constantes sobre a epidemiologia das MB são importantes não somente para prever padrões futuros, mas também para ajudar a difundir conhecimento a respeito dessa doença, além de auxiliar na implementação de métodos diagnósticos atualizados e medidas de controle da doença.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, T. S. et al. Epidemiological profile of meningitis in Brazil, based on data from DataSUS in the years 2020 and 2021. **Research, Society and Development**, 11, n. 3, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i3.27016>. Acesso em: 02 ago. 2023.



ALAMARAT, Z.; HASBUN, R. Management of Acute Bacterial Meningitis in Children. **Infect Drug Resist**, 13, p. 4077-4089, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S240162>. Acesso em: 09 out. 2023.

BRASIL, M. D. S. Situação Epidemiológica das Meningites no Brasil. **Ministério da Saúde**, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/meningite/publicacoes/situacao-epidemiologica-das-meningites-no-brasil-2022.pdf/view>. Acesso em: 13 set. 2023.

CALDAS, M. L. L. D. S.; BEREZIN, E. N. Epidemiology of meningitis in children in a Brazilian northeastern state. **Research, Society and Development**, 9, n. 9, p. e570997553, 08/30 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7553>. Acesso em: 20 out. 2023.

CRUZ, M. C.; CAMARGOS, P.; NASCIMENTO-CARVALHO, C. M. Impact of meningococcal C conjugate vaccine on incidence of invasive meningococcal disease in an 18-year time series in Brazil and in distinct Brazilian regions. **Trop Med Int Health**, 27, n. 3, p. 280-289, Mar 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/tmi.13718>. Acesso em: 28 set. 2023.

FERRO, M.; SOUZA, C.; ANDRADE, K.; MAIA, I. Análise epidemiológica da meningite meningocócica no Brasil. **Research, Society and Development**, 12, p. e6012139408, Jan. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v12i1.39408>. Acesso em: 11 set. 2023.

GONÇALVES, M. G. *et al.* Avaliação de kits comerciais baseados em PCR multiplex em tempo real para diagnóstico de meningite bacteriana. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, 20, p. 1-18, 05/12 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.57148/bepa.2023.v.20.39209>. Acesso em: 26 set. 2023.

GRANDO, I. M. *et al.* Impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis in children up to two years of age in Brazil. **Cad Saude Publica**, 31, n. 2, p. 276-284, Fev 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00169913>. Acesso em: 15 ago. 2023.

HECKENBERG, S. G.; BROUWER, M. C.; VAN DE BEEK, D. Bacterial meningitis. **Handb Clin Neurol**, 121, p. 1361-1375, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7020-4088-7.00093-6>. Acesso em: 28 jul. 2023.

HOFFMAN, O.; WEBER, R. J. Pathophysiology and treatment of bacterial meningitis. **Ther Adv Neurol Disord**, 2, n. 6, p. 1-7, Nov 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1177/1756285609337975>. Acesso em: 19 jul. 2023.

KIM, K. S. Acute bacterial meningitis in infants and children. **Lancet Infect Dis**, 10, n. 1, p. 32-42, Jan 2010. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70306-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70306-8). Acesso em: 05 ago. 2023.

KREBS, V. L.; TARICCO, L. D. [Risk factors for bacterial meningitis in the newborn]. **Arq Neuropsiquiatr**, 62, n. 3A, p. 630-634, Set 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-282x2004000400012>. Acesso em: 20 jul. 2023.



LIPHAUS, B. *et al.* Meningite: O que precisamos saber? **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, 15, n. 178, p. 23-32, 11/30 2018. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/37936>. Acesso em: 10 set. 2023.

LIPHAUS, B. L. *et al.* Meningites Virais: Diagnóstico e Caracterização Laboratorial dos Agentes Etiológicos. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, 18, n. 214, p. 58-66, 11/08 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.57148/bepa.2021.v.18.37207>. Acesso em: 11 set. 2023.

LUCENA, A. R. F. P. *et al.* Panorama da meningite pneumocócica no Brasil, 2007-2020. **Boletim Epidemiológico [Internet]**, Vol. 52, n. N° 25, p. 21-34, 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: 13 out. 2023.

MANTESE, O. C. *et al.* [Etiological profile of bacterial meningitis in children]. **J Pediatr (Rio J)**, 78, n. 6, p. 467-474, Nov-Dez 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572002000600005>. Acesso em: 02 ago. 2023.

PARELLADA, C. I. *et al.* Trends in Pneumococcal and Bacterial Meningitis in Brazil from 2007 to 2019. **Vaccines (Basel)**, 11, n. 8, Jul 25 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines11081279>. Acesso em: 12 out. 2023.

PARIKH, S. R. *et al.* The everchanging epidemiology of meningococcal disease worldwide and the potential for prevention through vaccination. **J Infect**, 81, n. 4, p. 483-498, Out 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.079>. Acesso em: 26 ago. 2023.

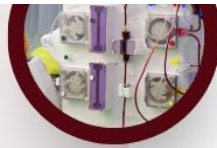
PUTZ, K.; HAYANI, K.; ZAR, F. A. Meningitis. **Prim Care**, 40, n. 3, p. 707-726, Set 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pop.2013.06.001>. Acesso em: 14 jul. 2023.

SALGADO, M. M. *et al.* Evolution of bacterial meningitis diagnosis in Sao Paulo State-Brazil and future challenges. **Arq Neuropsiquiatr**, 71, n. 9B, p. 672-676, Sep 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0004-282X20130148>. Acesso em: 25 ago. 2023.

SCARPIN, G. B. S.; PETRONI, T. F. 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. **Livro Da IV Mostra Dos Trabalhos De Conclusão De Curso Da Especialização Em Vigilância Laboratorial Em Saúde Pública - Agron Science**, p. 250-256, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.53934/9786599965821-38>. Acesso em: 04 set. 2023.

TEIXEIRA, D. C. *et al.* Risk factors associated with the outcomes of pediatric bacterial meningitis: a systematic review. **J Pediatr (Rio J)**, 96, n. 2, p. 159-167, Mar-Abr 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2019.07.003>. Acesso em: 15 ago. 2023.

YU, A. L. F. *et al.* Vigilância e controle de doenças de transmissão respiratória. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, 20, n. 220, p. 1-56, 04/01 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.57148/bepa.2022.v.19.37882>. Acesso em: 09 out. 2023.



ZUNT, J. R. *et al.* Global, regional, and national burden of meningitis, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Neurol**, 17, n. 12, p. 1061-1082, Dec 2018. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30387-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30387-9). Acesso em: 15 set. 2023.



Capítulo 04

DOI: 10.53934/20242-04

PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA EM *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE LEITE PASTEURIZADO INTEGRAL

Adriana Fiorussi Higino¹ Christiane Asturiano Ristori², Ruth Estela Gravato Rowlands², Cecília Geraldês Martins²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – IAL/CALI/NMA; E-mail: ahigino@alumni.usp.br

²¹ Pesquisador do Núcleo de Microbiologia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, CEP: 01246-000. E-mail: cecilia.martins@ial.sp.gov.br

Resumo

O leite de vaca é um produto de importância econômica e um dos alimentos mais completos em termos nutricionais, fundamental para a dieta humana. Pela mesma razão, constitui um excelente substrato para o desenvolvimento de uma grande diversidade de microrganismos patogênicos. A maioria das cepas de *E. coli* são comensais, contudo, algumas descritas como *E. coli* diarreio gênicas, apresentam fatores de virulência que podem causar doenças intestinais e extra intestinais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e pesquisar os genes de virulência em *Escherichia coli* isoladas de amostras de leite pasteurizado integral coletadas no período de setembro de 2010 a dezembro de 2012, no estado de São Paulo. Foram analisadas 609 amostras de leite pasteurizado integral provenientes de 17 usinas de beneficiamento do Estado de São Paulo. As análises microbiológicas realizadas foram: Determinação do Número Mais Provável de Coliformes Totais e Termotolerantes e Pesquisa de *Salmonella* spp. Os genes de virulência pesquisados foram *stx1*, *eae*, *stx2*, *hly*, *st*, *aggR*, *lt*, *ipaH* e *bfp*. Do total de amostras analisadas, 26 estavam em desacordo com a RDC n°12, 02/01/2001, por conter coliformes termotolerantes. *Salmonella* spp não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Das 609 amostras pesquisadas, 3,9% foram positivas para *E. coli* e não foram detectados os genes de virulência em nenhuma cepa. O constante monitoramento do leite pasteurizado é fundamental para a avaliação da qualidade do produto ofertado à população e a busca ativa de *E. coli* diarreio gênicas com relevante impacto para a Saúde Pública.

Palavras-chave: leite; qualidade dos alimentos; fatores de virulência; *Escherichia coli*

Introdução

O leite de vaca é um produto importante para a economia brasileira, sobretudo devido ao país figurar entre os maiores do mundo em produtividade, além de compor rotineiramente a dieta no Brasil, sendo ingerido puro e/ou em preparações culinárias. (CONCEIÇÃO *et al.*, 2018; BALBINOTTI *et al.*, 2021; MULLER *et al.*, 2022; EMBRAPA, 2023a; EMBRAPA, 2023b). A qualidade microbiológica do leite, bem como o controle higiênico-sanitário de toda a cadeia produtiva, são estratégias para a sanidade do produto ofertado, especialmente por se tratar de uma matriz alimentar altamente nutritiva com elevado potencial de contaminação por microrganismos patogênicos e de risco de veiculação de doenças



transmitidas por alimentos (DTA) (CONCEIÇÃO *et al.*, 2018; SILVA TEIXEIRA e ANDRADE FIGUEIREDO, 2018; BALBINOTTI *et al.*, 2021; PEIXOTO *et al.*, 2022).

Algumas cepas de *E. coli* são patógenos relevantes para a saúde pública, responsáveis por ocasionar quadros diarreicos e a síndrome hemolítica urêmica (SHU) em humanos, entre outras manifestações clínicas (DENAMUR *et al.*, 2021; GOMES *et al.*, 2021). As cepas patogênicas são classificadas como diarreio gênicas e divididas em seis patotipos: enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), produtora de toxina Shiga (STEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) e enteroinvasora (EIEC), diferenciados, particularmente, pelos fatores de virulência e o quadro clínico a eles associados (BENDARY *et al.*, 2022; GEURTSSEN *et al.*, 2022; KOLODZIEJEK *et al.*, 2022). Os aparatos de virulência são responsáveis por ditar os mecanismos de patogenidade das cepas, apresentando distintas ações pelas quais ocorre a interação com as células do hospedeiro, como, entre outras, por adesão, invasão e ancoragem (JIANG *et al.*, 2021; BENDARY *et al.*, 2022).

Portanto o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e pesquisar os genes de virulência *stx1*, *eae*, *stx2*, *hly*, *st*, *aggR*, *lt*, *ipaH* e *bfp* em *Escherichia coli* isoladas de amostras de leite pasteurizado integral coletadas no período de setembro de 2010 a dezembro de 2012, no estado de São Paulo.

Material e Métodos

As análises microbiológicas realizadas foram Determinação do Número Mais Provável de Coliformes Totais e Termotolerantes e Pesquisa de *Salmonella* spp, segundo as metodologias descritas no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (KORNACHI e JOHNSON, 2001), em 609 amostras de leite pasteurizado integral, no período de setembro de 2010 a dezembro de 2012, provenientes de 17 usinas de beneficiamento do Estado de São Paulo. Positivaram para *E. coli* 3,9% (24/609) das amostras, dessas foram isoladas e analisadas 49 cepas, sendo pelo menos uma cepa proveniente de cada amostra positiva, com identificação bioquímica da espécie realizada por meio do IMVic (KORNACHI e JOHNSON, 2001). As cepas de *Escherichia coli* foram armazenadas em caldo infusão cérebro coração (BHI) com glicerol, mantidas a -20°C e reativadas em caldo BHI, incubadas a 35°C por 18-24h.

A extração do DNA foi realizada utilizando kit de extração QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, USA), seguindo as instruções do fabricante. Os extraídos de DNA foram armazenados a -20 °C e encaminhados para PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

A reação de PCR foi realizada com 25 µL de volume total. Para a reação multiplex dos genes *stx1*, *eae*, *stx2* e *hly* foram adicionados 12,5 µL de GoTaq® Master Mix [1,5 mM de MgCl₂ e 200 µM de cada dNTP, com pH 8,5] (Promega, EUA), 1,0 µL de cada *primer* (Invitrogen), 2,5 µL de água ultrapura livre de DNA e RNase (Invitrogen, EUA) e 2 µL da amostra de DNA extraído. Para controle positivo foi utilizado *E. coli* O157:H7 e para controle negativo água ultrapura livre de DNA e RNase (Invitrogen, EUA).

Para a reação duplex *st* e *aggR* foram adicionados 12,5 µL de GoTaq® Master Mix [1,5 mM de MgCl₂ e 200 µM de cada dNTP, com pH 8,5] (Promega, EUA), 1,0 µL de cada *primer* (Invitrogen), 6,5 µL de água ultrapura livre de DNA e RNase (Invitrogen, EUA) e 2 µL da amostra de DNA extraído. Para controle positivo foram utilizadas duas cepas, *E. coli* IAL ST/LT e *E. coli* IAL 2391, e para controle negativo água ultrapura livre de DNA e RNase (Invitrogen, EUA).

Para as reações simplex dos genes *lt*, *ipaH* e *bfp* foram adicionados 12,5 µL de GoTaq® Master Mix [1,5 mM de MgCl₂ e 200 µM de cada dNTP, com pH 8,5] (Promega,



EUA), 1,0 µL de cada *primer* (Invitrogen), 8,5 µL de água ultrapura livre de DNA e RNase (Invitrogen, EUA) e 2 µL da amostra de DNA extraído. Para controle positivo foi utilizado, respectivamente para os genes *lt*, *ipaH* e *bfp*, *E. coli* IAL 1893, *E. coli* IAL 307 (O124:K72), *E. coli* O127:k6 e para controle negativo água ultrapura livre de DNA e RNase (Invitrogen, EUA).

As amplificações foram realizadas em termociclador. A separação molecular foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2,0% em tampão TBE 1x e 1,0 µL de brometo de etídio. O peso padrão molecular utilizado foi de 100 pb (Promega, EUA). A eletroforese foi realizada a 120 V durante 60 minutos em cuba horizontal contendo TBE 1x e o gel foi visualizado em transiluminador de luz UV.

Resultados e Discussão

Do total de amostras analisadas, 4,3% (26/609) estavam em desacordo com a especificação regulatória vigente no período do estudo - RDC nº12, 02/01/2001 (BRASIL, 2001), por conter população de coliformes termotolerantes acima do limite tolerado de 4 NMP/mL e as amostras foram procedentes de 06 usinas de beneficiamento. Dentre as amostras analisadas, 64 (10,5%) apresentaram população de coliformes termotolerantes variando de $\geq 0,3$ a $\leq 4,0$ e 519 (85,22%) amostras apresentaram população inferior a 0,3 NMP/mL. *Salmonella* spp não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas.

Entre as 609 amostras pesquisadas, 3,9% (24/609) foram positivas para *E. coli* e destas apenas 07 amostras apresentaram população acima de 4 NMP/mL. Esses resultados podem indicar falhas na aplicação das Boas Práticas de Fabricação (exemplo: pasteurização), utilização de matéria-prima de baixa qualidade e falhas na cadeia do frio ao longo da produção e comercialização do produto.

Não foram detectados os genes de virulência pesquisados no presente estudo para as 49 cepas isoladas das amostras positivas. Vale salientar, no entanto, que esse resultado não expressa a possibilidade de abrandamento das medidas de controle da qualidade microbiológica do leite pasteurizado.

Em estudo realizado com leite pasteurizado por Amézquita-Montes e colaboradores (2015) em Cartagena, na Colômbia, foi observado a presença de coliformes em 48,7% das amostras analisadas, com confirmação de *E. coli* em 6,6%, contaminação relacionada a falhas pós-pasteurização ou ao tratamento térmico ineficiente.

Estudos conduzidos com pesquisa de fatores de virulência de *E. coli* em produtos lácteos pasteurizados têm demonstrado a detecção de genes em 0,5% a 6% das amostras, sendo mais citados os patótipos STEC e EPEC (ROSÁRIO *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2021; MADANI *et al.*, 2022). Rosário *et al.* (2021) observaram que 6% das amostras de diversos produtos lácteos apresentavam *E. coli* e 4% das amostras possuíam genes de virulência para o patótipo STEC. A ocorrência de surtos envolvendo produtos lácteos pasteurizados foi relatado por Jenkins *et al.* (2022) ocasionado por *E. coli* STEC O157:H7 na Inglaterra. Hirose *et al.* (2023) também relataram um surto no Japão de *E. coli* diarreiogênica atípica semelhante a *E. coli* STEC O157:H7. Ambos os surtos foram relacionados à contaminação cruzada durante o processo de pasteurização devido a problemas nos equipamentos, além de outras hipóteses como falhas higiênicas e temperatura térmica ineficiente.

Genes de virulência são menos incidentes em produtos lácteos pasteurizados quando comparados a produtos crus, que estão frequentemente relacionados ao risco e/ou surtos de doenças transmitidas por alimentos (ABRI *et al.*, 2019; RIBEIRO JÚNIOR *et al.*, 2019; JENKINS *et al.*, 2022; ZAREI AHMADY *et al.*, 2023). No entanto, ainda é imprescindível



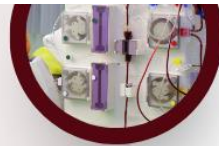
o monitoramento, as boas práticas de fabricação e a contenção de erros pós-pasteurização, sobretudo devido a diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos ao tratamento térmico.

Conclusão

Os resultados do presente estudo permitem concluir que o leite pasteurizado integral apresentou baixa frequência de contaminação por coliformes termotolerantes e *E. coli* e ausência dos genes de virulência pesquisados. Contudo, o constante monitoramento do leite pós-pasteurização é fundamental para a avaliação da qualidade do produto ofertado para a população, auxiliando no monitoramento contínuo da qualidade microbiológica do leite pasteurizado e na busca ativa de *E.coli* diarreio gênicas que podem apresentar fatores de virulência causadores de doenças com relevante impacto para a Saúde Pública.

Referências

- ABRI, R., JAVADI, A., ASGHARI, R., RAZAVILAR, V., SALEHI, T. Z., SAFAEEYAN, F., REZAEI, M. A. Surveillance for enterotoxigenic & enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from animal source foods in Northwest Iran. **The Indian journal of medical research**, v. 150, n. 1, p. 87–91, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2019_17>. Acesso em: 20 set. 2023.
- AMÉZQUITA-MONTES, Z., TAMBORSKI, M., KOPSOMBUT, U. G., ZHANG, C., ARZUZA, O. S., GÓMEZ-DUARTE, O. G. Genetic Relatedness Among *Escherichia coli* Pathotypes Isolated from Food Products for Human Consumption in Cartagena, Colombia. **Foodborne pathogens and disease**, v. 12, n. (5), p. 454–461, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1881>>. Acesso em: 22 set. 2023.
- BALBINOTTI, M. Z., DERETI, R. M., BARBOSA, R. S., BENDER, S. E., ALVARENGA, M. B., BARRETO, F., JUNIOR, W. S. **Programa Leite Seguro: segurança, qualidade e integridade de leite e produtos lácteos sul-brasileiros para alimentação saudável e proteção ao consumidor**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2021.
- BENDARY, M. M., ABD EL-HAMID, M. I., ALHOMRANI, M., ALAMRI, A. S., ELSHIMY, R., MOSBAH, R. A., BAHNASS, M. M., OMAR, N. N., AL-SANEA, M. M., ELMANAKHLY, A. R., BRAGA, E. E., LOPES, J. M. P., OLIVEIRA, K. S. S., MAIA, I. L. C. A., NASCIMENTO, J. S. Pesquisa de *Escherichia coli* e avaliação da produção qualitativa de biofilme em amostras de leite pasteurizado comercializado na cidade do Rio de Janeiro. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 3, n. 1, p. 54-64, 2022. Disponível em: <<https://revistascientificas.ifrj.edu.br/index.php/alimentos/article/view/2217>>. Acesso em: 10 ago. 2023.
- BRASIL. 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p.45-53. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html>. Acesso em: 11 ago. 2023.
- CONCEIÇÃO, G. L.; COIMBRA, V.C.S; BEZERRA, D. C.; BEZERRA, N. P. C. Caracterização da qualidade microbiológica de leite e derivados processados em indústrias maranhenses sob serviço de inspeção estadual. **Higiene alimentar**, v.32, n.284/285, 2018.



- DENAMUR, E., CLERMONT, O., BONACORSI, S., GORDON, D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews. Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 37–54, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41579-020-0416-x>>. Acesso em: 10 jul. 2023.
- EMBRAPA. **Anuário Leite 2023: leite baixo carbono**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023a. 118p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono>>. Acesso em: 03 jul. 2023.
- EMBRAPA. **Brasil em 50 alimentos**. Brasília, DF: Embrapa Semiárido, 2023b. 359 p. ISBN 978-65-89957-68-3. Disponível: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1153294/brasil-em-50-alimentos>>. Acesso em: 03 jul. 2023.
- GEURTSSEN, J., DE BEEN, M., WEERDENBURG, E., ZOMER, A., MCNALLY, A., POOLMAN, J. Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. **FEMS microbiology reviews**, v. 46, n. 6, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/femsre/fuac031>>. Acesso em: 18 jul. 2023.
- GOMES, T. A. T., DOBRINDT, U., FARFAN, M. J., PIAZZA, R. M. F. Editorial: Interaction of Pathogenic *Escherichia coli* With the Host: Pathogenomics, Virulence and Antibiotic Resistance. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.654283>>. Acesso em: 10 jul. 2023.
- HIROSE, S., OHYA, K., YOSHINARI, T., OHNISHI, T., MIZUKAMI, K., SUKUKI, T., TAKINAMI, K., SUZUKI, T., LEE, K. IYODA, S. Atypical diarrhoeagenic *Escherichia coli* in milk related to a large foodborne outbreak. **Epidemiology and Infection**, v. 151, 2023. Disponível em: <[doi:10.1017/S0950268823001395](https://doi.org/10.1017/S0950268823001395)>. Acesso em: 25 out. 2023.
- JENKINS, C., BIRD, P. K., WENSLEY, A., WILKINSON, J., AIRD, H., MACKINTOSH, A., GREIG, D. R., SIMPSON, A., BYRNE, L., WILKINSON, R., GODBOLE, G., ARUNACHALAM, N., HUGHES, G. J. Outbreak of STEC O157:H7 linked to a milk pasteurisation failure at a dairy farm in England, 2019. **Epidemiology and Infection**, v. 150, n. 114, 2022. Disponível: <<https://doi.org/10.1017/S0950268822000929>>. Acesso em: 19 set. 2023.
- JIANG, L., YANG, W., JIANG, X., YAO, T., WANG, L., YANG, B. (2021). Virulence-related O islands in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Gut microbes**, v. 13, n. 1, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1992237>>. Acesso em 31 jul. 2023.
- KOŁODZIEJEK, A. M., MINNICH, S. A., HOVDE, C. J. *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors and the ruminant reservoir. **Current opinion in infectious diseases**, v. 35, n. 3, p. 205–214, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000834>>. Acesso em: 18 jul. 2023.
- KORNACKI, J. L., JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: Downes, F. P. e Ito, K. (eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, American Public Health Association, Washington, DC, 4a edition, cap. 8: 69-82, 2001.
- MADANI, A., ESFANDIARI, Z., SHOAEI, P., ATAIEI, B. Evaluation of Virulence Factors, Antibiotic Resistance, and Biofilm Formation of *Escherichia coli* Isolated from Milk and Dairy Products in Isfahan, Iran. **Foods** (Basel, Switzerland), v. 11, n. 7, p. 960, 2022. Disponível: <<https://doi.org/10.3390/foods11070960>>. Acesso em: 19 set. 2023.
- MULLER, T., MACIEL, M. J., REMPEL, C. Qualidade físico-química e microbiológica do leite bovino do Vale do Taquari no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 23, 2022. Disponível em: <<https://revistas.ufg.br/vet/article/view/72986>>. Acesso em: 7 jul. 2023.



- PEIXOTO, M. G. C., CARVALHO, M. R. S., MAGALHÃES, V. M. A. **O leite bovino que produzimos e consumimos**. Brasília, DF: Embrapa, 2022. 28 p, 2022.
- RIBEIRO JÚNIOR, J. C., SILVA, F. F., LIMA, J. B. A., OSSUGUI, E. H., TEIDER JUNIOR, P. I., CAMPOS, A. C. L. P., NAVARRO, A., TAMANINI, R., RIBEIRO, J., ALFIERI, A. A., BELOTI, V. Short communication: Molecular characterization and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from raw milk and Minas Frescal cheeses in Brazil. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 12, p. 10850–10854, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2019-16732>>. Acesso em: 20 set. 2023.
- ROSÁRIO, A. I. L. S., CASTRO, V. S., SANTOS, L. F., LISBOA, R. C., VALLIM, D. C., SILVA, M. C. A., FIGUEIREDO, E. E. S., CONTE-JUNIOR, C. A., COSTA Costa, M. P. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from pasteurized dairy products from Bahia, Brazil. **Journal of dairy science**, v. 104, n. 6, p. 6535–6547, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3168/jds.2020-19511>>. Acesso em: 19 set. 2023.
- SILVA TEIXEIRA, C. M.; ANDRADE FIGUEIREDO, M. Qualidade microbiológica do leite bovino no Brasil associada a *Staphylococcus aureus*. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 6, n. 1, p. 196-216, 31 dez. 2018. Disponível: <<https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevCiVet/article/view/41172>>. Acesso em: 07 jul. 2023.
- WANG, S., YU, Z., WANG, J., HO, H., YANG, Y., FAN, R., DU, Q., JIANG, H., HAN, R. Prevalence, Drug Resistance, and Virulence Genes of Potential Pathogenic Bacteria in Pasteurized Milk of Chinese Fresh Milk Bar. **Journal of food protection**, v. 84, n.11, p. 1863–1867, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.4315/JFP-21-094>>. Acesso em: 19 set. 2023.
- ZAREI AHMADY, A. ALIYAN ALIABADI, R., AMIN, M., AMERI, A., ABBASI MONTAZERI, E. Occurrence of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes from raw milk and unpasteurized buttermilk by culture and multiplex polymerase chain reaction in southwest Iran. **Molecular biology reports**, v. 50, n. 4, p. 3661–3667, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11033-023-08261-3>>. Acesso em: 19 set. 2023.



Capítulo 05

DOI: 10.53934/20242-05

ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE ÁLCOOL EM GEL COMERCIALIZADAS NO CENÁRIO PÓS-PANDEMIA

Mariana Sbaraglini Garcia Silva¹; Fernanda Fernandes Farias²; Maria Cristina Santa Bárbara²; Ellen Gameiro Hilinski³

¹Aluno(a) do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública, CMCS, IAL – CEFOR;
E-mail: mariana.sbaraglini@outlook.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneantes – NFQC – IAL.

³Docente/pesquisador do Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança – NBS – IAL.

A pandemia por COVID-19 aumentou o consumo, procura e produção de álcool em gel no Brasil e no mundo devido à recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS). O álcool em gel, classificado como um cosmético grau II com atividade antimicrobiana, possui características que exigem comprovação de segurança e/ou eficácia para o registro obrigatório na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. No cenário global de emergência de saúde pública declarada pela OMS, medidas temporárias foram tomadas, dentre elas a liberação da produção de álcool em gel 70% (p/p) sem necessidade de notificação ou registro, com possíveis impactos na qualidade do produto. Seguindo os parâmetros definidos pela legislação, este trabalho analisou 11 amostras de álcool em gel fabricadas após o fim do estado de Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional, frente aos requisitos regulatórios físico-químicos e sua atividade bacteriostática. Das amostras avaliadas, 82% apresentaram resultado satisfatório para o teor alcoólico e/ou para avaliação da atividade bacteriostática frente aos microrganismos *S. aureus*; *E. coli*; *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa*. Não foram evidenciados resultados em desacordo com os padrões regulatórios para o ensaio de viscosidade. Comparado com trabalhos publicados durante o período de pandemia, foi possível evidenciar o impacto do monitoramento da qualidade e fiscalização dessa categoria de cosméticos com a volta da obrigatoriedade de registro e/ou notificação aos órgãos sanitários.

Palavras-chave: controle de qualidade; cosméticos; eficácia; etanol

INTRODUÇÃO

O consumo de álcool em gel ganhou destaque em 2020 devido à pandemia por SARS-Cov-2, com a recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para higienização das mãos com preparações alcoólicas contendo 70% (p/p) de álcool, em situações nas quais o acesso à água e sabão não estivesse disponível (ABIHPEC, 2020). O álcool em gel é classificado como um produto cosmético de higiene pessoal com ação antisséptica, ou seja, um produto de grau II com atividade antimicrobiana, cuja comprovação é exigida ao ser registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2022a).



A regulamentação sobre a disponibilização obrigatória de soluções alcoólicas antissépticas em serviços de saúde enfatiza a importância do uso na prevenção e controle de infecções, o estabelecimento da graduação alcoólica de diferentes formulações, a obrigatoriedade da notificação e registro no órgão competente, bem como a realização de ensaios laboratoriais para avaliação da qualidade dos produtos (BRASIL, 2010).

No cenário global de emergência de saúde pública declarada pela OMS (OPAS, 2020), a ANVISA (BRASIL, 2012) flexibilizou temporariamente os requisitos regulatórios para a manufatura e comercialização de produtos à base de álcool com graduação 70% (p/p) ou 70°INPM, sem a necessidade de notificação ou registro, desde que os critérios de qualidade, eficácia e segurança do produto fossem atendidos. As publicações estabeleceram os critérios e os procedimentos extraordinários e temporários para a fabricação e comercialização de preparações antissépticas durante o estado de Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) (BRASIL, 2020a; BRASIL, 2022b). O fim da ESPIN em maio de 2022 revogou a RDC n° 641/2022 condicionando novamente as formulações de álcool em gel à regularização junto à ANVISA por meio dos processos de registro ou notificação (BRASIL, 2022b).

A importância da utilização do álcool em gel durante o período de pandemia nos estabelecimentos de saúde e na comunidade foi evidenciada e demonstrada pela adesão ao uso frequente por profissionais da área e pela população. Entretanto, conforme revelado nos dados disponíveis em literatura, a flexibilização temporária para produção e comercialização sem registro ou notificação das preparações antissépticas à base de álcool 70% (p/p), nos anos de 2020 a 2022, afetou significativamente a qualidade destes produtos (NISBAR *et al*, 2023). Deste modo, o presente trabalho objetivou avaliar os parâmetros físico-químicos e a presença de atividade bacteriostática de amostras de álcool em gel comercializadas no período pós-pandêmico a fim de verificar se as formulações manufaturadas após o fim da ESPIN, um período marcado por distintas alterações regulatórias frente ao cenário de pandemia e medidas realizadas para o controle da transmissão da COVID-19, atendiam os requisitos mínimos de qualidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o terceiro trimestre de 2023, foram avaliadas 11 amostras de produtos cosméticos álcool em gel 70° INPM ou 70% p/p de diferentes marcas e lotes, comercializadas na cidade de São Paulo/SP, com data de fabricação posterior ao fim da ESPIN (BRASIL, 2022e). A viscosidade das amostras foi avaliada através do viscosímetro da marca Brookfield® modelo Synchro-lectric Viscometer, utilizando o Spindle n° 4. A leitura de cada amostra foi realizada 3 vezes utilizando 10 RPM e os resultados das médias das leituras foram expressos por cálculo em centipoise (cP). A densidade das amostras foi avaliada através do densímetro digital da marca Mettler Toledo® modelo Density Excellence D4. Utilizou-se o método de análise da densidade do álcool a 20°C e os resultados expressos de acordo com a tabela alcoométrica da Organização Internacional de Metrologia Legal (OIML) e comparados com a tabela alcoométrica da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019; OIML, 2015). Para a atividade bacteriostática, placas de petri contendo ágar nutriente previamente inoculado com 200µL de suspensões microbianas individuais de *S. choleraesuis* ATCC 10708, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 11229 e *P. aeruginosa* ATCC 15442, foram utilizadas para adição das amostras em orifícios centrais. Em seguida, as placas foram incubadas à 36 ± 1°C por 24 ± 2 horas (INCQS, 2018). A observação de halo de inibição foi caracterizada como presença de atividade bacteriostática.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 11 amostras foram submetidas aos testes de densidade e atividade bacteriostática, não sendo possível a realização da análise da viscosidade para a amostra nº 9, devido à quantidade insuficiente de amostra. Tendo em vista que a legislação (BRASIL, 2022d) permite a variação de no máximo 10% do teor de álcool declarado no rótulo (70° INPM ou 70% p/p), o resultado do ensaio é considerado satisfatório se a graduação alcoólica do produto estiver compreendida entre 63% e 77% (p/p).

Os álcoois géis fabricados após o fim da ESPIN e que foram analisados neste artigo apresentaram teor alcoólico satisfatório em 82% (n = 9) das amostras avaliadas, estando aptos a exercer a função de assepsia das mãos. Apenas as amostras nº 3 e nº 10 apresentaram resultados insatisfatórios para o teor de álcool (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados físico-químicos e microbiológicos em amostras de álcool em gel.

Amostras	Densidade 20°C (g/cm ³)	Teor alcoólico		Viscosidade 27°C (cP)	Atividade Bacteriostática
		OIML (% p/p)	Farmacopeia (% p/p)		
1	0,8680	69,836	70,51	13.533	S
2	0,8803	64,636	65,29	15.100	S
3	0,9202	47,075	47,86	4.500	S
4	0,8756	66,632	67,16	15.733	S
5	0,8723	68,027	68,71	NV	S
6	0,8681	69,794	70,51	13.733	S
7	0,8724	67,985	67,93	4.767	S
8	0,8713	68,448	69,16	NV	S
9	0,8786	65,359	66,06	-	I*
10	0,9822	9,750	11,19	NV	I
11	0,8730	67,732	68,38	NV	S

Fonte: elaborada pela autora (2023)

Legenda: S= satisfatório; I= insatisfatório para todos os microrganismos utilizados no ensaio; I*= insatisfatório somente para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; NV= resultado não válido. Parâmetros de aceitação para teor alcoólico = 63% a 77%; Viscosidade = acima de 4.000cP para aqueles com teor alcoólico abaixo de 68%, acima de 8.000cP para aqueles com teor alcoólico igual ou mais que 68%.

No estudo realizado por Farias *et al.* (2023), das amostras avaliadas e descritas como antissépticos para as mãos, 46,15% obtiveram resultados insatisfatórios para o teor de álcool etílico quando foi empregado o mesmo método para determinação por densidade. O teor de álcool etílico e a densidade do álcool em gel não apresentaram alterações significativas ao serem submetidos a diferentes temperaturas no estudo realizado por Silva L. *et al.* (2023).

O tipo de polímero utilizado na produção do álcool em gel e, conseqüentemente, a viscosidade do álcool em gel influenciam não somente a performance do álcool como agente antisséptico, mas também sua aplicação, fluidez e espalhamento na pele e aderência ao uso pelo consumidor (ABUGA *et al.*; 2021). Não foram evidenciados resultados insatisfatórios para as amostras que apresentaram resultados válidos utilizando o viscosímetro (n= 6). Apesar de apresentar resultado insatisfatório para o teor de álcool etílico, a amostra nº 3 atendeu ao critério de aceitação para viscosidade frente à legislação (BRASIL, 2022c). Ao padronizar o ensaio com o Spindle nº 4 houve a limitação dos dados de 4 amostras (Tabela 1), em que não foi possível realizar a determinação da viscosidade por conta da alta viscosidade observada (resultados não válidos). No estudo realizado por Silva L. *et al.*

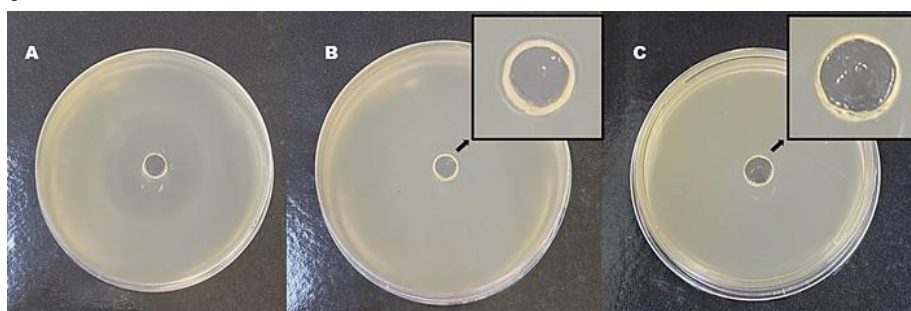


(2023), utilizando as mesmas condições deste trabalho para o parâmetro viscosidade, os valores se mantiveram abaixo de 4.000 cP em todas as variações de temperatura estabelecidas, classificando a amostra como insatisfatória.

A análise da atividade bacteriostática demonstrou que 82% (n = 9) das amostras ensaiadas apresentaram halo de inibição frente aos microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*. Não foi possível evidenciar halo de inibição para a amostra nº 9 frente ao microrganismo *P. aeruginosa*. A amostra nº 10 não apresentou halo de inibição em nenhuma das placas, sendo incapaz de inibir o crescimento dos quatro microrganismos empregados no ensaio (Tabela 1). Cenário semelhante foi evidenciado no estudo realizado por Hilinski E. *et al*; (2023), no qual após a avaliação da atividade bacteriostática de 38 amostras de álcool gel comercializadas durante o período de pandemia por SARs-Cov-2, 13% não apresentaram atividade bacteriostática, com destaque para a ausência de formação de halo de inibição frente ao microrganismo *S. aureus*.

Além da influência da graduação alcoólica para a presença/ausência de formação do halo de inibição, durante a avaliação dos dados do presente trabalho, foi observada diferença no diâmetro dos mesmos (Figura 1). As amostras que continham Triclosan em sua composição (nº 2, 4 e 5), apresentaram halos de inibição com maiores dimensões para os microrganismos avaliados, com exceção das placas contendo *P. aeruginosa*.

Figura 1 - Representação da presença/ausência de halos de inibição no ensaio de determinação de atividade bacteriostática.



Fonte: elaborada pela autora (2023)

Legenda: A= halo com maior diâmetro em amostra contendo álcool 70% e Triclosan; B= halo com menor diâmetro em amostra contendo etanol 70%; C= ausência de halo de inibição.

Ambrosino e colaboradores (2022) observou menor atividade bactericida em amostras de álcool em gel 70% (p/p) quando comparadas com soluções antissépticas que continham um ativo complementar em sua formulação. De acordo com dados disponíveis na literatura, a adição do Triclosan aumenta a atividade bactericida contra bactérias Gram positivas; sua atividade contra *P. aeruginosa* é inferior quando comparado às outras espécies (OMS, 2009).

CONCLUSÕES

Com o retorno da obrigatoriedade de comprovação por estudos de segurança e eficácia para a manufatura e comercialização de formulações cosméticas de álcool em gel, após a revogação das resoluções que flexibilizavam sua fabricação, foi possível observar que a qualidade dos produtos atendeu aos parâmetros regulatórios em aproximadamente 73% das amostras avaliadas, evidenciando o atendimento às Boas Práticas de Fabricação bem como a eficácia do monitoramento e da fiscalização constante realizada pelas autoridades sanitárias.



REFERÊNCIAS

ABIHPEC, Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Venda de álcool em gel cresceu 1.076,4% de janeiro a outubro de 2020. Internet, 15 dez. 2020. Disponível em: <https://abihpec.org.br/venda-de-alcool-em-gel-cresceu-1-0764-de-janeiro-a-outubro-de-2020/>. Acesso em: 29 mai. 2023.

ABUGA, K; NYAMWEYA, N. Alcohol-based hand sanitizers in COVID-19 prevention: a multidimensional perspective. *Pharmacy (Basel)*, v. 9, n. 1, p. 64, 2021. DOI:10.3390/pharmacy9010064. Acesso em: 20 jun. 2023.

AMBROSINO, A; PIRONTI, C; DELL'ANNUNZIATA, F; GIUGLIANO, R; CHIANESE, A; MOCCIA, G; DECARO, F; GALDIERO, M; FRANCI, G; MOTTA, O. Investigation of biocidal efficacy of commercial disinfectants used in public, private and workplaces during the pandemic event of SARS-CoV-2. *Sci Rep*, v.12, n. 1, p. 54-68. DOI:10.1038/s41598-022-09575-1. Acesso em: 18 out. 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 42, de 25 de outubro de 2010. Dispõe sobre a obrigatoriedade de disponibilização de preparação alcoólica para fricção antisséptica das mãos, pelos serviços de saúde do País, e dá outras providências. *Diário Oficial da União* de 26 de outubro de 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 422, de 16 de setembro de 2020(a). Altera a Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 350, de 19 de março de 2020, que define os critérios e os procedimentos extraordinários e temporários para a fabricação e comercialização de preparações antissépticas ou desinfetantes sem prévia autorização da Anvisa e dá outras providências, em virtude da emergência de saúde pública internacional relacionada ao SARS-CoV-2. *Diário Oficial de União* de 17 de setembro de 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 641, de 24 de março de 2022(b). Define os critérios e os procedimentos extraordinários e temporários para a fabricação e comercialização de preparações antissépticas ou sanitizantes oficinais sem prévia autorização da Anvisa e dá outras providências, em virtude da emergência de saúde pública internacional relacionada ao SARS-CoV-2. *Diário Oficial de União* de 30 de março de 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 691, de 13 de maio de 2022(c). Dispõe sobre a industrialização, exposição à venda ou entrega ao consumo, em todas as suas fases, do álcool etílico hidratado em todas as graduações e do álcool etílico anidro, como produto destinado a limpeza de superfície, desinfecção e antisepsia da pele ou substância. *Diário Oficial de União* de 18 de maio de 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 752, de 19 de setembro de 2022(a). Dispõe sobre a definição, a classificação, os requisitos técnicos para rotulagem e embalagem, os parâmetros para controle microbiológico, bem como os requisitos técnicos e procedimentos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. *Diário Oficial da União* de 21 de setembro de 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 766, de 8 de dezembro de 2022(d). Autoriza, extraordinária e temporariamente, a venda livre e a doação de álcool etílico na concentração de 70% p/p (setenta por cento, expresso em peso



por peso), na forma física líquida, devidamente regularizado na Anvisa. Diário Oficial de União de 14 de dezembro de 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 6ª ed. v. 1. Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria GM/MS Nº 913, de 22 de abril de 2022(e). Declara o encerramento da Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) em decorrência da infecção humana pelo novo coronavírus (2019-nCoV) e revoga a Portaria GM/MS nº 188, de 3 de fevereiro de 2020. Diário Oficial da União de 22 de abril de 2022.

FARIAS, F. F.; YANO, H. M; MARTINS, V. A. P; TRUJILLO, L. M.; HILINSKI, E. G.; RODRIGUES, K. C. da S.; ALMODOVAR, A. A. B.; SANTA BÁRBARA, M. C. Impacto na qualidade de antissépticos e desinfetantes com álcool 70% (p/p) utilizados no enfrentamento da pandemia provocada pelo SARS-CoV-2. Revista do Instituto Adolfo Lutz, [S. l.], v. 82, p. 1–10, e39152, 2023. Disponível em: DOI:10.53393/rial.2023.v82.39152. Acesso em: 19 out. 2023.

HILINSKI, E. G; RODRIGUES, K. C. S; ALMODOVAR, A. A. B; YANO, H. M; TRUJILLO, L. M; MARTINS, V. A. P; SANTA BÁRBARA, M. C; FARIAS, F. F. Avaliação de produtos à base de álcool etílico 70% (p/p) comercializados no período de pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2. Bol Inst Adolfo Lutz. São Paulo, v. 33, n. U, art. 4, 2023. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/ial/publicacoes/bial/>. Acesso em: 19 out 2023.

INCQS, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. 65.3240.016 - Método para avaliação das atividades bacteriostática e fungistática de saneantes e substâncias preservativas. In: Fundação Oswaldo Cruz, p. 1-17, 2018.

NISBAR, N. D; KHAIR, S. K. J; BUJANG, N. B; YUSOP, A. Y. M. Determination of ethanol, isopropyl alcohol and methanol in alcohol based hand sanitiser to ensure product quality, safety and efficacy. Scientific Reports, v. 13, n. 1, p. 9478, 2023. Disponível em: DOI: 10.1038/s41598-023-36283-1. Acesso em: 20 out. 2023.

OIML, Organização Internacional de Metrologia Legal. OIML Bulletin. Quarterly Journal, v. 56, n. 3, p. 5, 2015. Disponível em: https://www.oiml.org/en/publications/bulletin/pdf/oiml_bulletin_july_2015.pdf Acesso em: 16 out. 2023.

OPAS, Organização Pan-Americana de Saúde. OMS declara emergência de saúde pública de importância internacional por surto de novo coronavírus. [s. l.], 2020. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/news/30-1-2020-who-declares-public-health-emergency-novel-coronavirus>. Acesso em: 29 mai. 2023.

OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care. Geneva, 2009. p.49. Disponível em: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/44102/9789241597906_eng.pdf?sequence=1 . Acesso em: 16 out. 2023.

SILVA, L. M; FARIAS, F. F; HILINSKI, E. G; SANTA BARBARA, M. C. Álcool gel para combate ao covid-19: avaliação da qualidade com base no estudo de estabilidade.



Saúde coletiva: Mudanças, necessidades e embates entre sociedade e estado 2. Ponta Grossa: Atena, p. 140, 2023. DOI: 10.22533/at.ed.43023150210. Acesso em: 18 out. 2023.



Capítulo 06

DOI: 10.53934/20242-06

AUTENTICAÇÃO DE LINHAGENS PORTADORAS DE GENES CODIFICADORES DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS NO NÚCLEO DE COLEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Gabriela Vitoria Penna Arruda¹ Elizabeth Harummy Takagi² Tânia Sueli de Andrade³;

¹Estudante do curso de Especialização em Vigilância Epidemiológica em Saúde – NCMO - IAL;
E-mail: gvitoriaarruda@gmail.com

²Docente/pesquisador do Depto do Núcleo de Coleção de Micro-organismos – NCMO – IAL.

³Pesquisadora Científica/Diretora do Núcleo de Coleção de Micro-organismos – NCM – IAL.

RESUMO

O Núcleo de Coleção de Micro-organismos, fundado em 1940, possui mais de 10.000 linhagens, a maioria das quais é de relevância para a saúde pública. Algumas dessas linhagens carregam genes de resistência aos antimicrobianos, portanto, exigem monitoramento regular para garantir a manutenção de suas características. Para esse propósito, 10 linhagens, catalogadas como portadoras de genes que codificam enzimas de resistência, foram submetidas a diferentes métodos de autenticação, como MALDI-TOF, determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando fita de Etest para imipenem e PCR multiplex, visando alvos específicos do gene *bla_{OXA}*. Constatamos que apenas uma linhagem de *Escherichia coli* apresentou uma concentração inibitória mínima de 0,125 µg/mL para imipenem, diferindo do esperado para essa linhagem. Das quatro linhagens de *Acinetobacter baumannii*, apenas uma não teve sua resistência confirmada pela PCR, devido à falta de amplificação para o gene *bla_{OXA-253}*. Dos dez micro-organismos analisados, apenas um não exibiu um perfil de resistência através da CIM, e outra linhagem não teve sua resistência confirmada por PCR, o que contradizia as informações presentes em seu registro como sendo resistente. Diante dos resultados obtidos, foi possível evidenciar a necessidade do controle lote a lote das linhagens após os processos de preservação, possibilitando o fornecimento de material biológico com qualidade assegurada.

Palavras-chave: MALDI-MS, PCR multiplex, resistência microbiana a medicamentos.

INTRODUÇÃO

As coleções microbiológicas de serviço como a do Núcleo de Coleção de Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz (NCMO-IAL), desempenham um papel importante na preservação de recursos biológicos e fornecimento deste material para pesquisas científicas, acadêmico, desenvolvimento de ensaios de diagnóstico, controle de qualidade de ensaios e atividades de ensino contribuindo assim para a formação de recursos humanos também. A disponibilização de linhagens é autenticada em conformidade com regulamentações, e a presença de mecanismos para assegurar a qualidade do material preservado é fundamental. (PEIXOTO, 2006; SETTE, 2006). O NCMO-IAL foi estabelecido no ano de 1940, e



atualmente possui mais de 10.000 linhagens no acervo, contendo linhagens de bactérias, fungos, e protozoários como *Leishmania* sp e *Trypanossoma* sp, além de linhagens de resistência. (ANDRADE, 2008).

Neste estudo, 10 linhagens com genes de resistência aos carbapenêmicos foram selecionadas para autenticação após a preservação por liofilização, quanto a sua espécie, concentração inibitória mínima para imipenem e presença de genes codificadores para oxacilinas relacionadas à resistência para essa classe de antimicrobianos. Os dados obtidos por caracterização polifásica, na integração de diferentes técnicas fenotípicas e genotípicas, foram registrados e laudos elaborados de acordo com o sistema de garantia de qualidade presente no NCMO-IAL, tornando as linhagens disponíveis para fornecimento para aquelas que apresentaram sucesso na autenticação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram reativadas 10 linhagens bacterianas do acervo do Núcleo de Coleções de Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz (NCMO-IAL) conforme descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Linhagens bacterianas de resistência

IAL	Linhagens	Lote	Gene
7426	<i>Acinetobacter baumannii</i>	12/21	<i>blaOXA-253</i>
7427	<i>Escherichia coli</i>	12/21	<i>mcr-1</i>
7428	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	12/21	<i>blaVIM-2</i>
7429	<i>Acinetobacter baumannii</i>	12/21	<i>blaOXA-23</i>
7430	<i>Acinetobacter baumannii</i>	12/21	<i>blaOXA72(blaOXA 24-like)</i>
7433	<i>Escherichia coli</i>	12/21	<i>blaNDM-1</i>
9723	<i>Acinetobacter baumannii</i>	09/22	<i>blaOXA-23</i>
9824	<i>Escherichia coli</i>	03/23	<i>blaNDM</i>
9825	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	03/23	<i>blaNDM</i>
9835	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	03/23	<i>blaVIM</i>

Fonte: elaborado pelo autor, (2023).

Foi realizada a avaliação microscópica pela técnica de coloração de Gram e macroscópica do crescimento bacteriano em ágar MacConkey e ágar comum após 24 horas de incubação, á 37°C. A partir do crescimento em ágar comum, foi realizada a autenticação da espécie bacteriana por análise de proteínas utilizando a técnica de (MALDI-TOF). As amostras das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chlororaphis* e *Escherichia coli* foram submetidas ao procedimento de extração em placa, enquanto as linhagens de *Acinetobacter baumannii* passaram pelo procedimento de extração em tubo, conforme as recomendações da Bruker.

Foi realizado o teste de concentração inibitória mínima (CIM) para imipenem utilizando fita comercial Etest. A linhagem IAL 6014 *Escherichia coli* lote 03/17 que tem como referência ATCC 25922 foi usada para controle do teste. Foi utilizado o ágar Mueller Hinton para aplicação da fita de E-test, e incubado por 24 horas a 37°C. Os pontos de corte clínicos foram definidos pela plataforma BrCast (2023).

Para obtenção do DNA bacteriano, foram utilizados três métodos: I) lise por choque térmico; II) Extração com kit Extracta DNA e RNA de Patógenos MDX Locus, III) kit PureLink Genomic DNA Invitrogen.



A extração de DNA por kit Extracta DNA e RNA de Patógenos MDX Loccus foi realizada de acordo com o manual do fabricante. A extração pelo kit PureLink® Genomic DNA Kits Invitrogen foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. A eluição final foi realizada com água ultrapura estéril. Os DNAs extraídos por kit foram quantificados por espectrofotometria no equipamento DeNovix. Todos os DNAs obtidos foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Para as linhagens depositadas como portadoras de gene codificadoras de enzimas do tipo OXA foi realizada a PCR Multiplex e os produtos de PCR correspondentes aos genes relacionados à resistência aos carbapenêmicos foram novamente amplificados com DNA polimerase de alta fidelidade, os produtos purificados pelo kit Biospin PCR Purification Kit (BioFlux).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as linhagens selecionadas apresentaram crescimento uniforme, sem sinais de contaminação, e tiveram as identificações de espécie confirmadas pela técnica de MALDI-TOF, os resultados estão apresentados na **Tabela 4**, assim como os valores encontrados para a concentração inibitória mínima para imipenem por Etest.

Tabela 4 - Autenticação das espécies das linhagens e concentração inibitória mínima para imipenem

IAL	Linhagens	Lote	MALDI-		
			TOF (Score)	CIM (µg/mL)	S/I/R*
7426	<i>Acinetobacter baumannii</i>	12/21	2,47	>32	R
7427	<i>Escherichia coli</i>	12/21	2,37	0,125	S
7428	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	12/21	2,16	>32	R
7429	<i>Acinetobacter baumannii</i>	12/21	2,22	>32	R
7430	<i>Acinetobacter baumannii</i>	12/21	2,57	>32	R
7433	<i>Escherichia coli</i>	12/21	2,42	16	R
9723	<i>Acinetobacter baumannii</i>	12/21	2,47	>32	R
9824	<i>Escherichia coli</i>	09/22	2,47	24	R
9825	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	03/23	2,38	>32	R
9835	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	03/23	2,42	>32	R
6014	<i>Escherichia coli</i> (controle CIM)	03/17	2,25	0,125	S

Fonte: elaborado pelo autor *com base em BrCAST 2023.

S: Sensível, I: Intermediário, R: Resistente.

Na determinação da concentração inibitória mínima para imipenem foi possível observar que todas as linhagens avaliadas apresentaram resistência ao carbapenêmico, porém a linhagem IAL 7427 *Escherichia coli* lote 12/21, apresentou CIM 0,125 µg/mL que de acordo com o documento Tabela de Pontos de Corte Clínicos do BrCAST - EUCAST é classificada como sensível. Esta linhagem é descrita em sua ficha de depósito contendo o gene de resistência *mcr-1* que é citado por Rebelo (2018 apud YAO *et al.*, 2016) como sendo



plasmidial. As mudanças no fenótipo de uma linhagem após a preservação podem ser atribuídas a uma variedade de fatores como, por exemplo, choque térmico, estresse oxidativo e variações de temperatura, podem induzir mudanças genotípicas e fenotípicas nas culturas. Deste modo é de grande importância avaliar a integridade genômica após a preservação (PRAKASH, 2013).

Neste estudo, foi pesquisada apenas a presença de genes codificadores de enzimas do tipo OXA relacionado à resistência aos carbapenêmicos e foi usada a PCR multiplex descrita por Woodford e colaboradores (2016), que foi posteriormente adaptada por Higgins e colaboradores (2010).

Para as quatro linhagens de *Acinetobacter baumannii*, observou-se a amplificação do gene *bla*_{OXA-51-like} (353 pb), que, embora não seja determinante para a resistência aos carbapenêmicos, é considerado intrínseco para espécies *Acinetobacter baumannii* (TURTON, *et al.*, 2006), corroborando os dados obtidos por MALDI-TOF.

Não foi observada formação de produto de PCR para a linhagem IAL 7429 *A.baumannii* com o DNA obtido por choque térmico, provavelmente devido ao excesso de proteínas e componentes celulares que inibiram a reação da PCR. No entanto, o DNA extraído por kit da Invitrogen e o obtido com o kit da Locus, permitiram a amplificação dos produtos de DNA esperados para *bla*_{OXA-51-like} e *bla*_{OXA-23}.

Foi possível obter produtos de PCR compatíveis com o tamanho aguardando para os genes relacionados com a resistência aos carbapenêmicos *bla*_{OXA-24-like} (246 pb) para a linhagem IAL 9723 e *bla*_{OXA-23-like} (501 pb) para as linhagens IAL 7429 e IAL 7430, respectivamente.

Para identificar o gene *bla*_{OXA-253} na linhagem IAL 7426 de *Acinetobacter baumannii* (lote 12/21), utilizamos oligoiniciadores específicos para *bla*_{OXA-143}. No entanto, devido à alta semelhança de 95% na identidade de nucleotídeos entre *bla*_{OXA-253} e *bla*_{OXA-143}, conforme observado por Girlich *et al.* (2014), não conseguimos amplificar o gene *bla*_{OXA-143} em nenhuma das três extrações de DNA realizadas na amostra IAL 7426.

Embora seja variante de *bla*_{OXA-253}, usar oligoiniciadores descritos por Higgins e colaboradores (2010), foi gerado um produto de PCR que não se anelou na sequência, e ao comparar com as sequências de nucleotídeos de *bla*_{OXA-253} e *bla*_{OXA-143} contidas no NCBI, utilizando a ferramenta BioEdit Alignment Editor, verificou-se que o oligoiniciador da fita senso de *bla*_{OXA-143} é homólogo a *bla*_{OXA-253}, no entanto, o da fita anti-senso possui uma região de polimorfismo. Como resultado, a amplificação deste gene para esta linhagem não pôde ser continuada.

CONCLUSÕES

Todas as linhagens foram autenticadas pelo método de MALDI-TOF, que se mostrou muito eficiente e de alta confiabilidade nos resultados, tornando a metodologia prática em relação aos métodos de identificação fenotípicos.

A resistência ao imipenem foi verificada em todas as linhagens, exceto para IAL 7427 *Escherichia coli* lote 12/21, o que reforça a importância das autenticações do perfil genético após preservação lote a lote.

Todas as linhagens que haviam sido descritas na ficha de depósito como portadoras de genes codificadores de enzimas do tipo *bla*_{OXA}, puderam ser autenticadas com exceção para a linhagem IAL 7426 *Acinetobacter baumannii* de lote 12/21.

Diante dos resultados obtidos foi possível evidenciar a necessidade do controle de qualidade lote a lote das linhagens após os processos de preservação, etapa fundamental para



o Núcleo de Coleção de Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz que atua como coleção de serviço e deve fornecer produtos com confiabilidade e qualidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a minha família que apoiou para que eu permanecesse em São Paulo, a diretora do Núcleo de Coleção de Micro-organismos Tânia Sueli de Andrade, a minha orientadora Elizabeth Harummy Takagi, aos colegas Camila Modesto e Nicolas Castilho, e aos colaboradores do Núcleo de Coleção de Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, T. S.; BASTOS, L. T.; SCOLA, M. C. G.; FELIPPE, J. M. M. S. Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz – 68 Anos de história dedicados à saúde pública. **Bepa - Boletim Epidemiológico Paulista**, v.5 n.59, p.10–15, Nov.2008. Disponível em: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2008/ses-27386/ses-27386-4467>

DALTONICS, B. MALDI Biotyper 3.1 User Manual. **Bruker**, 1 p.1–212, 2012.

DE VERO L. *et al.* Preservation, characterization and exploitation of microbial biodiversity: The perspective of the italian network of culture collections. **Review Microorganisms**, v.7, 685, Dec. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120685>

HIGGINS, P. G.; LEHMANN M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 305. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.10.014>

PEIXOTO, A.L.; BARBOSA, M.R.V.; MENEZES M.; MAIA L.C. Diretrizes e Estratégias para a Modernização de Coleções Biológicas Brasileiras e a Consolidação de Sistemas Integrados de Informação sobre Biodiversidade. **Programa de Pesquisa em Biodiversidade**, p. 324, 2006. Ministério da Ciência e Tecnologia.

PRAKASH, O.; NIMONKAR, Y.; SHOUCHE, Y. S. Practice and prospects of microbial preservation. **In FEMS Microbiology Letters**, v. 339, n. 1, p. 1–9 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>

REBELO, A.R. *et al.* Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. **Eurosurveillance**. v. 23, n.6, p.1–11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-0067>

SETTE, L.D. *et al.* Recomendações para operação e gerenciamento de Coleções de Culturas de Microorganismos. **Sociedade Brasileira de Microbiologia. Guia para Operação de Coleções de Culturas: Domínio Microorganismos**. Fiocruz, 2006.

Disponível em:
https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/sbmgerenciamentocolecoes_culturas.pdf



TURTON, J.F. *et al.* Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla OXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2974–2976, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.01021-06>

WOODFORD, N. *et al.* Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International journal of antimicrobial agents**, v. 27, n. 4, p. 351-3, Jan. 2006. Disponível em: [doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004).



Capítulo 07

DOI: 10.53934/20242-07

USO DE IMUNOGLOBULINAS E SUBCLASSES COMO MARCADORES IMUNOLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DA NEUROANGIOSTRONGILÍASE: revisão integrativa

Débora Oliveira dos Santos¹; Amanda de Oliveira Baccin²; Leyva Cecília Vieira de Melo³

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - CPM - IAL; e-mail: debora-oliveira15@outlook.com

²Mestranda do Programa de Pós-graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo - PPG-CCD/SES/SP - CPM - IAL

³Docente/pesquisador do Núcleo de Enteroparasitas - CPM - IAL

Resumo: A neuroangiostrongilíase, doença emergente causada pelo nematódeo *Angiostrongylus cantonensis*, apresenta uma série de desafios diagnósticos devido à sua difícil identificação e à dispersão dos estudos já realizados. O diagnóstico definitivo é complicado, pois exige a detecção de larvas ou seus fragmentos no líquido cefalorraquidiano e/ou nos olhos. Nesse contexto, a busca por métodos diagnósticos eficazes inclui a investigação das diversas classes de imunoglobulinas (Igs), que desempenham papel importante na resposta imunológica do hospedeiro frente a infecções. Esta revisão integrativa identificou 10 estudos sobre o uso de IgA, IgE, IgG e IgM no imunodiagnóstico da doença e investigou seu potencial, bem como os países que mais contribuíram para esse conhecimento. Destacou-se que a IgG e suas subclasses foram as mais estudadas, demonstrando as melhores sensibilidades (13-100%) e especificidades (66,8-100%), enquanto as outras classes de Ig tiveram desempenho inferior. Em relação à produção científica, a Tailândia divulgou a maioria das publicações (6/10), seguida pelo Brasil, Cuba, Estados Unidos e Taiwan, cada um com uma publicação. No entanto, é essencial realizar novas pesquisas que avaliem individualmente as classes de Igs, levando em consideração suas características e averiguando os períodos ideais para suas detecções no soro ou líquido cefalorraquidiano, a fim de aprimorar o diagnóstico da doença.

Palavras-chave: *Angiostrongylus cantonensis*; imunodiagnóstico; imunoglobulinas; neuroangiostrongilíase; revisão integrativa.

INTRODUÇÃO

Angiostrongylus cantonensis causa neuroangiostrongilíase, doença associada à meningite eosinofílica em humanos, que se infectam ao ingerir moluscos ou hospedeiros paratênicos contaminados com larvas de terceiro estágio (CARVALHO et al., 2022; BARRATT et al., 2016). A confirmação diagnóstica ocorre através da detecção de larvas, seus fragmentos ou DNA no líquido cefalorraquidiano (LCR) (CARVALHO et al., 2022). A baixa frequência desses achados destaca a importância dos métodos imunológicos, como ELISA, *Dot-blot* ELISA e *Western Blot*, técnicas mais empregadas atualmente, no entanto, reações cruzadas e soroconversão tardia podem levar a resultados falsos positivos e negativos (MELO et al., 2022). A diversidade de Igs pode melhorar o diagnóstico, mas a pulverização das informações dificulta a compreensão do conhecimento existente. Este trabalho, por meio de revisão integrativa, teve o objetivo de sintetizar estudos sobre o uso de diferentes classes de Igs no diagnóstico da neuroangiostrongilíase, visando compreender a produção científica e identificar lacunas para pesquisas futuras.

MATERIAL E MÉTODOS

Para cumprir os objetivos do trabalho, a metodologia de revisão integrativa foi realizada conforme recomendado por Cooper (1982) e aplicada em seis etapas: identificação do tema e seleção das questões norteadoras; estabelecimento de critérios para inclusão e exclusão; definição das



informações a serem extraídas; avaliação dos estudos incluídos; interpretação; e apresentação e divulgação dos resultados. As questões norteadoras levantadas para elaboração do trabalho foram: 1. Quais classes de imunoglobulinas foram utilizadas em pesquisas para o diagnóstico da neuroangiostrongilíase desde o ano 2000? 2. Em quais países os estudos foram conduzidos? e 3. Quais as imunoglobulinas que apresentaram potencial diagnóstico para a doença?

Para a busca dos artigos foram usadas quatro bases de dados, a saber: PubMed - National Library of Medicine; LILACS - Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde; SciELO - Scientific Electronic Library; e Google Acadêmico. Nestas, foram inseridos descritores em português e inglês, sendo eles: *Angiostrongylus cantonensis*; neuroangiostrongilíase; imunodiagnóstico; IgA; IgE; IgG; IgM; subclasses e combinações de Igs; *Western Blot*; ELISA; e *Dot ELISA*, os quais foram pesquisados individualmente e/ou com uso de booleanos (“e” ou “and”).

O software gerenciador de referências Mendeley® foi utilizado para agrupar os trabalhos, identificar os artigos originais, ano de publicação e o nome dos autores. Em seguida foram aplicados os critérios de inclusão: trabalhos publicados no período de janeiro de 2000 a setembro de 2023; em qualquer idioma; e que abordaram uso das imunoglobulinas no diagnóstico da neuroangiostrongilíase, com a utilização das técnicas *Western Blot*, ELISA e *Dot ELISA*. Artigos que estavam fora do período estabelecido e que não corresponderam à proposta do trabalho foram excluídos.

Os artigos levantados que atenderam aos dois primeiros critérios exigidos foram submetidos à leitura exhaustiva de títulos e resumos para avaliar a adequação ao último critério. Seguiu-se, então, a leitura dos conteúdos para a avaliação das metodologias, resultados e conclusões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados 6.919 artigos nas bases de dados dos quais apenas dez (0,14%) atenderam aos critérios estabelecidos por este trabalho, mostrando um grande volume de material disponível, porém com pouco aproveitamento, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Número de artigos obtidos nas bases de dados que utilizaram Imunoglobulinas no diagnóstico da neuroangiostrongilíase (2000 a setembro/2023).

Imunoglobulinas	PUBMED			SCIELO			LILACS			Google Acadêmico			Global		
	n	exclusão	total	n	exclusão	total	n	exclusão	total	n	exclusão	total	n	exclusão	total
IgA	5	5	0	0	0	0	0	0	0	288	288	0	293	293	0
IgE	4	4	0	0	0	0	0	0	0	487	487	0	491	491	0
IgG	23	21	2	1	1	0	2	2	0	1.358	1.358	0	1.384	1.382	2
IgM	9	9	0	0	0	0	0	0	0	504	504	0	513	513	0
IgA x IgE	3	3	0	0	0	0	0	0	0	243	243	0	246	246	0
IgA x IgM	5	5	0	0	0	0	0	0	0	249	249	0	254	254	0
IgA x IgG	5	5	0	0	0	0	0	0	0	321	321	0	326	326	0
IgE x IgM	3	3	0	0	0	0	0	0	0	287	287	0	290	290	0
IgE x IgG	3	3	0	0	0	0	0	0	0	578	578	0	581	581	0
IgM x IgG	9	9	0	0	0	0	0	0	0	552	552	0	561	561	0
IgA x IgE x IgM	3	3	0	0	0	0	0	0	0	191	191	0	194	194	0
IgA x IgE x IgG	3	3	0	0	0	0	0	0	0	244	244	0	247	247	0
IgA x IgM x IgG	5	5	0	0	0	0	0	0	0	260	260	0	265	265	0
IgE x IgG x IgM	3	3	0	0	0	0	0	0	0	286	285	1	289	288	1
IgA x IgE x IgM x IgG	3	3	0	0	0	0	0	0	0	191	190	1	194	193	1
Subclasses IgA e outras	4	4	0	0	0	0	0	0	0	177	177	0	181	181	0
Subclasses IgG e outras	5	5	0	0	0	0	0	0	0	605	599	6	610	604	6
Total	95	93	2	1	1	0	2	2	0	6821	6813	8	6919	6909	10

Fonte: Elaborada pelos autores (2023).

O Google Acadêmico foi a base com o maior número de artigos sobre o assunto, com 6.821 publicações (98,60%) (Tabela 1). Entretanto, 6.813 (99,88%) foram excluídas (Tabela 1), sendo 890 (13,05%) por não estarem dentro do período estabelecido; 2.966 (43,54%) por estarem duplicadas e 2.957 (43,41%) por não se relacionarem ao tema de interesse. Esta base de dados, como explicitado por Delgado López-Cózar et al. (2019), indexa automaticamente informações da *web* acadêmica, tornando a busca globalizada, o que, apesar de ampliar os resultados, acaba trazendo informações não relacionadas ao tema. Mesmo assim, esta plataforma foi responsável por oito artigos,



correspondendo a 0,12% do volume total e 80% do material aproveitado para as análises, mostrando que, se usado criteriosamente, pode ser uma boa fonte de pesquisa científica.

Já em relação ao PubMed, foram encontrados 95 artigos (Tabela 1), dos quais sete (7,37%) foram excluídos por estarem fora do período estabelecido; 77 (81,05%) por serem duplicatas e nove (9,47%) por não estarem relacionados ao tema. Restaram dois (2,11%) artigos que atenderam a todos os critérios exigidos. Neste caso, quando se busca por uma informação muito específica e com pouco tempo para pesquisar, pode ser uma opção.

Por outro lado, LILACS e SciELO foram as bases com menos resultados, sendo dois e um artigos encontrados, respectivamente (Tabela 1), os quais foram rejeitados por não abordarem a temática. Sendo assim, para este trabalho, não foram úteis, sugerindo que assuntos pouco estudados podem não ser contemplados nessas bases de dados.

Em relação aos dez trabalhos triados, todos os artigos descreveram estudos com a utilização de IgG e/ou suas subclasses e/ou a combinação destas com outras Igs, destacando um desequilíbrio de interesse na pesquisa das diversas classes e subclasses de Igs, com a carência de estudos específicos voltados a outros anticorpos para o refinamento do diagnóstico laboratorial da neuroangiostromingilíase. Além disso, observou-se que 2023 foi o único ano que apresentou mais de um trabalho (Quadro 1), mostrando que essa escassez de pesquisas na área esteve presente, pelo menos, nos últimos 23 anos.

Outro ponto importante, foram seis publicações (60%) realizadas na Tailândia e uma (10%) em cada um dos demais países (Brasil, Cuba, Estados Unidos e Taiwan), conforme ilustrado na figura 1. Segundo Eamsobhana (2013), a Tailândia apresenta grande parte dos casos de meningite eosinofílica por *A. cantonensis* dentre as nações endêmicas da doença, e esse dado pode justificar o maior número de trabalhos terem sido publicados neste país. No entanto, seguramente estes dados estão desatualizados, necessitando de revisões sistemáticas para reavaliar a real e atual distribuição dos casos humanos da doença.

Figura 1 - Quantidade de artigos publicados por país, que atenderam os critérios do trabalho.



Fonte: Elaborado pelos autores em mapchart.net (2023).

Com base nos dados obtidos a partir da análise dos trabalhos selecionados, destaca-se que, embora a IgG seja o marcador mais frequentemente empregado nos ensaios diagnósticos (STEEL et al., 2023), suas subclasses demonstraram um potencial diagnóstico mais promissor, com resultados globalmente semelhantes, enquanto as demais Igs apresentaram resultados contraditórios.



Quadro 1 - Apresentação da síntese de artigos incluídos na revisão. Os artigos foram denominados estudos e numerados de 1 a 10.

Estudos	Ig	País de origem	Intervenção estudada	Resultados	Referência
1. Angiostrongylidiasis: analysis of antigens of Angiostrongylus costaricensis adult worms versus IgG from infected patients with Angiostrongylus cantonensis.	IgG	Tailândia	Os autores analisaram a reatividade cruzada de Ags de vermes adultos de <i>A. costaricensis</i> e soros com anticorpos IgG de pacientes com infecção por <i>A. cantonensis</i> e por outras infecções, por meio da técnica de ELISA.	Os resultados mostram que o Ag bruto de <i>A. costaricensis</i> teve alto percentual de sensibilidade com anticorpos séricos de pacientes com neuroangiostrongilíase. O teste apresentou sensibilidade e especificidade de 92,59% e 73% respectivamente. A baixa especificidade do teste se deu pelas reações dos anticorpos séricos com vários tipos de moléculas antigênicas.	DEKUMYOY et al. 2000.
2. Diagnosis of human angiostrongylidiasis.	IgA, IgE, IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.	Tailândia	Os autores através de revisão sistemática analisaram os principais métodos para diagnóstico da angiostrongilíase.	A reatividade das imunoglobulinas e subclasses foi avaliada através de ELISA. Os estudos mostram que o anticorpo IgG1 teve a maior sensibilidade (100%) e especificidade (86,8%), enquanto IgA e IgM mostram baixa resposta. Os níveis de IgA, IgE, IgG e IgM são maiores em pessoas infectadas.	VITTA 2012.
3. Eosinophilic meningitis associated with angiostrongylidiasis: clinical features, laboratory investigations and specific diagnostic IgG and IgG subclass antibodies in cerebrospinal fluid.	IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.	Tailândia	Os autores analisaram a resposta do IgG e das subclasses do IgG no líquido cefalorraquidiano (LCR) de 15 pacientes com meningite eosinofílica através de ELISA e presença de IgG em soro para o Ag de 29 kDa por meio de <i>Western Blot</i> .	O <i>Western blot</i> expôs que o Ag de 29 kDa reagiu com 53% dos soros. A sensibilidade para detecção de IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 foi de 40% (06/15), 40% (06/15), 47% (07/15) e 13% (02/15), respectivamente. Combinar a detecção do IgG para o Ag de 29 kDa em soro por <i>Western blot</i> e das subclasses no LCR por ELISA pode ter sensibilidade de 80%.	KITTIMONGKO LMA et al. 2007.
4. Specific IgG Antibody Subclasses to Angiostrongylus cantonensis in Patients with Angiostrongylidiasis.	IgA, IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	Tailândia	O total dos anticorpos IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM contra o Ag de <i>A. cantonensis</i> foi determinado por ELISA em soro de casos comprovados de angiostrongilíase humana, casos suspeitos de angiostrongilíase com meningite eosinofílica e um grupo controle. Especificidade e sensibilidade diagnóstica foram avaliadas.	Os resultados mostraram que os valores médios do ELISA para IgG e subclasses foi significativamente maior nos grupos de pacientes do que no grupo controle. Sensibilidade foi: IgM (0%); IgA (42,8%); IgG (85,7%); IgG1 (100%); IgG2 (71,4%); IgG3 (42,8%) e IgG4 (85,7). Especificidade foi: IgM (100%); IgA (96,3%); IgG (88,9%); IgG1 (100%); IgG2 (96,3%); IgG3 (96,3%) e IgG4 (96,3%). A resposta do IgA sérico foi em geral deficiente, mas maior que no grupo controle. O IgG1 deve a maior sensibilidade e especificidade. Os níveis das subclasses do anticorpo IgG podem explicar as respostas imunes ao parasita.	INTAPAN et al. 2002.
5. IgG1, IgG2 and IgE intrathecal synthesis in Angiostrongylus cantonensis meningoencephalitis.	IgA, IgE, IgM, IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.	Cuba	Os autores analisaram as subclasses do IgG e padrão de síntese intratecal do IgE em 20 pacientes pediátricos com meningite eosinofílica por <i>A. cantonensis</i> . ELISA foi feito para pesquisa de anticorpo contra o parasita no soro e no LCR.	50% dos pacientes tiveram um padrão de síntese intratecal de IgA+IgM+IgG; 8 tiveram uma resposta intratecal de IgA+IgG; 6 tiveram padrão de síntese de IgG1+IgG2; IgG1+IgG2+IgG3 em um paciente e IgG1+IgG2+IgG4 em um paciente. Síntese intratecal do IgE foi observada em 4 pacientes.	DORTA-CONTRERAS et al. 2005.
6. Immunological diagnosis of human angiostrongylidiasis due to Angiostrongylus cantonensis (Nematoda: Angiostrongylidae).	IgE, IgG1, IgG2.	Tailândia	Os autores revisaram o estado das informações existentes e avanços no diagnóstico imunológico da infecção por <i>A. cantonensis</i> .	Os estudos mostram que um ELISA desenvolvido para anticorpos IgG1 consegue distinguir meningite eosinofílica por <i>A. cantonensis</i> e que o padrão de síntese de Ig1+IgG2+IgE pode contribuir para o diagnóstico.	EAMSOBHANA et al., 2009.
7. Evaluation of human IgG subclass antibodies in the serodiagnosis of angiostrongylidiasis.	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.	Tailândia	Foram analisadas as respostas das subclasses do IgG ao Ag de 29 kDa de <i>A. cantonensis</i> por <i>Western blot</i> para determinar se os anticorpos das subclasses do IgG podem ser usados para melhorar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico sorológico.	Os resultados indicam que o uso do <i>Western blot</i> para detecção de anticorpos IgG4 é o teste mais confiável. A detecção de IgG4 dá sensibilidade e especificidade de 75% e 95%, respectivamente. O teste pode diferenciar entre neuroangiostrongilíase humana e outras doenças que causam meningite eosinofílica.	INTAPAN et al. 2003.
8. IgE antibody responses in cerebrospinal fluids relate to the brain pathological injury of hosts with Angiostrongylus cantonensis infection.	IgE, IgG, IgM.	Taiwan	Os autores analisaram os níveis de IgG, IgM e IgE no soro e LCR de diferentes cepas de roedores (BALB/C, CBA, C57BL/6 E C57BL/10) infectados com <i>A. cantonensis</i> por 5 semanas, pela técnica de <i>Western Blot</i> e ELISA. As respostas do anticorpo IgE, IgG e IgM anti-L5 no LCR foram analisadas.	Os resultados mostram que anticorpos anti larvas L5 aumentaram no LCR dos roedores, principalmente o IgE. A IgG anti L5 começou a aumentar no soro dos roedores a partir da 3ª semana e teve pico nas semanas 4 e 5. Anticorpo IgE anti L5 aumentou significativamente a partir da semana 3. Níveis de IgM não foram expressivos. Sugere-se que a resposta do IgE é mais importante no LCR do que no soro. O trabalho pode ajudar a identificar marcadores específicos para a doença.	LEE et al. 2023.
9. Comparison of Antibody Isotype Response to Angiostrongylus cantonensis in Experimentally Infected Rats (<i>Rattus norvegicus</i>) Using Hawai'i 31 kDa Antigen in an Indirect ELISA.	IgA, IgE, IgG, IgM.	Estados Unidos	Os autores utilizaram o antígeno de 29 kDa isolado do Hawai para confirmar a presença das imunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE no plasma de ratos seis semanas pós infecção com 50 larvas de terceiro estágio de <i>A. cantonensis</i> , através de ELISA indireto.	Houve presença de todas as imunoglobulinas contra o isolado. IgG teve 100% de sensibilidade na detecção da infecção. A sensibilidade do IgM, IgA e IgE foi de 56%, 44% e 22%. Necessidade de mais estudos sobre IgA e IgE.	STEEL et al. 2023.
10. Immunoanalysis of different antigenic preparations of Angiostrongylus cantonensis for neuroangiostrongylidiasis diagnosis improvement	IgG	Brasil	Os autores avaliaram diferentes preparações antigênicas de fases evolutivas de <i>A. cantonensis</i> pela técnica de <i>Western Blot</i> . Foram usadas 112 amostras de soro, sendo 17 de neuroangiostrongilíase confirmada; 25 não confirmados; 2 indeterminadas; 46 de outras helmintíases e 20 soros de pacientes sem helmintíases.	Todas as frações apresentaram reatividade com os soros dos pacientes com neuroangiostrongilíase, principalmente a membrana alcalina da fêmea, a fração alcalina solúvel da fêmea e solução solúvel salina da fêmea. A solução alcalina da fêmea apresentou a maior sensibilidade (91,21%), o que sugere que os antígenos da membrana são mais sensíveis para detecção de anticorpos IgG anti- <i>A. cantonensis</i> .	Melo et al., 2022.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Além do exposto, as análises sugerem que a confiabilidade desses dados é prematura, uma vez que as demais Igs parecem não ter sido devidamente exploradas ou estudadas individualmente. Os resultados das sensibilidades e especificidades das Igs analisadas estão dispostos na Tabela 2. Em



relação à aparente baixa sensibilidade das Igs A, M e E, é provável que estas possam ser usadas em testes de triagem para que novas coletas possam ser feitas dias depois, com o intuito de confirmar o diagnóstico com o uso da IgG, já adotada atualmente, mas sem descartar a doença em exames imunológicos realizados precocemente.

Tabela 2 - Sensibilidades e especificidades apresentadas pelas Igs estudadas.

Estudos	Imunoglobulina	Sensibilidade	Especificidade
2,4,9	IgA	42,8-44%	96,30%
9	IgE	22%	--
1, 3, 4, 9, 10	IgG	40-100%	73-88,9%
2, 3, 4, 7	IgG1	40-100%	66,8-100%
2, 3, 4, 7	IgG2	42-71%	90-96,3%
2, 3, 4, 7	IgG3	13-42,8%	90-96,3%
2, 3, 4, 7	IgG4	40-85,7%	90-96,3%
2, 4, 5, 8, 9	IgM	0-56%	100%

Fonte: Elaborada pelos autores (2023).

Vale destacar que, considerando que a neuroangiostrongilíase tem soroconversão tardia para a IgG e os sintomas costumam surgir prematuramente, técnicas baseadas apenas na detecção desta classe de Ig podem resultar em falsos negativos. Nesta situação, a IgM, associada a resposta imune primária em infecções, poderia ser um marcador imunológico útil para a detecção da doença, como exemplificado por Steel et al. (2023). Além disso, os níveis de IgA são altos nas mucosas, sendo um marcador de infecção recente que poderia ser ativado precocemente quando *A. cantonensis* está no trato gastrointestinal (STEEL et al, 2023; SCHROEDER et al. 2010). Por fim, a IgE apesar de ter a concentração sérica baixa e meia vida curta, é importante contra infecções parasitárias causadas por vermes (SCHROEDER et al., 2010).

É necessário levar em consideração que a maioria dos estudos analisados não informou de forma clara os períodos de infecção em que foram obtidas as amostras utilizadas. Tais informações seriam fundamentais para a interpretação dos resultados, visto que as Igs A, E e M são anticorpos de resposta primária, sendo mais confiáveis nos primeiros dias de sintomas dos pacientes, podendo ter sido subestimada a eficácia destes. Desta forma, como evidenciado por Steel et al. (2023), todas as Igs são detectáveis no soro e LCR de pessoas infectadas com *A. cantonensis*, justificando assim o aprofundamento das pesquisas com outros marcadores imunológicos, em diferentes momentos pós-infecção para o preenchimento das lacunas existentes em relação ao tema, pois o diagnóstico precoce da neuroangiostrongilíase pode diminuir os casos graves da doença e suas sequelas, fornecendo um melhor prognóstico para os pacientes.

CONCLUSÕES

A revisão integrativa trouxe à luz de forma organizada a situação do diagnóstico imunológico da neuroangiostrongilíase no mundo, confirmando as dificuldades e importância para detecção da doença, mas que carece de mais estudos para a sua melhoria. Este trabalho apontou também que o uso das Igs tem apresentado bons resultados, sendo a IgG e suas subclasses as mais citadas, com IgG, IgG1, IgG2 e IgG4 com as melhores respostas, sensibilidades e especificidades, a despeito de sua detecção ser tardia nas infecções. Por outro lado, a IgA e subclasses, IgE e IgM apresentaram resultados contraditórios, não esclarecendo dúvidas em relação a seus potenciais no diagnóstico precoce da infecção, sugerindo a realização de novos estudos que levem em conta as características e especificidades de cada Ig para o aprofundamento dos conhecimentos. Além disso, os poucos estudos realizados parecem estar centralizados em países já considerados endêmicos ou com potencial endêmico ainda não conhecido, como o Brasil.

REFERÊNCIAS

BARRATT, J. et al. *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. *Parasitology*, v. 143, n. 9, p. 1087–1118, ago. 2016.



CARVALHO, M. S. N. et al. Epidemiological, clinical and laboratory aspects of *Angiostrongylus cantonensis* infection: an integrative review. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. e262109, 26 set. 2022.

COOPER, H. M. Scientific Guidelines for Conducting Integrative Research Reviews. **Review of Educational Research**, v. 52, n. 2, p. 291–302, 1982.

DELGADO LÓPEZ-CÓZAR, E.; ORDUÑA-MALEA, E.; MARTÍN-MARTÍN, A. Google Scholar as a Data Source for Research Assessment. Em: GLÄNZEL, W. et al. (Eds.). **Springer Handbook of Science and Technology Indicators**. Springer Handbooks. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 95–127.

DEKUMYOY, P. et al. Angiostrongyliasis : Analysis of antigens of *Angiostrongylus costaricensis* adult worms versus IgG from infected patients with *Angiostrongylus cantonensis*. 1 dez. 2000.

DORTA-CONTRERAS, A. J. et al. IgG1,IgG2 and IgE intrathecal synthesis in *Angiostrongylus cantonensis* meningoencephalitis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 238, n. 1, p. 65–70, 15 nov. 2005.

LEE, C.-Y. et al. IgE antibody responses in cerebrospinal fluids relate to the brain pathologic injury of hosts with *Angiostrongylus cantonensis* infection. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 4 set. 2023.

EAMSOBHANA, P. Angiostrongyliasis in Thailand: Epidemiology and Laboratory Investigations. **Hawai'i Journal of Medicine & Public Health**, v. 72, n. 6 Suppl 2, p. 28–32, jun. 2013.

EAMSOBHANA, P. Towards Precise and Rapid Diagnosis of Eosinophilic Meningitis due to the Rat Lungworm *Angiostrongylus cantonensis*. **Siriraj Medical Journal**, v. 62, n. 2, p. 84–89, 2010.

EAMSOBHANA, P.; YONG, H. S. Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae). **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 425–431, 1 jul. 2009.

INTAPAN, P. M. et al. Evaluation of human IgG subclass antibodies in the serodiagnosis of angiostrongyliasis. **Parasitology Research**, v. 89, n. 6, p. 425–429, 1 abr. 2003.

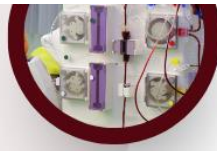
INTAPAN, P. M. et al. Specific IgG antibody subclasses to *Angiostrongylus cantonensis* in patients with angiostrongyliasis. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 20, n. 4, p. 235–240, dez. 2002.

KITTIMONGKOLMA, S. et al. Eosinophilic meningitis associated with angiostrongyliasis: clinical features, laboratory investigations and specific diagnostic igg and igg subclass antibodies in cerebrospinal fluid. **Southeast asian j trop med public health**, v. 38, n. 1, 2007.

MELO, L. C. V. DE et al. Immunoanalysis of different antigenic preparations of *Angiostrongylus cantonensis* for neuroangiostrongyliasis diagnosis improvement. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e220086, 2022.

SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2010 Primer on Allergic and Immunologic Diseases. v. 125, n. 2, Supplement 2, p. S41–S52, 1 fev. 2010.

STEEL, A. et al. Comparison of Antibody Isotype Response to *Angiostrongylus cantonensis* in Experimentally Infected Rats (*Rattus norvegicus*) Using Hawai'i 31 kDa Antigen in an Indirect ELISA. **Pathogens**, v. 12, n. 4, p. 625, abr. 2023.



- VITTA, A. Diagnosis of human angiostrongyliasis. **Asian Biomedicine**, v. 6, n. 2, p. 141–150, 31 mar. 2012.
- WANG, Q.-P. et al. Human angiostrongyliasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 10, p. 621–630, 1 out. 2008.



Capítulo 08

DOI: 10.53934/20242-08

OCORRÊNCIA DE MENINGITE PNEUMOCÓCICA NA REDE REGIONAL DE ATENÇÃO À SAÚDE 13, NO PERÍODO ENTRE 2015 A 2020.

RESUMO

Introdução: A meningite é conceituada como a ocorrência de um processo inflamatório nas meninges, membranas que revestem o cérebro e medula espinhal. No Brasil, *Streptococcus pneumoniae* é considerado o segundo agente causador mais frequente de meningite bacteriana. **Metodologia:** Neste estudo observacional descritivo foram analisados casos de meningite pneumocócica no período de 2015 a 2020 na Rede Regional de Assistência à Saúde (RRAS) 13. **Resultados:** Ao todo, 124 casos de meningite por pneumococo foram registrados no SINAN. Durante o período analisado, o sexo masculino foi predominante, totalizando 65 casos. A faixa etária mais atingida foi a adulta entre 20 a 59 anos. A maior parte dos casos confirmados evoluiu para alta hospitalar, no entanto o número de óbitos permaneceu significativo. **Conclusão:** A meningite pneumocócica permanece sendo um desafio na saúde pública na região abrangida pela RRAS 13. No entanto, este estudo demonstrou a relevância da imunização em massa, através da aplicação de vacinas, como medidas fundamentais na prevenção da meningite por pneumococo.

Palavras-chave: Meningite; Notificação; *Streptococcus pneumoniae*; Saúde Pública

INTRODUÇÃO

Meningite é conceituada como a ocorrência de um processo inflamatório nas meninges, membranas que revestem o cérebro e medula espinhal. Podem ser ocasionadas por diferentes agentes infecciosos (vírus, bactérias, fungos ou parasitas) ou por outras causas não infecciosas, como por exemplo, traumatismos e reações medicamentosas, entre outros (BRASIL, 2021). A prevalência e distribuição dos microrganismos capazes de provocar essa enfermidade variam conforme as particularidades de cada região.

Atualmente, os casos de meningite bacteriana representam um desafio nacional e global em termos de saúde pública dada às expressivas taxas de morbimortalidade, a sua incidência e capacidade de provocar surtos esporádicos e epidemias em qualquer país. É uma doença classificada como endêmica em todos os continentes, incluindo em países desenvolvidos. Entretanto, sua frequência está inversamente relacionada aos níveis socioeconômicos e à faixa etária. Em casos mais graves, a taxa de mortalidade pode alcançar a 70%, sendo comumente associada a ocorrência de sequelas neurológicas. (MEIRELLES *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2021).

Os três principais agentes etiológicos de meningite bacteriana, são *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* e de acordo com o Ministério da Saúde meningite meningocócica predomina no Brasil enquanto meningite pneumocócica aparece no segundo lugar, apresentando alta letalidade (30%), o que justifica uma atenção especial quanto à sua vigilância e notificação (BRASIL, 2021).

Streptococcus pneumoniae, também conhecido como pneumococo pertence à família *Streptococcaceae*, sendo microscopicamente caracterizado como cocos Gram positivos, dispostos em cadeias curtas ou pares, podendo apresentar cápsula. Quando estão em pares,



apresentam bordas achatadas e externas lanceoladas, semelhante a chama de vela. É um patógeno frequentemente encontrado no trato respiratório superior (nasofaringe e orofaringe) de seres humanos assintomáticos e saudáveis. As enfermidades mais comumente vinculadas ao *Streptococcus pneumoniae* incluem pneumonia, bacteremia, otite média e sinusite. (VIEIRA *et al.*, 2007; HIROSE *et al.*, 2015; TEIXERA, *et al.*, 2015).

Devido aos altos índices de morbimortalidade, a meningite pneumocócica é comumente relacionada com morte e sequelas graves. Destaca-se que é uma enfermidade que costuma atingir todas as faixas etárias, principalmente crianças, idosos e indivíduos com condições crônicas ou imunossupressoras, como síndrome nefrótica esplênica (anatômica ou funcional), insuficiência renal crônica, diabetes mellitus e infecção pelo HIV, têm um maior risco de contrair a doença (BRASIL, 2021).

Existem diversas abordagens diagnósticas disponíveis para a identificação da meningite pneumocócica. A abordagem tradicional envolve o cultivo em meios nutritivos como ágar sangue e ágar chocolate. É crucial preceder com um exame microscópico de esfregaços corados pelo método de Gram, pois a presença de diplococos Gram-positivos no material é altamente indicativa de meningite pneumocócica. Outra técnica que pode ser utilizada tanto em líquido quanto em sangue é a detecção de antígenos capsulares por meio de diversas técnicas imunológicas. Recentemente, demonstrou-se que a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser excepcionalmente valiosa para o diagnóstico de infecções por pneumococos (SZTAJNBOK, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2015).

O início imediato do tratamento com antibióticos é essencial e não impede a coleta de amostras para diagnóstico etiológico, como líquido cefalorraquidiano, sangue ou outros espécimes clínicos. No entanto, é recomendável que a coleta das amostras para realização de cultura seja realizada de preferência antes do início do tratamento ou o mais próximo possível desse momento. O tratamento rápido e apropriado dos casos tem um impacto significativo na redução da mortalidade e são cruciais para um prognóstico satisfatório. (BRASIL, 2021).

O principal método de prevenção e controle da meningite pneumocócica é através da imunização. Atualmente, as vacinas pneumocócicas conjugadas 10 e 13 valentes, liberadas pelas agências reguladoras e comercializadas no país, atuam contra os 10 e 13 sorotipos mais associados à resistência bacteriana e de maior frequência no país. Desde 2010, o Ministério da Saúde introduziu desde março de 2010 a vacina pneumocócica 10 valente no Programa Nacional de Imunização (PNI) no calendário para crianças menores de dois anos de idade. Para os idosos acima de 60 anos, ou pessoas em situação de maior vulnerabilidade para a doença pneumocócica, como portadores de doenças crônicas, imunodeprimidos, pacientes com fístula liquórica, entre outros, a vacina polissacarídica é ofertada pelos Centros de Referências de Imunobiológicos Especiais (CRIE) (PERCIO, 2013; HIROSE *et al.*, 2015).

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foi realizado um estudo observacional descritivo visando analisar a ocorrência de casos de meningite pneumocócica no período de 2015 a 2020 na Rede Regional de Assistência à Saúde (RRAS) 13. Os dados foram obtidos a partir de registros disponibilizados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), relatórios epidemiológicos, publicações científicas, artigos e livros, de maneira retrospectiva. Ao longo da pesquisa, foram incluídas informações, como: sexo, faixa etária, evolução dos casos e métodos de diagnóstico laboratorial. Foi feita uma revisão de literatura para contextualizar os resultados obtidos, comparando-os com trabalhos anteriores e identificando tendências e padrões na incidência de meningite pneumocócica. Para a realização dos gráficos, foram

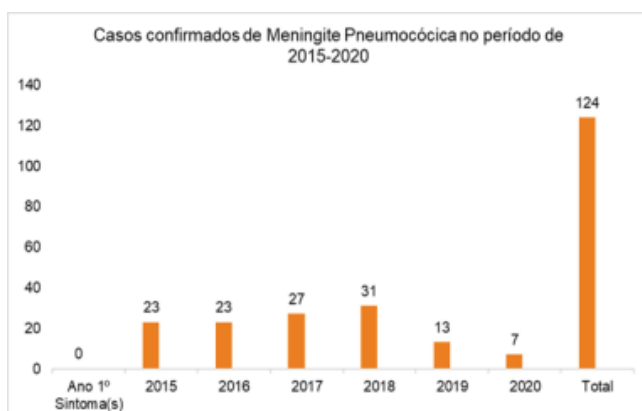


utilizados os programas disponibilizados pela Microsoft, o Excel 2007 e 2016, para visualização e representação dos dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado através de um levantamento retrospectivo dos casos confirmados de meningite pneumocócica na macrorregião de saúde que compõe a RRAS 13. De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), durante o período de 2015 a 2020, foi notificado um total de 124 casos. O Gráfico 1 demonstra o número de casos e a ocorrência da doença conforme os anos analisados.

Gráfico 1

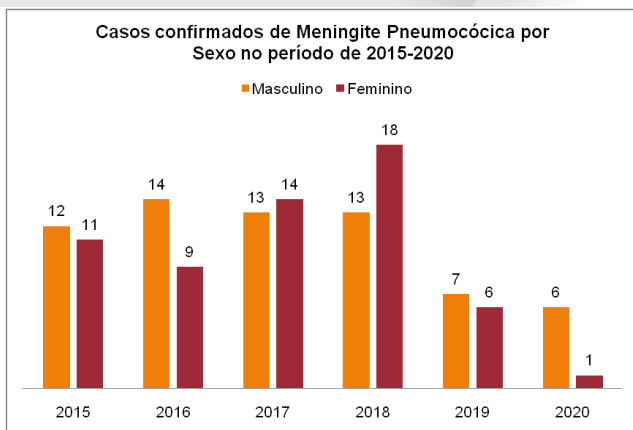


Fonte: Elaborado pela autora.

Analisando individualmente cada ano, pôde-se notar que em 2018 ocorreu o maior número de casos confirmados, totalizando 31. Em contrapartida, o ano de 2020 foi o que apresentou a menor quantidade, sendo apenas 7 casos confirmados de meningite pneumocócica. Observando de maneira geral, percebe-se que há uma tendência de queda no número de pessoas acometidas por este agente etiológico. Embora seja provável que a quantidade de casos em 2020 tenha sido afetada devido ao uso obrigatório de máscaras no período mais crítico da pandemia de SARS-Cov2 (Covid19), já que os anos anteriores exibiram um total parcialmente constante entre 2015 e 2017. Diminuindo subitamente no período de 2019 e 2020.

Em relação ao gênero dos indivíduos acometidos pela meningite pneumocócica na RRAS 13, verificou-se uma prevalência de casos confirmados em pacientes do sexo masculino, contabilizando 65, ou 52,42% de ocorrências no total. Por outro lado, as pessoas do sexo feminino registraram 59 casos confirmados da doença. Durante os anos analisados, somente em 2017 e 2018 ocorreu uma alteração na predominância dos casos, tornando mais frequentes em pessoas do sexo feminino. Os dados obtidos estão dispostos no Gráfico 2.

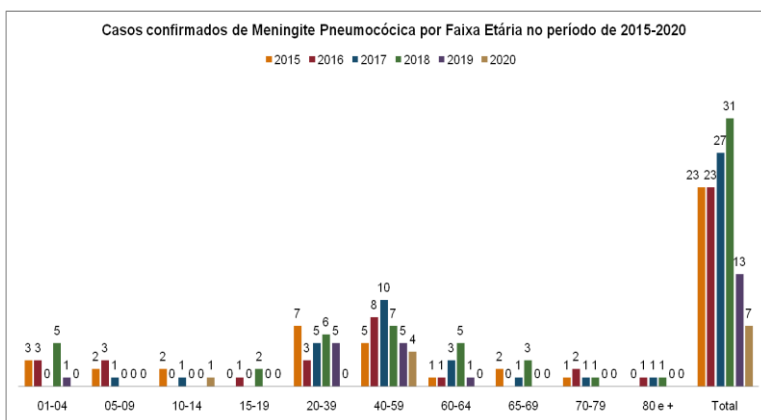
Gráfico 2



Fonte: Elaborado pela autora.

Em relação à faixa etária, os resultados deste estudo mostraram, também, que os mais acometidos foram adultos entre 40 a 59 anos, representando 39 casos confirmados de meningite pneumocócica. Em seguida, os indivíduos de 20 a 39 anos também apresentaram alta incidência nos casos confirmados, totalizando 26 registros. Crianças de 1 a 4 anos apresentaram ao todo 12 casos durante período analisado. O Gráfico 3 demonstra os dados analisados.

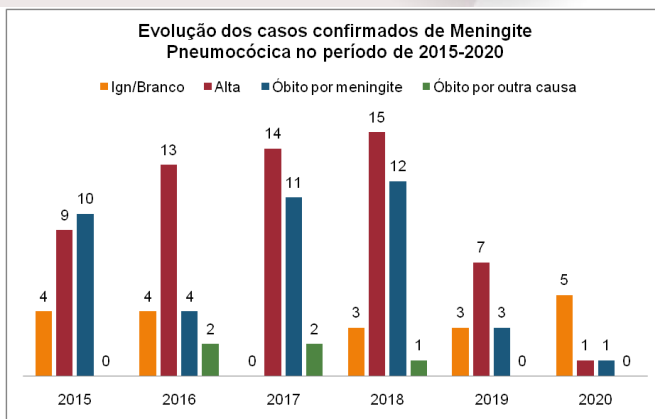
Gráfico 3



Fonte: Elaborado pela autora.

Quanto à evolução dos casos, constatou-se que a maioria dos pacientes acometidos pela doença durante os anos analisados evoluíram para alta hospitalar. No entanto, paralelamente, a mortalidade também se manteve elevada, contabilizando 41 óbitos enquanto foram registrados apenas 5 óbitos por outras causas. Destaca-se a ausência de informações sobre a evolução dos casos confirmados. Os dados desta análise estão esboçados no Gráfico 4.

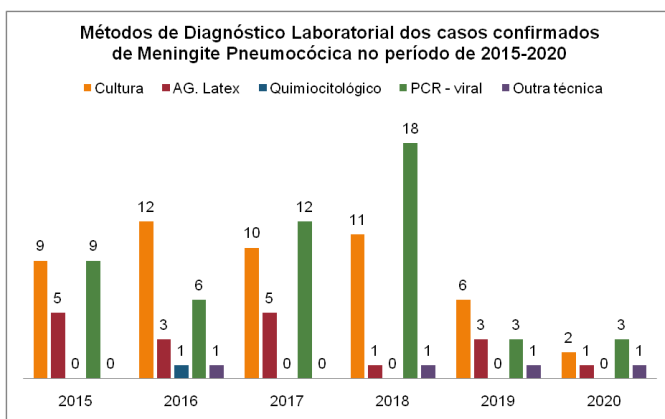
Gráfico 4



Fonte: Elaborado pela autora.

Os métodos de diagnósticos laboratoriais mais utilizados no decorrer dos anos analisados foram, simultaneamente, o PCR e a Cultura. A Aglutinação em Látex e o exame Quimiocitológico também foram aplicados, no entanto, em números inferiores quando comparados as outras técnicas. O Gráfico 5 demonstra a quantidade de vezes que cada critério foi usado na identificação da meningite pneumocócica.

Gráfico 5



Fonte: Elaborado pela autora.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos através das análises feitas durante a realização deste trabalho, compreende-se que a meningite pneumocócica permanece sendo um desafio na saúde pública do país. A não correspondência entre a diminuição dos casos e a taxa de letalidade sugere que é essencial implementar novas abordagens e estratégias no controle dessa doença.

Este estudo demonstrou a relevância da imunização em massa, através da aplicação de vacinas, como medidas fundamentais na prevenção da meningite por pneumococo.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Secretaria De Vigilância Em Saúde/Ministério Da Saúde. Panorama da meningite pneumocócica no Brasil, 2007-2020. **Boletim Epidemiológico**. Volume 52. Nº 25. P.21-32, Jul. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de>>



[conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2021/boletim-epidemiologico-25_svs.pdf](#)>. Acesso em: 27 out. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Meningite**. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/meningite>>. Acesso em: 10 ago. 2023.

HIROSE, T. E. *et al.* Pneumococcal meningitis: epidemiological profile pre- and post-introduction of the pneumococcal 10-valent conjugate vaccine. *J Pediatr (Rio J)*, v. **91**, n. **2**, p. 130-135, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2014.07.002>. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jped/a/8MZqHrZ7P3BLKtKcmMs7cVn/>>. Acesso em: 25 ago. 2023.

MEIRELLES. D. L. *et al.* Investigação de meningite por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil, utilizando métodos laboratoriais convencionais. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 8, n. 85, p.15 -22, 2011. Disponível em: <<https://periodicos.saude.sp.gov.br/BEPA182/article/view/38461>>. Acesso em: 29 set. 2023.

PERCIO, JADHER. **Perfil clínico-epidemiológico e fatores preditivos para óbito hospitalar dos casos de meningite pneumocócica notificados no IIER entre 2007 e 2011**. Monografia apresentada na conclusão do Programa de Aprimoramento Profissional da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, na área de Epidemiologia Hospitalar. São Paulo. S. P.: [s.n.], 2013. 36 p. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/07/1103958/jadher_percio.pdf>. Acesso em: 27 ago. 2023.

SILVA, A. F. T. da *et al.* Estudo epidemiológico sobre meningite bacteriana no Brasil no período entre 2009 a 2018. *Rev Med (São Paulo)*, v. 100, n. 3, p. 220 -228, maio-jun. 2021.; doi: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v100i3p220-228>. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/171748>>. Acesso em: 20 ago. 2023.

SZTAJNBOK, D. C. N. Meningite bacteriana aguda. **Revista de Pediatria SOPERJ**, n. 13:2, p. 72-76, 2012. Disponível em: <http://revistadepediatricsoperj.org.br/detalhe_artigo.asp?id=622>. Acesso em: 27 ago. 2023.

TEIXEIRA, L. M.; MERQUIOR, V. L. C.; CAMPOS, L. C.; PINTO, T. C. A. *Streptococcus pneumoniae*. In: TRABULSI, L.R.; ALTHERTUM, F. **Microbiologia**. Atheneu, São Paulo, 6 ed. 2015. P. 209-215. Disponível em: <<https://doceru.com/doc/8enxx0e>>. Acesso em: 27 out. 2023.

VIEIRA, A. C. *et al.* *Streptococcus pneumoniae*: estudo das cepas isoladas de liquor. **Jornal de Pediatria**. V. 83:1, 2007. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jped/a/SyDhzbKLJ3Pqm8SRn6Hn3Ms/?lang=en>>. Acesso em: 25 ago. 2023.



Capítulo 09

DOI: 10.53934/20242-09

ANÁLISE COMPARATIVA DE TRÊS METODOLOGIAS DE BASES VOLÁTEIS TOTAIS EM PESCADO

Anna Beatriz Goularte Santin¹; Roberto Carlos Fernandes Barsotti²;

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância em Saúde Pública - CLR Santos – Instituto Adolfo Lutz; E-mail: beatrizgsantin@gmail.com

²Pesquisador Científico do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas – CLR Santos – Instituto Adolfo Lutz

Resumo: O pescado é um alimento de elevada qualidade nutricional para o consumo humano por apresentar excelente fonte de proteína com alta digestibilidade, entre outros nutrientes benéficos à saúde. Não obstante, é um alimento de fácil deterioração, por conter alta atividade de água e pH próximo da neutralidade. Bases voláteis totais (BVT) é um método utilizado pelo serviço de inspeção oficial para avaliar a qualidade do pescado para o consumo. Este estudo comparou três metodologias para a quantificação de BVT em amostra de peixe salgado seco oriundas da UNESP e analisadas no IAL CLR Santos, sendo que para cada método foram conduzidos 5 réplicas com aproximadamente 10,0 g de amostra. Foi também realizada uma adaptação nas metodologias, sendo utilizada a mesma solução receptora de H_3BO_3 3% e a titulação com HCl 0,1 M. No primeiro método sendo o oficial atual do MAPA, a amostra foi extraída com $HClO_4$ 6% e alcalinizada com NaOH 20%; No segundo método referenciado pela EMBRAPA, foi utilizado TCA 5% para extração e alcalinizada com MgO onde surgiu um precipitado o que levou ao questionamento e alterada para NaOH 20%; Já no terceiro método, de destilação direta, descrito por Nicolau Antonacopoulos, a amostra foi transferida diretamente para o equipamento com água destilada. Após os dados obtidos através da titulação, foi possível comparar as médias e desvios-padrão dos resultados com valores distintos, concluindo que método 1 mostrou-se mais preciso além desta metodologia ser adotada como referência pelo MAPA.

Palavras-chave: Base Volátil no Pescado; Bases Voláteis Totais; Deterioração do Pescado; Frescor do Peixe

INTRODUÇÃO

Pescado é todo animal que vive geralmente em água doce ou salgada e que é utilizado para a alimentação podendo ser peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos (Furtado, 2021). É um alimento de elevada qualidade nutricional para o consumo humano por apresentar excelentes fontes de proteínas com alta digestibilidade, entre outros nutrientes benéficos à saúde. Não obstante, é o alimento de origem animal com maior probabilidade de deterioração devido a fatores extrínsecos que vão desde a manipulação Inicial na pesca, comercialização, armazenamento até o seu consumo, pois estes fatores determinam a intensidade da degradação devido aos fatores intrínsecos, sendo no elevado teor de nutrientes que podem ser consumido pelos microrganismos, na rápida absorção destrutiva enzimática, na taxa de atividade metabólica da microbiota, na grande quantidade de lipídios insaturados e pH próximo a neutralidade (Soares; Gonçalves, 2012).



Os profissionais da saúde têm recomendado o uso de pescados, pois estes, possuem gordura poliinsaturada que apresenta efeitos redutores sobre teores dos triglicerídeos e colesterol, reduzindo a incidência de doenças cardiovasculares (Araújo; Soares; Góis, 2010). Com a grande procura e consumo de pescados vale ressaltar que, estes devem passar por controle de qualidade evitando possíveis doenças transmitidas por alimentos (DTAs), que atualmente remetem a um problema de saúde pública (Soares Gonçalves, 2012).

Ao abordar sobre o tema "a qualidade do Pescado" temos um vasto significado, podendo referir-se ao quesito espécie ou tamanho daquele animal que foi pescado refletindo na qualidade do seu valor comercial, como também em sua aparência e frescor, remetendo ao seu grau de deterioração e a qualidade para o consumo humano (Silva *et al.*, 2008). Quanto a análise da ação enzimática e de microrganismos patogênicos do pescado, pode-se observar a produção de uma alta taxa de metabólitos que podem ser a trimetilamina, a dimetilamina e a amônia quantificados analiticamente através da determinação das Bases Voláteis Totais (BVT) (Souza; Silva, 2021).

O método de BVT segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2009) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2022) baseia-se na extração de materiais solúveis presentes no pescado com um ácido, que após alcalinização, o extrato é submetido a destilação por arraste de vapor, sendo os componentes de básicos voláteis absorvidos pelo ácido receptor e a concentração de BVT é obtida através de titulação das bases absorvidas, no qual é o método oficial para avaliar o frescor do pescado, podendo assim destacar sua qualidade para o consumo.

Devido os fatores intrínsecos e extrínsecos do pescado que colaboram com a sua degradação, além da variedade de metodologias para se avaliar o frescor do pescado, se faz necessário a análise comparativa das metodologias mais utilizadas atualmente e descritas na literatura para averiguar quais métodos seriam viáveis no momento de escolha para o uso na rotina laboratorial. Mediante ao projeto "Plataforma Tecnológica de Inspeção Sanitária para Pesca Artesanal" que foi realizado no Instituto Adolfo Lutz (IAL) CLR Santos juntamente com a UNESP, a presente pesquisa realiza a análise de três metodologias mais utilizadas de bases voláteis totais em pescado para compará-las estatisticamente e avaliar suas funcionalidades.

Espera-se que esta pesquisa contribua para a descoberta de novas hipóteses de viabilidade entre os métodos, sendo a qualidade da metodologia realizada um fator determinante para futuras análises. Além disso, que as conclusões possam servir de base para outros estudos de comum acordo com o tema.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização desta pesquisa foi feito um levantamento bibliográfico, utilizando como fonte os seguintes bancos de dados: Scielo, PubMed e Google Acadêmico. Nas buscas dos artigos foram utilizadas as palavras-chaves e artigos em português e inglês sendo elas: bases voláteis totais, frescor do peixe, base volátil no pescado, ciência do pescado e deterioração do pescado.

Além da revisão bibliográfica, foram feitos ensaios analíticos no laboratório, sendo amostras de peixe salgado e seco oriundo do Projeto "Plataforma Tecnológica de Inspeção Sanitária para Pesca Artesanal" coletadas pela UNESP na Comunidade Pesqueira Artesanal da Enseada da Baleia, Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo, e analisadas no Instituto Adolfo Lutz CLR Santos. O projeto foi aprovado quanto ao Mérito Científico pelo Conselho Técnico do IAL com a Ciência da Direção Geral e cadastro CTC - IAL 21P/2023. Pode se



destacar que de acordo com o Art 133 do Decreto Nº 10.468, de 18 de agosto de 2020, “pescado fresco é aquele que não foi submetido a qualquer processo de conservação, a não ser pela ação do gelo, mantido em temperaturas próximas à do gelo fundente, com exceção daqueles comercializados vivos”, no Brasil a regulamentação de BVT se dá por este decreto, sendo o limite para pescado fresco de 30 mg de N 100g⁻¹, (Brasil, 2020) Porém não há regulamentação na legislação brasileira referente ao peixe salgado e seco.

Foram realizadas as seguintes metodologias: Método oficial atual do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Método de destilação de um extrato desproteínizado com Ácido tricloroacético (TCA) como referência a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e o Método de destilação direta descrito por Antonacopoulos. Em cada método foram feitas 5 réplicas contendo aproximadamente 10,0 g , além de uma adaptação nas metodologias utilizando a mesma solução de recepção e titulação mediante as diretrizes da EMBRAPA.

Os materiais utilizados seguiram de acordo com a recomendação do MAPA (2022): balança analítica, bureta de 20 mL, equipamento para destilação por arraste de vapor de nitrogênio e proteínas, tubo de ensaio Kjeldahl, Erlenmeyers, funil de vidro, homogeneizador magnético, papel de filtro e provetas de 50 e 100 mL, além de timer, bandejas descartáveis e/ou Beckers para pesagem das amostras. Os reagentes e soluções aplicados foram: água destilada, silicone antiespumante, solução de ácido bórico (H₃BO₃) 30 g L⁻¹, óxido de magnésio (MgO), solução de ácido perclórico (HClO₄) 60 g L⁻¹, solução de ácido tricloroacético (TCA) 5%, solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 200 g L⁻¹, solução de fenolftaleína 10 g L⁻¹, solução indicadora de Tashiro e solução padronizada de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L⁻¹.

Para o primeiro método, após o preparo de amostra onde foi pesada em uma alíquota aproximadamente 10g, adiciona-se 90 mL de HClO₄ a 60 g L⁻¹, em um Becker e homogeneizou-se por 5 minutos em homogeneizador magnético. Após 10 minutos de repouso seguiu-se a filtração utilizando um funil e um filtro de papel qualitativo. Em seguida foi colocado 50 mL do filtrado em um tubo de ensaio Kjeldahl, e adicionou-se 1 gota de silicone e 5 gotas de fenolftaleína como indicador, e levou-se ao equipamento de destilação por arraste a vapor. Logo após adicionou-se 6,5 mL de NaOH 20%, onde a alcalinização é verificada mediante a mudança de cor para rosa devido a solução de fenolftaleína 10g L⁻¹. Em um Erlenmeyer com 100 mL de solução de H₃BO₃ e algumas gotas de indicador de Tashiro, mas durante a destilação irá mudar para verde. Após 10 minutos, o destilado foi titulado com solução de HCl 1% até a viragem da cor verde para azul, destacando o volume de ácido gasto (MAPA, 2022).

No segundo método com a amostra já preparada, transferiu-se para um Becker e homogeneizou-se por 5min com 90 mL de TCA 5%, e após decantar por 10 minutos, filtrou-se utilizando o funil e filtro de papel qualitativo. 50 mL do filtrado foi transferido para um tubo de ensaio Kjeldahl, onde realizou-se dois ensaios para alcalinizar a amostra, o primeiro com 1g de MgO e outro com 6,5 mL de NaOH 20%. O filtrado foi destilado em uma alíquota de aproximadamente 70mL em 10 minutos. O destilado foi recolhido em recipiente com 100 mL de solução de H₃BO₃ com algumas gotas do indicador de Tashiro. Em conclusão, titulou-se com solução de HCl 1% até o ponto de viragem de cor de verde para azul. (Fogaça, 2009).

Já no terceiro método, de destilação direta como o nome sugere, a amostra foi submetida em água destilada, igualmente homogeneizada e colocada diretamente no equipamento de destilação sem a filtragem, realizando o mesmo procedimento já descrito anteriormente. E para finalizar titulou-se com solução de HCl 1% até a cor verde virar para azul, anotando o volume de ácido gasto (Antonacopoulos, 1989).



Expressão dos resultados a ser utilizada nos métodos 1 e 2 segundo o MAPA:

$$N/100g = \frac{(V - Vb) \times f \times M \times 14 \times 2 \times 100}{m}$$

Expressão dos resultados a ser utilizada no método 3 segundo Antonacopoulos:

$$N/100g = \frac{M \times 1,4 \times 100}{m}$$

Sendo:

V = volume de solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ gasto na titulação da amostra, em mL;

Vb = volume de solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ gasto na titulação do branco, em mL;

f = fator de correção da solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ ;

M = molaridade da solução de HCl, em mol L⁻¹ ;

14 = massa molar do nitrogênio, em g mol⁻¹ ;

2 = fator de diluição;

m = massa da amostra, em g.

Para os cálculos das médias e desvios-padrão das amostras foi utilizado o programa Microsoft Excel. As diferenças estatísticas entre os métodos foram através da Análise de Variância (ANOVA), utilizando como ferramenta o programa PAST. O intervalo de confiança para esta pesquisa foi estabelecido acima de 95%, e as medianas consideradas estatisticamente diferentes de p <0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 pode-se observar os valores das médias e desvios-padrões

Tabela 1 – Concentração das Médias e Desvios-Padrão dos Resultados das Análises

	Método	Método	Método
	1	2	3
	60,7 ±	88,4 ±	55,3 ±
	0,7	4,7	0,8

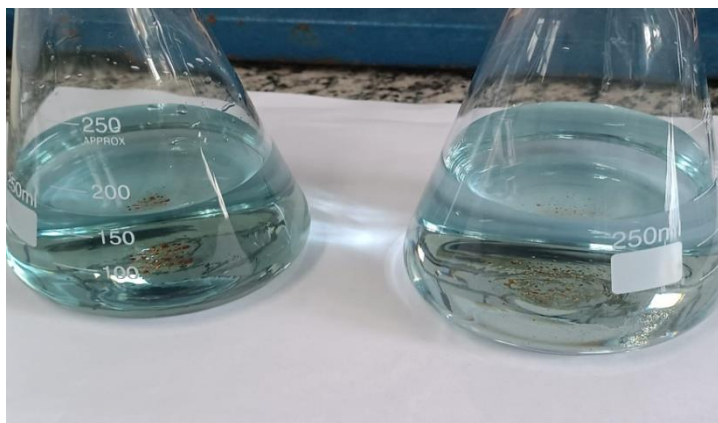
Fonte: Santin, 2023

Legenda: Método 1 - Ácido Perclórico, Método 2 -Ácido Tricloroacético e Método 3 - Destilação direta

No método 1 a concentração das médias e o desvio-padrão é de 60,7 ± 0,7 mg N.100g⁻¹, no método 2 de 88,4 ± 4,7 mg N.100g⁻¹ e no método 3 de 55,3 ± 0,8 mg N.100g⁻¹. O teste de ANOVA para medidas repetidas (Pelo teste- T pareado) rejeitou a igualdade de médias, entre os métodos 1 e 2 sendo p = 0,00004, entre os métodos 1 e 3 p = 0,00062 e entre 2 e 3 p = 0,00008.

Os valores encontram-se acima do que a legislação brasileira permite para peixe fresco, porém vale ressaltar que se trata de amostra de peixe salgado e seco, e que já estavam em uso no laboratório. Além de que o desvio padrão do método 2 demonstrou-se maior do que os do método 1 e 3.

Durante o processo de alcalinizar a amostra com MgO na segunda metodologia, foi percebido o surgimento de precipitado e a coloração azul (figura 1). A fim de saber se o destilador estava contaminado foi realizado um segundo ensaio apenas com água destilada como reagente para alcalinização, tendo em vista a coloração roxa no final e sem a formação da substância desconhecida, concluiu-se que o destilador estava íntegro o que levou a realização de um terceiro ensaio utilizando 6,5 mL de NaOH no qual não houve a formação de precipitado e o filtrado apresentou-se na cor verde.



Figura

Fonte:

Santin,

1
2023

Legenda: Destilado com substâncias desconhecidas alaranjadas.

Podem-se destacar alguns pontos relevantes nas análises quanto ao seu uso rotineiro no laboratório. No método 1 com ácido perclórico, observa-se que a solução filtrada aparenta ser mais límpida e estável além do destilador se apresentar menos gorduroso ao final da análise comparado aos ácidos das outras metodologias, porém não é só de se evidenciar que o seu uso precisa ser feito com cautela visto que se trata de um ácido com risco explosivo como também seu custo costuma ser elevado. No método 2 com ácido tricloroacético, a solução filtrada apresenta-se pouco turva, além de que houve a formação de precipitado como na figura 1 com valor incompatível na titulação que levou-se ao questionamento de sua formação sendo assim foram realizadas duas alcalinizações na primeira com MgO e na segunda com NaOH. No método 3 observa-se que a metodologia com maior praticidade, custo baixo, Porém precisa-se de mais silicone antiespumante no momento da destilação.

CONCLUSÕES

Em suma, podemos concluir que as três metodologias apresentaram médias diferentes. Deve-se ressaltar que além do primeiro método ser recomendada oficialmente pelo MAPA mostrou o resultado mais preciso, e como recomendado o filtrado pode ser mantido até 7 dias refrigerado pois quando o laboratório tem uma demanda maior de análises isso pode ser um fator importante.

Quanto ao segundo método, precisa-se averiguar e realizar mais testes com o ácido utilizado, testando também com outras marcas de reagente, pois acredita-se que o TCA utilizado possa estar comprometido já que apresentou o precipitado.

Devido ao tempo hábil, não foi possível realizar uma pesquisa a fundo sobre o que poderia ser o precipitado formado na segunda metodologia e uma maior quantidade de análises para se obter uma resposta mais apurada.

REFERÊNCIAS

ANTONACOPOULOS, N.; VYNCKE, W. Determination of volatile basic nitrogen in fish: A third collaborative study by the West European Fish Technologists' Association (WEFTA). *Z Lebensm Unters Forsch* **189**, 1989. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01683206>. Acesso em: 26 maio 2023.



ARAÚJO, D. A. F. V; SOARES, K. M. P.; GÓIS, V. A. Características gerais, processos de deterioração e conservação do pescado. **PUBVET**, 2010 Disponível em: <https://ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/2645>. Acesso em: 30 jul 2023.

BRASIL, Decreto nº 10.468, de 18 de agosto de 2020. Dispõe sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/decreto-n-10.468-de-18-de-agosto-de-2020-272981604>. Acesso em: 16 ago. 2023

FOGAÇA, F. H. S. et al. Determinação de bases nitrogenadas voláteis (BNV). **EMBRAPA Documentos 189: Métodos para Análise de Pescados**, Teresina, ed. 21, p. 27-29, 2009. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/80694/1/documento-189.pdf>. Acesso em: 26 maio 2023.

FURTADO, A. A. L. Pescados. **EMBRAPA**, [S. l.], p. 1, 9 dez. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos/processos/grupos-de-alimentos/pescados>. Acesso em: 1 jul. 2023.

JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPEIA. Legislação nº L 338, de 22 de dezembro de 2005. Actos cuja publicação é uma condição da sua aplicabilidade. **VALORES-LIMITE DO AZOTO BÁSICO VOLÁTIL TOTAL (ABVT) PARA DETERMINADAS CATEGORIAS DE PRODUTOS DA PESCA E MÉTODOS DE ANÁLISE A UTILIZAR**, 2005. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2074-20191214>. Acesso em: 29 maio 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (Brasília). Métodos da Rede LFDA. **Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal. Bases voláteis totais**, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/legislacao-metodos-da-rede-lfda/poa/metodos_oficiais_para_analise_de_produtos_de_origem_animal-_1a_ed-_2022_assinado.pdf. Acesso em: 26 maio 2023.

SILVA, L. K. S. et al. Otimização e padronização do uso da metodologia para determinação de bases nitrogenadas voláteis totais (BNVT) em camarões *Xyphopenaeus kroyeri*. **Brazilian Journal of Food Technology**, 2008. Disponível em: https://bjft.ital.sp.gov.br/especiais/especial_2009_2/v12ne_t0288.pdf. Acesso em: 16 ago 2023.

SOARES, K. M. P.; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **R. Inst. Adolfo Lutz**, 2012. Disponível em: https://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial71_1_completa/1426.pdf. Acesso em: 20 jul. 2023.

SOUZA, J. H. R; SILVA, L. K. S. As bases nitrogenadas voláteis totais são confiáveis para aferir o frescor de pescado?. *In: CORDEIRO, CARLOS ALBERTO MARTINS et al. Ciência e Tecnologia do Pescado: Uma análise pluralista*. 1. ed. Guarujá SP: Científica Digital, 2021. v. 3, cap. 3, p. 40-57. ISBN 10.37885/211006380. Disponível em: <https://downloads.editoracientifica.com.br/books/978-65-5360-015-7.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2023.





Capítulo 10

DOI: 10.53934/20242-10

ESPOROTRICOSE HUMANA NO BRASIL: ASPECTOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E EPIDEMIOLÓGICOS

Ana Caroline Pereira¹; Jaqueline Otero Silva²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública- SUS/SP- IAL; E-mail: ana.caroline1999@outlook.com.br

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

Resumo: A esporotricose humana é uma micose subcutânea de distribuição mundial causada pelo fungo do gênero *Sporothrix* spp. Foi descrita pela primeira vez no Brasil em 1907 por Lutz e Splendore. Trata-se de uma infecção transmitida ao homem através de propágulos fúngicos presentes no solo e nas plantas, inoculados na pele ou mucosa por meio de ferimentos (infecção sapronótica), ou por arranhaduras ou mordeduras de animais (infecção zoonótica). O trabalho objetiva descrever as características clínicas, laboratoriais e epidemiológicas da doença, e ainda abordar sua distribuição no Brasil. Trata-se de uma revisão bibliográfica elaborada a partir de artigos científicos, jornais e livros utilizando como bases de dados PubMed, SciElo e Google Acadêmico. *Sporothrix* spp. possui a capacidade de causar comprometimento local ou disseminado com formas clínicas mais graves (imunorreativa e disseminação sistêmica). *Sporothrix schenckii* era o agente etiológico da esporotricose em humanos, *Sporothrix schenckii* era o agente etiológico da esporotricose em humanos, mas foi identificada uma espécie mais patogênica, *Sporothrix brasiliensis*, transmitida pelos animais. Testes moleculares foram desenvolvidos para o diagnóstico laboratorial, mas a cultura se mantém como padrão-ouro. Atualmente, observa-se a prevalência de casos de esporotricose em todas as regiões do Brasil sendo as maiores taxas de infecção no Sudeste. A notificação ocorre em alguns estados e municípios. A subnotificação não revela a dimensão dos casos, resultando em negligência, caracterizando um problema de saúde pública.

Palavras-chave: Esporotricose humana; *Sporothrix* spp.; Zoonose

INTRODUÇÃO

No Brasil, a esporotricose foi relatada pela primeira vez em 1907 por Lutz e Splendore que isolaram o fungo de ratos e humanos. *Sporothrix* é formado por fungos eucariontes, heterotróficos, imóveis e com quitina na parede celular. Apresentam termodimorfismo, a temperatura de 35°C a 37°C possuem a fase leveduriforme, a temperatura 25°C a 30°C a fase filamentosa (OROFINO-COSTA *et al.* 2022). As espécies que fazem parte do complexo *Sporothrix* com maior importância clínica por serem patogênicas são: *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana* e *S. luriei* (BARROS *et al.* 2011). *S. brasiliensis* é considerada a espécie mais virulenta causando a doença em indivíduos imunocompetentes sendo transmitida por infecção zoonótica (RODRIGUES *et al.* 2015) O fungo está presente nas plantas, espinho, madeira e solo contaminado. Em razão ao seu habitat, a via clássica de transmissão era através da inoculação de elementos fúngicos na pele ou mucosa por ferimentos (infecção sapronótica), causado por *S. schenckii*. No entanto, notou-se outra via de transmissão recorrente, por mordeduras e/ou arranhaduras de



animais, principalmente gatos (infecção zoonótica). Classicamente, em ambos os casos a lesão se inicia com o nódulo no local da inoculação. O diagnóstico é feito através da associação de exames clínicos e laboratoriais correlacionando os resultados com dados epidemiológicos (BARROS *et al.* 2011). Atualmente, a doença é considerada de emergência devida sua subnotificação em alguns estados e municípios do Brasil e tem se tornado um problema de saúde pública. Nesse contexto, o trabalho tem como objetivo abordar as características clínicas, laboratoriais e epidemiológicas da esporotricose humana e analisar seus impactos e distribuição no Brasil, com intuito de relatar a importância da vigilância da doença.

METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado por meio de uma revisão bibliográfica com base em artigos científicos, jornais e livros referentes à esporotricose humana retratando suas características clínicas, laboratoriais e epidemiológicas. Foi feita uma busca nas bases de dados publicados no PubMed, SciELO e Google Acadêmico. Os descritores utilizados foram: esporotricose humana, *Sporothrix spp*, zoonose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As manifestações clínicas da esporotricose humana são divididas em cutânea, mucosa, extracutânea e/ou disseminada. A disseminação via linfática (linfocutânea) formando uma cadeia nodulosa é a mais comum (80% dos pacientes). Na forma extracutânea, o fungo pode atingir outros órgãos e sistemas sem comprometer a pele por via hematogênica (QUEIROZ-TELLES *et al.* 2019). Na disseminada as lesões são espalhadas pela pele, sendo a forma clínica mais grave. A forma imunorreativa é rara e caracterizada por uma intensa reação de hipersensibilidade (SÃO PAULO, 2020). A gravidade das manifestações clínicas depende de fatores como: imunidade do paciente, profundidade do inóculo no trauma, carga e patogenicidade fúngica (BARROS *et al.* 2011).

O diagnóstico laboratorial é realizado por meio de exames micológicos, histológicos, imunológicos e moleculares. O micológico consta em exame direto, cultura e identificação. No exame direto com Hidróxido de Potássio 20% observamos em microscopia, leveduras em formato de charuto ou apenas formas ovaladas com divisão em brotamento. A coloração de Giemsa realizada a partir de impressões de pus ou biópsia aumenta sensibilidade do exame (SCHEREIBER, A.Z *et al.* 2013), apesar de apresentar baixa sensibilidade e especificidade comparado à cultura devido à baixa carga fúngica em amostras clínicas humanas. A cultura é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico. O gênero *Sporothrix* cresce em meios de cultura como Ágar Sabouraud Dextrose acrescido de antibióticos (cloranfenicol ou gentamicina) ou Ágar Mycosel (OROFINO-COSTA *et al.* 2017). Por ser um fungo dimórfico é recomendado semear as amostras biológicas em dois tubos de meio de cultura e incubar a 30°C e 37°C cada. Na fase filamentosa (30°C) as colônias apresentam um aspecto membranoso com coloração esbranquiçada a bege com um halo escuro. Na micromorfologia se apresenta na forma de hifas septadas e hialinas com conídios piriformes ovais lembrando arranjo de “margaridas”. A fase leveduriforme a 37°C não é típica do gênero (SCHEREIBER, A.Z *et al.* 2013). No diagnóstico histopatológico a coloração de hematoxilina e eosina é a mais utilizada (BARROS *et al.* 2011). No entanto, possui pouca contribuição na identificação do agente etiológico devido à dificuldade de encontrar leveduras no tecido, são observadas somente em 18 a 35% dos casos (SÃO PAULO, 2020). Os métodos imunológicos mais utilizados são testes de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) com 90% de especificidade e 80% sensibilidade, e o Imunoblot. A reação intradérmica com esporotriquina é utilizada em inquéritos epidemiológicos



(OROFINO-COSTA, 2022). Os métodos moleculares mais empregados são baseados em reações de PCR que apresentam alta sensibilidade e especificidade comparados aos testes fenotípicos (RODRIGUES *et al.* 2015). O MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) é uma técnica que pode auxiliar no diagnóstico molecular, contribuindo para identificação presuntiva do agente (MATOS *et al.* 2019).

A esporotricose humana é considerada uma doença endêmica no Brasil, com maior incidência de casos da América Latina. Essa elevada incidência pode ser justificada pelo surgimento dos casos relacionados à transmissão zoonótica, especialmente gatos, por serem susceptíveis a se infectarem e transmitirem a doença aos humanos. Inicialmente, a doença era associada aos homens que trabalhavam nas áreas rurais ou profissionais que mantinham contato direto com o solo, com o surgimento da transmissão zoonótica, a doença se tornou comum também entre as crianças e mulheres, alterando o perfil epidemiológico (OROFINO-COSTA *et al.* 2017). Atualmente, observa-se a dispersão do fungo por praticamente todas as regiões do Brasil. No Norte do país, os casos se concentram no estado do Amazonas, em Manaus, que instituiu a doença como notificação compulsória através da Lei N.º 5.411, de 24 de fevereiro de 2021 (MANAUS, 2021). No período de janeiro a novembro de 2022 foram registrados 230 casos sendo 225 reportados em Manaus (FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAZONAS, 2022). O Nordeste se destaca, com casos registrados na Bahia, Rio Grande do Norte, Alagoas e principalmente Pernambuco, no município de Recife. Pernambuco no período de 2014 a 2016 notificou a ocorrência de um surto correspondendo ao maior número de casos registrados no estado (SILVA *et al.* 2018).

No Centro-oeste, não há registro de grandes surtos; entretanto, parte dos estados considera a doença como notificação compulsória como Mato grosso do Sul e Distrito Federal (MATO GROSSO DO SUL, 2021; BRASÍLIA (DF), 2021). Segundo Falcão *et al.* (2019), Goiás está entre os estados com maiores taxas de hospitalizações na região no período de 1992 a 2015. Do total de 782 hospitalizações, o estado apresentou 69 (8,8%), com apenas um óbito nesse período, mas não teve registro de surtos. No Sul do país, os primeiros casos relatados ocorreram no Paraná em 2011 (Curitiba). Em 2017, foram registrados 43 casos e em 2022 o número subiu para 4.141 (PARANÁ, 2023). No estado do Rio Grande do Sul, o município de Rio Grande é considerado o segundo estado com maior número de notificações (POESTER *et al.* 2019).

Apesar da prevalência de casos em todo o Brasil, as maiores taxas de infecção ocorrem na região Sudeste (MOREIRA *et al.* 2021). O Rio de Janeiro possui várias áreas endêmicas, as cidades de maior incidência são o Rio de Janeiro (296 casos) e Nova Iguaçu (106 casos) e Campos dos Goytacazes com menor número (30 casos) (RIO DE JANEIRO, 2021). Gremião *et al.* (2017) correlacionaram essa alta incidência à transmissão zoonótica, ao analisar dados registrados pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Rio de Janeiro. No período de 1997 a 2011 foram descritos 4.188 casos em humanos e de 1998 a 2015, 244 cães e 4.703 gatos também foram diagnosticados com a doença, indicando-os como principal fonte de contágio. O estado de São Paulo também possui um número de casos significativos na região Sudeste, relacionados à transmissão zoonótica. O primeiro caso de esporotricose humana causado por *S. brasiliensis* adquiridas por felinos foi descrito em 2011. Na cidade de Guarulhos entre 2014 a 2016 foram registrados 685 casos de infecção por gatos e de 2017 a 2019 houve um aumento de 450% (BITTENCOURT *et al.* 2022). Veasey *et al.* (2022) ao avaliarem 20 pacientes, por oito anos, de um hospital terciário de São Paulo verificaram que 70% deles relataram terem tido contato com gatos doentes. Camargo (2018), no município de Bauru-SP ao analisar 43 casos de esporotricose humana no período de 1996 a 2016 constatou que 21 pacientes tiveram como principal via de contágio a transmissão zoonótica,



especialmente pessoas do lar e profissionais liberais. A análise dos impactos da doença em todo estado não é possível em razão da esporotricose ser notificada somente em alguns municípios. No entanto, apesar da subnotificação, torna-se evidente que a esporotricose humana tem se disseminado para diversas cidades do Brasil (VEASEY *et al.* 2022).

A esporotricose, atualmente, é considerada um problema de saúde pública, devido à ausência de programas para controle da doença, serviços de saúde escassos ou negligenciados, subnotificação e desconhecimento da doença pela população. Como solução para tal problemática seria a inclusão da esporotricose na lista de notificação compulsória pelos estados e municípios, implementação de centros de atendimentos médico nas regiões de maiores incidências e a disseminação das informações relevantes sobre a doença por meio das unidades de saúde (BARROS *et al.* 2010). Poester *et al.* (2022) exemplificaram uma política pública a ser adotada ao descrever o município de Rio Grande-RS, que implementou em 2017 um serviço público de referência especializado para atender pacientes suspeitos de infecção por esporotricose, com o intuito de garantir gratuitamente, pelo SUS, diagnóstico, tratamento e acompanhamento de qualidade. O programa também divulgou informações relativas à transmissão da doença para a população. A criação de serviços públicos de qualidade garante controle epidemiológico, e o aumento das notificações coopera com a vigilância da doença no Brasil.

CONCLUSÕES

A esporotricose é uma doença endêmica em quase todos os estados do Brasil, com as maiores incidências na região Sudeste. A notificação da doença, frequentemente, se limita às capitais dos estados, negligenciando os municípios, contribuindo para o desconhecimento da prevalência dos casos nesses locais. Conforme evidenciado, a maioria dos casos relatados são adquiridos por transmissão zoonótica com a disseminação de uma espécie mais patogênica, *S. brasiliensis*. Diante desse cenário, são necessárias medidas de vigilância eficazes para controle da doença em todo país, atentando-se especialmente as comunidades desfavorecidas com menor acesso às informações e a saúde, além da inclusão da doença na lista de notificação compulsória nacional. O desenvolvimento de novas pesquisas relativas à esporotricose é fundamental para redução da sua incidência no Brasil.

REFERÊNCIAS

BARROS, M. B. L.; ALMEIDA PAES, R. de.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633 – 654, 2011, Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/cmr.00007-11>. Acesso em: 15 ago. 2023.

BARROS, M.B.L. *et al.* Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. Revista Panamericana de Salud Pública, v. 27, n. 6, p. 455-60, 2010. Disponível em: <https://scielosp.org/pdf/rpsp/2010.v27n6/455-460/pt>. Acesso em: 24 jul.2023

BITTENCOURT, A. A. *et al.* A neglected disease. Human sporotrichosis in a densely populated urban area in São Paulo, Brazil: clinical epidemiological and therapeutic aspects. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v.53, p.739-748, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s42770-022-00713-5> Acesso em: 24 jul.2023

BRASÍLIA (DF). Portaria nº 664, de 08 julho de 2021. **Diário Oficial do Distrito Federal**. Brasília, 2021, ed 130. Disponível em: <file:///C:/Users/lorena/Downloads/DIARIO%20OFICIAL%20DO%20DISTRITO%20FEDERAL.pdf>. Acesso em: 03 out.2023



CAMARGO, D. **Estudo Epidemiológico e de Georreferenciamento da Esporotricose Humana na Região de Bauru, Estado de São Paulo**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, 2018.

FUNDAÇÃO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE DO AMAZONAS –DRA. ROSEMARY COSTA PINTO. **Esporotricose: Saúde do Amazonas informa sobre a doença e orienta como se prevenir**. [Manaus,AM], 2022. Disponível em:https://www.fvs.am.gov.br/noticias_view/7562. Acesso em: 07 out. 2023.

GREMIÃO, I.D.F.*et al.* Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: cat to human transmission. **Plos Pathogens**, , v. 13, n. 1, 2017.Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006077>. Acesso em: 05 set. 2023

MANAUS (AM). Lei n. 5411, de fevereiro de 2021. **Diário Oficial do Estado do Amazonas**. Manaus, 2021. Disponível em: file:///C:/Users/lorena/Downloads/diario_am_2021-03-11_pag_53.pdf. Acesso em:03 out.2023

MATO GROSSO DO SUL. Secretaria de Estado de Saúde. **Gerência técnica de Zoonoses/CEVE/DGVs/SES**, 2021. Disponível em: <https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2021/08/Nota-tecnica-esporotricose.pdf>. Acesso em: 07 out.2023

MATOS, A.M.F. *et al.* Identification by MALDI-TOF MS of *Sporothrix brasiliensis* Isolated from a Subconjunctival Infiltrative Lesion in an Immunocompetent Patient. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 22,2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms8010022> Acesso em: 29 set. 2023

MOREIRA, S. M. *et al.* Implementation of an Animal Sporotrichosis Surveillance and Control Program, Southeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 3, p. 949 - 952, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2703.202863>. Acesso em: 27 jul.2023

OLIVEIRA, Jeferson Carvalhaes de. Micoses subcutâneas. In: OLIVEIRA, Jeferson Carvalhaes de. **Tópicos em micologia médica**. Rio de Janeiro, 2014. P.95-102. Disponível em: <https://controllab.com/wp-content/uploads/Micologia-Medica-4a-edicao.pdf>. Acesso em: 30 Out. 2023.

OLIVEIRA, M.M.E. **Identificação e análise filogenética de espécies do gênero *Sporothrix* isoladas em área endêmica de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2009. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2009. 67f. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/9241/manoel_oliveira_ipecc_mest_2009.pdf;jsessionid=1DCB6E5991837CFD05EBEB8F1E9A8236?sequence=1 Acesso em: 30 Out. 2023. – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2009

OROFINO-COSTA, R.*et al.* Sporotrichosis: an update on epidemiology,etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **An Bras Dermatol** ,2017. v. 92, n. 5,p. 606 – 620, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5674690/pdf/abd-92-05-0606.pdf>. Acesso em: 11 ago. 2023.

OROFINO-COSTA, R. *et al.* Human sporotrichosis: recommendations from the brazilian Society of dermatology for the clinical, diagnosticand therapeutic management. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n.6, p. 757-777, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9582924/pdf/main.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2023.



PARANÁ, Ministério Público do Paraná. **MPPR reunirá gestores públicos e entidades para tratar de alta de casos de doença que atinge gatos e humanos, 2023.** Disponível em: <https://mppr.mp.br/Noticia/MPPR-reunira-gestores-publicos-e-entidades-para-tratar-de-alta-de-casos-de-doenca-que> . Acesso em: 03 out. 2023.

POESTER, V.R. *et al.* Desconhecimento de profissionais e ações de extensão quanto à esporotricose no extremo Sul do Brasil. **Vittale Revista de Ciências da Saúde**, v.31, n.1, p. 8-14, 2019. Disponível em: <https://periodicos.furg.br/vittale/article/view/8214/5934%20>(.Acesso em:02 ago. 2023

POESTER, V.R. *et.al.* CATastrophe: Response to the challenges of zoonotic sporotrichosis in southern Brazil. **Mycoses**, v.65 p. 30-34, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/myc.13363>. Acesso em: 04 jul.2023

QUEIROZ-TELLES, F.; BUCCHERI, R.; BENARD, G. Sporotrichosis In Immunocompromised Hosts. **Journal Of Fungi**, v.5, n.8; p. 1 – 23, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463096/pdf/jof-05-00008.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2023.

RIO DE JANEIRO. Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. **Boletim epidemiológico esporotricose nº 001/2021**, 2021 Disponível em: <<http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=x19OcAuQdLk%3D>>. Acesso em:13 out. 2023.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S. de; CAMARGO, Z. P. de. Molecular Diagnosis of Pathogenic Sporothrix Species. **PLoS Negl Trop Dis**, v.9, n.12, p. e0004190, Dec 1, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4666615/pdf/pntd.0004190.pdf>. Acesso em: 18 jul.2023.

SÃO PAULO (SP). Secretaria Municipal de Saúde. **Nota Técnica 09 DVE/DVZ/COVISA/ 2020**. Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020, 2020. Disponível em: https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/upload/saude/Nota_tecnica_09_2020_e_sporotricose_humana_03_07_2023.pdf. Acesso em: 13 out. 2023.

SCHEREIBER, A.Z *et al.* Detecção e identificação de fungos de importância médica. *In: Brasil. ANVISA. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde*. Módulo 8: /Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: Anvisa, 2013. 46p.: il.9 volumes. Disponível em: https://www.saude.go.gov.br/images/imagens_migradas/upload/arquivos/2017-02/modulo-8---deteccao-e-identificacao-de-fungos-de-importancia-medica.pdf. Acesso em: 30 out. 2023.

SILVA, G M. *et al.* Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p:1767-1771, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5027>. Acesso em: 08 set. 2023

VEASEY, J.V. *et al.* Epidemiological and geographical distribution profile of urban sporotrichosis in the city of São Paulo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2022. v. 97, n.2, p. 228-230, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9073216/pdf/main.pdf> . Acesso em: 19 ago. 2023.



Capítulo 11

DOI: 10.53934/20242-11

PROTOSCOLOS MOLECULARES APLICADOS A ISOLADOS DE *Plasmodium* EM PROGRAMA DE PROFICIÊNCIA LABORATORIAL: AVALIAÇÃO DOS TESTES qPCR E NESTED PCR

Lauani Vitória Rodrigues Seragusse¹; Mariana Aschar Ferraz²; Silvia Maria Di Santi³

¹Estudante do Curso de Especialização Vigilância Laboratorial em Saúde Pública, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, lauani.vitoria@hotmail.com

²Pós Doutoranda, Núcleo de Estudos em Malária, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, mariana_aschar@usp.br

³Pesquisador Científico, Núcleo de Estudos em Malária, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, santi@usp.br

Resumo: Um dos desafios para o controle da malária é o diagnóstico laboratorial. Embora a gota espessa seja o teste de referência, tendo como método complementar o teste de diagnóstico rápido, protocolos moleculares são necessários para detecção de baixas parasitemias e diferenciação acurada das espécies de *Plasmodium*. Programas de proficiência são fundamentais para avaliação do desempenho de laboratórios de referência com atuação em assistência e pesquisa, como ocorre no Núcleo de Estudos em Malária do Instituto Adolfo Lutz. Este trabalho teve como objetivo a aplicação prática de qPCR e *nested* PCR em amostras provenientes de um painel de controle de qualidade externo do Programa Global da Malária da Organização Mundial de Saúde em parceria com o Serviço Nacional de Avaliação de Controle de Qualidade Externo do Reino Unido (*WHO Global Malaria Programme/United Kingdom National External Quality Assessment Service*). Os ensaios foram realizados utilizando os protocolos moleculares disponíveis no Núcleo de Estudos em Malária e submetidos para avaliação pelas instituições responsáveis pelo Programa de Controle de Qualidade. Uma amostra foi diagnosticada como *P. vivax*, uma como *P. knowlesi*, uma como *P. ovale*, cinco como *P. falciparum* e duas consideradas negativas. Todos os resultados apresentados foram concordantes com o diagnóstico realizado pelo Programa de Controle de Qualidade, validando os protocolos utilizados no Núcleo de Estudos em Malária.

Palavras-chave: malária; diagnóstico laboratorial; *Plasmodium*; controle de qualidade; PCR

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa transmitida pela picada de fêmeas do mosquito *Anopheles* infectadas com *Plasmodium* durante o repasto sanguíneo e sua incidência é aumentada pelas condições ambientais favoráveis à proliferação do vetor e a condições socioeconômicas que dificultam as medidas de controle (Buck e Finnigan, 2023). Em humanos, são cinco as espécies que causam a malária: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. malariae* e *P. ovale*. *P. falciparum* e *P. vivax* são as espécies mais prevalentes, sendo *P. falciparum* a mais patogênica. Esta espécie é a predominante na África Subsaariana, contribuindo com 95% dos casos e 96% dos óbitos em nível global, sendo 78.9% das mortes

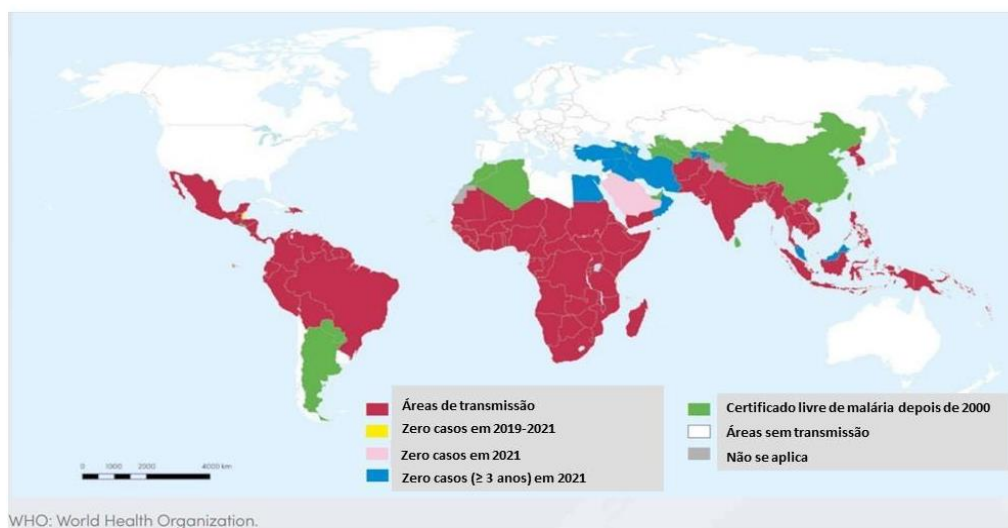


em crianças abaixo de cinco anos (WHO, 2022). *P. knowlesi* é encontrado no sudeste da Ásia e pode levar a malária grave e morte se não tratado precocemente (Ashley; Pyae; Woodrow, 2018). *P. malariae* e *P. ovale* geralmente apresentam quadros de malária não complicada. Os principais sintomas são febre, calafrio, sudorese, dor no corpo, náusea e vômito. Nos casos graves a evolução pode levar a anemia grave, hipoglicemia, acidose metabólica, insuficiência renal, edema pulmonar e coma (Segurado e Di Santi, 2022).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e os Programas Nacionais preconizam a confirmação diagnóstica pela microscopia e/ou testes rápidos para guiar o tratamento, visto que os esquemas terapêuticos diferem em função da espécie de *Plasmodium* (Brasil, 2022; WHO, 2022). O tratamento de *P. falciparum* é baseado no uso de derivados de artemisinina em combinação com outro antimalárico. O tratamento para *P. vivax* e *P. ovale* é baseado no uso de cloroquina para combater a fase assexuada sanguínea e primaquina para as formas latentes no fígado, os hipnozoítos, responsáveis pelas recaídas da malária. Como *P. malariae* não apresenta estas formas latentes, o tratamento utiliza somente cloroquina (Brasil, 2021; WHO, 2022).

Em 2021 foram registrados 247 milhões de casos de malária no mundo, 95% em países africanos (WHO, 2022). No mesmo ano, mais de 500 mil casos foram confirmados nas Américas, 74% causados por *P. vivax* e 26% por *P. falciparum* e infecções associadas, com 120 mortes (OPAS, 2022). São três as espécies de *Plasmodium* que causam malária no Brasil: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. O Ministério da Saúde reporta que 99,9% da transmissão ocorre na região Amazônica. Na região extra-Amazônica acontecem surtos esporádicos que podem resultar no aumento da transmissão em áreas de baixa endemicidade. Em 2021 foram notificados 139.211 casos no país, sendo 17% por *P. falciparum* e 83% por *P. vivax* (Brasil, 2022). O quadro epidemiológico da malária é apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Mapa de risco para malária, 2021. Países com zero casos autóctones nos últimos três anos consecutivos são considerados como tendo eliminado a malária



Adaptada de WHO, World malaria report (2022)

O padrão ouro para diagnóstico da malária é a gota espessa de sangue corada pelo método de Walker, onde é possível identificar e diferenciar as espécies circulantes do *Plasmodium*. Quando realizada por profissional altamente capacitado, o limite de detecção da gota espessa pode ser de 5-10 parasitos/ μ L de sangue. A microscopia é um método de baixo custo e de fácil execução, além de auxiliar no monitoramento do tratamento da



infecção (Brasil, 2021). Os testes de diagnóstico rápido (TDRs) são utilizados como alternativa à microscopia em locais com recursos limitados, são de fácil execução e fornecem resultados em 15 minutos (Feleke; Tarko; Hadush, 2017). Os TDRs baseiam-se na detecção da proteína rica em histidina 2 (HRP-2) expressa em *P. falciparum* e da lactato desidrogenase (pLDH) presente em todas as espécies que infectam humanos (Martíáñez-Vendrel et al., 2020) e apresentam limite de detecção acima de 100 parasitos/ μL de sangue. Além da HRP-2 o *P. falciparum*, também expressa a proteína rica em histidina 3 (HRP-3). Testes que se baseiam nessas duas proteínas podem apresentar resultados falso-negativos devido a possibilidade de deleção em um desses genes e/ou nos dois (Vera-Arias et al., 2022). Testes sorológicos não são recomendados para rotina de malária devido à persistência de anticorpos após a cura (Mathison e Pritt, 2017). As técnicas moleculares garantem uma sensibilidade e especificidade mais assertiva para o diagnóstico de malária, com limite de detecção de 1-5 parasitos/ μL de sangue (Tomasz et. al, 2020), aumentando a capacidade de identificar infecções submicroscópicas em casos assintomáticos e infecções mistas. Dentre os métodos moleculares temos a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP). Apesar do excelente desempenho são técnicas ainda pouco utilizadas na rotina devido ao alto custo, sendo mais aplicáveis em inquéritos epidemiológicos e estudos sobre desempenho de protocolos moleculares (Mathison e Pritt, 2017).

Devido à heterogeneidade de protocolos existentes para o diagnóstico molecular de malária, surgiu a necessidade de monitorar os resultados apresentados por laboratórios de referência que utilizam testes baseados em amplificação de ácidos nucleicos. O esquema de controle de qualidade externo da OMS para testes baseados na amplificação de ácidos nucleicos, em parceria com o Serviço Nacional de Avaliação Externa de Qualidade do Reino Unido (UK NEQAS), surgiu para assegurar e validar a qualidade dos testes moleculares através de painéis constituídos de amostras variadas entre positivas e negativas para *Plasmodium*. Mediante os resultados apresentados pelos laboratórios participantes, o sistema de controle de qualidade externo avalia o desempenho dos métodos utilizados nestes centros de diagnóstico, para que possam desenvolver seus trabalhos de forma confiável e com maior qualidade (WHO, 2015; Cunningham et al., 2020). Os protocolos moleculares ainda apresentam alto custo e necessidade de infraestrutura laboratorial, o que inviabiliza seu uso em regiões remotas. Porém, devem ser disponibilizados em laboratórios de referência, possibilitando a detecção de casos assintomáticos, além de oferecer alternativas para a determinação das cinco espécies de *Plasmodium* que infectam humanos (Srisutham et al., 2023).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de métodos moleculares qPCR e *nested* PCR, utilizados no Núcleo de Estudos em Malária do Instituto Adolfo Lutz para detecção e diferenciação de espécies de *Plasmodium*, em amostras controles do Programa Global de Malária da Organização Mundial de Saúde em parceria com o Serviço Nacional de Avaliação de Controle de Qualidade Externo do Reino Unido (*WHO Global Malaria Programme/United Kingdom National External Quality Assessment Service – WHO/NEQAS*).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 10 amostras do painel de controle de qualidade WHO/NEQAS, para a validação do diagnóstico realizado no Núcleo de Estudos em Malária. O painel compreendeu cinco amostras de sangue liofilizadas e cinco amostras de sangue plotadas em papel filtro (Protein Saver Whatman®, Merck, Darmstadt, Alemanha). Este tipo de coleta é denominado *dried blood spot* (DBS). As amostras liofilizadas foram ressuspendidas (SLR)



em 500 μ L de água ultrapura para posterior extração de DNA. As amostras plotadas em papel filtro foram picotadas utilizando a metade do material que estava depositado em um círculo de 1cm de diâmetro e foram adicionadas em tubo de 2 mL. O DNA foi extraído das amostras de SLR e DBS utilizando kits comerciais QIAamp DNA Blood Mini Kit (QiAgen®, Hilden, Alemanha) e QIAamp DNA Mini Kit (QiAgen®, Hilden, Alemanha) respectivamente, eluído em 50 μ L e armazenado a -20°C até o processamento. A técnica de PCR em tempo real (qPCR) para amplificação gênero-específica (Lima et al., 2011) foi realizada com os *primers* M60 e M61 e sonda M62 contendo FAM™ (5-carboxifluoresceína), e um *quencher* TAMRA™ (N, N, N, N-tetrametil-6-carboxirrodamina) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), desenhados para amplificação de fragmentos do gene que codifica a SSU rRNA de *Plasmodium*, incluindo controles positivos e negativos. Para detecção das cinco espécies de *Plasmodium* foi utilizado um protocolo de *nested* PCR, baseado na amplificação de genes da dihidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS), padronizado por Tanomsing e colaboradores (2010). Este protocolo utiliza dois ciclos de amplificação gênero-específicos, seguidos dos ciclos espécie-específicos. Para a primeira reação foram utilizados os *primers* gênero-específicos Pla-DHFR-F e Pla-TS-R e para a segunda reação (*semi-nested*) foram utilizados os *primers* também gênero-específicos Pla-DHFR-NF e Pla-TS-R. Com o produto amplificado foram realizados ensaios *nested* PCR com *primers* espécie-específicos para cada uma das cinco espécies de *Plasmodium*. Todas as reações contaram com controles positivos para cada uma das cinco espécies de *Plasmodium* e controle negativo. As amostras positivas para *P. falciparum* foram selecionadas para os ensaios de detecção de deleções nos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* de *P. falciparum* (Baker et al., 2005). Para a primeira reação foram utilizados os *primers* P*fh*rp2_F1 e P*fh*rp2_R1. Na reação *semi-nested* foram utilizados os *primers* P*fh*rp2_F2 e P*fh*rp2_R1. Os ensaios para detecção de *pfhrp3* foram realizados com os *primers* P*fh*rp3_F1 e P*fh*rp3_R1 na primeira reação e P*fh*rp3_F2 e P*fh*rp3_R1 no *semi-nested*. Para os ensaios de detecção de deleções nos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* foram selecionadas as amostras positivas para *P. falciparum*: 8459, 8462, 8463, 8464, 8465. Como controles foram utilizados os isolados de *P. falciparum* Dd2 (deleção em *pfhrp2*), HB3 (deleção em *pfhrp3*) e NF54 3D7 (sem deleção).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O qPCR resultou positivo nas amostras 8457, 8459, 8460, 8461 (SLR), 8462, 8463, 8464, 8465 (DBS). Duas amostras foram negativas na qPCR (8458-SLR e 8466-DBS). Todas as amostras foram ensaiadas por *nested* PCR para determinação das espécies de *Plasmodium*. As amostras 8459, 8462, 8463, 8464 e 8465 foram diagnosticadas como *P. falciparum*, a amostra 8457 como *P. knowlesi*, a amostra 8460 como *P. ovale* e a 8461 como *P. vivax*. As amostras 8458 e 8466 foram confirmadas como negativas. As amostras positivas para *P. falciparum* foram ensaiadas para detecção de deleções nos genes *pfhrp2* e *pfhrp3*. A amostra 8459 não apresentou deleções nos genes *pfhrp2* e *pfhrp3*. As quatro restantes apresentaram deleções nos dois genes. Os resultados do painel de controle de qualidade externo WHO/NEQAS são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Resultados de qPCR, *nested* PCR para detecção de espécies e *nested* PCR para deleções em genes *pfhrp2* e *pfhrp3* do Painel de Controle de Qualidade Externo - Programa Global da Malária da Organização Mundial de Saúde/Serviço Nacional de Avaliação de Controle de Qualidade Externo do Reino Unido



Amostra WHO/NEQAS	qPCR (Ct)	Parasitemia qPCR	DHFR-TS	Resultado Final	pfhrp2	pfhrp3
8457	24,63	396,52	Pk	Pk		
8458	negativo	negativo	negativo	negativo		
8459	29,48	19,02	Pf	Pf	+	+
8460	25,64	211,80	Po	Po		
8461	32,76	2,43	Pv	Pv		
8462	25,60	298,29	Pf	Pf	-	-
8463	29,75	24,99	Pf	Pf	-	-
8464	34,53	1,35	Pf	Pf	-	-
8465	36,83	0,19	Pf	Pf	-	-
8466	negativo	negativo	negativo	negativo		

Ct = Cycle threshold; Pk = *P. knowlesi*; Pf = *P. falciparum*; Po = *P. ovale*; Pv = *P. vivax*

O diagnóstico da malária é crucial para controle e eliminação da doença. As metas estabelecidas pela OMS têm como objetivo alcançar um mundo livre da malária. Desde o ano 2000 15 países receberam a certificação de livres da malária. Até 2030, as estratégias propostas buscam eliminar a doença em 30 países (WHO, 2021). Se por um lado, o teste de referência, a gota espessa, tem sua utilização disseminada em todas as regiões endêmicas, as estratégias de eliminação da malária exigem ferramentas de diagnóstico mais robustas, como os ensaios moleculares capazes de identificar com acurácia tanto as espécies de *Plasmodium*, como as infecções assintomáticas (Cunningham et al., 2020). Os dados obtidos mostram a adequação do uso de qPCR para detecção gênero-específica de *Plasmodium*, visto que todas as amostras positivas na qPCR foram confirmadas na *nested* PCR. Estes achados validam esta técnica para a triagem de grande número de amostras, por sua rapidez e confiabilidade, possibilitando a detecção de 1 p/μL (Lima et al., 2011). Com relação à *nested* PCR (Tanomsing et al., 2010), esta técnica representa uma ferramenta sensível e com alta especificidade para detecção das espécies de *Plasmodium* que infectam o homem. Os resultados de todos os ensaios realizados foram inseridos no site da UK Neqas, responsável pelo preparo e envio das amostras, que confirmou o diagnóstico de todo o painel analisado. É evidente a importância da participação de laboratórios de referência em programas de proficiência laboratorial de excelência, para assegurar a qualidade dos resultados obtidos e o adequado desempenho destas unidades. Embora os programas nacionais de controle e eliminação da malária preconizem a hemoscopia e os TDRs na rotina laboratorial, ensaios mais sensíveis devem ser disponibilizados para situações específicas como triagem de doadores de sangue, doação de órgãos e inquéritos epidemiológicos visando a eliminação da malária.

4. CONCLUSÃO

A aplicação de métodos moleculares demonstrou ser altamente eficaz no diagnóstico da malária, especialmente devido à sua capacidade de detectar baixas parasitemias e espécies de *Plasmodium*, o que desempenha um papel significativo na identificação e distribuição de casos da doença. A participação no esquema de controle de qualidade externo WHO/NEQAS possui um papel fundamental nos laboratórios de referência em diagnóstico de malária, como o Núcleo de Estudos em Malária do Instituto Adolfo Lutz, garantindo a precisão e confiabilidade dos protocolos moleculares utilizados, principalmente pela grande variedade de ensaios disponíveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHLEY, E. A.; PYAE PHYO, A.; WOODROW, C. J. Malaria. **The Lancet**, v. 391, n. 10130, p. 1608–1621, abr. 2018.



BAKER, J. et al. Genetic diversity of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. **The Journal of infectious diseases**, vol. 192, n. 5, p. 870-877, set. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis – Volume 53 (17), 2022. Disponível em <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria/situacao-epidemiologica-da-malaria/boletins-epidemiologicos-de-malaria/boletim-epidemiologico-vol-53-no17-2022-panorama-epidemiologico-da-malaria-em-2021-buscando-o-caminho-para-a-eliminacao-da-malaria-no-brasil/view>>. Acesso em: 12 de setembro de 2023

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Guia de tratamento da malária no Brasil/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis – 2. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2021. 84 p.: il. ISBN 978-65-5993-096-8.

BUCK, E.; FINNIGAN, N. A. Malaria. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

CUNNINGHAM, J. A. et al. WHO malaria nucleic acid amplification test external quality assessment scheme: results of distribution programmes one to three. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 129, mar. 2020.

FELEKE, D. G.; TARKO, S.; HADUSH, H. Performance comparison of CareStart™ HRP2/pLDH combo rapid malaria test with light microscopy in north-western Tigray, Ethiopia: a cross-sectional study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, p. 399, jun. 2017.

LIMA, G. F. M. C. et al. Malaria diagnosis from pooled blood samples: comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large-scale. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 691–700, set. 2011.

MARTIÁÑEZ-VENDRELL, X. et al. Quantification of malaria antigens PfHRP2 and pLDH by quantitative suspension array technology in whole blood, dried blood spot and plasma. **Malaria Journal**, v. 19, p. 12, jan. 2020.

MATHISON, B. A.; PRITT, B. S. Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 2009–2017, jul. 2017.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Organização Mundial da Saúde. Malária. Disponível em <<https://www.paho.org/pt/topicos/malaria>>. Acesso em: 20 de agosto de 2023.

SEGURADO AC, DI SANTI SM. – Malária. In: R. Salomão. Infectologia: Bases Clínicas e Tratamento. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2ª. Ed., 2022. cap. 25, p. 211 – 224.



SRISUTHAM, S. et al. A novel sensitive hexaplex high-resolution melt assay for identification of five human *Plasmodium* species plus internal control. **Acta Tropica**, vol. 248, p. 107020, sep. 2023.

TANOMSING, N. et al. Accurate and sensitive detection of *Plasmodium* species in humans by use of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase linker region. **Journal of clinical microbiology**, vol. 48, n. 10, p. 3735-3737, out 2010

TOMASZ L. A. et al. Use of real-time multiplex PCR, malaria rapid diagnostic test and microscopy to investigate the prevalence of *Plasmodium* species among febrile hospital patients in Sierra Leone. **Malaria journal**, v. 19, n. 1, p. 84, feb. 2020.

VERA-ARIAS, C. A. et al. High-throughput *Plasmodium falciparum* hrp2 and hrp3 gene deletion typing by digital PCR to monitor malaria rapid diagnostic test efficacy. **eLife**, v. 11, p. e72083, jun. 2022.

WHO. Global Malaria Programme. A WHO external quality assurance scheme for malaria nucleic acid amplification testing; jun. 2015. Disponível em: <<https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241509985>>. Acesso em: 17 out. 2023.

WHO. Global technical strategy for malaria 2016–2030, 2021 update. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240031357>>. Acesso em: 07 de dezembro de 2023.

WHO. World malaria report 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em <<https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022>>. Acesso em: 18 de agosto de 2023.



Capítulo 12

DOI: 10.53934/20242-12

INFLUENZA AVIÁRIA: O POTENCIAL PANDÊMICO DO VÍRUS H5N1

Pâmela dos Santos Barbosa¹; Fabio Hiroto Shimabukuro²

¹Aluna do Curso de Especialização, Núcleo de Ciências Biomédicas, CLR XI, IAL Sorocaba

pamela_sbarbosa@hotmail.com

² Pesquisador Científico, Núcleo de Ciências Biomédicas, CLR XI, IAL Sorocaba

Resumo: Os vírus da influenza A e seus subtipos são considerados uma ameaça à saúde pública global. Com epidemias de gripes sazonais e com pandemias no histórico, requerem atenção e monitoramento constante. Desde a descoberta em 1996 na China, o vírus Influenza Aviário de Alta Patogenicidade (IAAP) H5N1, também se tornou motivo de preocupação e alerta. A possibilidade desse vírus zoonótico sofrer rearranjo ou mutações ao longo do tempo, principalmente pelo espalhamento - para assim adquirir especificidade quanto ao receptor celular humano - é a peça chave para desencadear uma possível pandemia com alta morbidade e mortalidade. Em 26 anos foram registrados 896 casos de H5N1 em humanos em 22 países. Recentemente, de 2020 a 2023, várias mortes de aves tanto selvagens quanto domésticas foram relatadas em vários países da África, Ásia, Europa e nas Américas (Norte, Central e Sul) pela variante do clado H5 2.3.4.4b. Neste trabalho, revisamos e atualizamos a epidemiologia do vírus H5N1 e, de forma geral a sua patogênese, focada em alterações que possibilitem a transmissão entre humanos e o surgimento de uma nova pandemia. Concluimos que mesmo com vários surtos globais restrito em animais, e raros casos em humanos, o vírus influenza H5N1 precisa de algumas mudanças específicas em sua genética, para que consiga com eficiência, realizar a transmissão entre humanos e assim, apresentar capacidade pandêmica.

Palavras-chave: epidemiologia; Vírus da Influenza A Subtipo H5N1; patogênese; transmissão

INTRODUÇÃO

O vírus Influenza, pertencente à família *Orthomyxoviridae*, possui envelope e o genoma com RNA de sentido negativo. Dentre sua classificação de subtipos, a influenza A (Flu A) é o vírus mais comum e causador de pandemias e epidemias sazonais, indicando que ele tenha sido o maior causador de doenças em aves desde 1878. (COSTA, Ligia Maria Cantarino da & MERCHAN-HAMANN, Edgar, 2016; SEALY JE, *et al.* 2021)

Pertencente ao grupo do Flu A, o vírus IAAP/H5N1, considerado como uma zoonose vem recebendo atenção desde sua descoberta em 1996 na China, devido a situação devastadora com aves de criação, e por isso, é um vírus temido e cotado como possível pandêmico, mesmo que ainda não tenha a capacidade de transmissão entre humanos. (ZHANG H, *et al.* 2013)



Em 2021, o vírus espalhou em aves migratórias, e foi detectado em outros continentes causando preocupação global, pois possui a habilidade de se adaptar em vários hospedeiros. O vírus influenza H5N1 possui um total de 878 infecções em humanos, sendo 458 óbitos, considerando um período de 20 anos. O reservatório desse vírus são as aves selvagens (aquáticas/ migratórias), mas a infecção pode ocorrer em outras aves e espécies terrestres, como galinhas e codornas que são aves de capoeira (domésticas), e mamíferos, como por exemplo, os porcos, cavalos, cães e humanos. (PAHO, 2023; YAMAJI R, *et al.* 2020)

Este trabalho tem por objetivo avaliar a possibilidade de uma pandemia pelo vírus influenza aviário H5N1, demonstrando a sua epidemiologia com foco no espalhamento global a partir dos animais infectados, e a transmissão para humanos e entre os humanos, além da descrição sucinta da patogênese do vírus, em torno das prováveis mutações que este pode vir a adquirir.

MATERIAL E MÉTODOS

Embasada nos sites oficiais de governos e organizações, como Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e do Centro de Controle de Doenças (CDC – Atlanta, EUA), Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) e bases de dados on-line PubMed, SSRN Product & Services, foram coletadas as principais informações de notícias e artigos publicados do período entre 2013 a 2023. A busca foi realizada entre julho e novembro de 2023, onde foram lidos e analisados. Imagens foram produzidas e/ou adaptadas para um melhor entendimento do trabalho. Foram utilizadas as seguintes palavras chaves: *epidemiology; avian influenza H5N1; H5N1; pathogenesis of avian influenza H5N1; streaming.*

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etiologia e transmissão

O vírus influenza é observado desde a pré-história, porém só foi isolado em 1933. No Brasil, os relatos são logo após a colonização por volta de 1552 e 1559. (COSTA, Lígia Maria Cantarino da & MERCHAN-HAMANN, Edgar, 2016) Esse vírus possui quatro tipos, sendo a influenza A o vírus que atinge animais e humanos e está associado aos casos de epidemias e pandemias. As pandemias de gripe que conhecemos são todas derivadas do vírus aviário, e os tipos de alta patogenicidade geralmente pertencem ao subtipo H5 ou H7, e está relacionada a interação vírus-hospedeiro. (WANG D, *et al.* 2021)

Como as aves silvestres (migratórias/aquáticas) são as principais na transmissão do vírus (figura 1), o ambiente mais provável é os de água doce. Essa transmissão se dá a partir da via oral- fecal, pelo contato de outras aves com as fezes, com gotículas salivares, e a carcaça de aves contaminadas. Essa relação oral – fecal é devido a replicação do vírus ocorrer no trato gastrointestinal e na cloaca dessas aves contaminadas. (JOSEPH U, *et al.* 2016) A partir das aves migratórias, a transmissão pode ocorrer para as aves silvestres locais e dessas para as aves domésticas e comerciais.

O contágio aos humanos pode ser adquirido a partir de criadouros (granjas) e mercados com as aves contaminadas e vivas, através do contato com secreções respiratórias e fezes dessas aves. Para evitar esse contágio, o abate sanitário de toda a granja é o mais comum, mas não suficiente. A quarentena e desinfecção de todo o local se faz necessário



para esse controle, já que gaiolas e utensílios usados com as aves também ficam contaminados por um período de tempo, tornando-se fonte de transmissão. E como profilaxia da infecção, é correto a vacinação das aves contra a gripe. (GUAN Y & SMITH GJ, 2013; WANG D, *et al.* 2021; REISCHAK, Dilmara, *et al.* 2023)

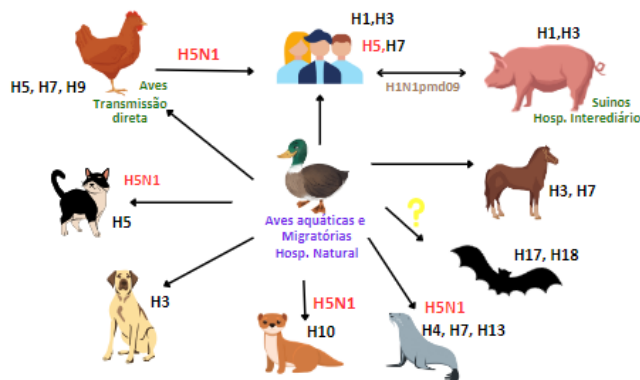


Figura 1 - Vias de transmissão do vírus influenza A, a partir de aves aquáticas e migratórias, e os subtipos de acordo com as espécies receptoras

Fonte: Figura do próprio autor.

A nível global, todo ano esse vírus é monitorado através dos Programa Global da Gripe e do GISRS, e a partir disso é decidido quais vacinas devem ser produzidas contra a gripe sazonal para o próximo ano. Nesse contexto, existe o Sistema de Vigilância de Síndromes Respiratórias, com o programa Rede de Vigilância Sentinela de Síndrome Gripal (SG), analisando e notificando os casos através de laboratórios de referência, através de coletas semanais de unidades de saúde selecionadas, além de compartilhar as estirpes encontradas com os grandes centros como a OMS. (CVE, 2021)

Espalhamento global de H5N1

A China é um país considerado epicentro de influenza, originando vários vírus da gripe, com sua localização favorável para as aves migratórias. (GUAN Y & SMITH GJ, 2013) Assim como na China, o continente asiático inteiro apresenta surtos de H5N1, sendo o mais recente dois casos no Camboja, onde uma menina de 11 anos foi a óbito após a infecção pelo influenza H5N1. (BOYLE, J & NEELY, J, 2023) Já no continente africano atualmente eles vivem a maior crise de gripe aviária já vivida, com a África do Sul, o maior produtor de aves para consumo do continente, relatando milhares de perdas na produção. (GOTTEMS, L, 2023)

A Europa registrou em 2022 um caso na Inglaterra (SEALY JE, *et al.* 2021), e outro na Espanha, e em 2023 foi o Reino Unido quem divulgou um caso humano, além de infecção em mamíferos como martas, raposas e lontras. (HO, PL, 2023) Recentemente, casos de gatos infectados por influenza A na Polônia, vieram a público. A OMS informou que 46 gatos foram infectados pelo H5N1, e dos 19 genomas detectados, todos foram do mesmo clado (H5 2.3.4.4b). (OMS, 2023)



Em 2021, o H5 da linhagem 2.3.4.4b se disseminou pelas Américas entre as aves silvestres e domésticas, e em setembro de 2023, o Brasil registou a marca de 100 casos do H5N1, na grande maioria em aves migratórias e nenhum caso em humanos foi relatado até o presente momento. (ZEM, R 2023)

Patogênese

Esse vírus consiste em oito segmentos de RNA, que em conjunto com o complexo polimerase + NP, são conhecidos como vRNPs (Ribonucleoproteína viral), que codificam 10 proteínas, como a Matrix (M1 e M2), Complexo Polimerase PB1, PB2 e PA; NP (Nucleocapsídeo) e NS (proteínas não estruturais NS1 e NS2). A Hemaglutinina (HA), a Neuraminidase (NA), são primordiais para que ocorra a infecção do vírus na célula hospedeira, e até o momento, o vírus Flu A aviário possui uma variação de 16 subtipos de HA (H1 –H16) e nove NA (N1-N9) igual a 144 subtipos conhecidos, e isso confere ao vírus uma diversidade de hospedeiros. (ZHANG H, *et al.* 2013)

As glicoproteínas HA e NA, são responsáveis por fazer o reconhecimento na superfície das células hospedeiras, entrada do genoma viral na célula-alvo, em específico através da ligação ao ácido siálico, a partir de endocitose. O pH de ativação celular é de total importância, pois é ele quem vai causar uma mudança conformacional na HA para assim ocorrer a fusão das membranas (celulares e viral). Se o pH for maior, é melhor para a infecção celular em aves. Se o pH for menor é mais favorável para infecção celular em mamíferos. As proteínas virais M1 e M2 são responsáveis por auxiliar na mudança do pH e na liberação do complexo polimerase PB1, PB2 e PA, que tem grande importância no ciclo de vida e na evolução do vírus. O estudo de Gabriel G *et al.* (2013) demonstra que mutações nas proteínas virais como PB2, aumenta a patogenicidade e a virulência do H5N1. (ZHANG H *et al.* 2013)

As proteínas não estruturais NS1 tem papel fundamental na resposta imunológica do hospedeiro. De acordo com Dayan Wang, *et al.* (2021), mutações na NS1, poderiam gerar adaptações nos vírus, alterando a NEP e consequentemente a replicação do genoma viral na célula alvo. Outro ponto que caracteriza um fenótipo de alta patogenicidade e virulência, é o sítio de clivagem multibásico (MBCS) na proteína HA. (SEALY JE, *et al.* 2021) A temperatura de 37-42°C é essencial para que haja replicação eficiente do vírus aviário. (GABRIEL G, *et al.* 2013) O vírus é dividido em 10 clados (0-9), sendo que os clados 0, 1 e 2 são os que infectam humanos. (VELKOV T, *et al.* 2013)

Desencadeamentos da transmissão entre humanos e potencial pandêmico

Os suínos teriam facilidade em realizar esse rearranjo, pois possuem vários receptores, tanto para vírus oriundos de aves, quanto os vírus derivados de humanos. E como os mamíferos são biologicamente mais próximos aos humanos que as aves, esse rearranjo em suínos poderia causar a transmissão interespecie para humanos. (YIN J, *et al.* 2013; OMS, 2023) O vírus pode sofrer uma deriva antigênica, com alterações ao longo do tempo nos antígenos de membrana, que são as glicoproteínas HA e a NA, ou uma mudança antigênica, quando ocorre a combinação viral em um hospedeiro e assim gerar adaptação e consequentemente um novo vírus (figura 2). (CDC, 2023)

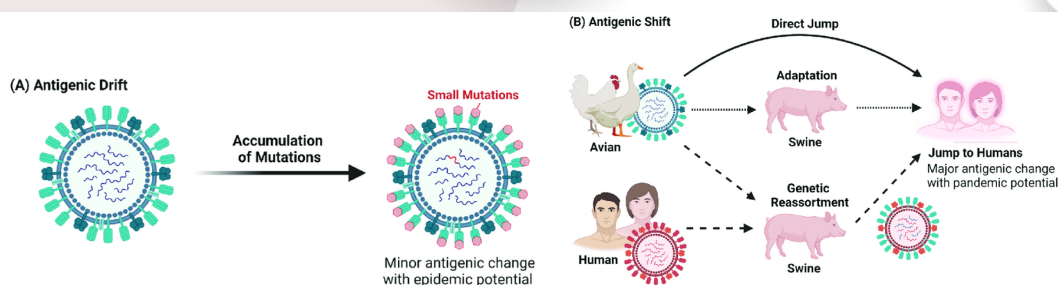


Figura 2- Deriva e mudança antigênica

Fonte: Adaptado de Yeo, Joshua & Gan, Samuel Ken-Em, 2021

Como o vírus H5N1 ainda não é transmissível entre humanos, os estudos sugerem que pelo menos uma mutação na HA ou NA seria necessária. Dentre as mutações, um exemplo é a mudança na especificidade da HA na ligação α -2,3 para α -2,6. Essa ligação refere-se à afinidade que o vírus tem com determinada parte do organismo, como por exemplo, a ligação α -2,3 está mais presente no trato intestinal de aves aquáticas, enquanto a ligação α -2,6 está presente no trato respiratório superior de humanos. (YIN J, *et al.* 2013; IMAI M, *et al.* 2013)

CONCLUSÕES

A influenza causa uma doença aguda que está presente no cotidiano dos seres humanos. O H5N1, por sua vez, ainda contido na transmissão entre aves, e com casos esporádicos em humanos, requer vigilância constante por que como visto, ele é apto a rearranjos com outros vírus e mutações genéticas pontuais que podem torná-lo transmissível entre humanos e por consequência, causar surtos zoonóticos, epidemias e até pandemias. Pesquisas e monitoramento se fazem necessários para avaliar todas as possibilidades de alterações genéticas, transmissibilidade, além de estudos para desenvolvimento e produção de vacinas específicas e terapias antivirais, reduzindo a infecção e a transmissão do vírus, além da vigilância sentinela com as aves migratórias, silvestres e de capoeira.

REFERÊNCIAS

BOYLE, J & NEELY, J; **CNN Brasil, 2023**; Situação da gripe aviária é “preocupante”, alerta OMS após casos de H5N1 em humanos no Camboja; Disponível em: [CDC; **CENTRO DE CONTROLE DE DOENÇAS, 2023**; How Flu Viruses Can Change: “Drift” and “Shift”; Disponível em: <https://cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm#print> ; Acesso em 15 out. 2023.](https://www.cnnbrasil.com.br/saude/situacao-da-gripe-aviaria-e-preocupante-alerta-oms-apos-casos-de-h5n1-em-humanos-no-camboja/#:~:text=Casos%20no%20Camboja,testou%20positivo%20para%20o%20v%C3%A9rus; Acesso em 09 set. 2023.</p>
</div>
<div data-bbox=)

COSTA, Ligia Maria Cantarino da; MERCHAN-HAMANN, Edgar. **Pandemias de influenza e a estrutura sanitária brasileira: breve histórico e caracterização dos**



cenários. Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua, v. 7, n. 1, p. 11-25, mar. 2016. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232016000100002>. Acesso em 17 out. 2023.

CVE; **Centro de Vigilância Epidemiológica, 2021**; Vigilância da Influenza no Estado de São Paulo; Disponível em: https://portal.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-respiratoria/influenza/doc/vigil_influenza_16dez.pdf Acesso em 01 dez. 2023.

GABRIEL G, Czudai-Matwich V, Klenk HD. **Adaptive mutations in the H5N1 polymerase complex.** Virus Res. 2013 Dec 5;178(1):53-62. doi: 10.1016/j.virusres.2013.05.010. Epub 2013 Jun 1. Acesso em 19 ago. 2023.

GOTTEMS, L; **Agrolink, 2023**; África do Sul vive maior crise de gripe aviária; Disponível em: https://www.agrolink.com.br/noticias/africa-do-sul-vive-maior-crise-de-gripe-aviaria_483813.html Acesso em 05 out.2023.

GUAN Y & SMITH GJ. **The emergence and diversification of panzootic H5N1 influenza viruses.** Virus Res. 2013 Dec 5;178(1):35-43. doi: 10.1016/j.virusres.2013.05.012. Epub 2013 Jun 2. Acesso em 30 jul. 2023.

HO, PL; **Cerdi Butatan, 2023** - Risco pandêmico de influenza aviária H5N1 cresce com a chegada do vírus à América do Sul; Disponível em: <https://cerdi.butantan.gov.br/noticias/risco-pandemico-de-influenza-aviaria-h5n1-cresce-com-a-chegada-do-virus-a-america-do-sul>; Acesso em 05 out. 2023.

IMAI M, Herfst S, Sorrell EM *et al.* **Transmission of influenza A/H5N1 viruses in mammals.** Virus Res. 2013 Dec 5;178(1):15-20. doi: 10.1016/j.virusres.2013.07.017. Epub 2013 Aug 13. Acesso em 30 jul. 2023.

JOSEPH U, Su YC, Vijaykrishna D, Smith GJ. **The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission.** Influenza Other Respir Viruses. 2017 Jan;11(1):74-84. doi: 10.1111/irv.12412. Epub 2016 Aug 8. Acesso em 26 out. 2023

OMS; **ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2023**; Influenza A(H5N1) em gatos – Polônia; Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON476>; Acesso em 30 set. 2023.

PAHO; **ORGANIZAÇÃO PAN- AMERICANA DE SAÚDE, 2023**; Boletim Epidemiológico PAHO; Avaliação de risco à saúde pública relacionada aos surtos de influenza aviária de alta patogenicidade (IAAP) A(H5N1), clado 2.3.4.4b, em espécies animais na Região das Américas; p.3; Acesso em: 8 out. 2023

REISCHAK, Dilmara and Rivetti Jr, Anselmo Vasconcelos, *et al.* **First Report and Genetic Characterization of the Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus in Cabot's Tern (Thalasseus Acuflavidus), Brazil.** Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=4543981>; Acesso em 28 set. 2023.



SEALY JE, Howard WA, Molesti E, *et al.* Amino acid substitutions in the H5N1 avian influenza haemagglutinin alter pH of fusion and receptor binding to promote a highly pathogenic phenotype in chickens. *J Gen Virol.* 2021 Nov;102(11):001672. doi: 10.1099/jgv.0.001672. Acesso em 15 set. 2023.

VELKOV T, Ong C, Baker MA *et al.* **The antigenic architecture of the hemagglutinin of influenza H5N1 viruses.** *Mol Immunol.* 2013 Dec;56(4):705-19. doi: 10.1016/j.molimm.2013.07.010. Epub 2013 Aug 7. Acesso em 19 ago. 2023.

YIN J, Liu S, Zhu Y. **An overview of the highly pathogenic H5N1 influenza virus.** *Virol Sin.* 2013 Feb;28(1):3-15. doi: 10.1007/s12250-013-3294-9. Epub 2013 Jan 16. Acesso em 30 jul. 2023

WANG D, Zhu W, Yang L, Shu Y. **The Epidemiology, Virology, and Pathogenicity of Human Infections with Avian Influenza Viruses.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2021 Apr 1;11(4):a038620. doi: 10.1101/cshperspect.a038620; Acesso em 19 set. 2023

YAMAJI R, Saad MD, Davis CT *et al.* **Pandemic potential of highly pathogenic avian influenza clade 2.3.4.4 A(H5) viruses.** *Rev Med Virol.* 2020 May;30(3):e2099. doi: 10.1002/rmv.2099. Epub 2020 Mar 5. Acesso em 26 out.2023

YEO, Joshua & Gan, Samuel Ken-Em, 2021; Disponível em: Peering Into Avian Influenza A (H5N8) for a Framework towards Pandemic Preparedness. 10.20944/preprints202109.0506.v1. Acesso em 13 out .2023.

ZEM, R; **G1, 2023**; Brasil registra 100º caso de gripe aviária, aponta relatório do governo; Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2023/09/15/brasil-registra-100o-caso-de-gripe-aviaria-aponta-relatorio-do-governo.ghtml>; Acesso em: 16 set. 2023.

ZHANG H, Hale BG, Xu K, Sun B. **Viral and host factors required for avian H5N1 influenza A virus replication in mammalian cells.** *Viruses.* 2013 Jun 10;5(6):1431-46. doi: 10.3390/v5061431. Acesso em 08 out. 2023



Capítulo 13

DOI: 10.53934/20242-13

UTILIZAÇÃO CENTENÁRIA DA VACINA BCG E PERSPECTIVAS VACINAIS

Giovanna Vernice da Silva¹; Andrea Gobetti Coelho Bombonatte².

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - CLR- Santos – E-mail: verniceggs@gmail.com

²Diretora Técnica do CLR-Santos – CLR-Santos.

Resumo: Após mais de um século depois de sua introdução em 1921, a BCG se apresenta ainda como a única vacina contra a tuberculose disponível para ser utilizada em humanos e apresenta melhores resultados em crianças e adolescentes, com eficácia que varia entre 0% a 80% em adultos, o que resulta no desenvolvimento da infecção ativa como decorrência de reativação ou disseminação. Com o avanço tecnológico, diversas vacinas estão em desenvolvimento para sobrepujar as fraquezas da BCG utilizando diversas estratégias relacionadas a utilização de subunidades proteicas, a vetores virais, a inativação de células utilizando micobactérias, e vacinas de BCG recombinante. Desta maneira, este trabalho foi organizado com o objetivo de apresentar as perspectivas vacinais para a tuberculose e seus mecanismos de ação, assim como avaliar as limitações da atual vacina BCG para melhores resultados. Foi realizado um levantamento bibliográfico em buscadores, como LILACS, SCIELO, MEDLINE, BVS e Periódicos CAPES. O desenvolvimento de vacinas com tecnologias mais modernas, atreladas com uma melhor eficácia, é capaz de melhores resultados para a prevenção e tratamento de casos de tuberculose, uma vez que envolvem abordagens diferentes à da vacina BCG.

Palavras-chave: vacina bcg; vacinas contra a tuberculose; tuberculose

INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é uma doença causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) com características de quase erradicação em países desenvolvidos, porém ainda assola diversos países em desenvolvimento, como o Brasil. O surgimento de uma vacina – a conhecida BCG, ou vacina do Bacilo de Calmette-Guérin – contra a TB foi muito importante para a medicina, uma vez que ajudou a conferir proteção e, conseqüentemente, salvar diversas vidas ao longo dos anos (JIANG *et al.*, 2023; SRIVASTAVA; DEY; MUKHOPADHYAY, 2023).

O tratamento de TB se baseia em grande parte pela utilização de medicamentos anti-TB e na vacinação pela BCG como medida protetora, principalmente em neonatos e crianças. A vacina BCG se encontra como uma parte fundamental do calendário de imunização infantil de diversos países, essencialmente aplicada em infantes e neonatos. No ano de 2019, 115 países apresentaram taxa de imunização por meio da BCG superior a 80% e 87 apresentaram números superiores a 90%. Alguns países apresentaram prevalência aumentada de TB, com taxas variadas de cobertura vacinal. Papua Nova Guiné apresentou valores aproximados de 45%, enquanto Bangladesh, China, Tailândia e Tanzânia tiveram taxas de cobertura vacinal de 99% (LANGE *et al.*, 2022; SETIABUDI AWAN *et al.*, 2021).



De acordo com a OMS (2023), os países das Américas apresentam uma taxa compartilhada de 85% em 2019, 70% em 2020, 82% em 2021 e 87% em 2022 de vacinação entre crianças menores de um ano. Países como o Brasil apresentaram taxas de 73% em 2020 e 69% em 2021, especialmente devido a ocorrência da pandemia da Covid-19 (CASTREJON *et al.*, 2022).

Desta maneira, o desenvolvimento de vacinas mais eficazes pode trazer um melhor aproveitamento ao tratamento e cura efetiva. O avanço tecnológico permite o surgimento de novas estratégias vacinais, as quais podem sobrepular as fraquezas trazidas pela BCG com o passar dos anos. As tecnologias criadas envolvem a utilização de subunidades proteicas, vetores virais, inativação de células com a utilização de micobactérias e o desenvolvimento de BCG recombinante (SRIVASTAVA; DEY; MUKHOPADHYAY, 2023).

Além disso, a Organização Mundial da Saúde apresenta planos de erradicação da Tuberculose até 2030 e a vacinação protetora pode trazer grandes resultados, uma vez que, embora os indivíduos tenham contato com a micobactéria, tenham uma menor chance de desenvolver a doença por estarem imunizados adequadamente e assim quebrar a cadeia de transmissão da doença (LANGE *et al.*, 2022; SRIVASTAVA; DEY; MUKHOPADHYAY, 2023).

Portanto, este trabalho foi organizado com o objetivo de apresentar as perspectivas vacinais para a TB e seus mecanismos de ação, avaliar as limitações da atual vacina BCG ao revisar os mecanismos imunológicos envolvidos na TB, apresentar um recorte histórico do surgimento da BCG, sua capacidade de proteção contra a doença, bem como suas limitações, e discutir novas estratégias vacinais mais eficazes contra a doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realizar esta pesquisa, foi feito um levantamento bibliográfico, ou seja, a busca de informações já publicadas, utilizando como fonte as seguintes bases de dados da saúde: LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SCIELO (Scientific Electronic Library online), MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval System on-line), BVS (Biblioteca Virtual em Saúde) e Periódicos CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior).

Na busca dos artigos foram utilizadas palavras-chaves em português e inglês selecionados mediante consulta aos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme, sendo elas: Vacina BCG, Vacinas contra a Tuberculose, Tuberculose.

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 2018 e 2023; em periódicos nacionais e internacionais, em idiomas português, inglês ou espanhol.

Artigos, dissertações ou teses incompletas, que não abordarem ao menos um dos descritores indicados, publicados em anos anteriores e com duplicidade, assim como revisões sistemáticas, meta-análises e estudos com apresentação insuficiente dos resultados foram excluídos do estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Atualmente, a BCG, imunizante aplicado pela primeira vez em 1921 (figura 1), se encontra como a única vacina disponível para a prevenção de casos de TB, mas seu desenvolvimento data de muito tempo antes (SETIABUDIAWAN *et al.*, 2022).

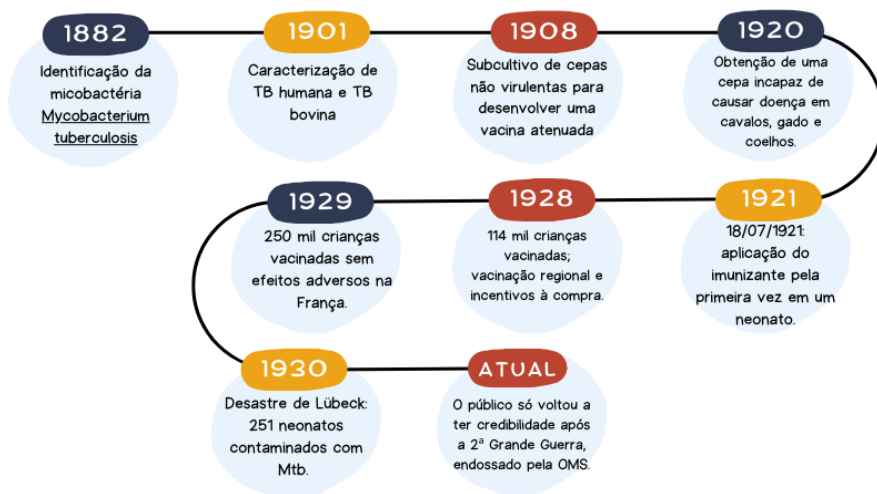


Figura 1 – Contexto histórico do surgimento da vacina BCG.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

No entanto, a ausência de novos imunizantes até os dias atuais pode estar relacionada com o fato de não se compreender adequadamente os mecanismos imunológicos associados à proteção contra a infecção causada pelo Mtb (SETIABUDIAWAN *et al.*, 2022).

Segundo Setiabudiawan *et al.* (2022) e Romano *et al.* (2023), a proteção ocasionada por linfócitos T é importante e extensiva, mas sua capacidade de diferenciar linfócitos T efetores pode diminuir com o passar do tempo, de maneira que a proteção em neonatos e infantes é maior do que em indivíduos mais velhos.

Grande parte da imunidade desenvolvida pela imunização se dá pela imunidade adaptativa celular, uma vez que há a possibilidade de se formar uma imunidade a longo prazo. Entretanto, a vacinação pode levar ao desenvolvimento de uma “imunidade treinada” que conta com a participação de células *natural killer* (NK), neutrófilos e monócitos, os quais são extremamente adaptativos de uma maneira não dependente de antígenos e são mediadas por fatores epigenéticos e reprogramações metabólicas estimulados pela BCG (SETIABUDIAWAN *et al.*, 2022; LANGE *et al.*, 2021; CHO *et al.*, 2021; NADOLINSKAIA; KOTLIAROVA; GONCHARENKO, 2022).

O principal benefício associado com a vacina BCG está relacionado com a prevenção de TB infantil, sobretudo casos de TB miliar infantil. A eficácia de sua proteção está associada principalmente aos dez primeiros anos de vida. O imunizante é muito importante para prevenir casos de infecções primárias com a micobactéria, embora o perfil protetor decaia com o tempo (LANGE *et al.*, 2021; SABLE; POSEY; SCRIBA, 2020).

Entretanto, as respostas imunológicas não podem necessariamente estar associadas com respostas protetoras e a falta de marcadores confiáveis que indiquem proteção ao organismo leva a dificuldades para a produção de vacinas que realmente sejam eficazes (SETIABUDIAWAN *et al.*, 2022; FOSTER *et al.*, 2021).

Além disso, embora seja uma vacina eficaz em neonatos e crianças, suas limitações residem no fato de que há a perda da eficácia e proteção conforme os anos se avançam. Muitas pessoas também vivem com TB latente e, embora dificilmente estes casos levem a reativação, são casos de potenciais riscos de doença ativa, especialmente em adolescentes e adultos. Vacinas com uma eficácia maior podem quebrar a cadeia de transmissão de casos



de TB até mesmo em pacientes que não sabem que já tiveram contato com a micobactéria (SABLE; POSEY; SCRIBA, 2020; FOSTER *et al.*, 2021).

Com os avanços tecnológicos, novos imunizantes têm sido desenvolvidos com o tempo para atender as necessidades crescentes que são encontradas pelas limitações da BCG ao utilizar diversos mecanismos de ação (SRIVASTAVA; DEY; MUKHOPADHYAY, 2023; BOUZEYEN; JAVID, 2022).

Um dos mecanismos de ação utilizados para o desenvolvimento de novas tecnologias são vacinas de subunidades virais, em que a imunogenicidade é explorada de acordo com os critérios de parede celular, cápsula, antígenos de secreção, antígenos da fase de dormência e de ressuscitação e antígenos da região de diferenciação (RD) de BCG. Associados a estes antígenos, os adjuvantes são adicionados, de maneira que haja a melhor entrega de resposta (ZHANG *et al.*, 2023).

O Mtb e o BCG compartilham aproximadamente 98% de seu genoma, de maneira que a superexpressão de antígenos de Mtb pode aumentar a eficácia da vacina, assim como melhorar a resposta treinada do indivíduo em face do contato. Além disso, a utilização destes antígenos pode ser um excelente meio carreador para eliminar antígenos imunogênicos de BCG e aumentar a resposta contra a TB. Outra opção vacinal é a readministração da BCG, situação que exige posteriores estudos, porém apresentou aumento da resposta celular (SRIVASTAVA; DEY; MUKHOPADHYAY, 2023).

A utilização de vetores virais para a entrega de antígenos micobacterianos é uma excelente opção de transferência, uma vez que se trata de moléculas geneticamente modificadas que são capazes de gerar resposta imunológica ao superexpressarem antígenos. Alguns vírus são comumente utilizados, como o Adenovírus, vírus Influenza e o vírus Vaccinia (SRIVASTAVA; DEY; MUKHOPADHYAY, 2023; BOUZEYEN; JAVID, 2022; AFKHAMI *et al.*, 2020; QU; ZHOU; LI, 2021).

As novas tecnologias também permitem que haja alterações particulares a cada imunizante que não se enquadram a mecanismos de ação específicos e que estão relacionadas a fragmentação de cepas por meio de métodos de inativação, a deleção de genes de cepas atenuadas para aprimorar as respostas imunológicas e até mesmo a associação de antígenos de Mtb a antígenos de HIV para uma melhor resposta de pacientes que sejam HIV+ e estejam infectados por TB (SRIVASTAVA; DEY; MUKHOPADHYAY, 2023; BOUZEYEN; JAVID, 2022; AFKHAMI *et al.*, 2020).

Desta maneira, a BCG se estabelece como uma vacina muito importante para a prevenção de casos de TB infantil e casos de TB extrapulmonar, mas é necessário que os horizontes sejam expandidos para que haja a erradicação desejada da doença por meio de imunizantes que atendam aos mecanismos imunológicos e possam interromper a cadeia de transmissão mantida pela Mtb. Para isso, os estudos precisam ser diversos para abrangerem diversos mecanismos de ação e, por sua vez, atenderem as ações do sistema imunológico.

CONCLUSÕES

A administração da BCG durante o último século foi muito importante porque permitiu que muitas vidas fossem protegidas por meio dos efeitos conhecidos por “imunidade treinada”. Além disso, seus efeitos inespecíficos permitem que possa ser amplamente aplicada em outras situações, como para o tratamento de neoplasias de bexiga, de maneira que sua aplicabilidade é ainda maior do que para o que foi inicialmente produzido.

No entanto, com as descobertas de novos mecanismos imunológicos envolvidos com a TB, novas vacinas são necessárias para que a proteção seja realizada de maneira melhor e,



por sua vez, possam assegurar a erradicação de TB no mundo de maneiras seguras e altamente eficazes.

REFERÊNCIAS

AFKHAMI, S. *et al.* Advancing Immunotherapeutic Vaccine Strategies Against Pulmonary Tuberculosis. **Frontiers in Immunology**. 9 set 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7509172/>. Acesso em: 24 out 2023.

BCG Immunization coverage estimates by WHO region. **WHO**. Disponível em: <https://apps.who.int/gho/data/view.main.81500?lang=en>. Acesso em: 23 nov 2023.

BCG Immunization coverage estimates by WHO country. **WHO**. Disponível em: <https://apps.who.int/gho/data/view.main.80500?lang=en>. Acesso em: 23 nov 2023.

BOUZEYEN, R.; JAVID, B.. Therapeutic Vaccines for Tuberculosis: An Overview. **Frontiers in Immunology**. 24 jun 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9263712/>. Acesso em: 24 out 2023.

CASTREJON, M. M. *et al.*. The impact of COVID-19 and catch-up strategies on routine childhood vaccine coverage trends in Latin America: A systematic literature review and database analysis. **Human Vaccine Immunotherapy**. 30 nov 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36084255/>. Acesso em: 23 nov 2023.

CHO, T *et al.* A review of the BCG vaccine and other approaches toward tuberculosis eradication. **Human Vaccine Immunotherapy**, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8475575/>. Acesso em: 11 set 2023.

FOSTER, M. *et al.* BCG-induced Protection Against Mycobacterium tuberculosis infection: Evidence, mechanisms, and implications for next-generation vaccines. **Immunological Reviews**. 12 mar 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8252066/>. Acesso em: 23 out 2023.

JIANG, F. *et al.* A Summary on Tuberculosis Vaccine Development—Where to Go? **Journal Of Personalized Medicine**. 24 fev. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10054751/>. Acesso em: 15 julho 2023.

LANGE, C. *et al.* 100 years of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. **Lancet Infect Dis**. set. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34506734/>. Acesso em: 18 julho 2023.

NADOLINSKAIA, N.; KOTLIAROVA, M.; GONCHARENKO, A. Fighting Tuberculosis: In Search of a BCG Replacement. **Microorganisms**. 22 dec 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9863999/>. Acesso em: 23 out 2023.

QU, M.; ZHOU, X.; LI, H. BCG Vaccination Strategies Against Tuberculosis: Updates and perspectives. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**. 02 dec 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8903987/>. Acesso em: 23 out 2023.



SABLE, S. B.; POSEY, J. E.; SCRIBA, T. J.. Tuberculosis Vaccine Development: Progress in Clinical Evaluation. **Clinical Microbiology Reviews**, Jan 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6822991/>. Acesso em: 11 set 2023.

SETIABUDIAWAN, T. P. *et al.* Protection against tuberculosis by Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination: A historical perspective. **Med**. jan. 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35590145/>. Acesso em: 07 ago 2023.

SRIVASTAVA, S.; DEY, S.; MUKHOPADHYAY, S.. Vaccines against Tuberculosis: Where Are We Now? **Vaccines**. 22 maio 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10223910/>. Acesso em: 08 ago 2023.

ROMANO, M. *et al.* A Structural View at Vaccine Development against M. tuberculosis. **Cells**. 14 jan 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36672252/>. Acesso em: 24 out 2023.

ZHANG, Y. *et al.* Advances in Protein Subunit Vaccines Against Tuberculosis. **Frontiers in Immunology**. 15 ago 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10465801/>. Acesso em: 23 out 2023



Capítulo 14

DOI: 10.53934/20242-14

NOROVÍRUS: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E MEDIDAS PREVENTIVAS

Bianca Fioravanti Salvadori¹; Fábio Hiroto Shimabukuro²;

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – Núcleo de Ciências Biomédicas - CLR XI - IAL Sorocaba. E-mail: bi.salvadori.98@gmail.com

²Pesquisador Científico - Núcleo de Ciências Biomédicas - CLR XI - IAL Sorocaba.

Resumo: O norovírus (NoV) é considerado a principal causa não bacteriana de gastroenterite aguda em humanos, após a introdução da vacina contra o Rotavírus (RV) responsável por casos esporádicos e surtos em hospitais, creches, navios e asilos. A sua transmissão ocorre através do contato direto com infectados, alimentos e água contaminada, existindo hipóteses da transmissão zoonótica, porém ainda sem comprovação. No Brasil e a nível global, o principal genogrupo circulante de NoV é o GII, sendo o mais prevalente em surtos de gastroenterites. A existência de inúmeros genótipos e constante mutação do vírus dificulta o desenvolvimento de uma vacina confiável e eficaz. Com isso, atualmente as principais medidas profiláticas estão relacionadas com o diagnóstico rápido, isolamento e tratamento do infectado, controle da contaminação de alimentos, água, superfícies ambientais e fômites. Ensaios clínicos de possíveis vacinas contra o NoV estão em andamento, atualmente nas fases I e II.

Palavras-chave: DTA; Epidemiologia; Norovírus; Prevenção;

INTRODUÇÃO

A gastroenterite aguda (GEA) é um dos problemas de saúde mais comuns em todo o globo. Por muitos anos o RV foi considerado a principal causa de episódios diarréicos em crianças, por meio da implementação da vacina no plano de imunização infantil foi possível observar um declínio da incidência onde foi aplicado (PIRES et al., 2015).

O NoV se tornou a principal causa de GEA grave na infância em alguns países que instituíram a vacinação generalizada contra RV, como Finlândia, Estados Unidos e Brasil (HEMMING et al., 2013; PAYNE et al., 2013; SANTOS et al., 2017). Os NoV são considerados uma causa importante de GEA em todas as faixas etárias (SARMENTO et al., 2021) e a segunda causa mais frequente, depois do rotavírus (RV) em crianças menores de 5 anos de idade (PIRES et al., 2015). Gera um impacto significativo no bem-estar humano em termos de morbidade, custos econômicos e mortalidade nos países em desenvolvimento (WHITE, 2014).

NoV foi citado como a principal causa mundial de doenças de transmissão hídrica e alimentar (YEARGIN; GIBSON, 2019). Estima-se que o GEA devido ao NoV cause 699 milhões de casos e 219.000 mortes em todo o mundo todos os anos (BARTSCH et al., 2016). A identificação do alimento como veículo transmissor é dificultada por conta das subnotificações dos casos, problemas na investigação de surtos e dos diferentes agentes etiológicos, que possuem rotas de transmissão alternativas (contato pessoa-pessoa, aerossóis produzidos durante o vômito e contato pessoas-animais; ambiental: água, solo e ar) (HAVELAAR et al., 2015), são um problema de saúde pública, pois ainda não existe um agente antiviral ou vacina disponível (FUMIAN et al., 2016).



A atualização de dados e conhecimentos sobre o NoV pode trazer informações importantes sobre a situação da doença. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi elaborar uma revisão bibliográfica integrativa através do levantamento de dados em artigos científicos para tratar dos principais aspectos do NoV com ênfase na epidemiologia molecular e métodos de prevenção.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa de literatura científica foi realizada por consulta à base de dados PubMed, Scielo, Scopus e repositório ARCA (Fiocruz), empregando como palavras-chave: Norovirus; Epidemiology; Prevention; Zoonosis; Foodborne. Foram selecionados artigos publicados do período de 2013 a 2023, com foco nas informações sobre epidemiologia molecular e prevenção. A busca foi realizada entre julho e outubro de 2023.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os NoV pertencem à família Caliciviridae e são vírus não envelopados, possuindo capsídeo, divididos em 10 genogrupos, sendo os GI, GII, GIV, GVIII e GIX caracterizados por serem mais patogênicos para humanos, subdivididos em 49 genótipos, o principal genótipo identificado em casos esporádicos é o GII.4, que apresentam novas variantes a cada 2-4 anos. Essa classificação foi estabelecida com base nas análises filogenéticas da ORF-2 de 164 sequências de NoV (CHHABRA et al., 2019). O material genético é constituído por RNA de fita simples, e sua replicação, dependente dos receptores da membrana celular do hospedeiro (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014).

Os NoV apresentam uma alta taxa de mutação e estão em constante evolução por alterações de nucleotídeos e recombinação do genoma. Cepas recombinantes de norovírus foram detectadas como causadoras de surtos de GEA em diversos países. A recombinação é uma das principais forças motrizes que moldam a evolução dos vírus, fornecendo um mecanismo para gerar vírus geneticamente novos e, portanto, a capacidade de escapar do sistema imunológico. No genoma NoV, um hotspot de recombinação está presente próximo à junção ORF1 / ORF2 e uma variedade de cepas recombinantes foram detectadas em todo o mundo (FUMIAN et al., 2016).

As infecções por NoV são autolimitantes em indivíduos saudáveis, mas estão associadas a complicações graves em indivíduos imunocomprometidos, idosos e crianças. Os principais sintomas são vômitos e diarreia que geralmente são de curta duração; pode gerar mialgias, arrepios e febre baixa (GREEN, 2014). Os sintomas geralmente começam 1 a 2 dias seguintes após o contato com o vírus permanecem durante 1 a 8 dias (LUZ; MIAGOSTOVICH, 2017). A gravidade dos sintomas pode variar com as cepas (BARCLAY et al., 2014).

A transmissão pode ocorrer diretamente através do contato com indivíduos infectados pela via fecal-oral ou a aerossóis infecciosos produzidos pelo vômito, ou indiretamente seja pela ingestão de alimentos e água contaminados (BARCLAY et al., 2014). Os modos de transmissão, a gravidade da doença e as pressões evolutivas influenciam o risco representado pelas infecções por NoV e podem variar entre as estirpes (DE GRAAF; VAN BEEK; KOOPMANS, 2016).

A transmissão alimentar é responsável por 10% dos surtos causados por GII.4, 27% por todos os outros genótipos únicos e 37% por misturas de GII.4 e outros (VERHOEF et al., 2015). Os alimentos mais sujeitos à contaminação por NoV são frutas, verduras, frutos do mar e alimentos prontos para consumo que não sofrem processamento adicional



(sanduíches, saladas de vegetais, produtos de confeitaria). Frutas e verduras, geralmente são consumidas cruas e passam por tratamentos sanitários industriais que não garantem a eliminação total do patógeno quando presente (LUZ; MIAGOSTOVICH, 2017).

Baseado nos estudos atuais, ainda não é possível afirmar que o NoV pode ser considerado uma zoonose, atualmente sendo considerada apenas uma hipótese. Atualmente, não existem estudos controlados de surtos durante os quais animais e humanos tenham sido amostrados simultaneamente. Porém existem evidências que o NoV seja uma zoonose, por meio da identificação do RNA do NoV humano diferentes espécies (cachorros, roedores, aves, suínos e gado) (VILLABRUNA; KOOPMANS; DE GRAAF, 2019).

A evidência de transmissão do NoV de animais para humanos é limitada, se baseia principalmente em análises sorológicas. Caso tais transmissões ocorram, elas provavelmente são eventos raros, difíceis de identificar por serem geralmente assintomáticas ou esporádicas. Para melhorar as chances de identificar a transmissão interespecies, seria necessário implementar uma vigilância mais específica, que incluísse amostras de animais e humanos que tenham contato próximo, de preferência durante surtos, utilizando métodos de detecção imparciais. Desvendar os reservatórios de NoV e transmissão interespecies auxiliará a entender a evolução e a origem desses vírus (VILLABRUNA; KOOPMANS; DE GRAAF, 2019).

Em um estudo de levantamento de dados sobre o panorama das DTHA no Brasil, entre os anos de 2009 e 2019, os vírus representaram 9% dos casos de surtos de DTHA, sendo 4% causado por NoV. Porém, a maior parte dos casos notificados não foi determinado o agente envolvido, considerando-se o agente ignorado, inconclusivo ou inconsistente. A não identificação do agente etiológico envolvido no surto está relacionada com a notificação tardia, coleta de amostras de água ou alimento em tempo inadequado, ou testes de laboratórios inconsistentes, impossibilitando o controle e prevenção dos casos (AMARAL et al., 2021)

A investigação dos surtos e estudos epidemiológicos são essenciais para garantir a saúde pública, destacando a importância de uma vigilância sistemática, apoiando a implementação de estratégias de prevenção e controle, bem como uma melhor compreensão da evolução molecular do NoV (DA SILVA RIBEIRO DE ANDRADE et al., 2018). O sequenciamento dos genes da polimerase e do capsídeo é uma ferramenta valiosa para uma compreensão adequada da epidemiologia e evolução do NoV (GONÇALVES BARREIRA et al., 2017). O contínuo surgimento de novas variantes do vírus enfatiza a necessidade de vigilância laboratorial ativa para NoV, incluindo epidemiologia molecular e estudos sobre a evolução do vírus (ANDRADE et al., 2017), e fornecem uma base para o desenvolvimento de vacinas (SIQUEIRA et al., 2017).

O genótipo GII é o mais prevalente em surtos de gastroenterites a nível mundial, sendo responsável por mais de 90% dos casos clínicos de norovirose relatados. Os NoV GII.4 acumulam mutações ao longo do tempo na sequência nucleotídica do gene que codifica a proteína VP1, o qual permite evasão da imunidade na população humana (PRADO; MIAGOSTOVICH, 2014).

Estudos realizados no Brasil nas regiões norte e nordeste (GONDIM et al., 2018; HERNANDEZ et al., 2018; PORTELA et al., 2021; SARMENTO et al., 2021; SIQUEIRA et al., 2017), e sul e sudeste (ANDRADE et al., 2017; DA SILVA RIBEIRO DE ANDRADE et al., 2018; FUMIAN et al., 2016; GONÇALVES BARREIRA et al., 2017) demonstram o predomínio em casos esporádicos, surtos de adultos e crianças no GII e cepas recombinantes. Sendo raros os estudos que resultaram genótipo diferentes, porém foi identificado GIV no estado do Rio de Janeiro (FIORETTI et al., 2018) e o GI em amostras do estado do Pará (SIQUEIRA et al., 2017). GII.4 Sydney[P16], GII.2[P16], GII.4



Sydney[P31] e GII.6[P7] são genótipos recombinantes prevalentes no Brasil (SARMENTO et al., 2021).

O primeiro passo para controlar surtos de NoV é o diagnóstico laboratorial rápido, que direciona a implementação de práticas de intervenção e controle apropriadas, como protocolos de limpeza e desinfecção, isolamento, agrupamento de pacientes com base nos sintomas, exclusão de funcionários sintomáticos ou manipuladores de alimentos, e se necessário, até fechamento de estabelecimentos (BARCLAY et al., 2014). A redução da transmissão é consequência do controle da contaminação de alimentos, água, superfícies ambientais e fômites, assim como a aplicação de boas práticas de manipulação e higiene adequada de manipuladores de alimentos. Assim como, é necessário educar os consumidores sobre como prevenir, controlar e como a infecção por NoV é ocasionada (CATES et al., 2015). Nas creches e escolas é indicado práticas como lavagem das mãos para funcionários e crianças, isolamento e exclusão de crianças e funcionários doentes, troca de fraldas e limpeza ambiental (LEONE et al., 2016). Para evitar a contínua transmissão, pode ser necessário suspender as operações de estabelecimentos como navios de cruzeiro, resorts, acampamentos e restaurantes (LUZ; MIAGOSTOVICH, 2017).

Em junho de 2016, o Comitê Consultivo de Desenvolvimento de Produtos para Vacinas da Organização Mundial da Saúde (OMS) identificou o NoV como uma doença prioritária para o desenvolvimento de vacinas (GIERSING et al., 2019). Atualmente, as vacinas contra NoV estão em ensaios clínicos (fases I e II), porém as vacinas candidatas enfrentam o desafio de uma definição pouco clara de imunidade de proteção cruzada entre os diferentes genótipos. Existe uma ampla diversidade genética e antigênica dos NoV com múltiplas variantes cocirculantes de vários genótipos. Além disso, a ausência de um sistema de cultura celular, de um modelo animal eficiente e de marcadores imunológicos confiáveis de proteção contra NoV para avaliação de vacinas dificulta ainda mais o processo de desenvolvimento (TAN, 2021). O surgimento de uma nova estirpe de GII.4 a cada 2–4 anos representa um problema no desenvolvimento de uma vacina. Este é um problema semelhante ao enfrentado pelo vírus Influenza e exigiria que a vacina evoluísse à medida que novas variantes surgissem. Uma vacina NoV ideal protegeria contra múltiplas variantes (WINDER; GOHAR; MUTHANA, 2022).

Os programas de vigilância epidemiológica e molecular integrada podem ajudar na tomada de decisões globais às políticas de implementação de vacinas. Além disso, como novos genótipos ou variantes podem surgir em qualquer parte do mundo e espalhar-se rapidamente, sendo necessários programas de vigilância contínua para acompanhar as tendências epidemiológicas e evolutivas das infecções por NoV (SARMENTO et al., 2021).

CONCLUSÕES

O NoV é a principal causa de GEA (não bacteriana) no Brasil e no mundo após a introdução da vacinação contra o RV, gerando um grande impacto no bem-estar e socioeconômico global. Existem hipóteses da sua transmissão zoonótica, porém para a comprovação seria necessário a realização de um estudo com uma vigilância mais específica, incluindo amostras de animais e humanos que tenham contato, a confirmação da transmissão interespecie auxiliaria no entendimento da evolução e origem do NoV. Atualmente, existem estudos que comprovam a identificação do NoV humano em amostras de diferentes espécies.

No Brasil, o NoV representou 4% como agente etiológico de surtos de origem alimentar no período de 2009 a 2019, porém essa estimativa provavelmente é subestimada devido à subnotificação e não identificação do agente etiológico. Com relação à epidemiologia molecular do Brasil, o genogrupo prevalente é o GII, sendo o GII.4



Sydney[P16] predominante. O monitoramento dos casos de GEA causados por NoV é essencial para avaliar o impacto deste vírus na comunidade (casos esporádicos e surtos), bem como para o desenvolvimento e avaliação de medidas de controle, como vacinas. Em razão da evolução rápida e contínua desses vírus requer um sistema de vigilância ativo que identifique genótipos circulantes e prevalentes que possam auxiliar no estabelecimento de uma eventual vacina no país. A implementação de um sistema de vigilância epidemiológico, e de notificação além de uma rede integrada entre os estados e países, auxiliaria no conhecimento de diversas áreas do conhecimento da doença (variedade genética, sazonalidade, distribuição), auxiliando no desenvolvimento de medidas profiláticas.

Atualmente, a vacina de NoV está em desenvolvimento (ensaios clínicos fase I e II), com isso, as principais medidas preventivas estão relacionadas com o diagnóstico rápido, isolamento e tratamento do infectado, controle da contaminação de alimentos, água, superfícies ambientais e fômites.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, S. M. B. et al. Panorama dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil no período de 2009 a 2019. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar - ISSN 2675-6218**, v. 2, n. 11, p. e211935, 17 dez. 2021.
- ANDRADE, J. S. R. et al. Detection and molecular characterization of emergent GII.P17/GII.17 Norovirus in Brazil, 2015. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 51, p. 28–32, 1 jul. 2017.
- BARCLAY, L. et al. **Infection control for norovirus. Clinical Microbiology and Infection** Blackwell Publishing Ltd, , 2014.
- BARTSCH, S. M. et al. Global economic burden of norovirus gastroenteritis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2016.
- CATES, S. C. et al. **Consumer education needed on norovirus prevention and control: Findings from a nationally representative survey of U.S. adults. Journal of Food Protection** International Association for Food Protection, , 1 mar. 2015.
- CHHABRA, P. et al. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. **Journal of General Virology**, v. 100, n. 10, p. 1393–1406, 2019.
- DA SILVA RIBEIRO DE ANDRADE, J. et al. Norovirus GII.17 Associated with a Foodborne Acute Gastroenteritis Outbreak in Brazil, 2016. **Food and Environmental Virology**, v. 10, n. 2, p. 212–216, 1 jun. 2018.
- DE GRAAF, M.; VAN BEEK, J.; KOOPMANS, M. P. G. **Human norovirus transmission and evolution in a changing world. Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 14 jun. 2016.
- FIORETTI, J. M. et al. Surveillance of Noroviruses in Rio De Janeiro, Brazil: Occurrence of New GIV Genotype in Clinical and Wastewater Samples. **Food and Environmental Virology**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 1 mar. 2018.
- FUMIAN, T. M. et al. Norovirus recombinant strains isolated from gastroenteritis outbreaks in southern Brazil, 2004-2011. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2016.
- GIERSING, B. K. et al. **Report from the World Health Organization's third Product Development for Vaccines Advisory Committee (PDVAC) meeting, Geneva, 8–10th June 2016. Vaccine. Anais...** Elsevier Ltd, 28 nov. 2019.
- GONÇALVES BARREIRA, D. M. P. et al. Detection and molecular characterization of the novel recombinant norovirus GII.P16-GII.4 Sydney in southeastern Brazil in 2016. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 1 dez. 2017.



- GONDIM, R. D. G. et al. Genetic Diversity of Norovirus Infections, Coinfections, and Undernutrition in Children From Brazilian Semiarid Region. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 67, n. 6, p. e117–e122, 1 dez. 2018.
- GREEN, K. Y. **Norovirus infection in immunocompromised hosts**. **Clinical Microbiology and Infection** Blackwell Publishing Ltd, , 2014.
- HEMMING, M. 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. **European Journal of Pediatrics**, v. 172, n. 6, p. 739–746, jun. 2013.
- HERNANDEZ, J. M. et al. Molecular epidemiology and temporal evolution of norovirus associated with acute gastroenteritis in Amazonas state, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, 2 abr. 2018.
- LEONE, C. M. et al. **A Review of State Licensing Regulations to Determine Alignment with Best Practices to Prevent Human Norovirus Infections in Child-Care Centers** **Public Health Reports**. [s.l] 2016.
- LUZ, I. D. S.; MIAGOSTOVICH, M. P. Norovírus em alimentos. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 5, n. 3, p. 100, 31 ago. 2017.
- PAYNE, D. C. et al. Norovirus and Medically Attended Gastroenteritis in U.S. Children. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 12, p. 1121–1130, 21 mar. 2013.
- PIRES, S. M. et al. Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2015.
- PORTELA, A. C. R. et al. Retrospective molecular analysis of norovirus recombinant strains in the amazon region, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 96, 1 dez. 2021.
- PRADO, T.; MIAGOSTOVICH, M. P. **Environmental virology and sanitation in Brazil: A narrative review**. **Cadernos de Saude Publica** Fundacao Oswaldo Cruz, , 1 jul. 2014.
- SANTOS, V. S. et al. Acute norovirus gastroenteritis in children in a highly rotavirus-vaccinated population in Northeast Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 88, p. 33–38, 1 mar. 2017.
- SARMENTO, S. K. et al. Virological and epidemiological features of norovirus infections in brazil, 2017–2018. **Viruses**, v. 13, n. 9, 1 set. 2021.
- SIQUEIRA, J. A. M. et al. Genotype diversity and molecular evolution of noroviruses: A 30-year (1982–2011) comprehensive study with children from Northern Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2017.
- TAN, M. **Norovirus vaccines: Current clinical development and challenges**. **Pathogens** MDPI, , 1 dez. 2021.
- VERHOEF, L. et al. Norovirus genotype profiles associated with foodborne transmission, 1999–2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 592–599, 2015.
- VILLABRUNA, N.; KOOPMANS, M. P. G.; DE GRAAF, M. **Animals as reservoir for human norovirus**. **Viruses** MDPI AG, , 1 maio 2019.
- WHITE, P. A. **Evolution of norovirus**. **Clinical Microbiology and Infection** Blackwell Publishing Ltd, , 2014.
- WINDER, N.; GOHAR, S.; MUTHANA, M. **Norovirus: An Overview of Virology and Preventative Measures**. **Viruses** MDPI, , 1 dez. 2022.
- YEARGIN, T.; GIBSON, K. E. **Key characteristics of foods with an elevated risk for viral enteropathogen contamination**. **Journal of Applied Microbiology** Blackwell Publishing Ltd, , 1 abr. 2019.





Capítulo 15

DOI: 10.53934/20242-15

CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS MELANIZADOS PRESENTES NO ACERVO DO NÚCLEO DE COLEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ – CENTRAL

Nicolas Vieira Guerra Castilho¹; Tânia Sueli de Andrade²;

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

²Pesquisadora Científica/Diretora do Núcleo de Coleções de Micro-organismos – NCMO – IAL

Resumo: O núcleo de coleções de micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz possui vasto acervo com linhagens de bactérias, fungos e protozoários derivados de amostras clínicas, isolados do ambiente e outras coleções de referência. Para ser devidamente incorporado ao acervo, o micro-organismo é submetido à autenticação completa através da análise das características por métodos fenotípicos clássicos, análises genotípicas e de proteômica, utilizando diferentes métodos de conservação. Este estudo propôs identificar e autenticar 15 linhagens de *Fonsecaea sp.* armazenadas no acervo do núcleo de coleções de micro-organismos derivadas de amostras clínicas de pacientes acometidos por cromoblastomicose e validar a viabilidade dos métodos de preservação empregados. As linhagens foram mantidas por Método de Castellani e congelamento a -80°C em miçangas por um período de até 16 anos. Todas as linhagens selecionadas foram reativadas com sucesso, sem ocorrência de contaminação. Com a identificação polifásica, foram integrados os aspectos fenotípicos macro e micromorfológicos, onde foi possível caracterizar padrões intraespécies de velocidade e tamanho de crescimento das colônias gigantes e padrões interespécies de conidiogênese, com métodos moleculares de PCR e sequenciamento utilizando iniciadores ITS1 e ITS4 que possibilitaram a formação de regiões consenso de DNA, confirmando identificações presuntivas realizadas e a espécie de uma linhagem identificada como *Fonsecaea monophora*.

Palavras-chave: Autenticação; Coleções de micro-organismos; *Fonsecaea*; Congelamento;

INTRODUÇÃO

O núcleo de coleções de micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz foi fundado em 1940 e possui vasto acervo com linhagens de bactérias, fungos e protozoários derivados de amostras clínicas, isolados do ambiente e também de outras coleções de referência. Para ser devidamente incorporado ao acervo, o micro-organismo é submetido à autenticação completa através da análise das características fenotípicas, genotípicas, proteômicas, um laudo é gerado e o micro-organismo é registrado com número de IAL (ANDRADE *et al.*, 2008). O acervo do núcleo de coleções de culturas do Instituto Adolfo Lutz conta com 211 linhagens de fungos melanizados derivados de amostras clínicas de pacientes acometidos por cromoblastomicose. Muitos desses fungos foram identificados, autenticados e armazenados por diferentes métodos de manutenção para serem incorporados ao acervo, porém alguns permanecem sem identificação de espécie e não possuem numeração de IAL.



Fungos possuem maior complexidade estrutural, morfológica e genética em relação à maioria das bactérias, e os melanizados são especialmente complexos pela verificação de pleomorfismo mesmo intraespécie, demandando análise morfológica criteriosa pelo analista. (ANDRADE, 2007)

Fungos melanizados como *Fonsecaea spp.*, *Exophiala spp.*, *Rhinochadiella spp.* e *Phialophora spp.* são alguns dos agentes etiológicos causadores da cromoblastomicose, infecção granulomatosa da pele e de evolução crônica, é encontrada em todo o mundo, majoritariamente em zonas tropicais e subtropicais, sendo endêmica em populações rurais de todo o país (GOMES *et al.*, 2016). O inóculo ocorre através de trauma transcutâneo em espinhos, folhagens e madeira contaminada (ANDRADE *et al.*, 2020), formando uma pequena pápula rósea podendo demorar de meses a anos até o aparecimento de lesões granulomatosas e verificação de estruturas globosas melanizadas conhecidas como células muriformes na microscopia de raspado da lesão, que caracterizam a patologia (DE BRITO *et al.*, 2018). O presente estudo tem o objetivo de realizar a caracterização e autenticação completa de 15 linhagens de *Fonsecaea* por métodos moleculares e validar os métodos de conservação empregados no núcleo de coleção de micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 15 linhagens com até 16 anos de armazenamento pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1963) e submetidas a análises macro e micromorfológicas e análises genômicas por PCR e sequenciamento no intuito de autenticar estas linhagens. Para reativação, uma porção de cada fungo foi repicada em tubo de ágar dextrose batata e incubada a 28°C, durante 6 a 18 dias, verificando e registrando a cada 3 dias o desenvolvimento das características dos fungos e mudanças no aspecto no meio de cultura com crescimento. Também foram selecionadas 6 linhagens de *Fonsecaea spp.* armazenadas no acervo do NCMO por método de congelamento a -80°C em miçangas para avaliar a viabilidade deste método de conservação por longos períodos (Tabela 1).

Tabela 1 – Linhagens e método empregado

IAL	Lote	Método de Manutenção	Linhagem	IAL	Lote	Método de Manutenção	Linhagem
4931	18/08/08	Castellani	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	5517	12/08/21	Castellani	<i>Fonsecaea spp.</i>
4902	18/08/08	Castellani	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	5518	12/08/21	Castellani	<i>Fonsecaea spp.</i>
4907	22/12/14	Castellani	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	5519	12/08/21	Castellani	<i>Fonsecaea spp.</i>
4956	12/08/21	Castellani	<i>Fonsecaea nubica</i>	5520	12/08/21	Castellani	<i>Fonsecaea spp.</i>
3999	24/09/14	Castellani	<i>Fonsecaea nubica</i>	3993	29/07/14	Miçanga	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
4915	20/01/15	Castellani	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	4907	21/01/15	Miçanga	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
4922	23/12/14	Castellani	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	3999	17/09/14	Miçanga	<i>Fonsecaea nubica</i>
5110	12/08/21	Castellani	<i>Fonsecaea nubica</i>	4915	18/02/15	Miçanga	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
5124	13/02/09	Castellani	<i>Fonsecaea monophora</i>	4922	26/01/15	Miçanga	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>
5494	12/08/21	Castellani	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	5124	17/09/14	Miçanga	<i>Fonsecaea monophora</i>
5497	12/08/21	Castellani	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>				

Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Informações de origem, lote, método de conservação, origem e temperatura de crescimento das linhagens.



Para análises macro e micromorfológicas, foi transferida no centro de placas de ágar dextrose batata uma porção de cada linhagem de *Fonsecaea sp.* e incubadas à 28°C para análise morfológica de colônia gigante e preparada uma placa de microcultivo em ágar dextrose batata para cada linhagem, incubadas nas mesmas condições supracitadas. As lâminas de microcultivo foram coradas com lactofenol azul de algodão quando verificada a formação conidiogênica.

Para a extração de DNA das linhagens, foram utilizados dois métodos distintos, um automatizado e outro convencional. O método automatizado utilizou o extrator e purificador de DNA e RNA – EXTRACTA®16 da Loccus com o protocolo MFXD-PU16, indicado para a extração de fungos. Foram seguidas as instruções do fabricante. Para triagem do método convencional foi utilizado Invitrogen DNA mini kit e selecionadas 2 linhagens *Fonsecaea pedrosoi* (IAL 5494 e 5497) e 2 *Fonsecaea spp.* (IAL 5518 e 5520), de acordo com as orientações do fabricante. A integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%, 100V por 30 minutos.

Foram realizadas duas reações de PCR, uma utilizando a GoTaq® Green Master Mix e outra utilizando a Platus Taq DNA Polimerase. Foram seguidas as orientações dos fabricantes quanto às quantidades e concentrações no preparo dos mixes. As condições de termociclagem seguiram 1 ciclo de 5 minutos a 95°C seguidos de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C e 1 ciclo de 5 minutos a 72°C. A amplificação dos produtos gerados foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% a 100 V por 30 minutos.

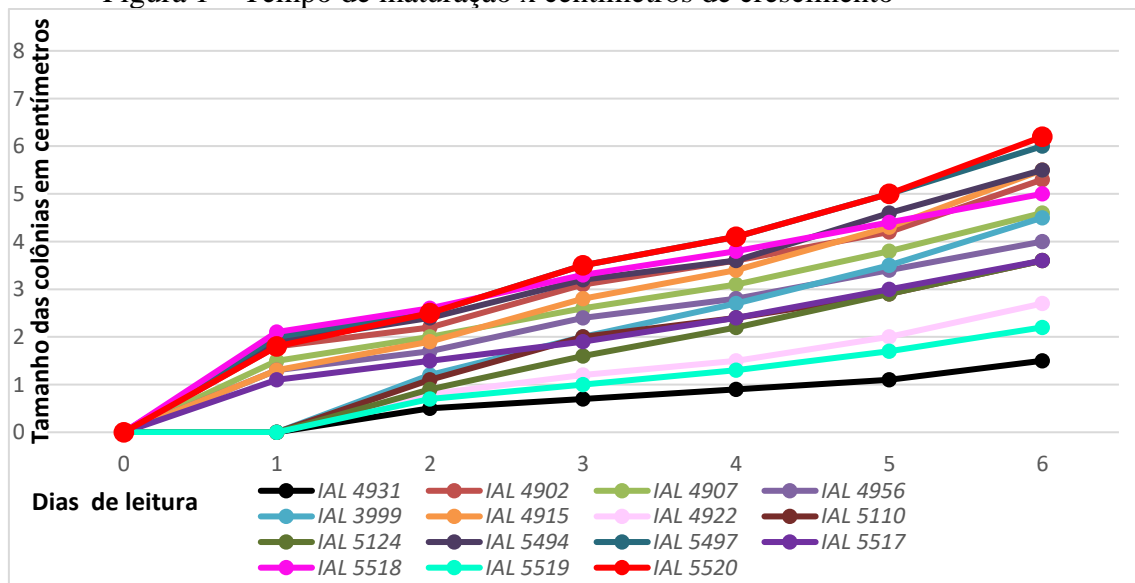
O protocolo e os insumos do kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems™) foram utilizados no preparo das amostras para sequenciamento. A reação foi realizada no sequenciador de DNA ABI Prism 3700 (Applied Biosystems). Os dados de eletroferograma obtidos do sequenciamento foram analisados e compilados por ferramenta digital de análise qualitativa de eletroferograma disponibilizado pelo site da EMBRAPA (lbi.cenargen.embrapa.br/phph/). As sequencias de nucleotídeos formados foram comparados com linhagens de referência armazenadas no Genbank da ferramenta BLAST® (NCBI). Para formatação das sequências e auxílio na comparação entre as linhagens foi utilizando o software Bioedit®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 15 linhagens selecionadas foram reativadas com sucesso, sem ocorrência de contaminação. Apesar do método de Castellani ser considerado um método de preservação de médio prazo (GUIMARÃES, 2011), as linhagens permaneceram viáveis mesmo com até 16 anos de armazenamento (Tabela 1).



Figura 1 – Tempo de maturação x centímetros de crescimento



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: IAL 4931 *F. pedrosoi*; IAL 4902 *F. pedrosoi*; IAL 4907 *F. pedrosoi*; IAL 4956 *F. nubica*; IAL 3999 *F. nubica*; IAL 4915 *F. pedrosoi*; IAL 4922 *F. pedrosoi*; IAL 5110 *F. nubica*; IAL 5124 *Fonsecaea monophora*; IAL 5494 *F. pedrosoi*; IAL 5497 *F. pedrosoi*; IAL 5517 *Fonsecaea spp.*; IAL 5518 *Fonsecaea spp.*; IAL 5519 *Fonsecaea spp.*; IAL 5520 *Fonsecaea spp.*

As 15 placas com colônias gigantes foram medidas 6 vezes no decorrer de 19 dias, para verificação de similaridade entre as linhagens (Figura 1). Para comparação, 3 linhagens (IAL 4931 e 4922 *F. pedrosoi*; IAL 5519 *Fonsecaea spp.*) formaram colônias pequenas (menos de 3cm), 10 linhagens (IAL 4902, 4907, 4915 e 5494 *F. pedrosoi*; IAL 4956, 3999 e 5110 *F. nubica*; IAL 5124 *F. monophora*; IAL 5517 e 5518 *Fonsecaea spp.*) formaram colônias médias (entre 3cm e 5cm) e 2 (IAL 5520 *F. monophora* e IAL 5497 *F. pedrosoi*) formaram colônias grandes (6 cm ou mais). Na análise de tamanho das colônias, 6 linhagens (IAL 4931, 3999, 4922, 5110, 5124 e 5519) apresentaram crescimento lento (até 12 dias) e 9 linhagens (IAL 4902, 4907, 4956, 4915, 5494, 5497, 5517, 5518 e 5520) apresentaram crescimento rápido (até 6 dias). Esses resultados corroboram com as identificações presuntivas e com a literatura descrita por Larone, 2000. A análise fenotípica indicou outras similaridades interespecies na topografia e aspecto das linhagens. Todas as colônias apresentaram centro elevado, com feixes concêntricos em tons de cinza e preto, resultados esses que corroboram com a literatura de referência. Entretanto, houve discrepâncias entre texturas e formatos das colônias: 4 linhagens, entre elas *F. pedrosoi* (IAL 4902) e *F. nubica* (IAL 4956, 3999 e 5110) apresentaram textura cotonosa, enquanto que 11 colônias, entre elas *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *Fonsecaea spp.* (IAL 4931, 4907, 4915, 4922, 5124, 5494, 5497, 5517, 5518, 5519 e 5520) apresentaram textura velutina. O formato das colônias de 8 linhagens (IAL 5520, 5519, 5494, 5110, 4915, 3999, 4907 e 4902) foi circular irregular, enquanto que 7 linhagens (IAL 5518, 5517, 5497, 5124, 4922, 4956 e 4931) apresentaram formato circular uniforme.

Os dois métodos de extração de DNA utilizados geraram resultados que puderam ser utilizados para a PCR, porém foi demonstrada maior eficiência do método automatizado por resultar em concentrações maiores (melhor extração) com maior intensidade de amplificação na eletroforese.



O sequenciamento dos produtos formou regiões consenso de DNA (contigs) com similaridades de até 100% quando comparadas com linhagens de referência presentes no GenBank BLAST® NCBI. O sequenciamento rendeu 6 contigs das linhagens de número de IAL 4902, 3999, 4915, 5494, 5497 e 5520 (Tabela 5). 10 linhagens não formaram regiões consenso de DNA com ambos os primers ITS1 e ITS4, porém 4 linhagens possuíam resultados passíveis de identificação presuntiva com pelo menos um dos primers ITS1 ou ITS4 quando comparados com o GenBank BLAST® NCBI (Tabela 2), porém, estes resultados não podem ser depositados no GenBank tampouco servir como autenticação completa.

Tabela 2 - Resultados e similaridade com o GenBank

IAL	Resultado	Contig ou F/R	Similaridade (%)
4902	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Contig	99.65%
3999	<i>Fonsecaea nubica</i>	Contig	99.65%
4915	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Contig	98.73%
4922	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	ITS4	100.00%
5124	<i>Fonsecaea monophora</i>	ITS4	100.00%
5494	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Contig	99.13%
5497	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	Contig	99.83%
5517	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	ITS1	100.00%
5519	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	ITS1	100.00%
5520	<i>Fonsecaea monophora</i>	Contig	100.00%

Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Resultados do sequenciamento comparados com linhagens de referência presentes no GenBank Blast® NCBI

O sequenciamento das amostras corroborou com os resultados das identificações presuntivas. A linhagem IAL 5520 que não possuía identificação de espécie, formou regiões consenso de DNA com 100% de similaridade com linhagens referência de *Fonsecaea monophora* depositadas no GenBank.

Apesar das análises morfológicas majoritariamente corroborar com a literatura de referência (LARONE, 2000) foram observadas discrepâncias interespecies e mesmo intraespecies. No método de identificação polifásica, essas características são integradas à análise molecular para identificar, caracterizar e expor essas discrepâncias a fim de relacionar diferentes espécies do gênero *Fonsecaea*.

CONCLUSÕES

A autenticação completa de 6 linhagens foi concluída por identificação polifásica. O método clássico de identificação para fungos melanizados consiste nas análises macro e microscópica, as quais podem levar a erros de análise se baseadas apenas nas morfologias, principalmente interespecies.

O conjunto das análises macro e microscópicas unidas às análises genômicas garantiram a autenticação completa das espécies de *Fonsecaea sp.* pela verificação das características esperadas com a similaridade com outras linhagens de referência de *Fonsecaea spp.*

O presente estudo possibilitou a identificação da espécie da linhagem IAL 5520 (antes *Fonsecaea spp.*) como *Fonsecaea monophora*. As informações dos resultados de



sequenciamento obtidos foram registradas e permitem que sejam depositadas em bancos genéticos, para serem utilizadas como referência pela comunidade científica.

Análises das linhagens IAL 5517 e 5519 forneceram resultados passíveis de identificação presuntiva que podem ser utilizadas para elaboração de novos estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Sérgio e Áurea, por me proporcionarem a vida e pela criação que recebi, serei eternamente grato. À minha irmã Giovana, minha sobrinha Angelina e minha companheira de vida Camila por sempre me apoiarem e incentivarem, não me deixarem fraquejar nem abaixar a cabeça, por toda a diversão e por toda força, muito obrigado. À minha orientadora Tânia por todo o carinho e atenção e pela experiência e sabedoria compartilhada. À colega Elizabeth por todo o auxílio e ensinamentos valiosos. À colega Gabriela por todas as informações trocadas e pausas para o café. E finalmente, a todos os precursores que contribuíram com o avanço e aprimoramento da ciência, possibilitaram que chegássemos onde estamos e aonde vamos chegar.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, T. S. *et al.* (2020). Chromoblastomycosis in the Amazon region, Brazil, caused by *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea nubica*, and *Rhinocladiella similis*: Clinicopathology, susceptibility, and molecular identification. **Medical Mycology**, 58(2), 172–180. <https://doi.org/10.1093/mmy/myz034>

ANDRADE, T. S. *et al.* (2007). Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57(3), 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.08.024>

ANDRADE, T. S. *et al.* (2008). **BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista**. Bepa Novembro, 5(59). http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa59_ial.htm

BRITO, A. C., BITTENCOURT, M. de J. S. (2018). Chromoblastomycosis: An etiological, epidemiological, clinical, diagnostic, and treatment update. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 93(4), 495–506. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187321>.

CASTELLANI, A. (1963). *Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water*. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, 20(1-2), 1-6. doi:10.1007/bf02054872

GOMES, R. R. *et al.*, (2016). Molecular Epidemiology of Agents of Human Chromoblastomycosis in Brazil with the Description of Two Novel Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 10(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005102>

GUIMARÃES, L. C. Métodos de preservação de fungos potencialmente toxicogênicos. **Repositório UFLA**, 2011. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/3137/1/DISSERTA%20de%20preserva%20de%20fungos%20potencialmente%20toxicog%20Anicos.pdf>. Acesso em: 25/10/2023



LARONE, D.H. Medically Important Fungi: A guide to Identification, 3^o ed., Washington, DC., 2000.



Capítulo 16

DOI: 10.53934/20242-16

FUNÇÕES DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES EM PARASITAS UNICELULARES

Paulo Henrique Kawakami Silva¹; Vera Lúcia Pereira Chioccola²

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

²Docente/pesquisador do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos – CPM – IAL

Resumo: As infecções parasitárias representam uma questão de extrema relevância em Saúde Pública, dado seu potencial para causar sérios danos tanto às populações humanas quanto aos animais. Nos últimos anos temos testemunhado uma crescente compreensão da importância das vesículas extracelulares (EVs), que são nanoestruturas com diâmetros que variam de 10 a 1000 nanômetros e são liberadas por todas as células eucarióticas e procarióticas. Desempenham múltiplas funções celulares essenciais, tais como, transporte de proteínas e ácidos nucleicos, além de facilitar a comunicação intercelular. Nas últimas décadas vários estudos têm mostrado a importância das EVs, principalmente na participação das infecções. Diante desse cenário, o presente estudo realizou uma análise retrospectiva utilizando revisões científicas pertinentes a esse tema, visando ampliar a compreensão sobre a participação das EVs na relação parasita-hospedeiro. Esta análise concluiu que o estudo das EVs de parasitas unicelulares abre novas perspectivas para a pesquisa, proporcionando uma compreensão mais profunda da biologia parasitária e das EVs. Isso cria oportunidades para diagnósticos e terapias inovadoras.

Palavras-chave: Comunicação Celular; Exossomos; Infecções Parasitárias; Parasitas; Vesículas Extracelulares.

INTRODUÇÃO

A comunicação entre células é crucial para a homeostase de seres multicelulares, ocorrendo através de contatos diretos ou transferência de moléculas. Foi identificado um terceiro mecanismo de comunicação celular: a transferência intracelular de vesículas extracelulares (EVs) (GURUNG et al., 2021). No ambiente extracelular, diversas vesículas são liberadas, originadas de compartimentos endossomais e da membrana plasmática, conhecidas como exossomos e microvesículas, respectivamente (GURUNG et al., 2021).

Enquanto a liberação de corpos apoptóticos durante o processo de apoptose é um fenômeno conhecido há algum tempo, a liberação de outros tipos de EVs pelas células saudáveis representa uma descoberta recente. As EVs são nanopartículas com bicamada lipídica, secretadas por quase todos os tipos celulares em diversos organismos (GURUNG et al., 2021).

Elas se dividem em três grupos: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (GURUNG et al., 2021). Devido ao seu papel crucial na comunicação intracelular e na modulação da resposta imunológica em parasitas unicelulares, as EVs são essenciais para a patogenicidade, adaptação ao ambiente e sobrevivência desses organismos. Pesquisar as EVs



em parasitas unicelulares é fundamental para entender suas estratégias adaptativas e desenvolver novas abordagens diagnósticas e terapêuticas para doenças parasitárias.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo refere-se a uma revisão de literatura científica de artigos em que os autores desenvolveram estudos sobre as EVs. Os resumos científicos foram pesquisados na internet nos sites de base de dados eletrônicos como SciELO, Google acadêmico, PubMed e Lilacs. As buscas foram realizadas através das palavras chaves no idioma inglês e publicadas em torno de 2010 até 2023. Os termos mais pesquisados foram “*extracelular vesicles*”, “*exosomes*”, “*parasite extracelular vesicles*” “*microvesicles*” e “*microRNAs*”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vesículas extracelulares

Essas vesículas desempenham um papel fundamental na comunicação entre células, facilitando a interação intercelular. Pesquisas recentes mostraram que as EVs são essenciais em vários processos biológicos. Ao mesmo tempo, influenciam nas respostas imunológicas, desempenhando um papel crucial na interação parasita-hospedeiro (AKERS et al., 2013).

Exossomos

A formação dos exossomos começa no interior da célula, onde vesículas intraluminais são formadas em compartimentos endossômicos, as vesículas intracelulares se fundem para formar corpos multivesiculares (MVBs) dentro de endossomo, os MVBs passam por um processo de maturação, esse processo está associado à formação de vesículas intraluminais. Os MVBs se movem em direção à membrana plasmática e fundem-se com ela, liberando as vesículas no ambiente extracelular. Conhecidas então como exossomos, essas vesículas são liberadas medindo cerca de 40–100 nm (Kalluri & Lebleu, 2020). Estudos mostraram que os exossomos são secretados em fluidos corporais, como sangue, urina, sêmen, líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico, líquido sinovial e leite materno (KALLURI; LEBLEU, 2020).

Microvesículas

Microvesículas (MV) são EVs formadas por brotamento ou fissão da membrana plasmática de células ativadas por diferentes estímulos. O aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} é crucial para determinar a composição dessas vesículas, permitindo a incorporação seletiva de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Isso confere uma heterogeneidade maior às MV em comparação com os exossomos. Com tamanhos variando de 50 nm a 1.000 nm de diâmetro, as MV são encontradas em tecidos e em diversos fluidos corporais, tornando-se essenciais em organismos multicelulares (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018).

A composição das MVs varia conforme a origem celular e o estímulo que as formou. Podem conter diferentes proporções de fosfolipídios, lipídios bioativos, RNAs como RNA mensageiro (mRNA) e microRNA (miRNA), enzimas, e proteínas do citoplasma celular. Citocinas e receptores específicos da célula de origem também são comuns nas MVs, tornando-as estruturas complexas e funcionalmente diversas (DOYLE; WANG, 2019).



Corpos apoptóticos

O processo de apoptose é algo natural e regulado para a morte celular programada em organismos multicelulares. Desempenham um papel fundamental para o equilíbrio homeostático, assegurando a proporção adequada entre a formação celular e a eliminação de células. Este processo não causa reações inflamatórias ou danos nos tecidos circundantes (AKERS et al., 2013).

Em seus estágios finais, as células liberam as vesículas extracelulares apoptóticas pela membrana (ApoEVs) (SANTAVANOND et al., 2021). Os corpos apoptóticos (ApoBDs), são um subconjunto importante de ApoEVs, formados a partir de um processo conhecido pela desmontagem de células apoptóticas, o qual se caracteriza por uma série de etapas morfológicas rigorosamente reguladas. Estas incluem a formação de bolhas na membrana plasmática, protruções na membrana apoptóticas e, finalmente, a fragmentação em ApoBDs (SANTAVANOND et al., 2021).

Funções das Vesículas Extracelulares em Parasitas Unicelulares

Estudos revelaram que as EVs liberadas por parasitas desempenham um papel crucial em hospedeiros infectados. Transportam antígenos específicos como proteínas excretadas/secretadas, intimamente relacionadas a fatores de virulência como toxinas, proteases e adesinas. As EVs liberadas pelos parasitas ativam do sistema imunológico do hospedeiro, especialmente induzindo respostas pró-inflamatórias e facilitando a disseminação do parasita (SHARMA et al., 2023).

Em infecções parasitárias, há três tipos distintos de liberação de EVs: 1) vesículas extracelulares liberadas exclusivamente pelos parasitas, contendo moléculas biologicamente ativas; 2) EVs originadas das células do hospedeiro, estimuladas pelas EVs do parasita, desencadeando uma resposta específica; 3) EVs provenientes das próprias células infectadas do hospedeiro, transportando informações moleculares vitais e desempenhando um papel crucial no processo infeccioso (SHARMA et al., 2023). A descoberta de que as EVs podem mediar à comunicação intercelular, através da entrega de materiais genéticos de uma célula para outra, tem impulsionado o interesse de mais estudos das EVs para possíveis biomarcadores de doenças (MARCILLA et al., 2014).

EVs de *Toxoplasma gondii*

Para identificar e isolar as EVs liberadas por *T. gondii*, são empregados métodos específicos para análises. A microscopia eletrônica é frequentemente usada para confirmar a presença das EVs, possibilitando uma visualização detalhada de suas estruturas (SILVA et al., 2018). Outro método comum é a Análise de Rastreamento de Nanopartículas, fundamental para determinar o tamanho e a quantidade de partículas com base no movimento browniano (SILVA et al., 2018). Além disso, a qPCR é uma técnica valiosa adotada para avaliar os níveis de expressão gênica. Esses métodos combinados oferecem uma abordagem completa para investigar as EVs liberadas pelo parasita, permitindo uma compreensão mais aprofundada de seu papel biológico (SILVA et al., 2018).

Quiarim et al., (2021) observaram que taquizoítos extracelulares têm a capacidade de liberar EVs pela membrana plasmática, pelo anel apical e pelo poro posterior. A população de EVs identificada apresentava tamanhos distintos, variando de 50 a 200 nm, sugerindo a presença de exossomos e microvesículas.



Estudos revelam que as EVs de *T. gondii* podem modular a ativação da imunidade protetora, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. As EVs provenientes de cultura de células dendríticas infectadas demonstraram propriedades antigênicas e adjuvantes, podendo oferecer proteção contra *T. gondii* em modelos de camundongos (BEAUVILLAIN et al., 2007). Além disso, a imunização de camundongos AS/n e BALB/c com os exossomos de *T. gondii* aumentou significativamente o tempo de sobrevivência, estimulando resposta tanto humoral quanto celular. Isso sugere que os exossomos possam ser considerados como potenciais candidatos a vacinas ou agentes terapêuticos contra a toxoplasmose (LI et al., 2018; MAIA et al., 2021).

EVs de *Trypanosoma cruzi*

Existem diversos métodos de isolamento de EVs utilizados em diferentes modelos experimentais, porém, é preciso ter uma avaliação criteriosa dos fatores pré-analíticos, bem como uma padronização e caracterização minuciosa das EVs obtidas para assegurar sua qualidade ideal. Os métodos de isolamento mais eficazes e amplamente utilizados em pesquisas envolvendo *T. cruzi* incluem a centrifugação diferencial, o gradiente de densidade e a filtração (ROSSI; GAVINHO; RAMIREZ, 2019).

As EVs de epimastigotas de *T. cruzi* foram minuciosamente caracterizadas, revelando duas populações distintas em termos de tamanho. A análise proteômica dessas vesículas revelou a presença de proteínas relacionadas ao metabolismo, interações parasita-hospedeiro, sinalização celular, ligação de ácidos nucleicos e fatores de virulência (PARANAIBA et al., 2019).

EVs de *Leishmania spp*

As EVs desempenham um papel essencial no ciclo de infecção por *Leishmania spp*, tanto nos estágios de promastigota quanto de amastigota. Os promastigotas secretam EVs no intestino médio do flebotomíneo, que são inoculadas com os parasitas quando o inseto pica um hospedeiro (ATAYDE et al., 2015). Estudos mostraram que a co-inoculação das EVs com os parasitas facilita a infecção. Além disso, macrófagos infectados com amastigotas também produzem EVs, as quais modulam as respostas imunes no hospedeiro. Esses processos destacam a importância fundamental das EVs na dinâmica da infecção por *Leishmania* (SHARMA et al., 2023).

As EVs transportam diversos fatores de virulência, fatores de transcrição e proteínas codificadas por genes de resistência a medicamentos. Em parasitas resistentes a medicamentos, as EVs secretadas contêm regiões genômicas com genes de resistência a medicamentos (DOUANNE et al., 2020). As EVs, ainda, podem transferir esses genes para parasitas em outras áreas, aumentando sua sobrevivência. Esse processo destaca a importância vital das EVs no transporte e disseminação de resistência a medicamentos em *Leishmania* (DOUANNE et al., 2020).

Relação microRNAs, vesículas extracelulares e interação patógeno-hospedeiro

Os miRNAs são pequenas moléculas de 17 a 25 nucleotídeos, sendo classificadas como RNAs não codificantes, desempenhando um papel crucial para a manutenção do genoma e na regulação da expressão gênica no nível do RNA mensageiro (mRNA) (JORGE et al., 2021). Devido a sua grande importância como reguladores de expressão gênica, os miRNAs têm servido de grande material para a pesquisa, existe uma grande suspeita de que estejam envolvidos em grandes processos biológicos, além de serem associados a condições



fisiológicas e patológicas específicas, tornando-as grandes potenciais biomarcadores para uma variedade de doenças (JORGE et al, 2021).

A análise do perfil de expressão de miRNAs não apenas auxilia no reconhecimento e diagnóstico preciso de doenças, mas também permite o monitoramento das respostas terapêuticas e a determinação do prognóstico do paciente, esta abordagem não apenas melhora a eficácia do tratamento, mas também auxilia em tomada de decisões sobre opções terapêuticas mais adequadas para cada paciente (JORGE et al, 2021).

Os miRNAs podem ser carregados em microvesículas durante sua biogênese, e existem mecanismos específicos para a seleção de miRNAs em exossomos e microvesículas. Um desses mecanismos são pelas células doadoras, que podem ser internalizadas pelas células receptoras, levando à transferência de miRNAs (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Os miRNAs transferidos podem regular a expressão gênica nas células receptoras, direcionando mRNAs específicos e influenciando vários processos celulares, a transferência de miRNAs mediada por microvesículas pode modular processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, apoptose e respostas imunológicas (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). O empacotamento de miRNAs específicos em microvesículas é um processo regulado, e fatores celulares e ambientais podem influenciar a composição de miRNAs em microvesículas extracelulares (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018).

Em infecções parasitárias existem estudos que mostram que os parasitas regulam a expressão gênica das células do hospedeiro, podendo modificar a expressão de diferentes miRNAs nas células, seja como resposta às estratégias do parasita ou como reação aos mecanismos de defesa do hospedeiro (DEOLINDO; EVANS-OSSES; RAMIREZ, 2013). Este processo tem como objetivo, aprimorar a capacidade do parasita de infectar e se reproduzir nas células-alvo, que podem incluir as células epiteliais, hepatócitos, hemácias e, em alguns casos, células do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas. Os parasitas alcançam isso inibindo respostas imunológicas relacionadas à apoptose e à produção de citocinas, aumentando assim sua habilidade de se proliferar dentro do hospedeiro (DEOLINDO; EVANS-OSSES; RAMIREZ, 2013).

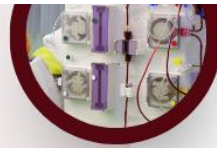
CONCLUSÕES

O estudo das EVs em parasitas unicelulares revela um mundo desconhecido e repleto de descobertas para a comunicação celular. Essas estruturas membranosas desempenham papéis cruciais na patogenicidade e sobrevivência desses organismos. Ao transportar proteínas e ácidos nucleicos, as EVs são ferramentas multifuncionais que manipulam o ambiente parasitário e a resposta imune do hospedeiro.

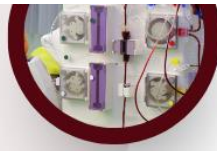
O estudo das EVs de parasitas unicelulares abre novas perspectivas para a pesquisa, proporcionando uma compreensão mais profunda da biologia parasitária e das EVs. Isso cria oportunidades para diagnósticos e terapias inovadoras.

Conclui-se que esse estudo não apenas aprofunda nossa compreensão da interação parasita-hospedeiro, mas também impulsiona avanços significativos na medicina e na saúde global.

REFERÊNCIAS



- AKERS, J. C. et al. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. **Journal of neuro-oncology**, v. 113, n. 1, p. 1–11, maio 2013.
- ATAYDE, V. D. et al. Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. **Cell Reports**, v. 13, n. 5, p. 957–967, 3 nov. 2015.
- BEAUVILLAIN, C. et al. A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. **Microbes and Infection**, Forum on cell-autonomous immunity. v. 9, n. 14, p. 1614–1622, 1 nov. 2007.
- DEOLINDO, P.; EVANS-OSES, I.; RAMIREZ, M. I. Microvesicles and exosomes as vehicles between protozoan and host cell communication. **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 1, p. 252–257, 1 fev. 2013.
- DOUANNE, N. et al. Unravelling the proteomic signature of extracellular vesicles released by drug-resistant *Leishmania infantum* parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 7, p. e0008439, 6 jul. 2020.
- DOYLE, L. M.; WANG, M. Z. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 727, 15 jul. 2019.
- GURUNG, S. et al. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. **Cell communication and signaling: CCS**, v. 19, n. 1, p. 47, 23 abr. 2021.
- JORGE, A. L. et al. MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer. **Einstein**, v. 19, p. eRB5996, [s.d.].
- KALLURI, R.; LEBLEU, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 367, n. 6478, p. eaau6977, 7 fev. 2020.
- LI, Y. et al. Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 467–477, 19 jan. 2018.
- MAIA, M. M. et al. Immunization with extracellular vesicles excreted by *Toxoplasma gondii* confers protection in murine infection, activating cellular and humoral responses. **International Journal for Parasitology**, v. 51, n. 7, p. 559–569, jun. 2021.
- MARCILLA, A. et al. Extracellular vesicles in parasitic diseases. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 3, p. 10.3402/jev.v3.25040, 22 dez. 2014.
- PARANAIBA, L. F. et al. Extracellular vesicles isolated from *Trypanosoma cruzi* affect early parasite migration in the gut of *Rhodnius prolixus* but not in *Triatoma infestans*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, p. e190217, 13 dez. 2019.
- QUIARIM, T. M. et al. Characterization of extracellular vesicles isolated from types I, II and III strains of *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 219, p. 105915, jul. 2021.
- ROSSI, I. V.; GAVINHO, B.; RAMIREZ, M. I. Isolation and Characterization of Extracellular Vesicles Derived from *Trypanosoma cruzi*. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1955, p. 89–104, 2019.
- SANTAVANOND, J. P. et al. Apoptotic Bodies: Mechanism of Formation, Isolation and Functional Relevance. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 97, p. 61–88, 2021.
- SHARMA, M. et al. Extracellular Vesicles and Their Impact on the Biology of Protozoan Parasites. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 9, p. 448, 15 set. 2023.
- SILVA, V. O. et al. Extracellular vesicles isolated from *Toxoplasma gondii* induce host immune response. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 9, p. e12571, 2018.



VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 4, p. 213–228, abr. 2018.



Capítulo 17

DOI: 10.53934/20242-17

COMPARAÇÃO DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS DE CARGA VIRAL - HIV, ANTES DURANTE E APÓS A PANDEMIA DO COVID-19.

Katley Santos do Nascimento¹; Dr. Luis Fernando de Macedo Brigido²

¹Estudante do Curso de Especialização- NDSS – IAL; E-mail: katleynascimento@hotmail.com

²Docente/pesquisador do Depto de Doenças Sanguíneas e Sexuais. – Centro de Virologia – IAL

Resumo: A pandemia de COVID-19 teve impactos nos serviços de saúde em geral, incluindo os Serviços de Atendimento Especializado (SAE), responsáveis pela coleta de sangue para realização do exame de Carga Viral do HIV-1 (CV-HIV). Este estudo teve como objetivo analisar o impacto da pandemia de COVID-19 nos exames de CV-HIV no Estado de São Paulo. Os dados de CV-HIV foram obtidos do Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (SISCEL) da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral, durante o período de janeiro de 2018 a junho de 2023. Foram selecionados dados de CV de pacientes que estavam em uso de tratamento antirretroviral e que pertenciam aos SAEs selecionados para o estudo. As comparações feitas entre os períodos pré, durante e pós a pandemia COVID-19 foram relacionadas a quantidade de entrada de exames, porcentagem de supressão viral, e variações na porcentagem da supressão viral decorrentes das trocas de equipamentos que ocorreram durante o período analisado. Na quantidade de exames encaminhados para testagem nos meses de março e maio comparado aos dois anos anteriores (2018 e 2019), observou-se uma redução de 63%, sendo observado o mesmo padrão nos meses seguintes. Os dados obtidos mostraram variações de supressão viral entre os períodos, entretanto a porcentagem da supressão aumenta de 86,11% no período pré-pandemia para 88,49% no período da pandemia. A comparação de equipamentos foi feita através de exames realizados em 2022 com um grupo de pacientes que realizou dois exames durante este ano em equipamentos cujo limite de quantificação diferiam, influenciando na categorização desses pacientes como suprimidos ou não. Com isso concluiu-se que mesmo com a interferência da pandemia nos serviços de saúde, as medidas adotadas pela Secretaria da Saúde viabilizaram a estabilidade da carga viral da população, mesmo que as consultas e exames não fossem tão regulares.

Palavras-chave: CV-HIV; COVID-19; Saúde-Pública; Epidemiologia-HIV

INTRODUÇÃO

O HIV desde seu surgimento com o despontamento de uma grande pandemia, até os dias de atuais onde milhares de pessoas vivem com o vírus, mostra-se com grande impacto epidemiológico. Os sistemas de saúde públicos tratam com grande seriedade o controle da infecção pelo HIV. (Greco, 2008) No Brasil o Sistema Único de Saúde (SUS) conta com uma abordagem ampla e completa para tratar das consequências do HIV, assim como sua prevenção. (MINISTÉRIO DA SAÚDE. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA MANEJO DA INFECÇÃO PELO HIV EM ADULTOS, 2018)



A pandemia do COVID-19 marcou o mundo e o Brasil por se tratar de um vírus com alta transmissibilidade, os sintomas da infecção como a dispneia, muitas vezes necessitavam de internação e/ou cuidados hospitalares o que rapidamente ocasionou na sobrecarga do sistema nacional de saúde. Na tentativa de controle de danos as medidas tomadas pelo governo federal em vigência foi implantação da quarentena e do distanciamento social. (AQUINO ET AL. 2020)

O monitoramento de pessoas vivendo com HIV (PVHIV) consiste no acompanhamento clínico regular e contínuo do paciente já vinculado ao Serviço de Saúde, garantindo que ele compareça às consultas, faça exames regularmente e dê seguimento ao seu tratamento. (Brasil, 2018) O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para manejo da infecção pelo HIV em Adultos orienta que a solicitação de exames de CV-HIV-1 para monitoramento laboratorial em PVHIV em seguimento clínico deve ser realizado a cada 6 meses para confirmação da continuidade da supressão viral, com exceções para realização de mais exames nos casos de início ou modificação de TARV ou confirmação de falha virológica. (Brasil, 2018).

Este é um trabalho descritivo que visa avaliar os impactos da Pandemia do COVID-19 na realização de exames de Carga Viral HIV (CV-HIV), através da comparação entre os períodos pré-pandêmico (janeiro de 2018 - 2019), pandêmico (2020 - 2021) e, pós pandêmico (2022 – junho 2023).

MATERIAL E MÉTODOS

Para análise foram selecionados resultados de carga viral e dados clínicos de pacientes acompanhados em três Serviços de Atenção Especializada (SAE), cujas amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Carga Viral do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL), no período de janeiro de 2018 a junho de 2023, foram obtidos do Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (SISCEL) do Ministério da Saúde. Dados pessoais dos pacientes não foram utilizados para garantir o anonimato.

Foram selecionados resultados de três SAEs da região metropolitana de São Paulo, com maior volume de amostras encaminhadas para testagem no IAL, representando juntos 1/3 do total de exames realizados no período analisado, essa abordagem foi adotada para manter a homogeneidade dos pacientes envolvidos nesta análise. Foi critério de inclusão na análise dados os quais o motivo de entrada declarado no laudo médico para emissão do BPA-1 como “Monitoramento de pessoas que estão em tratamento antirretroviral”. Outros motivos de entrada declarados foram critérios de exclusão da análise.

A quantificação da carga viral de HIV-1 realizada no Instituto Adolfo Lutz ao longo do período analisado foi determinada utilizando a técnica de Transcrição Reversa em Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (RT- qPCR). Considerou-se critério de supressão viral a definição do PCDT (2018), de resultados “não detectado” ou “abaixo do limite de detecção”. Contudo, é importante destacar que ocorreram mudanças nos equipamentos de RT-qPCR, utilizados ao longo do tempo, cujo as principais mudanças são os limites de quantificação e detecção, o que pode resultar em algumas variações nos resultados da análise, descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Especificações dos equipamentos utilizados na rotina durante o período de 2018 a 2023.

	Abbot Real Time HIV-1 (M2000)	Abbot Alinity m HIV-1	Roche Cobas 5800
Limite de Quantificação	40 cópias/mL	20 cópias/mL	20 cópias/mL
Limite de Detecção	25 cópias/mL	13,8 cópias/mL	13,2 cópias/mL



Período utilizado dentro do intervalo da pesquisa Janeiro/2018 – Fevereiro/2022 Março/2022 – Março/2023 Abril/2023 – Junho/2023

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A compilação dos dados foi feita utilizando o programa Microsoft Excel 2016 e, os agrupamentos para análise de carga viral, idade, gênero e quantidade de exames realizados durante o período foi realizado utilizando programa Stata 14. Para análise descritiva, foi empregado o Stata 14, enquanto a criação dos gráficos foi realizada no Microsoft Excel 2016. Valores expressos em mediana foram acrescidos de interquartil (25th-75th) e os expressos em média acrescidos de desvio padrão (DP). A Figura 1 apresenta o fluxograma deste trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionadas para avaliação 20.835 resultados laboratoriais de quantificação de Carga Viral do HIV-1 que entraram para monitoramento por estarem em uso de tratamento antirretroviral, no período de janeiro de 2018 a junho de 2023. As informações demográficas e laboratoriais dessa população estão descritas na Tabela 2 abaixo de acordo com o período observado.

Tabela 2 – Características demográficas e clínicas da população geral em TARV.

Variáveis	Total de amostras	2018-2019	2020-2021	2022 – Jun/2023
No. (%)	20835	7076	6775	6984
Sexo Feminino	6557 (31,5)	2367 (33,5)	2139 (31,6)	2051 (29,4)
Sexo Masculino	14273 (68,5)	4709 (66,6)	4636 (68,4)	4928 (70,6)
Sexo Ignorado	5 (0,02)	0	0	5 (0,07)
Idade (Mediana, IQR)	42 (32 – 52)	42 (33 – 52)	42 (32 – 52)	42 (32 – 53)
Supressão viral (%)	85,0	86,1	88,5	80,5

Fonte: Elaborado pela autora com base nos dados obtidos na plataforma SISCEL (2023)

A partir dos dados analisados, comparando os anos de 2018 e 2019 foi observado um crescimento de 18,3% na quantidade de exames de CV-HIV realizados no IAL, dados estes podem ser comparados e retificados com base nos registros obtidos no Estado de São Paulo no mesmo período que mostra uma crescente de 5,6% na quantidade de pessoas em TARV que realizam exame de CV-HIV anualmente. (DVIAHV...) Avaliando a distribuição na quantidade de exames encaminhados ao Laboratório de Carga viral do IAL no período pré-pandemia, foi observado um desvio padrão relativo (DPR) entre os meses 2018 de 13,4% e entre os meses de 2019 de 15,2%. Essa informação evidencia que, embora tenha um aumento na quantidade de exames no ano de 2019 esses exames se distribuíram mais irregularmente durante o ano. Comparando os meses com maior variação percentual entre os dois anos definidos como pré-pandêmicos destaca-se os meses de abril (32%), julho (33%) e setembro (52%), sendo essas porcentagens relativas ao aumento na entrada de exames em 2019 em relação a 2018.

No período de 2009 a 2022, o ano de 2020, marcado pela pandemia de COVID-19, é o único em que houve um declínio no número de exames de carga viral do HIV realizados anualmente no Estado de São Paulo em comparação com o ano imediatamente anterior, de acordo com os dados expressos pela plataforma de acompanhamento de indicadores clínicos. (DVIAHV...) Foi observado em diversos países impactos significativos nos serviços direcionados a cuidados de PVHIV, na África do Sul estima-se uma queda de 10% na realização de testes de CV-HIV, e no Brasil como um todo também houve uma diminuição na realização destes exames (PEOPLE..., 2020; DOMINGUEZ, 2021)



No período analisado com pandêmico (2020 e 2021) a distribuição na quantidade de exames encaminhados ao Laboratório de Carga viral do IAL mostra um DPR entre os meses de 2020 de 36,2% e entre os de 2021 de 16,9%. Isso mostra uma irregularidade muito maior na entrada de exames durante o ano de 2020 e ligeiramente maior durante o ano de 2021 quando comparadas com os anos pré-pandêmicos. Em relação a 2019 o ano de 2020 mostra uma queda de 34,8% na quantidade de exames realizados. Comparando os meses com maior variação percentual entre os dois anos definidos como pandêmicos destaca-se os meses de março (162%), abril (938%) e maio (93%), sendo estes percentuais de aumento na quantidade exames realizados no ano de 2021 em relação a 2020

Avaliando a distribuição na quantidade de exames encaminhados ao Laboratório de Carga viral do IAL no período pós-pandemia, foi observado um desvio padrão relativo (DPR) entre os meses 2022 de 12,7% e entre os meses de 2023 de 6,1%. Através dessas informações sobre a dispersão na quantidade de exames é possível ver uma aproximação dos resultados observados no período pré-pandêmicos, além de um distanciamento positivo das altas dispersões observadas no período pandêmico. Comparando os meses com maior variação percentual entre os dois anos definidos como pós-pandêmicos destaca-se os meses de janeiro (70%), abril (19%) e junho (16%), sendo essas porcentagens relativas ao aumento na entrada de exames em 2023 em relação a 2022.

De acordo com os decretos governamentais do Estado de São Paulo, considera-se pandêmico o período que compreende março de 2020 a março de 2022 entretanto a divisão em períodos foi feita de acordo com os anos mais afetados pela pandemia de COVID-19, sendo esses anos os anos de 2020 e 2021 pois durante esses anos estiveram em vigor as medidas mais restritivas de isolamento e distanciamento social, e embora a declaração do fim da pandemia tenha se dado apenas em março de 2022, no início deste ano já estavam suspensas muitas das medidas de isolamento e distanciamento já estavam em fases de flexibilização ou suspensas, retornando a normalidade a circulação de pessoas através das medidas estabelecidas pelo Plano São Paulo. (QUARENTENA [...]; SÃO PAULO, 2020a; SÃO PAULO, 2021a).

Destaca-se que durante a pandemia de COVID-19, especialmente nos meses de março a junho de 2020 e durante um intervalo similar em 2021 estiveram em vigor medidas mais restritivas e rigorosas de isolamento social. (SÃO PAULO, 2020b; SÃO PAULO, 2021b; SÃO PAULO, 2021c) Durante esses meses foram registradas altas taxas de incidência, morbidade e mortalidade relacionadas ao COVID-19, sendo em 2020 devido ao início da pandemia e em 2021 devido ao surgimento das variantes. (BARCELLOS; XAVIER, 2022).

Foi notada uma redução no número de exames realizados, principalmente durante os meses de abril e maio de 2020. Entretanto, em junho de 2020, observa-se um aumento dos números superior ao nível pré-pandêmico. Em contrapartida, no ano de 2021, não se nota uma redução significativa na quantidade de exames em comparação com os períodos antes e depois da pandemia.

Uma das questões levantadas acerca dos impactos da pandemia neste setor é a possibilidade de diminuição taxa de supressão viral da população. (90-90-90: ..., 2020) Para um serviço público de saúde o principal objetivo em relação ao HIV é o diagnóstico precoce e o tratamento, uma vez que um paciente com o tratamento adequado o paciente quase sempre terá a carga viral suprimida, e, portanto, não será transmissor do vírus. (90-90-90- ... 2017)

Para monitorar a eficácia do antirretroviral, são realizados exames para quantificação de carga viral, o recomendado é a realização desse exame a cada 6 meses. Estima-se que pacientes em TARV devem estar com a carga viral em uma das condições indetectáveis ou



residuais em um período de 6 meses após o início do tratamento. (MINISTÉRIO DA SAÚDE. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA MANEJO DA INFECÇÃO PELO HIV EM ADULTOS, 2018)

A OMS apresentou a meta 90-90-90, em 2020, com intuito de eliminar a infecção por HIV-1 até 2030. Esta meta objetiva diagnosticar 90% das pessoas potencialmente infectadas, tratar 90% das pessoas diagnosticadas e obter supressão viral em 90% das pessoas tratadas, ou seja, com CV-HIV indetectável. Uma das questões levantadas acerca dos impactos da pandemia neste setor é a possibilidade de diminuição taxa de supressão viral da população. (90-90-90: ..., 2020) Para um serviço público de saúde o principal objetivo em relação ao HIV é o diagnóstico precoce e o tratamento, uma vez que um paciente com o tratamento adequado o paciente quase sempre estará em supressão viral, e, portanto, não será transmissor do vírus. (90-90-90- ... 2017) Estima-se que pacientes em TARV devem estar com a carga viral em condições indetectáveis ou residuais em um período de 6 meses após o início do tratamento. (MINISTÉRIO DA SAÚDE. PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA MANEJO DA INFECÇÃO PELO HIV EM ADULTOS, 2018)

Em geral 85% dos dados avaliados estão dentro das condições de supressão (“não detectado” ou “abaixo do limite de quantificação” do equipamento) no período pré pandemia a supressão registrada é de 86,1%, e já no período da pandemia essa porcentagem registra um aumento para 88,5%.

Equiparando dados de 2019 e 2020 nota-se também a manutenção de altos níveis de supressão viral sendo neste estudo de 92% em 2019 e 93% em 2020. (MATSUDA et al., 2022). Dados do Estado de São Paulo e do Brasil seguem este mesmo padrão de ligeiro aumento da supressão viral ao longo dos anos de 2018 a 2021. (DVIAHV...) Isso pode ser justificado porque, apesar das medidas de restrição, de distanciamento físico e circulação das pessoas, o Estado ampliou a dispensa de medicamentos antirretrovirais de forma a não prejudicar o tratamento dos indivíduos HIV-1 soropositivos (BRASIL, Ministério da Saúde, 2020). No entanto, no período pós-pandemia, notou-se uma diminuição no número de casos de supressão viral, passando a ser de 80,5% no período entre 2022 e junho de 2023 contra 86,1% observado no período pré-pandêmico.

No período pós-pandêmico foi notada uma diminuição de resultados “não detectado” e aumento de resultados “<Lim.” uma vez que esses resultados foram obtidos através de exames realizados em equipamentos mais sensíveis cujo o limite de quantificação é de 20 cópias/mL, e no equipamento utilizado anteriormente o limite era 40 cópias/mL, fazendo com que uma parte dos pacientes que antes eram considerados “não detectado” fossem detectados pelo novo equipamento, ocasionando no fenômeno mencionado. Além disso os novos equipamentos capturam a faixa entre 20 e 39 cópias/mL que eram “perdidas” ou classificadas com “<Lim.” pelo equipamento anterior. Se em todo período pós pandêmico fosse considerada supressão viral também a faixa entre 20 e 39 cópias/mL a supressão seria de 86,9% no período pós pandêmico. Isto implica que embora exista uma redução, na porcentagem de supressão, esta redução não implica numa mudança no estado clínico da população e não é decorrente de um déficit no serviço, e sim oriunda da definição de supressão adotada pelo Ministério da Saúde.

Considerando os resultados dessa mudança de equipamento, os dados de carga viral de 584 pacientes que realizaram o exame duas vezes no ano de 2022, sendo o primeiro exame no sistema M2000 e o segundo no sistema Alinity e sendo a carga viral destes dentro da faixa de não detectados, abaixo do limite de quantificação ou quantificados entre 20 e 39 cópias/mL, estes foram analisados e comparados em níveis quantificação de carga viral, os resultados obtidos estão expostos na tabela 3.



Tabela 3 – Classificação de carga viral dos pacientes com análises realizadas em diferentes sistemas.

	M2000	Alinity
Não detectado	491 (74,9%)	353 (53,2%)
< 20 cópias/mL (Lim. Alinity)	-	202 (33,6%)
20 - 39 cópias/mL (<40 Lim. M2000)	93 (16,0%)	29 (5,0%)

Fonte: Elaborado pela Autora (2023).

Observou-se que as principais mudanças que ocorrem após a troca do M2000 para o Alinity é a redução da faixa “não detectado” e a do que era considerado “< Lim. (40 cópias)” para o M2000. Nos dados do Alinity é possível visualizar que a quantidade de amostras “não detectado” diminuiu em 28,1%, e essas amostras passam a ser classificadas como “< Lim. 20 cópias”, o mesmo ocorre com a faixa de “< Lim. (40 cópias/mL)” que também é estreitada após a troca de equipamento e essas também passam a se enquadrar na faixa de “< Lim. (20 cópias)”. Essas informações indicam que parte das amostras que possuíam uma carga viral abaixo de 20 cópias/mL o equipamento M2000 reconhecia como “Não detectado” e em equipamentos mais sensíveis como é o caso do Alinity passam a ser classificadas como “< Lim. (20 cópias/mL)” ou são quantificadas no intervalo de 20 a 39 cópias/mL.

O uso de equipamentos mais sensíveis, capazes de detectar baixas concentrações de RNA viral são melhores para o acompanhamento clínico de pessoas pois além de possibilitar a detecção precoce de infecções, tornando o início do tratamento o mais rápido possibilita também a detecção precoce de possíveis resistências ao TARV e o monitoramento preciso do tratamento e consequente melhor gestão da carga viral indetectável, que está relacionada a transmissibilidade do vírus. (FISCHER et al., 1999; SITNIK; REBELLO PINHO, 1998)

CONCLUSÕES

Diante do exposto, a presente pesquisa revela importantes insights sobre o impacto da pandemia de COVID-19 nas práticas laboratoriais relacionadas a exames, especialmente no contexto de testes para a detecção de CV-HIV. Ficou evidenciado que as medidas de contenção adotadas durante a pandemia resultaram em uma significativa redução no número de exames realizados, refletindo as restrições impostas pela situação emergencial.

No entanto, a análise longitudinal dos dados revelou uma gradual retomada nas atividades laboratoriais, conforme observado pelo aumento no número de exames realizados em 2021 em comparação com o ano anterior. Destaca-se ainda a heterogeneidade na distribuição mensal desses exames, sugerindo uma adaptação dinâmica às condições epidemiológicas e às medidas de flexibilização ao longo do tempo.

Um achado relevante desta pesquisa foi a constatação de que a pandemia não exerceu influência significativa na taxa de amostras com supressão viral. Este resultado sugere que as estratégias adotadas pelo Estado, possivelmente direcionadas à melhoria na distribuição de medicamentos, foram eficazes em manter a eficácia do tratamento, mitigando potenciais impactos negativos da pandemia nesse aspecto específico.

A introdução do equipamento Alinity, substituindo o M2000, permitiu uma estratificação mais precisa dos resultados de CV-HIV, segmentando-os em categorias de indetectáveis, <20 e 20-39. Contudo, a importância clínica e epidemiológica dessa diferenciação requer uma análise mais aprofundada, sendo um ponto que merece atenção futura.

Diante do exposto, a presente pesquisa contribui para a compreensão dos efeitos da pandemia nas práticas laboratoriais, destacando a resiliência e a capacidade de adaptação do sistema de saúde. As conclusões aqui apresentadas fornecem subsídios para aprimoramentos



na gestão de crises sanitárias, além de apontar para possíveis direcionamentos em futuras investigações relacionadas à estratificação de resultados laboratoriais em contextos epidemiológicos desafiadores.

REFERÊNCIAS

90-90-90: bom progresso, mas o mundo está longe de atingir as metas de 2020 - UNAIDS Brasil. 21 set. 2020. Disponível em: <https://unaid.org.br/2020/09/90-90-90-bom-progresso-mas-o-mundo-esta-longo-de-atingir-as-metas-de-2020/>. Acesso em: 4 nov. 2023.

90-90-90—An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic | UNAIDS. 1 jan. 2017. Disponível em: <https://www.unaids.org/en/resources/documents/2017/90-90-90/>. Acesso em: 4 nov. 2023.

AQUINO, Estela M. L. et al. Medidas de distanciamento social no controle da pandemia de COVID-19: potenciais impactos e desafios no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 25, suppl 1, p. 2423-2446, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1413-81232020256.1.10502020>. Acesso em: 19 out. 2023.

BARCELLOS, Christovam; XAVIER, Diego Ricardo. As diferentes fases, os seus impactos e os desafios da pandemia de covid-19 no Brasil. *Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde*, v. 16, n. 2, 30 jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.29397/reciis.v16i2.3349>. Acesso em: 19 out. 2023.]

BRASIL. Lei nº 10.741, de 1 de outubro de 2003. Lei nº 10.741, de 1º de Outubro de 2003. Disponível em: <https://www.lexml.gov.br/urn/urn:lex:br:federal:lei:2003-10-01;10741>. Acesso em: 31 out. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. OFÍCIO CIRCULAR nº 25000.037407/2020-75, de 17 de março de 2020. O cuidado das Pessoas Vivendo com HIV/AIDS (PVHIV) no contexto da pandemia do COVID-19. Disponível em: http://azt.aids.gov.br/documentos/Informe%20nº%2007_20%20-%20Anexo_Of.Circ.%2008_20-%20Cuidados%20PVHIV%20no%20contexto%20COVID-19.pdf. Acesso em: 30 out. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 454, de 20 de março de 2020. Declara, em todo o território nacional, o estado de transmissão comunitária do coronavírus (covid-19).

Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos | Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. 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>.

DOMINGUEZ, Bruno. Como a Covid-19 impacta a atenção às pessoas vivendo com HIV/Aids no Brasil. 5 abr. 2021. Disponível em:



<https://informe.ensp.fiocruz.br/noticias/51147>. Acesso em: 20 nov. 2023.

DVIAHV | Indicadores Clínicos. Disponível em: <http://indicadoresclinicos.aids.gov.br>. Acesso em: 20 nov. 2023.

FISCHER, Marek et al. Highly Sensitive Methods for Quantitation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA from Plasma, Cells, and Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 5, p. 1260-1264, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.37.5.1260-1264.1999>. Acesso em: 20 nov. 2023.

GRECO, Dirceu B. A epidemia da Aids: impacto social, científico, econômico e perspectivas. *Estudos Avançados*, v. 22, n. 64, p. 73-94, dez. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0103-40142008000300006>. Acesso em: 19 out. 2023.

MATSUDA, Elaine Monteiro et al. Impact of covid-19 on people living with HIV-1: care and prevention indicators at a local and nationwide level, Santo André, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 56, p. 37, 18 maio 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2022056004314>. Acesso em: 20 nov. 2023.

PEOPLE with HIV at greater risk of COVID-19 death in South African study. 10 jun. 2020. Disponível em: <https://www.aidsmap.com/news/jun-2020/people-hiv-greater-risk-covid-19-death-south-african-study>. Acesso em: 20 nov. 2023.

QUARENTENA | Governo do Estado de São Paulo. Disponível em: <https://www.saopaulo.sp.gov.br/coronavirus/quarentena/>. Acesso em: 19 out. 2023.

SÃO PAULO. Decreto nº 64.881, de 22 de março de 2020a. Decreto nº 64.881, de 22/03/2020. Disponível em: <https://www.lexml.gov.br/urn/urn:lex:br;sao.paulo:estadual:decreto:2020-03-22;64881>. Acesso em: 19 nov. 2023.

SÃO PAULO. Decreto nº 64.946, de 17 de abril de 2020b. Decreto nº 64.946, de 17/04/2020. Disponível em: <https://www.lexml.gov.br/urn/urn:lex:br;sao.paulo:estadual:decreto:2020-04-17;64946>. Acesso em: 19 nov. 2023.

SÃO PAULO. Decreto nº 65.460, de 8 de janeiro de 2021a. Decreto nº 65.460, de 08/01/2021. Disponível em: <https://www.lexml.gov.br/urn/urn:lex:br;sao.paulo:estadual:decreto:2021-01-08;65460>. Acesso em: 19 nov. 2023.

SÃO PAULO. Decreto nº 65.563, de 11 de março de 2021b. Decreto nº 65.563, de 11/03/2021. Disponível em: <https://www.lexml.gov.br/urn/urn:lex:br;sao.paulo:estadual:decreto:2021-03-11;65563>. Acesso em: 19 nov. 2023.

SÃO PAULO. Decreto nº 65.663, de 30 de abril de 2021c. Decreto nº 65.663, de 30/04/2021. Disponível em: <https://www.lexml.gov.br/urn/urn:lex:br;sao.paulo:estadual:decreto:2021-04-30;65663>. Acesso em: 19 nov. 2023.



SITNIK, Roberta; REBELLO PINHO, João Renato. Quantitation of HIV-1 RNA Viral Load Using NASBA Methodology and Comparison with other Surrogate Markers for Disease Progression. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, n. 3, p. 411-416, maio 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0074-02761998000300027>. Acesso em: 20 nov. 2023.



Capítulo 18

DOI: 10.53934/20242-18

USO DA METODOLOGIA RT-qPCR SYBR *GREEN* PARA DETECÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS

Beatriz Ferreira Garcia¹; Daniela Rodrigues Colpas²; Andréia Moreira dos Santos Carmo²; Ivana Barros de Campos^{2*}

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - Centro de Laboratório Regional Santo André, Instituto Adolfo Luz; E-mail: beatrizferreira139@gmail.com

²Pesquisador do Núcleo de Ciências Biomédicas – Centro de Laboratório Regional Santo André, Instituto Adolfo Luz; E-mail: * ivanacamp@gmail.com

Resumo: A metodologia padrão-ouro para detecção de vírus respiratórios é a PCR em tempo real com transcrição reversa. Possui alta sensibilidade e especificidade, mas é considerada de alto custo, devido aos equipamentos e insumos que inclui sonda composta por uma sequência genética específica ao alvo ligada a um fluoróforo. Durante a pandemia de COVID-19, observamos a falta de insumos para atendimento da demanda mundial, por isso, o estudo de protocolos alternativos e de menor custo é necessário para eventos como este. Além disso, visto os sintomas similares às outras infecções respiratórias graves, existiu grande necessidade de diferenciação entre os vírus, e por isso, a importância no uso de protocolos *multiplex*, que possam diferenciar o agente causador ou detectar a presença de coinfeções. Portanto, nesse estudo adotou-se o sistema de enzima polimerase com corante inespecífico (SYBR *green*), na ausência de sondas com fluoróforos, para detecção dos alvos amplificados, e sua diferenciação foi realizada através da curva de dissociação destes genes. Foram testadas 123 amostras quanto à presença dos vírus SARS-CoV-2, Influenza A e B, além do gene humano RP, em duas reações *multiplex*. A técnica apresentou alta especificidade ($\cong 99\%$), além de boa correlação com a metodologia padrão-ouro (Pearson $p < 0,0001$). Porém, a metodologia apresentou ótima sensibilidade ($\cong 94\%$) apenas para a detecção de SARS-CoV-2. Medidas de acurácia de diagnóstico foram geradas para cada gene e houve boa concordância (91-98%). Em comparação com a metodologia padrão-ouro, foi possível desenvolver um protocolo com custo inferior e com bom padrão de diagnóstico.

Palavras-chave: DIAGNÓSTICO MOLECULAR; INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS; RT-qPCR; SYBR *GREEN*

INTRODUÇÃO

Os vírus respiratórios são um grupo de agentes infecciosos que podem causar infecções no trato respiratório superior e inferior (ZHU *et al.*, 2020). Abrange uma grande variedade de vírus, entre eles estão os vírus da gripe e o coronavírus. São vírus de importância para saúde pública devido sua facilidade de propagação e potencial de causar pandemias (RAVI *et al.*, 2022).

A COVID-19 é uma doença causada pelo vírus SARS-CoV-2, um betacoronavírus pertencente ao subgênero Sarbecovírus (RAVI *et al.*, 2022). Essa linhagem de coronavírus foi encontrada pela primeira vez em humanos em dezembro de 2019 na província de Wuhan na China, e devido suas características de alta transmissibilidade se espalhou pelo mundo causando a pandemia de COVID-19 (DORLASS *et al.*, 2020). Outros vírus respiratórios



também são responsáveis por causar epidemias sazonais, como a Influenza A e B, e até mesmo pandemias, como a pandemia de H1N1 de 2009, causada pelo vírus Influenza A (LANA *et al.*, 2020).

Existem diferentes maneiras de diagnosticar as infecções por vírus respiratórios, entre eles estão os testes para identificar antígenos ou anticorpos e os testes de amplificação do ácido nucléico, que é tido como padrão-ouro (BOCCARDO, 2020). O teste consiste em detectar o material genético do vírus a partir do material biológico dos pacientes por meio da metodologia de *Polymerase Chain Reaction* em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR).

A vantagem de se realizar a RT-qPCR é atribuída a alta sensibilidade capaz de detectar a infecção logo no início dos sintomas. Porém, o uso dos reagentes e sondas específicos podem deixar a metodologia com um custo elevado, tornando-a menos acessível (RAHMASARI *et al.*, 2022). Além disso, durante a pandemia de COVID-19 foi observada a escassez de insumos para atendimento da demanda mundial. Por isso, o estudo de protocolos alternativos é necessário para eventos como este.

Uma maneira de baratear a técnica é substituir a sonda por um corante inespecífico intercalador de DNA, como o SYBR *green*, que na presença do gene amplificado utilizando *primers* específicos é capaz de produzir fluorescência. Através da análise da curva de dissociação, reação que ocorre após a qPCR, é gerada a temperatura de *melting* (T_m) do gene alvo, sendo assim possível diferenciar o gene amplificado. (RAHMASARI *et al.*, 2022).

Com base na análise da T_m , é possível desenvolver protocolos *multiplex*, permitindo detectar a presença de um ou mais vírus, indicando coinfeção. Isso é benéfico tendo em vista que as pessoas infectadas com SARS-CoV-2 apresentam sintomas inespecíficos, condizentes com Síndrome Gripal ou Síndrome Respiratória Aguda Grave (BAGGIO *et al.*, 2021). Então, com um ensaio *multiplex* pode-se diferenciar o agente causador, ou detectar a coinfeção.

A característica de ligação inespecífica de SYBR *green* possibilita que a mesma técnica seja utilizada para detecção de diferentes alvos, sendo necessário padronizar os *primers* e suas concentrações. Como qualquer outra metodologia, todas as modificações devem ser submetidas a um processo de validação do teste. Este procedimento é essencial para garantir a confiabilidade dos resultados, assegurando que as mudanças realizadas não comprometam a eficácia do protocolo.

Portanto, este trabalho teve o objetivo de padronizar uma metodologia *multiplex* para detecção de SARS-CoV-2, Influenza A (InfA), Influenza B (InfB) e RNaseP humano (RP), a partir da RT-qPCR SYBR *green* e comparar os resultados com a metodologia “padrão-ouro”, um *kit* comercial de RT-qPCR, para validar os resultados.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Para esse estudo foram selecionadas 123 amostras de secreção de nasofaringe que foram coletadas entre abril de 2022 a julho de 2023, com resultados previamente conhecidos a partir de ensaios realizados na rotina laboratorial do Centro de Laboratório Regional Santo André do Instituto Adolfo Lutz (IAL). Dividiram-se em 31 amostras positivas para SARS-CoV-2, 32 de Influenza A, 30 de Influenza B e 30 negativas. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (CAAE: 45285921.7.0000.0059) e dispensou o consentimento informado dos pacientes, uma vez que as amostras clínicas aqui relatadas foram coletadas para fins diagnósticos e os dados foram analisados anonimamente.



Extração do RNA

O material genético das amostras biológicas foi extraído utilizando o kit Bio Gene (Bioclin) pela metodologia de coluna de sílica, seguindo as orientações do fabricante. O material obtido foi armazenado em freezer a -80°C até o momento de uso.

Padronização do ensaio

Os *primers* utilizados foram sintetizados para os genes E, N e RdRP (CoV-E, Nch, CoV-RdRP, respectivamente) de Sarbecovirus e SARS-CoV-2, de acordo com CORMAN *et al.*, (2020); gene InfA de acordo com KAPLAN *et al.*, (2015); gene N de SARS-CoV-2 (N1) de acordo com PETRILLO *et al.*, (2020); gene InfB e RP de acordo com WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, 2021); todas com modificações nas concentrações.

Para determinar a concentração de cada *primer* que seria utilizada, foram realizados testes *single* de RT-qPCR SYBR *green* contendo amostra extraída positiva ou água ultrapura, como controle negativo, e reduções das concentrações a partir do protocolo original. Assim, além de definir a concentração que seria utilizada no *multiplex*, também se obteve o valor de T_m verdadeiro.

RT-qPCR padrão-ouro

Para uniformizar os resultados da metodologia padrão-ouro, utilizando o mesmo kit e mesma alíquota de extração, primeiramente realizamos a RT-qPCR de todas as amostras com o Kit Molecular INFA/INFB/SC2 Bio-Manguinhos. Como a quantidade total de amostras ultrapassava o limite de poços da placa de PCR, foram necessárias duas ciclagens de 60 amostras cada. A *master mix* foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante, adicionando $3,75\ \mu\text{L}$ da mistura de PCR e $1,25\ \mu\text{L}$ do *mix* INFA/INFB/SC2/RP para cada reação individual. Foram aplicados $5\ \mu\text{L}$ de *master mix* na placa de 96 poços e posteriormente $10\ \mu\text{L}$ de amostra em cada poço ou $10\ \mu\text{L}$ de controle negativo ou do controle positivo. O equipamento utilizado para a reação foi o QuantStudio5 da Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific), com as seguintes configurações: 50°C por 15 minutos para a transcrição reversa, 95°C por 2 minutos para desnaturação inicial e 40 ciclos de 95°C por 20 segundos e 58°C por 30 segundos. Resultados com *Cycle threshold* (C_t) ≤ 40 foram considerados detectados.

RT-qPCR SYBR *green multiplex*

A RT-qPCR SYBR *green multiplex* foi realizada com duas reações de diferentes combinações para todas as amostras. A primeira reação foi composta de *primers* para os genes CoV-RdRP, InfB e RP e a segunda reação foi realizada com *primers* para os genes InfA e CoV-E. A *master mix* foi preparada adicionando $0,4\ \mu\text{L}$ da enzima GoScript™ *Reverse Transcriptase* (Promega), $10\ \mu\text{L}$ da enzima PowerUp™ SYBR™ *green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), o volume necessário de *primers* de acordo com a concentração final e água ultrapura para completar o volume final de $15\ \mu\text{L}$ de *master mix* por reação. Esse volume foi aplicado na placa de PCR de 96 poços e adicionado $5\ \mu\text{L}$ de amostra em cada poço ou $5\ \mu\text{L}$ de controle negativo (água ultrapura) ou controle positivo (*kits* comerciais). O mesmo equipamento foi utilizado para essa metodologia, e com ciclagem de acordo com o fabricante das duas enzimas utilizadas, transcriptase reversa e DNA polimerase: 37°C por 15 minutos, 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 1 minuto. Ao final do ciclo de qPCR foi realizada a curva de dissociação, que permite distinguir o gene detectado, para isso, adicionou-se ao final dos 40 ciclos a seguinte configuração: 95°C por 15 segundos,



60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos. Os testes realizados com as outras enzimas seguiram o protocolo dos respectivos fabricantes.

Análise estatística

A avaliação do teste de diagnóstico foi realizada por meio do cálculo de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), acurácia conforme EUSEBI (2013). Coeficiente de correlação kappa (k) foi calculado em <https://idostatistics.com/cohen-kappa-free-calculator/#risultati>. Valores entre 0,81 a 1,00 são interpretados como concordância quase perfeita, 0,61 a 0,80 como concordância boa, 0,41 a 0,60 como concordância moderada, 0,21 a 0,40 como concordância justa, 0,01 a 0,20 como concordância mínima, e 0,00 como concordância ruim entre os testes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao realizar as reações *single* de RT-qPCR SYBR *green* se observou variação da T_m dos genes de acordo com a concentração de *primer* utilizada (dados não mostrados), o que dificultou a formação de condições *multiplex*. Também foi observado que a concentração de *primers* no *multiplex* precisava ser maior do que havia sido padronizado no *single*, o que ocasionou picos inespecíficos e algumas opções de *multiplex* foram sendo descartadas. Esses resultados não foram observados na literatura. A melhor opção de *multiplex* que prosseguiu a padronização e validação do método foi CoV-RdRP + InfB + RP e CoV-E + InfA. A concentração final dos *primers* sofreram reduções de 1,3X a 8X de acordo com o protocolo original.

As 123 amostras analisadas em ambas as metodologias foram categorizadas como 'positivo' quando o $C_t \leq 40$ e como 'negativo' na ausência de amplificação. Na RT-qPCR com SYBR *green multiplex*, além do valor de C_t , para uma amostra ser considerada positiva deve também apresentar a T_m específica para um ou mais genes do *multiplex*. Então, os produtos das reações foram submetidos à análise da T_m dos genes amplificados e seguindo os valores de referência obtidos nas reações *single*, foi possível distinguir qual gene havia sido amplificado.

Das 32 amostras positivas para Influenza A, a RT-qPCR SYBR *green multiplex* detectou 24; de 30 positivas para Influenza B, 20 foram detectadas; de 33 amostras positivas para SARS-CoV-2, 31 foram detectadas; todas as amostras foram positivas para o gene RP. Dentre esses resultados, estão duas amostras de coinfeção com o vírus de Influenza B e SARS-CoV-2.

Considerando os dados fornecidos pelo fabricante, a sensibilidade e especificidade da metodologia padrão-ouro são indicadas como 99,9% e 100%, respectivamente. Os dados de medidas de acurácia de diagnóstico para cada vírus pela técnica RT-qPCR SYBR *green multiplex* foram calculados e estão documentados na tabela 1.

Tabela 1: Medidas de acurácia de diagnóstico da RT-qPCR SYBR *green multiplex*

Vírus	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	FP	FN	VPP (%)	VPN (%)	Acurácia (%)	k
Influenza A	75,0	100,0	0	8	100	91,9	93,5	0,791
Influenza B	66,7	98,92	1	10	95,2	90,2	91,1	0,730
SARS-CoV-2	93,9	98,89	1	2	96,9	97,8	97,6	0,937

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Legenda: Falso positivo (FP), Falso negativo (FN); Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN); coeficiente de correlação kappa (k). VPP e VPN foram calculados com as seguintes fórmulas: $VPP = \frac{TP}{TP + FP}$; $VPN = \frac{TN}{TN + FN}$; $k = \frac{TP + TN}{TP + FP + FN + TN}$



$VP/(VP + FP)$ e $VPN=VN/(VN + FN)$, sendo VP verdadeiro positivo e VN verdadeiro negativo (EUSEBI, 2013)

Os resultados apontam que para a detecção dos três vírus, a metodologia RT-qPCR SYBR *green multiplex* apresentou alta especificidade, similar à metodologia padrão-ouro. Porém, a metodologia apresentou ótima sensibilidade apenas para a detecção de SARS-CoV-2. Resultados que se assemelham ao encontrado na literatura, em que os valores de especificidade ficaram próximos de 100%, como apresentado por RAHMASARI *et al.* (2020) e DORLASS *et al.* (2020) e a sensibilidade para detecção de SARS-CoV-2, similar à que foi apresentado por ALHAMLAN *et al.*, (2021). Os resultados para os vírus da Influenza A e B apresentaram relativamente grande número de FN, comprometendo seus resultados de sensibilidade, que apresentaram uma redução de 24% e 33,2%, respectivamente. Os valores de sensibilidade indicam a capacidade do teste de identificar com precisão os verdadeiros positivos e a especificidade a capacidade em identificar com precisão os verdadeiros negativos. Essa redução na sensibilidade não afetou os valores de VPP e VPN, que apresentaram bons resultados (acima de 80), ou seja, boa probabilidade de detectar os verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. Esses valores foram calculados de acordo com a fórmula apresentada por EUSEBI (2013). O alto número de FN pode ser explicado pela redução na concentração de *primers* quando comparada com as metodologias de referência, o que pode diminuir a sensibilidade para detectar amostras com concentrações virais mais baixas. Além disso, enquanto a metodologia padrão-ouro emprega 10 μ L de amostra, o protocolo desse estudo utiliza 5 μ L. Talvez, se a técnica RT-qPCR SYBR *green multiplex* utilizasse a mesma quantidade de amostra, a sensibilidade do teste poderia ser aprimorada. Quanto aos FP, apenas 2 amostras tiveram esse resultado, e poderiam ter esse resultado desconsiderado com base nos valores de T_m . As amostras FP para InfB e para CoV-E apresentaram $T_m=81,33$ e $T_m=78,09$, respectivamente, e foram discretamente diferentes das amostras verdadeiras positivas. Quanto a concordância entre as metodologias (acurácia), obtivemos boa porcentagem para os três vírus. Quanto ao coeficiente de correlação k , para detecção de SARS-CoV-2, ambas metodologias apresentaram concordância quase perfeita, e para detecção de Influenza A e B, apresentaram boa concordância.

Além disso, observou-se experimentalmente que quando o C_t da metodologia padrão-ouro foi superior a 30, a técnica com SYBR *green* teve menor detecção, o que resultou em queda da sensibilidade. A partir desse C_t , a eficiência da metodologia desse estudo caiu, sendo que com C_t da metodologia padrão-ouro entre 33-34, os resultados são negativos para RT-qPCR SYBR *green multiplex*, salvo exceções. Provavelmente, as amostras não detectadas pela técnica em estudo se devem a concentrações virais mais baixas presentes nas amostras, já que apresentaram valores mais altos de C_t .

A escolha pela metodologia RT-qPCR com SYBR *green* revelou-se uma boa opção para detecção dos vírus respiratórios, destacando-se por seu custo mais acessível, com um valor estimado na faixa de R\$74,00 a R\$104,00 como foi descrito por ALHAMLAN, *et al.* (2021) e METAWLLY *et al.* (2018). Enquanto que técnicas de PCR que utilizam sondas podem custar de R\$125,00 a R\$200,00 (METAWLLY *et al.*, 2018). Considerando o valor médio para as metodologias, R\$89,00 e R\$162,50, respectivamente, a técnica SYBR *green*, representa uma redução em torno de 45%.

CONCLUSÃO



O protocolo desse estudo, RT-qPCR SYBR *green multiplex*, pode ser empregado como uma alternativa para o diagnóstico de vírus respiratórios, visto seu bom desempenho em relação ao padrão-ouro. Proporcionando uma metodologia viável que não apenas mantém um alto padrão de detecção, mas também oferece a perspectiva de redução dos custos associados a um PCR em tempo real. Apesar dos resultados significativos obtidos nesse trabalho, estudos futuros são necessários com a padronização de Limite Mínimo de Detecção (LMD) e análises com mesmo volume de amostras entre as metodologias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Ivana por sua orientação, dedicação e apoio durante todas as etapas de elaboração deste trabalho. Em todo esse processo as suas orientações e sugestões enriqueceram não apenas o conteúdo, mas também a minha formação acadêmica. Agradeço também pela disponibilidade e pelo tempo dedicado para esclarecer dúvidas e compartilhar seu conhecimento. Agradeço também a Andréia por compartilhar material que contribuiu para elaboração do projeto e também a Daniela, Ana Luiza e a Delma pela colaboração durante o desenvolvimento de toda a parte prática.

REFERÊNCIAS

ALHAMLAN, F.S. et al. Development and validation of an in-house, low-cost SARS-CoV-2 detection assay. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 9, p. 1139-1143, jul., 2021. < doi.org/10.1016/j.jiph.2021.07.009>.

BOCCARDO, E. Vírus Respiratórios. 2020. Apresentação do PowerPoint. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/6713771/mod_resource/content/1/V%C3%ADrus%20respiratorios%20slides%20Virologia.pdf>.

BAGGIO, J.A.O. et al. Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) Causada por COVID-19: Um Fator Regional. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 117, n. 5, p. 976-977, 2021. < <https://doi.org/10.36660/abc.20210803>>.

CORMAN, V.M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease Bulletin**, n. 25, v. 3, jan., 2020. < <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>>.

DORLASS, E.G. et al. Lower cost alternatives for molecular diagnosis of COVID-19: conventional RT-PCR and SYBR Green-based RT-qPCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 51, v. 3, p. 1117-1123, ago. 2020. < <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00347-5>>.

EUSEBI, P. Diagnostic Accuracy Measures. **Cerebrovascular Diseases**, n. 36, v. 4, p. 267-272, 2013. < <https://doi.org/10.1159/000353863>>.

KAPLAN, B. et al. Influenza Virus Surveillance in Coordinated Swine Production Systems, United States. **Emerging Infectious Diseases**, n. 21, v. 10, p. 1834-1836, out., 2015. < <https://doi.org/10.3201/eid2110.140633>>.

LANA, R.M. et al. Emergência do novo coronavírus (SARS-CoV-2) e o papel de uma vigilância nacional em saúde oportuna e efetiva. **Cadernos de Saúde Pública**, n. 36, v. 3, 2020. < <https://doi.org/10.1590/0102-311X00019620>>.



METAWLLY, D.A. et al. Low cost detection of hepatitis C virus RNA in HCV infected patients by SYBR Green I real-time PCR. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 481-485, 2018. < doi.org/10.1016/j.ajme.2017.11.004>.

PETRILLO, S. et al. A Novel Multiplex qRT-PCR Assay to Detect SARS-CoV-2 Infection: High Sensitivity and Increased Testing Capacity. **Microorganisms**, n. 8, v. 7, jul., 2020. < <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071064>>.

RAHMASARI, R. et al. Low-cost SYBR Green-based RT-qPCR assay for detecting SARS-CoV-2 in an Indonesian setting using WHO-recommended primers. **Heliyon**, n. 8, v. 11, out., 2022. < <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11130>>.

RAVI, V.; SAXENA, S.; PANDA, P.S. Basic virology of SARS-CoV 2. **Indian Journal of Medical Microbiology**, n. 20, v. 2, p. 182-186, mar., 2022. < <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2022.02.005>>.

SOUZA, M.B. et al. Multiplex real-time PCR using SYBR Green: Unspecific intercalating dye to detect antimicrobial resistance genes of *Streptococcus pneumoniae* in cerebrospinal fluid. **PLoS ONE**, n. 17, v. 6, jun., 2022. < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269895>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO information for the molecular detection of influenza viruses**. 2021. Disponível em: < <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/laboratory-network/quality-assurance/eqa-project/information-for-molecular-diagnosis-of-influenza-virus>>.

ZHU, N. et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727-733, jan., 2020. <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>>.



Capítulo 19

DOI: 10.53934/20242-19

PADRÕES HISTOLÓGICOS DE FRUTAS TÍPICAS BRASILEIRAS

Beatriz Fernandes Lopes¹; Elaine Cristina de Mattos²; Flávia de Carvalho³

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - NCQB – IAL CLR VIII SA; E-mail: vet.beatrizlopes@gmail.com

²Pesquisadora Científica do Lab. de Microscopia – NCQB – IAL CLR VIII SA.

³Técnica de Laboratório – NCQB – IAL CLR VIII SA.

Resumo: A Microscopia Alimentar abrange a pesquisa e identificação de elementos histológicos, com a finalidade de verificar a identidade dos produtos alimentícios. O analista em microscopia de alimentos deve ser capaz de diferenciar os elementos histológicos de cada tipo de produto, revelando os ingredientes que fazem parte de sua formulação. Considerando a escassez de material de referência atualizado, moderno e com produtos nacionais, o objetivo deste trabalho foi confeccionar, a partir de fotografias, padrões histológicos que possam ser utilizados como referência nas análises laboratoriais da área de Microscopia Alimentar para confirmação dos ingredientes dos produtos alimentícios e detecção de fraudes. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratório Regional de Santo André, no período de julho a novembro de 2023. Os padrões histológicos foram confeccionados com fotos de lâminas montadas a partir de oito frutas tipicamente brasileiras, adquiridas em feiras e mercados da região do grande ABC. A identificação e descrição dos elementos histológicos foram feitas com base na literatura existente. As amostras tiveram suas lâminas preparadas após tratamento aplicado ao material, de acordo com o tipo de produto, utilizando processos físicos, químicos e tratamento complementar. A partir do desenvolvimento deste projeto, acredita-se que o material produzido possa ser utilizado como referência para os laboratórios que realizam análise histológica de produtos alimentícios, contribuindo para a elucidação de casos de fraudes e, ainda, para a confirmação dos ingredientes declarados em rótulo.

Palavras-chave: análise de alimentos; composição de alimentos; fraude; histologia; rotulagem de alimentos

INTRODUÇÃO

A Microscopia Alimentar abrange a pesquisa e identificação de elementos histológicos, com a finalidade de verificar a autenticidade e qualidade dos produtos alimentícios. Além de ser uma ferramenta para identificação dos ingredientes que fazem parte de um produto, a análise histológica também verifica a fraude, intencional ou não, que é a substituição total ou parcial de um componente por outro de menor valor (Rodrigues; Nogueira, 2007).

Na análise de elementos histológicos para identificar os ingredientes de um produto, o analista deve estar familiarizado com os princípios morfológicos e histológicos de vegetais e animais, uma vez que as matérias-primas vegetais presentes nos alimentos podem ser detectadas pela identificação de seus elementos histológicos e/ou amidos característicos



(Menezes Junior, 1949, 1958; Winton; Winton, 1932) e produtos cárneos são identificados por suas fibras musculares, feixes nervosos e vasos sanguíneos (Dias, 2020).

Grande parte dos vegetais tem elementos histológicos que os diferenciam e caracterizam, podendo ser tricomas, paredes celulares, células pétreas, amidos, células de uma área do fruto (epicarpo, mesocarpo ou endocarpo), detalhes como vasos condutores de seiva e sua posição entre as células podem colaborar na identificação de um vegetal (Mattos *et al.*, 2016).

MATERIAL E MÉTODOS

O atlas foi confeccionado com fotos de lâminas montadas a partir de padrões de frutas tipicamente brasileiras (açai, cacau, cambuci, cupuaçu, goiaba, jaboticaba, jatobá e pitanga). As fotos foram feitas utilizando máquina fotográfica (Canon, modelo EOS Rebel T100®) acoplada na lente ocular do microscópio óptico (Olympus, modelo CBA®) e microscópio petrográfico (Carl Zeiss, modelo JENAMED).

A identificação e descrição dos elementos histológicos foram feitas com base nos trabalhos de Menezes Junior (1949 e 1958), Winton e Winton (1932) e Gassner e Bothe (1989).

As amostras tiveram suas lâminas preparadas a partir das estruturas que compõem as frutas, tais como semente (endocarpo), polpa (mesocarpo), casca (epicarpo) e, quando necessário foi realizado clareamento, utilizando-se o hipoclorito de sódio a 2%. Com uma espátula, foram retiradas porções das diferentes partes das frutas e preparadas lâminas com água filtrada ou glicerizada a 2% e cobertas com lamínulas (Rodrigues; Nogueira, 2007). A solução de lugol como meio de montagem foi utilizada para corar amidos.

A lâmina foi observada inicialmente na objetiva de 10x para a obtenção da vista geral e em objetiva de 40x para identificação de cada elemento histológico (Barbieri *et al.*, 2001). A luz polarizada foi utilizada para melhor visualização das estruturas quando necessária. É importante ressaltar que não foram feitos cortes histológicos e as todas as imagens foram ampliadas digitalmente para melhor visualização dos elementos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Baseada em estudos sobre a morfologia dos tecidos vegetais característicos dos alimentos (Menezes Junior, 1949, 1958; Winton; Winton, 1932) e por comparação com padrões, a identificação microscópica dos elementos histológicos vegetais é uma atividade que exige um longo período de treinamento e experiência do analista (Pauli-Yamada *et al.*, 2021).

Com a globalização, novos produtos surgem a cada dia, advindos das diversas regiões do mundo, tornando o processo de identificação de elementos histológicos vegetais um tanto desafiador, tendo em vista a escassez de estudos atuais sobre a identidade vegetal de diversos alimentos e a dificuldade na aquisição de padrões para comparação (Pauli-Yamada *et al.*, 2021). Na rotina de análise histológica de alimentos é fundamental ter referências seguras e confiáveis para elucidação de casos de fraudes e confirmação dos ingredientes declarados em rótulo. O desenvolvimento deste projeto vem da necessidade de literatura atualizada e que inclua produtos nacionais, já que tem se aumentado, a procura, compra e a venda de produtos industrializados que utilizem de ingredientes de origem brasileira.



O presente estudo demonstrou os principais elementos histológicos de algumas frutas tipicamente brasileiras, de forma moderna e didática, possibilitando aos analistas de alimentos a consulta ao material produzido em suas análises de rotina.

As Figuras 1 a 9 mostram os elementos histológicos encontrados nas frutas brasileiras contempladas nesse estudo.

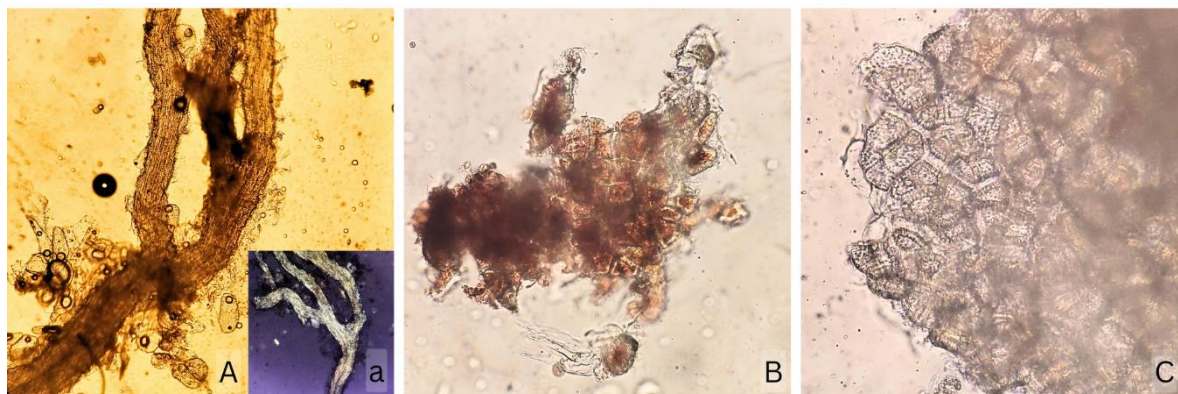


Figura 1 – Elementos histológicos do açai (*Euterpe oleracea* Mart.)

Legenda: A) Fibras do endocarpo (aumento de 100x). a) Fibras do endocarpo sob luz polarizada (aumento de 100x). B) Células pétreas do mesocarpo (aumento de 400x). C) Células pétreas de epicarpo (casca) após tratamento em hipoclorito 2% (aumento de 400x).

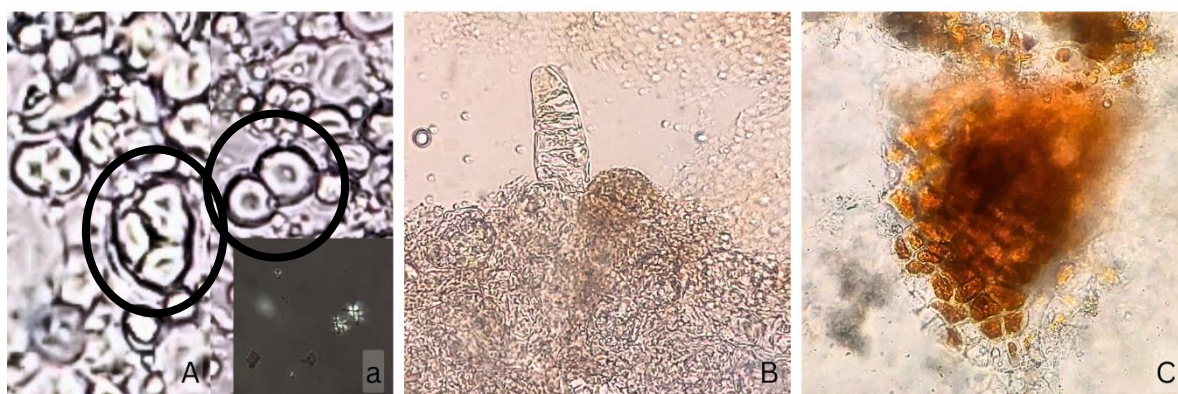


Figura 2 – Elementos histológicos do cacau (*Theobroma cacao* L.)

Legenda: A) Grãos de amidos pequenos arredondados agrupados de dois a quatro grãos (círculos), hilo forma uma cavidade no centro do grão (aumento de 400x). a) Grãos de amido sob polarização formando uma “cruz de malta” (aumento de 400x). B) Pelo multicelular da radícula do endocarpo (semente) (aumento de 400x). C) Envoltório do endocarpo (testa) (aumento de 400x).

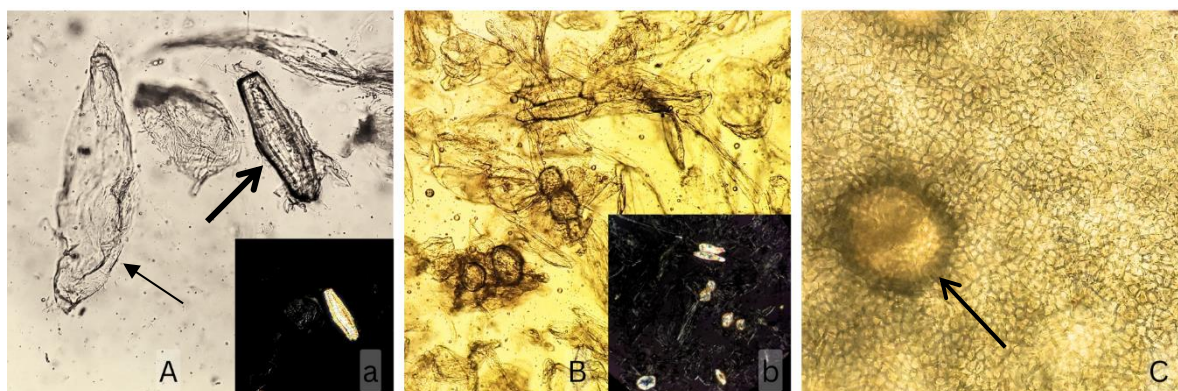


Figura 3 – Elementos histológicos do Cambuci (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum)

Legenda: A) Célula pétreia (seta grossa) e células do mesocarpo (seta fina) (aumento de 400x) a) Células pétreas do mesocarpo sob luz polarizada (aumento de 400x). B) Células pétreas com células de mesocarpo ligadas em



seu entorno (aumento de 100x). b) Células pétreas com células de mesocarpo ligadas em seu entorno sob luz polarizada (aumento de 100x). C) Epicarpo (casca) de células poligonais com espaço intercelular e cavidade secretora de óleo (seta) (aumento de 400x)

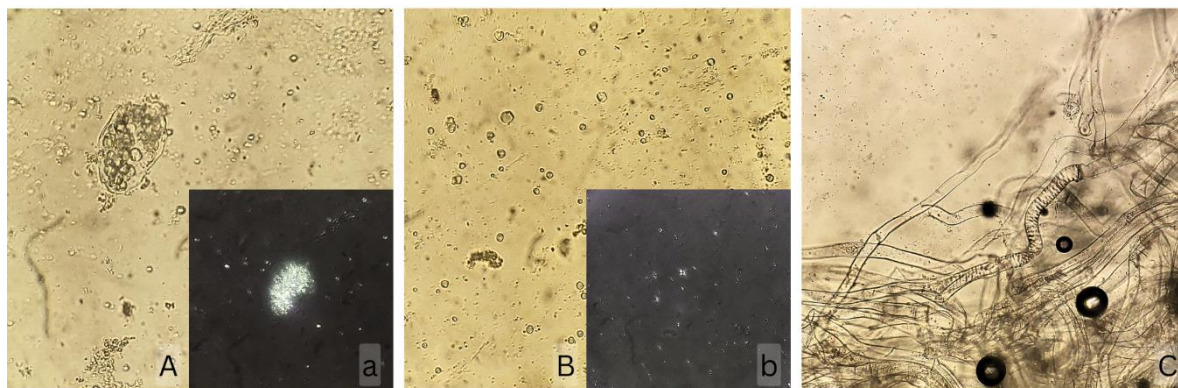


Figura 4 – Elementos histológicos do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum.)
Legenda: A) Célula de mesocarpo com grãos de amido em seu interior. a) Célula de mesocarpo com amidos em seu interior sob luz polarizada (aumento de 400x). B) Grãos de amido arredondados de tamanho variados soltos pelo campo de forma individual, em duplas ou trios, hilo côncavo sutil (aumento de 400x). b) Grãos de amido sob luz polarizada formando “Cruz de Malta” (aumento de 400x). C) Células alongadas do mesocarpo, compridas, de parede grossa, algumas lisas e outras com aparência “enrugada” (aumento de 100x)

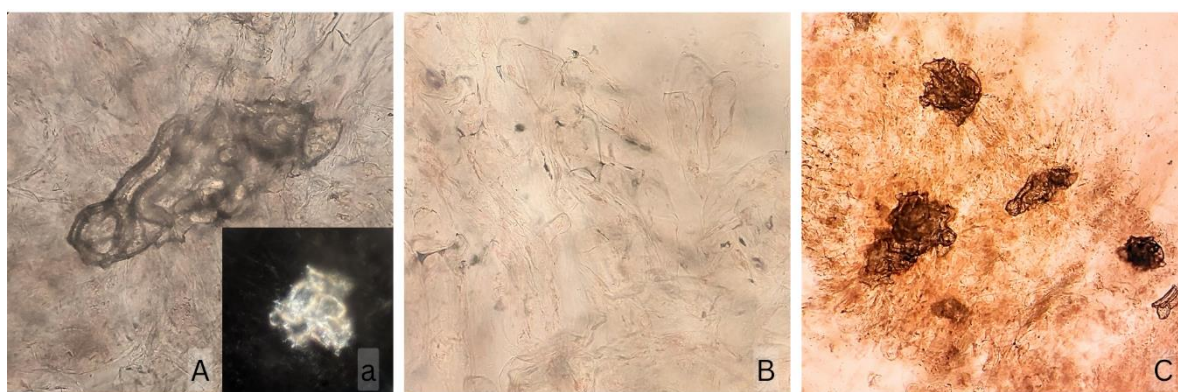


Figura 5 – Elementos histológicos da goiaba (*Psidium guajava* L.)
Legenda: A) Célula pétreas e células do mesocarpo (aumento de 400x) a) Células pétreas do mesocarpo sob luz polarizada (aumento de 400x). B) Células de mesocarpo (aumento de 400x) C) Epicarpo (casca) de células poligonais com espaço intercelular e cavidades secretoras (aumento de 100x).

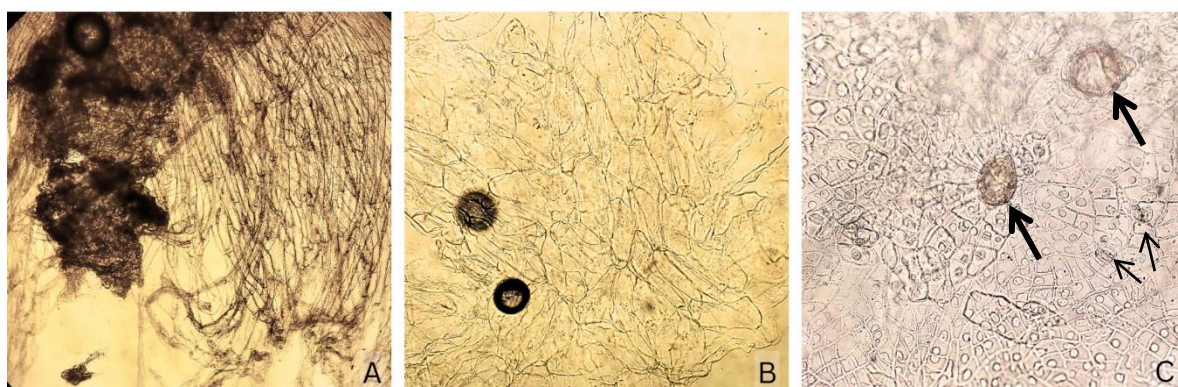


Figura 6 – Elementos histológicos da jaboticaba (*Plinia trunciflora*)
Legenda: A) Fibras alongadas de parede celular grossa, ligadas ao endocarpo (aumento de 40x) B) Células de mesocarpo arredondadas de diferentes formatos e tamanhos (aumento de 100x). C) Camada externa do epicarpo com células retangulares e isodiamétricas com espaço intercelular e estrutura circular em seu interior, estômatos (seta fina) e cavidade secretora (seta grossa) (aumento de 400x).

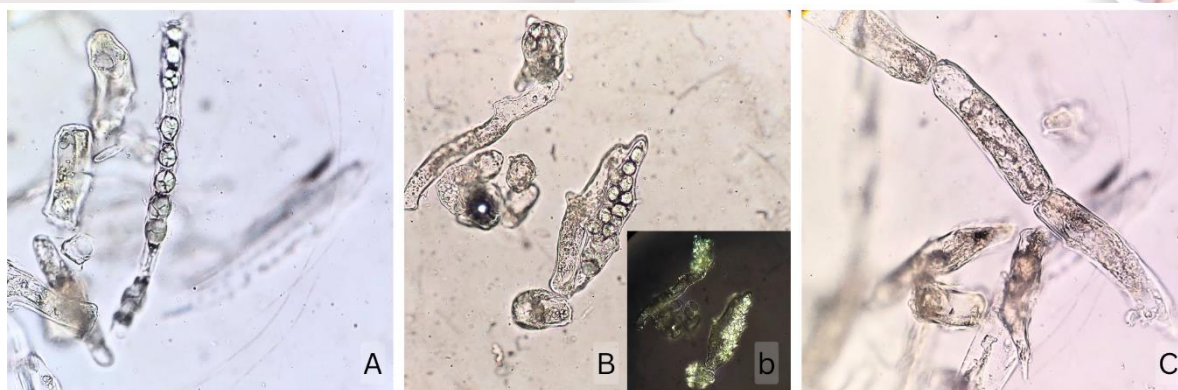


Figura 7 – Elementos histológicos do jatobá (*Hymenaea* L.)

Legenda: A - B) Células de mesocarpo alongadas com grãos de amido em seu interior (aumento de 400x) b) Célula de mesocarpo alongada com grãos de amido em seu interior sob luz polarizada (aumento de 400x) C) Células alongadas unidas pela extremidade formando “corrente” de células (aumento de 400x)

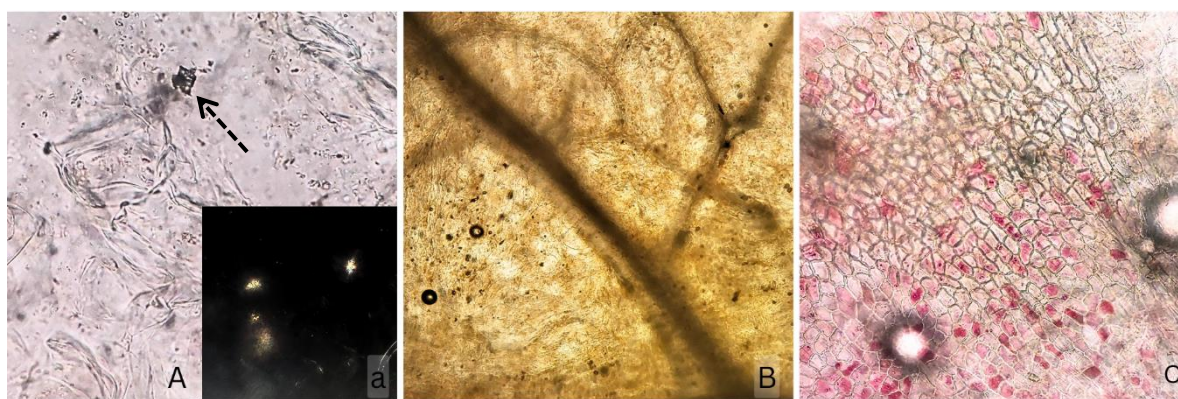


Figura 8 – Elementos histológicos da pitanga (*Eugenia uniflora* L.)

Legenda: A) Células de mesocarpo e cristais de oxalato de cálcio (seta pontilhada) (aumento de 400x). a) Células de mesocarpo e cristais de oxalato de cálcio sob luz polarizada (aumento de 400x). B) Células de mesocarpo e vasos espiralados (aumento de 100x). C) Camada externa da epiderme com células retangulares com pigmento rosado em seu interior (aumento de 400x).

CONCLUSÕES

O material produzido pode ser utilizado como referência para os laboratórios que realizam análise histológica de produtos alimentícios derivados de frutas típicas brasileiras, contribuindo para a elucidação de casos de fraudes e, ainda, para a confirmação dos ingredientes declarados em rótulo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Núcleo de Análises Químicas e Bromatológicas (NCQB) do Instituto Adolfo Lutz – CLR VIII Santo André pelo suporte na realização das análises histológicas.

REFERÊNCIAS

BARBIERI, M. K. *et al.* **Microscopia em Alimentos: identificação histológica e material estranho.** 2ª ed. Campinas, SP: CIAL/ITAL, 2001.



DIAS, M. A. C. Detecção Da Adulteração Fraudulenta De Carne Bovina Moída Através De Técnicas Histopatológicas. 2020. 14 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Residência em Patologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/28800>. Acesso em: 20 nov.2023.

GASSNER, G.; BOTHE, F. **Mikroskopische untersuchung pflanzlicher lebensmittel**, 5. ed. Stuttgart, DE: Gustav Fischer Verlag, 1989.

MATTOS, E. C. *et al.* Avaliação microscópica de alimentos: fundamentos e aplicações no controle de qualidade. In: GRANATO, D.; NUNES, D.S. **Análises químicas, propriedades funcionais e controle da qualidade de alimentos e bebidas**. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier; 2016. p. 481-99.

MENEZES JUNIOR J. B. F. A estrutura microscópica de sementes oleaginosas comestíveis. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 18, n. 1-2, p. 5-44, 1958. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/33316>. Acesso em: 10 jul. 2023.

MENEZES JUNIOR, J. B. F. Investigações sobre o exame microscópico de algumas substâncias alimentícias. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 9, n. 1-2, p. 18-77, jan/1949. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/33185>. Acesso em: 10 jul. 2023.

PAULI-YAMADA, L. F. *et al.* Isolamento e identificação microscópica de elementos histológicos vegetais: contribuições para o controle de qualidade e segurança dos alimentos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 80, p. 1-12, e36747, 2021. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/36747>. Acesso em: 14 jul. 2023.

RODRIGUES, R. M. M; NOGUEIRA, M. D. Fiscalização Por Análise Microscópica. In: ALMEIDA-MURADIAN, L. B. A.; PENTEADO, M. D. V. C. **Vigilância Sanitária: Tópicos sobre Legislação e Análise de Alimentos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2007. 72-80.

WINTON, A. I.; WINTON, K. B. **The structure and composition of foods**. London (UK): John Wiley & Sons, Inc, 1932.



Capítulo 20

DOI: 10.53934/20242-20

IDENTIFICAÇÃO DE MATÉRIAS ESTRANHAS EM ALIMENTOS À BASE DE PROTEÍNA VEGETAL (*PLANT-BASED*)

Isadora de Oliveira Silva¹; Maria Isabel Andrekowisk Fioravanti²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CLR III Campinas; E-mail: isa.oliveira_silva@hotmail.com

²Pesquisadora do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas – CLR III Campinas

Resumo: O número de consumidores que optam por produtos análogos a carnes feitos à base de plantas (*plant-based*) em busca de uma alimentação saudável, preocupação com bem-estar dos animais e questões ambientais vem crescendo exponencialmente, porém, essa nova classe de alimentos ainda não possui regulamentações específicas no Brasil. A microscopia alimentar pesquisa e identifica matérias estranhas presentes nos alimentos, com a finalidade de verificar a suas condições higiênico-sanitárias. Deste modo, o objetivo do estudo foi avaliar, através de técnicas microscópicas, a presença de matérias estranhas em nove alimentos *plant-based* que se propõem a substituir à: frango em cubos, carne moída, hambúrguer de frango e hambúrguer de carne. Para o estudo foi utilizada a técnica analítica oficial da AOAC (método 993.28). Como resultado, matérias estranhas microscópicas foram encontradas em 100% das amostras, sendo elas: ácaros, fragmentos de insetos e pelos de mamíferos não identificados. Não foram encontrados relatos na literatura sobre matérias estranhas em produtos *plant-based*, portanto, recomenda-se um monitoramento pelas autoridades e fabricantes para averiguar se há ou não a necessidade de estabelecer um limite de matérias estranhas para essa nova classe de alimentos. Como conclusão, por meio da análise microscópica foi possível detectar matérias estranhas em todas as amostras analisadas demonstrando que esta é uma importante ferramenta para o controle destes novos produtos, tanto na identificação das matérias estranhas presentes, quanto na verificação das condições sanitárias.

Palavras-chave: contaminantes físicos; dieta à base de plantas; microscopia óptica; segurança alimentar



INTRODUÇÃO

Mudanças nos padrões de consumo alimentar são impulsionadas pelo interesse crescente dos consumidores em uma alimentação mais saudável, preocupações com o bem-estar animal e questões ambientais. Os alimentos à base de plantas (*plant-based*) surgem como uma alternativa, feitos com ingredientes vegetais para reduzir o impacto ambiental, evitar o sofrimento animal e promover a saúde dos consumidores. No Brasil, o crescimento da indústria de alimentos *plant-based* é notável, mas enfrenta desafios devido à falta de regulamentação específica. Uma constante preocupação é quanto a adulteração (não intencional) que pode ser causada por substâncias indesejadas inseridas nos alimentos por desconhecimento, descuido ou falta de instalações e higiene adequadas durante o processamento dos alimentos (SANTOS *et al.*, 2022; FREITAS *et al.*, 2022; LIMA *et al.*, 2021; EAT-LANCET COMMISSION, 2019; ANVISA, 2022; BANSAL *et al.* 2017).

As condições higiênicas da indústria podem levar a presença de matérias estranhas (ME) em alimentos, com diferentes classificações, como ME microscópicas (como insetos e pelos de roedores) e ME macroscópicas (como areia e vidro). A legislação brasileira estabelece limites permitidos para ME microscópicas em alguns grupos de alimentos, visando garantir a segurança alimentar (BRASIL, 2022). Portanto, este estudo teve como objetivo identificar a presença de ME em alimentos *plant-based* por meio de técnicas microscópicas, abordando a questão da segurança e regulamentação alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de nove alimentos *plant-based* análogos a carnes foram adquiridos em supermercados de Campinas (São Paulo, Brasil), sendo de 2 marcas diferentes (A e B), que se propõem a substituir: frango em cubos (n=2), carne moída (n=1), hambúrguer de carne (n=4) e hambúrguer de frango (n=2).

Para o estudo foi utilizada a técnica analítica sugerida pela AOAC (AOAC, 2023), método 993.28 (16.13.02 – Light filth in bean paste), na qual 100 g da amostra homogeneizada foram adicionados em um béquer de 2000 mL, juntamente com 400 mL de água filtrada quente e homogeneizada manualmente por 1 minuto. Aproximadamente 200 mL de água quente e 15 mL de Igepal (CO-630, Labware) foram adicionados à mistura. Com auxílio de agitação magnética, a mistura foi fervida por 10 minutos. A amostra foi transferida quantitativamente para tamis n° 230 e lavada até que a água de lavagem se tornasse limpa. A amostra que permaneceu no tamis foi então transferida para frasco armadilha e adicionado 600 mL de solução de isopropanol 40%. A amostra foi novamente fervida por 10 minutos. O frasco foi retirado do aquecimento e adicionado 60 mL de vaselina e agitado por 10 minutos. Cuidadosamente, o volume do frasco foi completado até início do gargalo, com solução de isopropanol a 40%. Após repouso de 20 minutos a camada oleosa foi extraída para um béquer. Para a segunda extração, 35 mL de vaselina foi adicionado ao frasco armadilha, agitado por 30 segundos, completado o volume do frasco e extraído após 30 minutos de repouso para um segundo béquer.

As amostras recuperadas nos béqueres foram filtradas em papéis de filtro qualitativo riscados, através de bomba de vácuo. O material recolhido no papel filtro foi observado em microscópio estereoscópio (aumento de 30x) e, quando necessário, as impurezas foram



retiradas, colocadas em uma lâmina e observadas em microscópio óptico para identificação (aumento de 400x). Todas as análises foram realizadas com branco analítico. Se o número de FI entre as repetições de cada amostra apresentasse uma diferença superior a 10 unidades, a análise era repetida (CAMPOLO *et al.*, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ME macroscópicas, como insetos inteiros, objetos rígidos, pontiagudos e/ou cortantes, lasca de madeira, plástico rígido, pedra, metal, fragmentos de vidro não foram encontrados nas amostras. A Tabela 1 e Figura 1 apresentam as ME microscópicas, que foram observadas nas 9 amostras: FI (AF1, AF2, AM1, AC1, AC2, BC1, BC2, BF1 e BF2), ácaros (AF1 e AF2) e pelos de mamíferos (PM) não identificados (AF1, AF2, AC1, AC2, BC1, BC2, BF1 e BF2). A amostra AF2 foi a que mais apresentou matérias estranhas, enquanto a AM2 foi a que apresentou o menor número. Os ácaros foram identificados devido a sua coloração, forma e quantidade de patas. Os FI por sua forma, presença de poros, cerdas e coloração. Os PM pela presença de medula e escamas (MATTOS *et al.*, 2020; AQUINO e QUADROS, 2022).

Tabela 1: Tipo e quantidade de ME encontradas nas 9 amostras

Nome comercial	Amostra	Ingredientes com identificação histológica	Número e tipo de ME
Frango em cubos	AF1	Soja, ervilha, grão-de-bico e especiarias	1 ácaro 3 PM 3 FI
	AF2	Soja, ervilha, condimento	3 ácaros 1 FA 2 PM 10 FI
Carne moída	AM1	Soja, ervilha, beterraba	1 FI
	AC1	Soja, ervilha e beterraba	4 FI 3 PM
	AC2	Soja, ervilha e beterraba	3 FI 1 PM
Hambúrguer de carne	BC1	Ervilha, cebola, beterraba, pimenta-preta e alho	2 FI 2 PM
	BC2	Ervilha, cebola, beterraba, pimenta-preta e alho.	2 FI 1 PM
Hambúrguer de frango	BF1	Ervilha, amido modificado, cebola, pimenta-preta e alho	5 FI 1 PM
	BF2	Ervilha, amido modificado, cebola, pimenta-preta e alho	2 FI 1 PM



ME = matéria estranha; FI = fragmento de inseto; PM = pelo de mamífero; FA = fragmento de ácaro.
Fonte: elaborado pelo autor (2023)

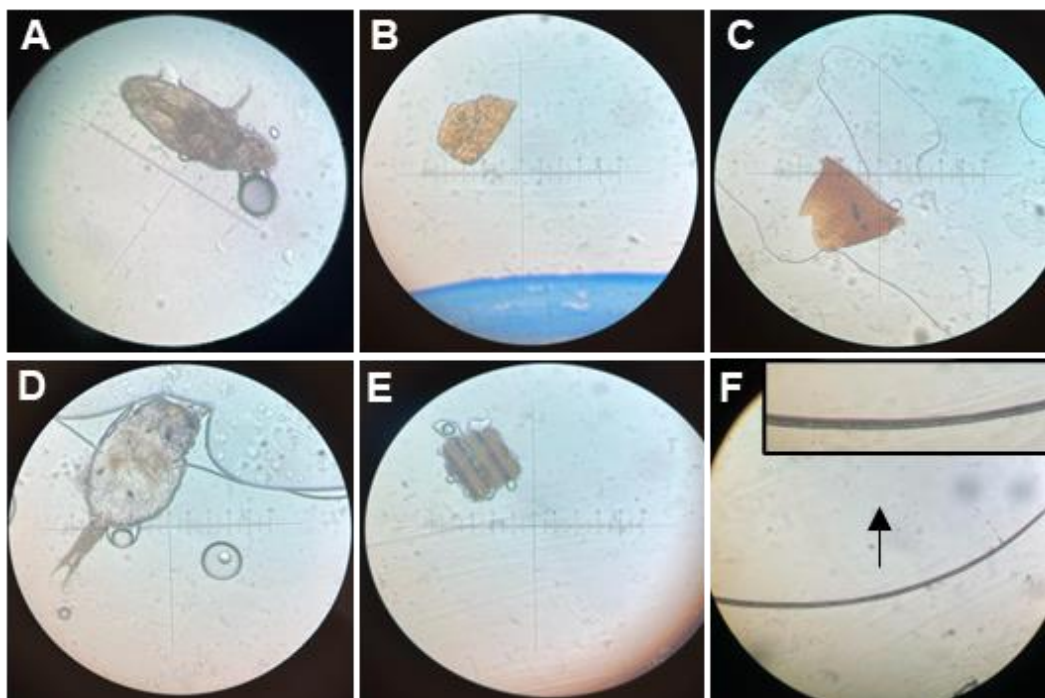


Figura 1: exemplos de ME encontradas nas amostras. A) Ácaro; B, C, D, E) fragmentos de insetos; F) pelo de mamífero não identificado (aumento de 400x). Fonte: elaborado pelo autor (2023).

De acordo com os ingredientes com identificação histológica que constam nos rótulos dos produtos estudados, pela RDC N° 623 (BRASIL, 2022) é tolerada uma determinada quantidade de ME em especiarias (80 FI na alíquota analisada) e para pimenta do reino moída (60 FI e 1 pelo de roedor em 50 g). Já o (FDA, 2018) estabelece limites de ME para ervilha (uma média de 5% variando o estado da matriz) e para pimenta-preta (média de 475 ou mais FI e 2 ou mais pelos de roedores por 50 g).

A classe de alimentos *plant-based*, assim como o restante dos ingredientes declarados nos rótulos (soja, grão-de-bico, beterraba, amido modificado, cebola e alho) não possuem limites de ME nas legislações e normas. Não foram encontrados relatos na literatura sobre matérias estranhas nessa classe de alimentos. O resultado obtido nesse estudo de 100% das amostras conterem ME, possivelmente se deve a presença de ervilha e/ou especiarias (pimenta preta) nas 9 amostras.

CONCLUSÕES

Como conclusão, por meio da análise microscópica foi possível detectar matérias estranhas em todas as amostras analisadas demonstrando que esta é uma importante ferramenta para avaliação dos ingredientes e das condições higiênicas dos produtos *plant-based*. ME microscópicas como fragmentos de insetos, ácaros e pelos de mamíferos foram encontradas em 100% das amostras analisadas. Portanto, é fundamental que a indústria e os órgãos reguladores trabalhem em conjunto para estabelecer limites de tolerância para ME e garantir a segurança desses produtos, a fim de proteger a saúde e a confiança dos consumidores.



REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Alimentos plant-based Relatório das oficinas virtuais para identificação do problema regulatório e dos agentes afetados**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Gerência-Geral de Alimentos, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/Relatoriodasoficinasparaidentificacaodoproblemaregulatorio150922.pdf>. Acesso em: 17 set. 2023.
- AOAC. Official Methods of Analysis AOAC International. **Association of Official Analytical Chemistry**, Maryland, 2023. Disponível em: <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis/>. Acesso em: 17 out. 2023.
- AQUINO, C. I. De; QUADROS, J. Análise tricológica de pelos-guarda de *Mus musculus*, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* (Rodentia: Muridae) aplicada à pesquisa e à identificação em alimentos. **Revista Visa e, Debate Sociedade, Ciência e Tecnologia**, v. 2, n. 10, p. 42–49, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.22239/2317-269x.02009>. Acesso em: 26 out. 2023.
- BANSAL, S.; SINGH, A.; MANGAL, M.; MANGAL, A. K.; KUMAR, S. Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1174–1189, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.967834>. Acesso em: 17 out. 2023.
- BRASIL, 2022. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 623/22. Dispõe sobre os limites de tolerância para matérias estranhas em alimentos, os princípios gerais para o seu estabelecimento e os métodos de análise para fins de avaliação de conformidade**. Diário Oficial da União. Brasília, 16 mar. 2022. Seção 1, p. 119. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6407691/RDC_623_2022_.pdf/507f6523-fb36-4d45-a6f8-52c840f8f393 (accessed on 28 August 2023a). Acesso em: 17 out. 2023.
- CAMPOLO, O.; PATANÈ, V.; VERDONE, A. M.; PALMERI, V. Survey of solid impurities and active infestation in flours produced in Calabria (Italy). **Journal of Stored Products Research**, p. 36–41, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2012.04.001>. Acesso em: 17 out. 2023.
- EAT-LANCET COMMISSION. **Dietas Saudáveis A Partir De Sistemas Alimentares Sustentáveis Alimento Planeta Saúde**. Disponível em: https://eatforum.org/content/uploads/2019/04/EAT-Lancet_Commission_Summary_Report_Portugese.pdf. Acesso em: 26 set. 2023.
- FDA. Food Defect Levels Handbook: Levels of natural or unavoidable defects in foods that present no health hazards for humans. 2018. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/ingredients-additives-gras-packaging-guidance-documents-regulatory-information/food-defect-levels-handbook>. Acesso em: 17 out. 2023.
- FREITAS, R. da S. de F. et al. ALIMENTAÇÃO PLANT-BASED E O IMPACTO NA SAÚDE BRASILEIRA: PROTOCOLO DE REVISÃO DE ESCOPO. RECIMA21 - REVISTA CIENTÍFICA MULTIDISCIPLINAR, v. 3, n. 10, p. 1–8, 2022. Disponível em: <https://recima21.com.br/index.php/recima21/article/view/2061/1587>. Acesso em: 26 set. 2023.
- LIMA, M. *et al.* ALIMENTAÇÃO À BASE DE PLANTAS: UMA REVISÃO NARRATIVA. **Associação Portuguesa de Nutrição**, v. 26, p. 46–52, 2021. Disponível em:



<https://actaportuguesadenutricao.pt/edicoes/mixed-meal-tolerance-test-as-a-screening-method-for-gestational-diabetes-a-narrative-review-2-2-2-2-2-3/>. Acesso em: 26 set. 2023.

MATTOS, E. C. De. *et al.* Fragment detection of Coleopteran and Triatomine insects in experimentally contaminated acai pulp and sugarcane juice. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, 2020. Disponível em: 10.1590/0037-8682-0119-2019. Acesso: 17 out. 2023.

SANTOS, A. R. Dos *et al.* Substituição dos alimentos de origem animal por de origem vegetal: Uma revisão bibliográfica. **VIII Fórum Rondoniense de Pesquisa**, v. 8, n. 1, 2022. Disponível em: <https://periodicos.saolucasjiparana.edu.br/foruns/article/view/500/496>. Acesso em: 26 set. 2023.



Capítulo 21

DOI: 10.53934/20242-21

HISTÓRICO DA TUBERCULOSE E EVOLUÇÃO DIAGNÓSTICA LABORATORIAL

Ana Giulia Dias Oliveira¹; Salisa Tania Denadai Rosa²

¹Estudante do Curso de Especialização de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - CLR III Campinas
E-mail: anagiuliaa7@gmail.com

²ATAS - Biomédica do Núcleo de Ciências Biomédicas – CLR III Campinas

Resumo: A tuberculose é uma doença antiga, de caráter infeccioso e transmissível, sendo ainda considerada a causa de muitas mortes no mundo. O diagnóstico precoce e o tratamento são fundamentais para alcançar a cura e evitar a disseminação, contribuindo assim para o controle epidemiológico. O objetivo do trabalho foi apresentar a trajetória da tuberculose ao longo dos anos, bem como a sua progressão no campo do diagnóstico laboratorial. O estudo foi realizado por meio de uma revisão da literatura, utilizando as bases de dados: Scielo, PubMed e Fiocruz. Tendo como descritores de pesquisa: diagnóstico laboratorial; evolução clínica; tuberculose. Contudo, concluiu-se que, apesar do avanço da sociedade e do diagnóstico laboratorial, a tuberculose continua sendo um grande desafio para a saúde pública global, e a pandemia de COVID-19 ainda exerce um impacto negativo no acesso ao diagnóstico e tratamento dessa enfermidade. Além disso, também foi possível concluir que todos os métodos de diagnóstico laboratoriais abordados para a detecção da tuberculose oferecem vantagens significativas para sua aplicação. No entanto, para a escolha do método a ser adotado, deve ser levado em consideração alguns fatores como: tempo necessário para a obtenção do diagnóstico, condições financeiras e a infraestrutura disponível no laboratório.

Palavras-chave: diagnóstico laboratorial; evolução clínica; tuberculose

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB), também conhecida como "peste branca", é uma doença infecciosa e transmissível causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, que afeta principalmente os pulmões, mas também pode acometer outros órgãos e sistemas (BRASIL, 2022a). Índícios de TB em múmias egípcias sugerem sua existência por pelo menos 4 mil anos (BRASIL, 2000). A doença em questão ainda permanece com significativos números de casos, sendo considerada a segunda principal causa de morte por um único agente infeccioso no mundo (BRASIL, 2022c).

A transmissão ocorre pelo ar, quando um indivíduo portador da forma contagiosa da infecção elimina bacilos através da tosse, fala ou espirro, sendo a forma pulmonar a mais comum e relevante para a transmissão (BRASIL, 2022a; JEREB, 2023). Assim, o diagnóstico precoce e a monitorização do paciente por partes das equipes de saúde se tornam crucial para interromper a capacidade de transmissão e permitir o início do tratamento, aumentando as chances de cura especialmente em grupos de alto risco (RIO DE JANEIRO, 2023).



Para o diagnóstico laboratorial, exames como a baciloscopia, teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB) e cultura são utilizados para detectar a presença do bacilo. O TRM-TB é usado para diagnósticos de novos casos, enquanto a baciloscopia é usada no acompanhamento do tratamento. Já a cultura permite não apenas o diagnóstico, mas também a realização do teste de sensibilidade e identificação de diferentes espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) (BRASIL, 2022a; BRASIL, 2022b).

Este estudo tem como propósito explorar a história da tuberculose, desde seus primórdios até os dias de hoje, analisando a evolução das técnicas de diagnóstico laboratorial aplicadas a essa doença por meio de revisão bibliográfica. A temática abordada desempenha um papel fundamental no cenário científico e tecnológico contemporâneo, pois não apenas acompanha a progressão do conhecimento sobre a tuberculose ao longo do tempo, mas também ressalta a importância do desenvolvimento contínuo de métodos diagnósticos cada vez mais eficazes. Isso inclui a busca por diagnósticos mais rápidos, sensíveis e específicos, abrindo perspectivas para futuras pesquisas sobre novas metodologias de diagnóstico da tuberculose.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia selecionada foi a revisão de literatura e, foram realizadas pesquisas nas seguintes bases de dados: Scielo, PubMed e Fiocruz. Tendo como descritores de pesquisa: diagnóstico laboratorial; evolução clínica; tuberculose. Para os resultados foram adotados como critérios de inclusão: artigos disponibilizados na íntegra, disponíveis na língua portuguesa e inglesa publicados entre os anos de 1999 a 2023. Excluíram-se obras não disponíveis na íntegra, assim como também aquelas que não se relacionavam com os objetivos do trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As origens da TB não são totalmente esclarecidas, mas acredita-se que tenha surgido através do contato com bois selvagens contaminados com o *Mycobacterium bovis*, levando a pequenos surtos endêmicos (GURGEL, 2019). Somente no ano de 1882, Heinrich Hermann Robert Koch descreveu a bactéria responsável pela TB, o que levou ao desenvolvimento da teoria da transmissibilidade (BRASIL, 2000).

Com a necessidade de diagnóstico laboratorial da doença, em 1930, surgiu a baciloscopia (ROLLA, 2013). Esse método consiste na confecção de uma lâmina que será posteriormente corada e analisada em microscópio, através de amostras de escarro e outros materiais (ANGRA *et al.*, 2013; BRASIL, 2022b). A baciloscopia ainda mantém sua importância nos dias atuais devido a sua facilidade de execução, custo-benefício favorável e eficácia no controle do tratamento, permitindo identificar casos de TB pulmonar entre 60% e 80% em adultos (BRASIL, 2022b; RIO DE JANEIRO, 2023). Em contrapartida, apresenta baixa sensibilidade, especialmente para grupos específicos de pacientes, como os que vivem com HIV/AIDS, crianças e portadores de TB extrapulmonar. Apresentando sensibilidade na faixa de 25% e 65% quando comparada a cultura (BRASIL, 2022b; ANGRA *et al.*, 2013).

A cultura é o método padrão-ouro para diagnosticar a TB, começando em 1950 com meios sólidos e posteriormente adotando a cultura líquida em sistemas automatizados. Este método consiste no isolamento e multiplicação de bacilo álcool ácido resistente (BAAR), além de permitir a diferenciação de espécies e realização do teste de sensibilidade (TS) aos fármacos de tratamento para TB (BRASIL, 2022b). Apresenta uma especificidade superior a 99% e maior sensibilidade quando comparada à baciloscopia e ao TRM-TB (PEDRO *et*



al., 2017). Nos casos de TB pulmonar com resultado negativo na baciloscopia, a cultura de escarro pode aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico (BRASIL, 2020a).

O TS tem como intuito avaliar o crescimento bacteriano diante da presença dos fármacos de primeira e/ou segunda linha utilizados no tratamento da TB, podendo ser classificados como fenotípicos e genotípicos (BRASIL, 2022b). O método fenotípico se fundamenta no uso do método das proporções em meio Löwenstein-Jensen (LJ), que envolve a avaliação da proporção de bacilos resistentes quando expostos a diferentes medicamentos. Outro método também utilizado é a redução do nitrato (nitratase) em meio LJ, no qual se observa a capacidade do *M. tuberculosis* em reduzir o nitrato presente no meio de cultura em nitrito. Podendo também ser utilizado em meio de cultura líquido em sistema automatizado (WHO, 2018; BRASIL, 2022b).

O TS genotípico faz uso da técnica de hibridização de sonda em linha (do inglês *Line Probe Assay* - LPA), que oferece uma vantagem significativa sobre os testes fenotípicos devido à sua capacidade de detectar o CMTB e mutações mais comuns em áreas resistentes em apenas três dias, enquanto os métodos fenotípicos podem levar meses. Além de resultar em uma diminuição nos gastos públicos com o TS (BRASIL, 2021b). Contudo, em alguns casos, a confirmação completa da resistência não pode ser assegurada apenas por esse teste, necessitando do método fenotípico. Isso ocorre pelo LPA não poder detectar mutações menos frequentes, que também podem levar à resistência (BRASIL, 2023d).

O TRM-TB, como sistema GeneXpert®, é uma ferramenta de diagnóstico aprovada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Lançado em 2004 e adotado em 2014 pelo Instituto Adolfo Lutz de Campinas, detecta o CMTB e mutações de resistência à rifampicina em até duas horas, simplificando os procedimentos moleculares (BRASIL, 2022b). Suas vantagens incluem maior sensibilidade como teste de diagnóstico inicial em comparação com a baciloscopia, perfil de sensibilidade ou resistência à rifampicina, execução mais rápida do que a baciloscopia, cultura e TS, menor risco biológico e custos mais baixos em relação à cultura e TS. A versão mais recente, chamada "Ultra" introduzida em 2018 no Instituto Adolfo Lutz de Campinas, tem sensibilidade semelhante à da cultura, mas não pode ser usada para monitorar o progresso do tratamento e tem custos mais altos que a baciloscopia, o que deve ser considerado em sua implementação (ANGRA *et al.*, 2013; BRASIL, 2022b).

Se tratando de diagnóstico da TB latente, a prova tuberculina é o teste padrão usado no Sistema Único de Saúde (SUS), ele envolve a inoculação de um derivado proteico purificado (PPD) do *M. tuberculosis*, com o objetivo de avaliar a resposta imune celular a esses antígenos. Esse teste é econômico e não requer equipamento de laboratório, mas sua precisão pode ser afetada por micobactéria não tuberculosa (MNT), vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guérin) e fatores relacionados à execução e leitura do teste (BRASIL, 2020b; BRASIL, 2022a). Outro teste para TB latente é o *Interferon-gama release assay* (IGRA) incorporado pelo SUS em 2020. Seu objetivo principal é quantificar a resposta imune celular dos linfócitos T a partir de amostras de sangue periférico, por meio de um estímulo *in vitro* com antígenos específicos do *M. tuberculosis* (BRASIL, 2022e). O IGRA supera a prova tuberculina em termos de acurácia na identificação da tuberculose latente, progressão para tuberculose ativa e associação de resultados positivos e a ocorrência de fatores de risco. Além disso, o IGRA exige apenas uma visita do paciente ao laboratório, enquanto a prova tuberculina requer duas visitas. Em termos de custo-efetividade, o IGRA demonstra melhor desempenho clínico a um custo menor. Concluindo, os testes IGRA são uma alternativa válida a prova tuberculina no diagnóstico da tuberculose latente, podendo ser usados em conjunto, sendo a escolha preferencial para indivíduos vacinados com BCG (BRASIL, 2020b).



CONCLUSÕES

Com o progresso da tecnologia ao longo dos anos, foram desenvolvidos novos métodos para diagnosticar a TB, cada um apresentando suas próprias vantagens e desvantagens. No Instituto Adolfo Lutz de Campinas, são utilizados métodos como cultura líquida automatizada, teste rápido molecular e teste imunocromatográfico, além de ser o laboratório de apoio na execução do *Interferon-gama release assay*. Enquanto isso, o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (Central) concentra-se na identificação de espécies e teste de sensibilidade por biologia molecular, visando a obtenção de um diagnóstico eficaz e rápido. Apesar dos incansáveis esforços ao longo dos anos por parte dos programas de combate à tuberculose e dos avanços no campo do diagnóstico laboratorial, essa doença ainda permanece como uma preocupação de saúde pública. Em cenários mais recentes, vale ressaltar que a pandemia de COVID-19 contribuiu para uma redução nos casos diagnosticados da tuberculose, o que pode resultar em um aumento na transmissão e desenvolvimento da doença. A tuberculose multirresistente e a interrupção do tratamento devido à sua duração prolongada são fatores que também contribuem para o agravamento da doença. Assim, destaca-se não somente a necessidade do diagnóstico precoce, mas também a importância da conscientização da população, visando prevenir a transmissão da doença e assegurar um tratamento eficaz.

REFERÊNCIAS

- ANGRA, P. et al. **The handbook Global Edition**. 2013. Disponível em: https://stoptb.org/wg/gli/assets/documents/TB%20MICROSCOPY%20HANDBOOK_FINAL.pdf Acesso em: 28 set. 2023.
- BRASIL, Imagens da Peste Branca: Memória da tuberculose. **Centro Cultural do Ministério da Saúde**. Março 2000 Disponível em: <http://www.ccs.saude.gov.br/peste-branca/tb-historia.php> Acesso em: 28 set 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Cultura líquida automatizada para detecção de micobactérias e teste de sensibilidade aos antimicrobianos utilizados no tratamento da tuberculose. **CONITEC**, 2020a. Disponível em: http://antigo-conitec.saude.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2020/Relatorio_CP18_Cultura_liquida_Tuberculose_18_2020_CP_ENCERRADA_6_7.pdf Acesso em: 28 set, 2023.
- BRASIL. Dados epidemiológicos da tuberculose no Brasil. **Ministério da Saúde**. Maio 2022c. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/tuberculose/publicacoes/apresentacao_dados-epidemiologicvos-da-tuberculose-no-brasil_maio_2022/@@download/file Acesso em: 12 set. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde [recurso eletrônico] – 5. ed. rev. e atual. – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2022a. Disponível em: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_5ed_rev_atual.pdf Acesso em: 25 set. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Recomendações para o Diagnóstico Laboratorial de Tuberculose e Micobactérias não Tuberculosas de Interesse em Saúde Pública no Brasil. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2022b. Disponível em: http://antigo.aids.gov.br/system/tdf/pub/2016/68446/tuberculose_-_web.pdf?file=1&type=node&id=68446&force=1 Acesso em: 23 set. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. NOTA INFORMATIVA Nº 2/2022-CGLAB/DAEVS/SVS/MS. **Ministério da Saúde**, 2022e – Disponível em:



http://antigo.aids.gov.br/system/tdf/legislacao/2022/-notas_informativas/ni_02-2022_recomendacoesigra_laboratorio.pdf?file=1&type=node&id=68387&force=1 Acesso em: 03 nov. 2023

BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações Técnicas para Laudo e Interpretação do Teste de Hibridização com Sonda em Linha (Line Probe Assay – LPA) para Tuberculose [recurso eletrônico]** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente, Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis. – Brasília : **Ministério da Saúde**, 2023d. Disponível em:

<https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/publicacoes/2023/recomendacoes-tecnicas-para-laudo-e-interpretacao-do-teste-de-hibridizacao-com-sonda-em-linha-line-probe-assay-lpa-para-tuberc.pdf> Acesso em: 29 set. 2023.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Relatório de recomendação nº 630. Publicado em 06, 2021b. Disponível em:

https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/01/1353343/20210708_teste-em-linha-detecao-resistencia-tuberculose_p_43.pdf Acesso em: 01 out. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **TESTE DE LIBERAÇÃO INTERFERON-GAMA (INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAY - IGRA) PARA DETECÇÃO DE TUBERCULOSE LATENTE EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS. CONITEC**, 2020b. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2020/sociedade/resoc222_interferon-gama_tuberculose_latente.pdf Acesso em: 03 nov. 2023

CYRIACO, C. et al. Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT). In: PROCÓPIO, M.J., org. **Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço [online]**. 7th ed. rev. and enl. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 53-69, 2014. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/zyx3r/pdf/procopio-9788575415658-05.pdf> Acesso em: 11 set. 2023.

GURGEL, C. F. A. M. A tuberculose na História. Boletim da FCM, v. 12, n.3, 2019. Disponível em: https://www.fcm.unicamp.br/boletimfcm/mais_historia/tuberculose-na-historia#:~:text=O%20termo%20tuberculose%20%C3%A9%20recente,em%20pulm%C3%B5es%20de%20doentes%20autopsiados. Acesso em: 22 set. 2023.

JEREB, J. Tuberculosis. **CDC Yellow Book**. Estados Unidos da América, 2023. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/tuberculosis#transmission> Acesso em: 21 set. 2023.

PEDRO, H. S. P. *et al.* **Desempenho da cultura líquida MGIT após implementação em uma rede de laboratórios públicos do estado de São Paulo**. Rev Inst Adolfo Lutz, 76:e1727, 2017. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial76_completa/artigos-separados/1727.pdf Acesso em: 25 set. 2023.

ROLLA, V. Tuberculose. **Agência Fiocruz**, 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/glossario-tuberculose> Acesso em: 19 set. 2023.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Guia Rápido da Tuberculose, **Ministério da Saude**, 2023. Disponível em:



https://www.subpav.org/aps/uploads/publico/repositorio/Guia_R%C3%A1pido_Tuberculose.pdf Acesso em: 02 out. 2023



Capítulo 22

DOI: 10.53934/20242-22

IMPORTÂNCIA DA ESCOLHA DO FIXADOR IDEAL PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Camila M.SANTOS^{1*}; Gislene M NAMIYAMA².

¹ Bolsista do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – NME/IAL– São Paulo; camilanodestoca@gmail

² Pesquisadora Científico, Núcleo de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz – NME/CPI/IAL-SP

Resumo: Para obtenção de boas micrografias eletrônicas, assim como a identificação de microrganismos ou de ultraestruturas celulares, a fixação é uma das etapas mais importantes na estabilização das estruturas e dos componentes celulares e intercelulares, preservando o material a ser analisado, mais próximo de como se encontram “*in vivo*”. Este trabalho teve como objetivo, avaliar ação de diferentes tipos de fixadores utilizados em Microscopia de luz. Foi realizado com amostras já processadas de fragmentos de fígado de *Calomys callosus*, em parafina com diferentes tipos fixadores (CEIAL e CTC nº 43/2006). Os resultados dos cortes em parafina mostraram a ação dos diferentes fixadores quanto à qualidade, preservação e integridade do tecido estudado. Os cortes fixados com paraformaldeído 4% apresentaram melhor preservação das estruturas celulares com menor extração do conteúdo citoplasmático e coloração adequada (Hematoxilina e Eosina). Portanto, é de suma importância o aprimoramento contínuo de técnicas de fixação de tecidos e de processamento de amostras, visando à obtenção de métodos cada vez mais precisos e confiáveis.

Palavras chave: Microscopia óptica, Cricetidae, Células, fixadores.

INTRODUÇÃO

A realização do estudo morfológico de qualidade requer compreensão dos cuidados minuciosos em cada uma das etapas envolvidas no processamento da amostra para análise tanto por microscopia de luz quanto por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (TOLEDO, 2021).

Uma etapa importante a ser realizada para obtenção de bons resultados é o cuidado com procedimento de fixação da amostra. A fixação é um processo responsável pela estabilização das estruturas celulares e intercelulares, que tem a finalidade de preservar a organização celular, protegê-las de proliferação bacteriana ou fúngica, de forma a manter a integridade durante o processamento de tecidos, bem como no armazenamento por longos períodos (ABRAHÃO *et al*, 2004; TOLEDO, 2021).

Ao retirar órgãos ou tecidos de um organismo, inicia-se o processo de autólise devido à falta de oxigenação, a falta de substâncias para o seu funcionamento e o acúmulo de gases, como dióxido de carbono, causando a morte. Para preservar as estruturas biológicas é fundamental que, partes do tecido sejam submetidas a um processo de perfusão ou imersão em um líquido fixador imediatamente após a sua extração (MOLINARO *et al*, 2009; AARESTRUP, B.J 2012; NUNES; CINSA, 2016).



Para uma fixação eficaz de tecidos na rotina, o fixador deve penetrar rapidamente nas células permitindo a difusão sem remover proteínas ou lipídeos. A fixação pode ser feita por agentes físicos (frio ou calor) ou químicos (HAYAT, 1970; PINTO, 2010).

A fixação química pode causar a desnaturação das proteínas, alterando sua conformação e podem ser classificados em fixadores coagulantes e não coagulantes. Se os fixadores utilizados forem etanol, metanol, acetona, estes são fixadores coagulantes. Os fixadores não coagulantes são os aldeídos fórmicos e glutarico e tetróxido de ósmio.

Dentre os fixadores não coagulantes o mais utilizado é o formaldeído. Este atua como um agente fixador químico, promovendo a estabilização das estruturas celulares e impedindo a deterioração das amostras de tecido. Normalmente em solução aquosa, a formalina é empregada em concentrações de 4% (diluição 1:10) para a fixação de tecidos, porém, outras concentrações podem ser adotadas, dependendo do tipo de tecido e objetivo da análise (FOX CH, *et al*, 1985; PEREIRA, 2007; LIMBERGER, 2011).

O paraformaldeído é utilizado como fixador primário para estabilizar estruturas das células reage com as ligações monovalentes dos grupos de aminoácidos nas proteínas. No entanto, a sua eficácia na fixação de proteínas é menor do que a do glutaraldeído. Portanto, não é a escolha recomendada para estudos ultraestruturais, especialmente para microscopia eletrônica, onde sua eficiência é limitada. Por outro lado, é importante notar que este fixador não tem um impacto negativo de forma deletéria em amostras realizadas para imunohistoquímica, pois não compromete a integridade de sítios antigênicos das proteínas (BALDANI, 1998).

Para o estudo de ultraestrutura celular são comumente utilizados os fixadores químicos como o glutaraldeído. O glutaraldeído (dialdeído glutárico) têm dois grupos aldeídos que reagem com os grupos amino das proteínas estabelecendo ligações cruzadas inter e intramoleculares. É um fixador aditivo, que vai se incorporando irreversivelmente às estruturas celulares em difusão lenta em tecidos (HADDAD *et al*, 2007).

O presente trabalho tem como objetivo geral “reduzir e prevenir riscos relacionados à saúde da população por meio de ações de vigilância, promoção e prevenção”, conforme a 3ª diretriz do Plano Estadual de Saúde de São Paulo (2020-2023), da qual se justifica o estudo sobre a importância das substâncias fixadoras utilizadas para preservação das amostras biológicas para análise morfológica em microscópio de luz, a fim de minimizar as alterações causadas por estas substâncias.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados fragmentos de fígado de *Calomys callosus* normais, previamente incluídos em parafina e fixados com diferentes fixadores.

Os fixadores utilizados neste experimento foram:

1. Fixador de Karnovsky – paraformaldeído (Merck) a 4% + glutaraldeído (Sigma) a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M , pH 7,2;
2. Fixador Paraformaldeído (Merck) a 4% em tampão fosfato de sódio (PBS), pH 7,3;
3. Formaldeído comercial (Synth) a 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) (diluição 1:10), pH 7,3;
4. Formaldeído comercial (Synth) a 4% aquosa (diluição 1:10), pH 5,0.

Os fragmentos de fígado foram fixados por 24 horas, lavados em tampão e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico e incluídos em parafina. Foram realizados cortes com espessura de 5µm no micrótomo (Micron). Os cortes foram colocados em banho Maria a 40°C e colhidos em lâminas silanizadas e secas em estufa. Foram coradas com



Hematoxilina (1 minuto) e Eosina alcóolica (1 minuto) e observadas no Microscópio de Luz Nikon Eclipse 80i e as imagens foram adquiridas com a câmera digital DS-U3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cortes de fígado fixados com Karnovsky.

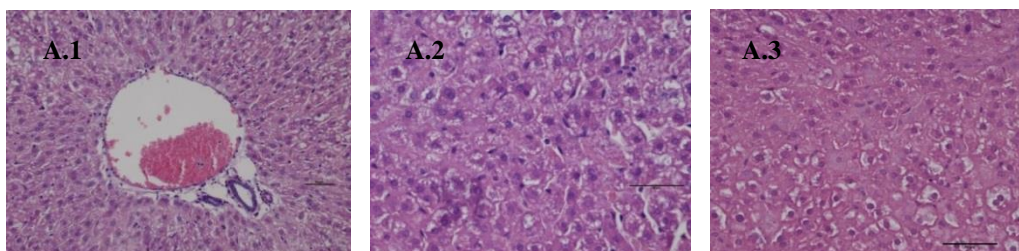


Fig 1. Fotomicrografias de cortes de fígado de *C. callosus* (Rodentia) fixado com Karnovsky. **A1.** Espaço medular evidenciando ducto biliar, vaso linfático, nervos e vasos sanguíneos, formando o que é conhecido como espaço porta, aumento de 20x. **A2 e A3,** espaço medular e cortical de corte de fígado mostrando partes do tecido íntegro e algumas células com citoplasma extraído, aumento 40x.

Fonte: Elaborado pelo autor

Cortes de fígado fixados com paraformaldeído a 4%.

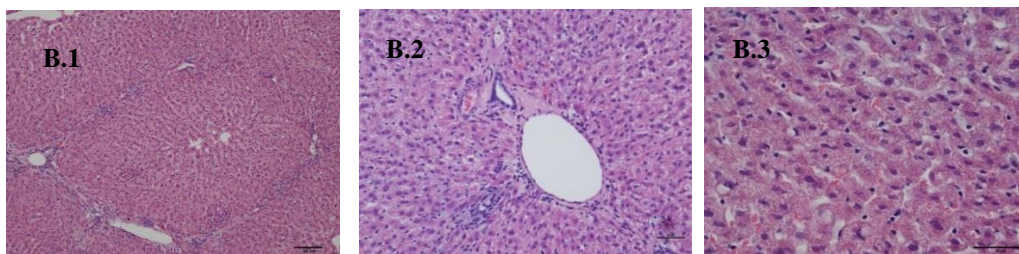


Fig 2 – Fotomicrografia de cortes de fígado de *Calomys callosus* (Rodentia) fixado com paraformaldeído a 4%. **B1.** Observa-se outro espaço porta mostrando o lóbulo hepático (hexagonal), com a veia central, aumento 10x. **B2** Espaço medular evidenciando ductos biliares, vasos linfáticos, nervos e vasos sanguíneos, formando o que é conhecido como espaço porta, no aumento de 20x. **B3.** Espaço medular, mostrando espaços entre as células hepáticas, aumento 40x.

Fonte: Elaborado pelo autor

Cortes de fígado fixado com formaldeído a 4% aquoso.

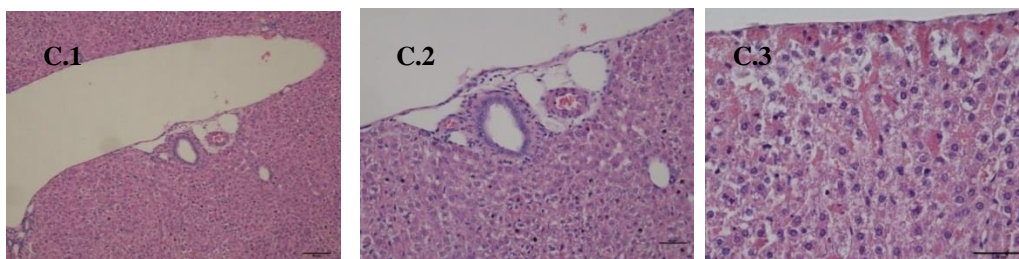


Fig. 3. – Fotomicrografia de cortes de fígado de *Calomys callosus* (Rodentia) fixado com formaldeído a 4% aquoso. **C1.** Espaço medular evidenciando que abriga ductos biliares, vasos linfáticos, nervos e vasos sanguíneos, formando o que é



conhecido como espaço porta, aumento de 10x; **C2**. Observa-se o mesmo espaço porta, aumento 20x. **C3**. Espaço cortical, com conteúdo citoplasmático extraído e algumas células degeneradas, aumento 40x.

Fonte: Elaborado pelo autor

Cortes de fígado fixados com Formaldeído a 4% em PBS

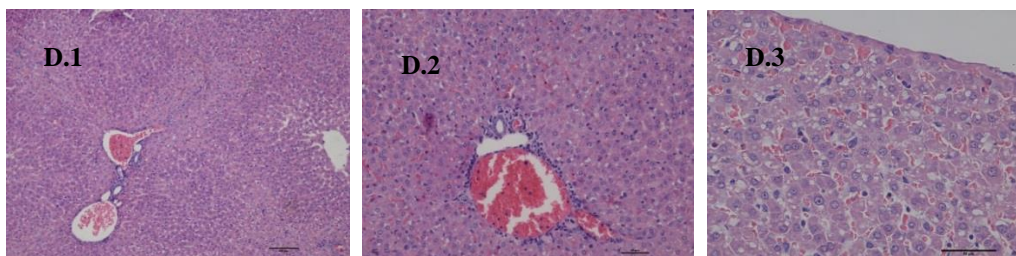


Fig 4. Fotomicrografia de cortes de fígado de *Calomys callosus* (Rodentia) fixado com formaldeído a 4% em PBS. **D1.** Espaço medular evidenciando que abriga ductos biliares, vasos linfáticos, nervos e vasos sanguíneos, formando o que é conhecido como espaço porta, aumento de 10x; **D2.** Observa-se o mesmo espaço medular no aumento de 20x. **D3** Espaço cortical do corte de fígado com espaços entre as células e núcleo com pontos claros, aumento de 40x.

Fonte: Elaborado pelo autor

Observação das fotomicrografias, as amostras revelaram diferenças na fixação em cortes de parafina. O fixador Karnovsky teve uma fixação boa, no entanto, algumas áreas apresentam extração do citoplasma. O paraformaldeído a 4% mostrou fixação mais uniforme sob as mesmas condições, mas observam-se alguns espaços entre as células hepáticas. O formaldeído a 4% aquoso, em aumento menor apresentou fixação uniforme, mas em aumentos maiores nota-se extração do citoplasma e núcleos degenerados. O formaldeído 4% em PBS apresentou uma fixação boa, mas a coloração mostrou pouco contraste, em aumento maior observam-se espaços entre as células e núcleos com regiões claras.

Provavelmente a extração observada em algumas regiões seja devido ao tamanho da amostra. O tamanho dos fragmentos são maiores para fragmentos incluídos em parafina do que o tamanho utilizado para MET que são de 1 mm². Também pode ter havido esgotamento do fixador, principalmente na amostra fixada em Karnovsky, fazendo com que algumas regiões não tivessem fixador suficiente. De acordo com Haddad *et al.*, 2007, o glutaraldeído é um fixador aditivo e, à medida que vai penetrando no tecido vai sendo irreversivelmente incorporado às estruturas, a sua concentração na solução fixadora vai decrescendo. Além disso, em cada sítio reativo para fixação serão consumidas em média várias moléculas do fixador.

Alguns estudos, incluindo o de ABRAHÃO *et al.*, 2004, descrevem que a morfologia celular muda gradualmente durante o processo de estabilização. Mesmo fixadores considerados os melhores para microscopia eletrônica, como o Karnovsky, mostraram, por meio de experimentos, perda variada de proteínas, lipoproteínas, carboidratos e lipídeos durante a fixação. A falta de conteúdo citoplasmático em algumas células é visível nas amostras fixadas com Karnovsky (fig 1).

Segundo WANG *et al* (2011), o formaldeído tem sido o fixador padrão para exames histopatológicos, ao mesmo tempo é inadequado devido à extração de DNA e RNA. As amostras processadas em formaldeído a 4% em PBS e formaldeído a 4% aquoso mostraram extração de parte do citoplasma dos hepatócitos e alteração nuclear. Este resultado se deve a considerável presença de metanol (de 11 a 16%) na solução comercial de formaldeído, que tem ação coagulante sobre as proteínas e alteram a estrutura do conteúdo celular. Embora o formaldeído se difunda rapidamente, suas reações são lentas.



Trabalho de Toledo (2021) descreve que o tempo de fixação com formalina, paraformaldeído e glutaraldeído pode afetar os resultados da coloração. Uma vez que a subfixação geralmente produz uma coloração reduzida na região central do bloco de tecido com coloração mais forte na área marginal, enquanto a superfixação gera o aspecto oposto (boa coloração na área interna e fraca coloração na parte externa). Análises dos cortes de tecido do fígado de *Calomys callosus* mostraram boa coloração na maioria dos cortes, apenas na fixação com formaldeído a 4% em PBS observou-se uma coloração pouco corada (pálida).

CONCLUSÕES

Com esse estudo foi possível observar a importância da qualidade e integridade da amostra dos tecidos quanto ao uso de diferentes tipos de fixadores para uma melhor compreensão perante o processamento de amostras para análise morfológica em microscópio de luz e posteriormente para o microscópio eletrônico de transmissão.

Este trabalho mostrou que os cortes fixados com paraformaldeído 4% apresentaram melhor preservação estruturais celulares, menor extração do conteúdo citoplasmático e uma coloração adequada. Parte dos fragmentos de fígado, processados com os diferentes fixadores em parafina foram reprocessados para técnica de corte ultrafino, infelizmente, não foi possível cortar os fragmentos e examinar no MET, devido ao curto período do estágio.

Seria interessante examinar os cortes ao MET e analisar a ação de cada fixador na ultraestrutura celular, a fim de procurar investir em pesquisas destinadas ao aprimoramento contínuo de técnicas de fixação e de processamento de materiais biológicos, visando à obtenção de métodos cada vez mais precisos e confiáveis.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, D. S. *et al.* Estudo comparativo com diversos fixadores para aplicação em microscopia eletrônica de transmissão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 63(2): 248-54 2004. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial63_2_completa/1005.pdf

AARESTRUP, B.J. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 457p.

BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; SILVA, R.A. da; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. **Técnicas microscópicas aplicadas na identificação e localização de bactérias fixadoras de nitrogênio e biomacromoléculas em tecidos vegetais**. Disponível em: Seropédica: Embrapa Agrobiologia, jul. 1998. 27p. (EmbrapaCNPAB. Documentos, 50). <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAB-2010/27241/1/doc050.pdf>

FOX C.H, JOHNSON F.B, WHITING J, ROLLER P.P. Formaldehyde fixation. **J Histochem Cytochem**. 1985 Aug; 33(8): 845-53. Disponível em [https://doi: 10.1177/33.8.3894502](https://doi.org/10.1177/33.8.3894502). PMID: 3894502.

HAYAT. M .A. **Principles and techniques of electron microscopy: Biological Applications**. Van Nostrand Reinhold, ed 4^a. New York Abril, 1970.

HADDAD. A; WANDERLEY. S. **Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicada as Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopias, 2007.



LIMBERGER. D. C. H. Processos de recuperação reuso e destinação do formol em laboratório de anatomia. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. **Centro de Tecnologia em Engenharia de Processos**. Rio Grande do Sul, 2011. <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/7948/LIMBERGER%2c%20DANIELA%20CRISTINA%20HAAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

MOLINARO, E. M; CAPUTO, L. F. G; AMENDOEIRA, M. R. R (Org.). A. Técnicas histológicas. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, v. 2. Rio de Janeiro: **EPSJV**; IOC, 2010. v. 2. 254 p

NUNES. C.S, CINSA. L. A. Princípios do Processamento Histológico de Rotina. Monografia. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 8, n. único, p. 31-40, 2016. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964830/2884-8890-1-sm.pdf>

PEREIRA. N. S. Degradação anaeróbia de formaldeído em reator operado em batelada sequenciais contendo biomassa imobilizada. Tese de Mestrado. **Escola de Engenharia de São Carlos**, São Paul, 2007. Disponível em: doi: 10.1016/ j.jhazmat.2008.07.028

PINTO, I. C. N. V. B. Avaliação de novos fixadores em anatomia patológica. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular)–Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2010. Disponível em: <http://handle.net/10773/8776>

WANG YN, LEE K, PAI S, LEDOUX WR. Histomorphometric comparison after fixation with formaldehyde or glyoxal. **Biotech Histochem**. 2011 Oct; 86(5):359-65. doi: 10.3109/10520295.2010.520275. Epub 2010 Sep 21

TOLEDO, C.V.A. Avaliação de método de fixação do sistema nervoso central do rato: **Estudo de banco de tecidos** – Universidade Federal de São Paulo, Escola de São Paulo de Medicina, x.53f, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/bitstream/handle/11600/65583/Disserta%20a%20a%20o%20final%2011-02-2022.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos ao Núcleo de Microscopia Eletrônica de Transmissão que me auxiliou em todas as etapas na execução deste trabalho.

Para as alunas que me acompanharam nesse caminho, Gabriela Vitoria Penna Arruda e a mestranda Luana Barbosa de Lima pela paciência e apoio.



Capítulo 23

DOI: 10.53934/20242-23

A IMPORTÂNCIA DO CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO NO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA A PESQUISA DE AGENTES INFECCIOSOS

Daniel Monteiro Ferreira¹; Cinthya dos Santos Cirqueira Borges²;
Sílvia D'Andretta Iglezias³; Thais de Souza Lima⁴

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública do Instituto Adolfo Lutz; E-mail: monteiro.daniel@outlook.com

²Pesquisador Científico do CP-NAP do Instituto Adolfo Lutz.

³Médica Patologista do CP-NAP do Instituto Adolfo Lutz.

⁴Ag. Téc. de Assistência à Saúde (Biomédico) do CP-NAP do Instituto Adolfo Lutz.

Resumo: A técnica de imuno-histoquímica se destaca como uma ferramenta poderosa para detectar e localizar moléculas específicas em tecidos biológicos. Contudo, dada a complexidade dos processos anatomopatológicos, torna-se imperativo implementar um controle de qualidade laboratorial eficaz, visando a minimizar variações técnicas e estabelecer padrões de referência. Nesse contexto, a inclusão de controles assume um papel crucial para garantir a qualidade e a confiabilidade dos resultados obtidos. Este estudo tem como objetivo abordar as etapas envolvidas na padronização, execução e avaliação dos controles de qualidade em reações de imuno-histoquímica para a pesquisa de agentes infecciosos, conduzidas pelo laboratório de imuno-histoquímica do Núcleo de Anatomia Patológica, do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. Para isso, foi conduzido um levantamento de dados por meio da ficha de controle de qualidade, a fim de avaliar os controles positivos de *Leptospira interrogans* nas reações de imuno-histoquímica nos últimos cinco anos (2019 a 2023). Foram propostas sugestões significativas para aprimorar a ficha de controles positivos do NAP-IAL, incluindo os parâmetros de dificuldade encontrados com mais frequência pelos patologistas na validação de controles positivos. A implementação de procedimentos rigorosos de controle de qualidade se revela fundamental para reduzir a variabilidade técnica e assegurar a consistência dos dados gerados. Portanto, investir em um controle de qualidade robusto na execução da técnica de imuno-histoquímica é uma medida essencial para manter os mais elevados padrões de excelência e segurança na prática clínica, especialmente na de agentes infecciosos que requerem diagnósticos precisos e minuciosos.

Palavras-chave: agentes infecciosos; controle de qualidade; imuno-histoquímica

INTRODUÇÃO

A imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica valiosa utilizada na área de patologia para identificar, localizar e quantificar proteínas e antígenos específicos em amostras de tecido. Essa técnica combina princípios da imunologia e histologia para identificar antígenos específicos relacionados à infecção em células e tecidos, ao utilizar anticorpos que se ligam aos antígenos de interesse. No entanto, para obter resultados precisos e confiáveis, é



essencial implementar um rigoroso controle de qualidade durante todo o processo (BOGEN et al., 2016).

O exame imuno-histoquímico envolve um processo complexo, composto por diversas etapas fundamentais, desde a fixação do tecido até a interpretação dos resultados. Durante cada etapa, podem ocorrer variações que podem afetar a qualidade dos resultados. O controle de qualidade desempenha um papel crucial na identificação e minimização dessas variações (FERRO, 2014).

Como enfatiza a RDC nº786/2023 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que normatiza laboratórios de Anatomia Patológica, os controles são utilizados para estabelecer padrões de referência, monitorar e verificar a exatidão dos procedimentos e identificar possíveis variações que possam afetar os resultados (ANVISA, 2023). Neste contexto, garantem vantagens cruciais proporcionadas pelo uso adequado de controles, tais como:

- Garantia de precisão: os controles são amostras com concentrações conhecidas e estáveis, que servem como base de comparação para as medições em curso. Ao analisar o desempenho do controle e compará-lo com o resultado desejado, é possível verificar a exatidão do método empregado, reduzindo a probabilidade de erros sistemáticos e aumentando a confiabilidade dos resultados obtidos.
- Monitoramento da qualidade: o uso regular de controles permite que o laboratório monitore a consistência e a estabilidade do processo ao longo do tempo. Variações indesejadas nos resultados podem ser detectadas precocemente, possibilitando a correção de falhas e a melhoria contínua dos procedimentos.
- Detecção de erros e falhas: quando os controles fornecem resultados fora do esperado, isso sinaliza a ocorrência de erros ou falhas no processo analítico. Essa detecção rápida permite ações corretivas imediatas, evitando que resultados incorretos sejam liberados e possam afetar diagnósticos, pesquisas ou qualquer outro trabalho que dependa da precisão das análises.
- Validação e acreditação: em laboratórios que buscam certificação ou acreditação, o uso de controles é uma parte essencial do processo. Os órgãos reguladores exigem evidências sólidas de que as análises são realizadas com precisão e confiabilidade, e os controles desempenham um papel crítico ao fornecer essa validação.
- Aumento da confiança dos clientes: a aplicação rigorosa de controles demonstra o compromisso do laboratório com a excelência analítica, aumentando a confiança dos clientes nos resultados fornecidos.
- Controle de qualidade externo: o uso de controles permite a rastreabilidade dos resultados ao longo do tempo e entre diferentes laboratórios, especialmente quando se utilizam controles certificados. Isso facilita a comparação de dados e a padronização de procedimentos, garantindo maior uniformidade na comunidade científica.

É, contudo, imprescindível que esses controles sejam implementados e monitorados de forma adequada, seguindo as melhores práticas da área, para que as vantagens mencionadas possam ser plenamente aproveitadas.

Segundo o College of American Pathologists (CAP) a validação dos protocolos de IHQ é necessária para estabelecer condições experimentais ótimas que garantam resultados precisos. A validação inclui a determinação da eficiência de recuperação antigênica, a padronização das concentrações de anticorpos e reagentes, a escolha do sistema de detecção apropriado e a definição de critérios de positividade e negatividade. A validação deve ser



realizada em diferentes tipos de tecido, considerando a heterogeneidade de expressão antigênica e especificidade cruzada (DABBS, 2019).

O Nordic Immunohistochemical Quality Control (NordiQC) enfatiza que os anticorpos são um dos principais componentes da análise imuno-histoquímica e a seleção de anticorpos adequados é essencial para garantir resultados precisos. É fundamental utilizar anticorpos altamente específicos e validados para o alvo desejado. Além disso, é importante padronizar as concentrações dos anticorpos, bem como avaliar sua reatividade e especificidade por meio de controles positivos e negativos (NIELSEN, 2015).

A escolha dos anticorpos e reagentes adequados é um passo crucial na imuno-histoquímica. A seleção de anticorpos deve considerar a especificidade, sensibilidade e afinidade para o antígeno de interesse. Os anticorpos policlonais são produzidos a partir de uma variedade de células B em resposta a um antígeno complexo, reconhecendo múltiplos epítomos. São uma mistura heterogênea, geralmente obtida do soro de animais expostos ao antígeno. Por outro lado, os anticorpos monoclonais derivam de uma única população de células B geneticamente idênticas, sendo altamente específicos para um único epítopo. São uniformes e produzidos por técnicas avançadas de biologia molecular, com aplicações fundamentais em áreas como terapia de câncer e diagnósticos precisos (HAMA et al., 2022).

Nesse sentido, como ressalta Bogen et al. (2016), o uso de controles positivos e negativos é essencial para verificar a eficiência da técnica e identificar qualquer variação indesejada na reação de imuno-histoquímica. Os controles positivos são amostras de tecido conhecidas por expressarem o antígeno de interesse, enquanto os controles negativos são amostras de tecido que não expressam o antígeno. A inclusão desses controles permite avaliar a sensibilidade, especificidade e validade dos resultados.

Os controles garantem que todas as etapas sejam executadas corretamente, desde a preparação da amostra até a detecção final do antígeno. Eles ajudam a identificar possíveis problemas técnicos e a evitar resultados falsos ou inconclusivos. Os reagentes utilizados na imuno-histoquímica possuem uma vida útil limitada e seu desempenho pode se deteriorar ao longo do tempo. É fundamental verificar a validade dos reagentes, incluindo anticorpos, corantes e reagentes de detecção, para garantir resultados confiáveis (VYBERG et al., 2005).

A imuno-histoquímica desempenha um papel fundamental na detecção, caracterização e compreensão das doenças infecciosas. Ela oferece uma abordagem poderosa para identificar agentes infecciosos em amostras de tecido, avaliar a resposta imune e elucidar os mecanismos patológicos subjacentes. Com sua aplicação adequada e controle de qualidade, a IHQ contribui significativamente para o diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Neste estudo, buscou-se, abordar as etapas que envolvem a padronização, execução e a avaliação dos controles de qualidade nas reações de imuno-histoquímica para a pesquisa de agentes infecciosos, realizadas pelo laboratório de imuno-histoquímica do Núcleo de Anatomia Patológica (NAP), do Centro de Patologia (CP) do Instituto Adolfo Lutz (IAL). Enfatizando a importância de dedicar a devida atenção a esse aspecto fundamental da validação analítica.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de revisão da literatura com levantamento de dados, visando disponibilizar uma síntese das evidências relacionadas ao controle de qualidade interno aplicado nas reações de imuno-histoquímica realizadas pelo Núcleo de Anatomia Patológica,



do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. Para exemplificar melhor a dinâmica dos controles positivos dentro das reações de imuno-histoquímica, avaliamos o desempenho do controle interno para a pesquisa de *Leptospira interrogans* nas reações de imuno-histoquímica no período de 2019 a 2023. Para isso, analisamos os parâmetros do controle positivo de *Leptospira interrogans* em cada reação e os principais apontamentos feitos pelos patologistas na ficha de controles positivos do NAP-IAL, identificada pelo código A-NAP-0081.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seleção do marcador para a detecção do agente infeccioso *Leptospira interrogans* se deu devido à sua relevância no contexto da saúde pública para o diagnóstico da leptospirose, uma doença com ocorrência em todo o território brasileiro, especialmente em áreas com condições precárias de saneamento básico, conforme relatado por Grumann et al (2017) e Hama et al. (2022). Patologia esta que representa um número significativo de casos nas reações de imuno-histoquímica realizadas ao longo do ano pelo Núcleo de Anatomia Patológica, do Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. A Tabela 1 apresenta em detalhes os dados coletados no período de 2019 a 2023.

Tabela 1 - Reações de imuno-histoquímica realizadas pelo NAP-IAL.

Ano	Total de reações NAP-IAL	Total de reações com o marcador <i>Leptospira interrogans</i>	Reações com controles (+) satisfatórios de <i>Leptospira interrogans</i> (%)	Reações com controles (+) insatisfatórios de <i>Leptospira interrogans</i> (%)
2019	72	53	77,4	22,6
2020	70	24	83,3	16,7
2021	84	22	72,8	27,2
2022	95	53	81,1	18,9
2023	60	48	54,2	45,8

Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Um dado digno de nota, é que nos anos de 2020 e 2021 houve o advento da pandemia do COVID-19, onde pelo Decreto Estadual nº64.880 de 20 de março de 2020, que se decretou a pandemia, foram suspensas as autópsias no estado de São Paulo, fato esse que levou a uma queda considerável das investigações de vigilância epidemiológica da leptospirose proveniente das amostras de autópsias que são recebidas pelo Instituto Adolfo Lutz.

A ficha de controle de qualidade interno para controles positivos do NAP-IAL é dividida em dois parâmetros: controles satisfatórios e insatisfatórios. Satisfatórios são controles que funcionaram e validaram o marcador na reação, e insatisfatórios são os que não funcionaram e não permitiram à validação do marcador na reação, entretanto, analisando-se todas as reações com *Leptospira interrogans* no período de 2019 a 2023, notamos sinalizações recorrentes dos patologistas aos controles insatisfatórios, sendo elas “ruim, fraco, presença de precipitado, borrado e reação de fundo”. Verificando-se os dados obtidos, juntamente com os patologistas do NAP-IAL, algumas considerações importantes foram feitas a respeito dos critérios de avaliação dos controles positivos, levando em conta, essencialmente, a performance da marcação, auxílio e/ou impacto no diagnóstico.



Os controles designados como “satisfatórios/bons” representam controles que alcançaram os critérios esperados. Eles exibem uma marcação visível de IHQ, facilmente identificável e localizável na área tecidual-alvo, sem interferências na leitura sob microscopia óptica. Esse padrão permite a validação do marcador dentro da reação, conforme descrito por David Dabbs (2019), ilustrado nas Figuras 1 e 2.

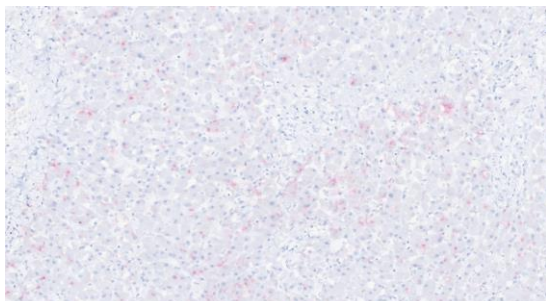


Figura 1 - Lâmina controle de *Leptospira interrogans* avaliada como “satisfatório/bom” em aumento final de 100x.
Fonte: elaborado pelo autor (2023).

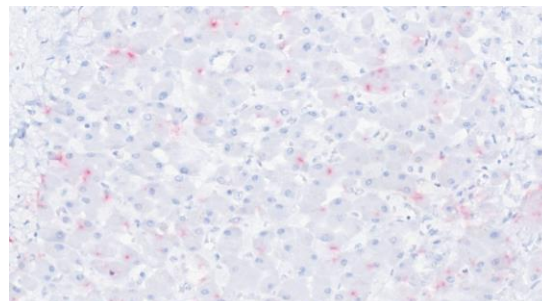


Figura 2 - Lâmina controle de *Leptospira interrogans* avaliada como “satisfatório/bom” em aumento final de 400x.
Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Nos controles sinalizados como “insatisfatórios”, nota-se que há divisões dentro deste mesmo parâmetro, pois, os parâmetros que interferem na visualização ou impediram a mesma são variados. Dentre eles, o que impossibilita o diagnóstico e a validação do marcador é o parâmetro “ruim”, pois este entende-se que o controle não atingiu seu objetivo, não sendo possível encontrar a marcação de IHQ esperada, necessitando obrigatoriamente, a repetição da reação para aquele marcador.

No que se refere ao parâmetro de avaliação “fraco”, a questão crítica envolve a possibilidade de o controle propiciar uma interpretação incorreta da marcação de IHQ, o que pode levar a diagnósticos equivocadamente negativos devido à leve intensidade da marcação. Especialmente na leptospirose, onde a marcação já é conhecida por ser delicada e sutil, como demonstrado por Girio et al. (2004).

No parâmetro de avaliação “presença de precipitado”, o principal desafio reside na observação da marcação da IHQ, que é dificultada pela presença de artefatos que podem ser confundidos com a marcação ou até mesmo impedir sua visualização nas áreas alvo do tecido. No caso da leptospirose, são as células de kupffer, conforme relatado no estudo de David Dabbs (2019).

O parâmetro de avaliação “borrado” apresenta como principal desafio no diagnóstico a perda de nitidez na marcação IHQ, decorrente de resíduos de reagentes utilizados durante a reação de imuno-histoquímica, como, por exemplo, o tampão de lavagem. Tal interferência vai de encontro a mesma problemática encontrada por Grumann et al. (2017).

No parâmetro “reação de fundo”, ocorre à marcação em áreas do tecido que não deveriam ser marcadas, seja por serem sabidamente negativas ou por não estarem devidamente padronizadas (marcações inespecíficas) para a detecção de *Leptospira interrogans*, exemplificada por Girio et al. (2004), impossibilitando o diagnóstico e podendo ocasionar em falsos positivos.

Os dados obtidos são consistentes com os achados da literatura, reforçando a importância de um diagnóstico minucioso para agentes infecciosos. Foram propostas sugestões significativas para aprimorar a ficha de controles positivos do NAP-IAL, incluindo os parâmetros de dificuldade encontrados com mais frequência pelos patologistas na



validação de controles positivos. Isso leva a uma conduta aprimorada no tratamento dos controles com avaliações insatisfatórias, promovendo uma comunicação mais clara e eficiente entre os patologistas e os analistas do NAP-IAL.

CONCLUSÕES

O controle de qualidade desempenha um papel fundamental na técnica de imuno-histoquímica, garantindo a confiabilidade e precisão dos resultados obtidos. Ao implementar rigorosos procedimentos de controle interno, é possível minimizar a variabilidade técnica e assegurar a consistência dos dados gerados. Isso não apenas aumenta a confiabilidade dos diagnósticos e pesquisas baseadas em IHQ, mas também promove avanços na compreensão e tratamento de diversas condições patológicas, especialmente na de agentes infecciosos que exigem um diagnóstico minucioso. Portanto, investir em um controle de qualidade robusto na execução da técnica de imuno-histoquímica é uma medida essencial para manter os mais elevados padrões de excelência e segurança na prática clínica e na pesquisa científica.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de expressar nossos sinceros agradecimentos ao Grupo Fleury, e em especial ao Dr. Tomás Zecchini Barrese, cuja generosa contribuição de tempo e esforço para digitalização das imagens das lâminas de controles (+) de *Leptospira interrogans*, desempenhou um papel fundamental no êxito deste projeto. O apoio foi vital e verdadeiramente apreciado.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada nº 786, de 5 de maio de 2023. Diário Oficial da União, (2023). Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-786-de-5-de-maio-de-2023-482394228>. Acesso em [12-08-2023].

BOGEN, S. A.; WANG, C.; SHAN, X. et al. Guidelines for validation of immunohistochemical assays. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 140, 908-910, (2016).

DABBS, David J. Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications. Ed. Saunders Elsevier, (2019).

FERRO, Amadeu Borges. Imunohistoquímica. Politécnico de Lisboa – Repositório Científico: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, (2014). Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.21/4569>. Acesso em: [02-08-2023].

GIRIO, Raul J. S.; PEREIRA, Fernando L. G.; FILHO, Moacir M.; MATHIAS, Luís. A.; HERREIRA, Rita C. P.; ALESSI, Antônio C.; GIRIO, Thaís M. S. Pesquisa de anticorpos contra *Leptospira spp.* em animais silvestres e em estado feral da região de Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil: utilização da técnica de imuno-histoquímica para detecção do agente. Ciência Rural. 34, 165–169 (2004).

GRUMANN, Marta R.; DA SILVA, Zigomar; DA LUZ, Flávia S.; FILHO, José R. S.; MACHADO, Tanise P.; COSTA, Marcio M.; VIEIRA, Maria I. B.; DA MOTTA, Adriana C. Uso da imuno-histoquímica no diagnóstico de leptospirose em primatas neotropicais. Acta Scientiae Veterinariae. 45, 1-7, (2017).



HAMA, Hamadou Oumarou; ABOUDHARAM, Gérard; BARBIERI, Rémi; LEPIDI, Hubert; DRANCOURT, Michel. Immunohistochemical diagnosis of human infectious diseases: a review. *Diagnostic Pathology*. 17, (2022).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças infecciosas e parasitárias. Guia de Bolso – Série B. Textos Básicos de Saúde, (2010). Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_gui_bolso.pdf. Acesso em: [24-07-2023].

NIELSEN, Soren. External quality assessment for immunohistochemistry: experiences from NordiQC. *Biotechnic and Histochemistry*. 90, 331–340, (2015).

SECRETÁRIA DA SAÚDE E DA SEGURANÇA PÚBLICA. Decreto Estadual N°64.880, de 20 de março de 2020. Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo (ALESP), (2020). Disponível em: <https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/decreto/2020/decreto-64880-20.03.2020.html>. Acesso em [18-06-2023].

VYBERG, Mogens; TORLAKOVIC, Emina; SEIDAL, Tomas; RISBERG, Bjorn; HELIN, Heikki.; NIELSEN, Soren. Nordic immunohistochemical quality control. *Croatian Medical Journal*. 46, 368–371 (2005).



Capítulo 24

DOI: 10.53934/20242-24

VIGILÂNCIA DO VÍRUS INFLUENZA: IMPORTÂNCIA DO ENSAIO FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA VIRAL

Viviane Ya Ting Hsu¹, Fabiana Cristina Pereira dos Santos²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – NDR/CV – IAL; E-mail: vivianehsu@outlook.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Doenças Respiratórias – CV, Instituto Adolfo Lutz

Resumo: A influenza é uma infecção aguda do sistema respiratório causada pelo vírus influenza. Os vírus tipos A e B são os de expressivo impacto na saúde pública. O influenza A, responsável por importantes pandemias e maior morbimortalidade, é classificado de acordo com a combinação de duas glicoproteínas presentes em sua superfície, a hemaglutinina (HA), que facilita a ligação com a célula-alvo e auxilia a entrada do genoma viral no citoplasma, além de ser o componente viral de reconhecimento imunológico utilizado para composição das vacinas, e a neuraminidase (NA), que facilita a liberação de novas partículas virais da célula-alvo. A primeira linha de tratamento contra influenza é a utilização de inibidores de neuraminidase (NAI), sendo o oseltamivir (Tamiflu®) e zanamivir (Relenza®) os representantes dessa classe medicamentosa utilizadas no Brasil e disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS) como parte do componente estratégico. O programa da rede global de vigilância da influenza realiza a caracterização antigênica e genética dos vírus circulantes para monitoramento do escape vacinal, e a suscetibilidade e resistência aos antivirais por ensaios de fluorescência (NA-Fluor) e quimioluminescência (NA-Star e NA-XTD) para garantir a eficácia do tratamento e atualização vacinal. Este monitoramento é essencial para determinar o papel dos antivirais específicos nos próximos eventos de ampla disseminação viral. O objetivo deste trabalho foi apresentar brevemente sobre os tipos de testes de suscetibilidade antiviral dos vírus e o seu papel na vigilância do influenza, visando subsidiar a implantação futura da metodologia no Centro Nacional para Influenza no NDR/IAL-SP.

Palavras-chave: Farmacorresistência viral; Influenza; Oseltamivir; Variabilidade fenotípica; Vigilância epidemiológica

INTRODUÇÃO

A influenza, conhecida como gripe, é uma infecção aguda do sistema respiratório, cuja principal forma e a mais eficaz de controlar a disseminação e diminuir a frequência dos casos graves e de óbito é a vacinação que, no Brasil, é disponibilizada no Sistema Único de Saúde através do Programa Nacional de Imunização (PNI) (BRASIL, 2018; BRASIL, [s.d.]; CDC, 2022). O influenza vírus tipo A (IAV), responsável pelas grandes pandemias registradas, pode ser subtipado de acordo com a combinação das glicoproteínas presentes em sua superfície, a hemaglutinina (HA ou H) e neuraminidase (NA ou N) (BRASIL, [s.d.]; DUWE, 2017; LAMPEJO, 2020). As diversidades antigênicas por meio do *drift* e *shift* antigênico que ocorrem nessas glicoproteínas podem conferir às novas cepas do vírus a



habilidade de se esquivar da imunização por vacinação, assim como conferir a elas resistência aos antivirais (BRASIL, 2016; DUWE, 2017; LAMPEJO, 2020).

Os inibidores de neuraminidase (NAI), cujos representantes são oseltamivir e zanamivir, é a classe de antivirais de primeira linha para prevenção e tratamento de influenza no Brasil, e atuam inibindo seletivamente a neuraminidase do vírus (BRASIL, 2018). Por mais que os vírus influenza circulantes sejam suscetíveis aos NAIs, entre 2007 e 2008, foram detectadas cepas com a mutação H275Y, que apresenta resistência natural ao oseltamivir (AIT-AISSA *et al.*, 2017; CDC, 2016; DUWE, 2017; KIM *et al.*, 2020; KRAMMER *et al.*, 2018; LAMPEJO, 2020; LEE, HURT, 2018; LINA *et al.*, 2018; MURTAUGH *et al.*, 2013; OKOMO-ADHIAMBO *et al.*, 2012).

O Instituto Adolfo Lutz (IAL), como um laboratório de referência regional (LRR) e centro de referência nacional para influenza (NIC, do inglês *National Influenza Center*), participa do monitoramento do vírus através da vigilância amostral das unidades sentinelas de Síndrome Gripal (SG) e vigilância universal da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), realizando a detecção do vírus por RT-qPCR e sequenciamento genético, visando a implantação de ensaios fenotípicos para melhorar o monitoramento e a investigação de resistência aos antivirais, de forma a proporcionar um melhor tratamento para os pacientes. Colabora também com o envio amostral para o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) para a composição anual da vacina para o hemisfério sul (BRASIL, 2016; WHO, 2022).

Devido aos fatores apresentados, este trabalho busca abordar brevemente sobre os ensaios de suscetibilidade e ressaltar a importância da resistência antiviral e seu papel na vigilância dos vírus influenza, de forma a embasar a futura implementação da metodologia no Centro Nacional para Influenza no NDR/IAL-SP.

METODOLOGIA

Para o presente trabalho foi realizado uma revisão sistemática com base em artigos científicos publicados em periódicos indexados em base de dados como *Google Scholar*, *PubMed*, *Wiley*, *Lilacs* e outros semelhantes. A pesquisa foi realizada com as seguintes palavras-chaves, isoladas ou combinadas: influenza, ensaio fenotípico, resistência, suscetibilidade antiviral, inibidor de neuraminidase, oseltamivir, tamiflu, vigilância e seus equivalentes em língua inglesa. A busca pelos artigos foi realizada entre os meses de maio a outubro de 2023, dando preferências a publicações mais recentes respeitando o intervalo de 2010 a 2023, com enfoque em ensaios fenotípicos de resistência ao antiviral especificamente voltado aos inibidores de neuraminidase, com foco no oseltamivir como contribuição para a vigilância no Brasil e para a rede global de vigilância da influenza. Estudos que abordem sobre o ensaio realizado em animais e/ou outros fármacos da classe dos NAI, exceto oseltamivir e zanamivir, não foram incluídos devido à incompatibilidade com foco deste trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As mutações virais podem ser detectadas por sequenciamento clássico, pirosequenciamento, RT-PCR, PCR digital ou por análise da curva de *melting* dos produtos de amplificação de PCR e entre outras metodologias, que são técnicas sensíveis e não necessitam do isolamento viral. Contudo a detecção de resistência por ensaios genotípicos é cara e somente válida para mutações específicas já conhecidas ou com comprovação da



resistência *in vitro* (DUWE, 2017; LAMPEJO, 2020; LAPLANTE, ST. GEORGE, 2014; LINA *et al.*, 2018; OH *et al.*, 2023). A mudança de um único nucleotídeo, por mais que não interfira na tradução de RNAm, ou seja, não substitua o aminoácido e não altere o perfil de resistência, pode resultar na ineficiência dos ensaios moleculares devido a perda de sinal de detecção. Este fato ressalta a importância de constantes estudos que propiciem atualizações nas sequências genômicas e dos ensaios genotípicos, demonstrando também a necessidade e a relevância dos ensaios fenotípicos, que não dependem do sequenciamento e, por conseguinte, são menos suscetíveis a essas alterações (LAPLANTE, ST. GEORGE, 2014). Sendo assim, a correlação entre a presença da mutação relacionada com resistência e a sua ocorrência *in vitro* ainda é incerta e podem existir mutações não identificadas, impossibilitando a detecção somente por análise genotípica (DUWE, 2017).

Enquanto a detecção de resistência por ensaios genotípicos são o padrão ouro para classe das adamantonas, para os NAIs o padrão ouro são os ensaios fenotípicos, seguidos de confirmação por ensaios genotípicos, tais quais, o pirosequenciamento e sequenciamento da neuraminidase por Sanger, que também são aplicadas para identificação de marcadores de resistência das demais classes de antivirais, os adamantanos, NAIs e os não NAIs, que incluem os inibidores da polimerase (baloxavir marboxil, favipiravir, pimodivir), nitazoxanide e DAS181, que se encontra nas fases finais do estudo clínico (AIT-AISSA *et al.*, 2018; DUWE, 2017; KRAMMER *et al.*, 2018; LEE, HURT, 2018; OH *et al.*, 2023; OKOMO-ADHIAMBO *et al.*, 2012; ZAMBON, 2012). Ao estabelecer a vigilância viral com duas estratégias, genotípicas e fenotípicas, evita-se a interpretação equivocada dos resultados individualizados, permitindo otimizar as ações da vigilância focando nas variantes que efetivamente representam uma ameaça para saúde pública (ZAMBON, 2012).

Os ensaios fenotípicos para determinação de suscetibilidade aos NAIs, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), são os ensaios por fluorescência (NA-Fluor) e quimioluminescência (NA-Star e NA-XTD) disponibilizados por kits comerciais e dependentes de isolamento viral, porém permitem a determinação da concentração inibitória de 50% (IC₅₀) (DUWE, 2017; HODGES *et al.*, 2019; OH *et al.*, 2023; OKOMO-ADHIAMBO *et al.*, 2012; WHO, c2023). A escolha para o ensaio ideal depende de fatores relacionados à capacidade de adequação do laboratório quanto ao custo, sustentabilidade, velocidade de obtenção dos resultados, confiabilidade dos valores obtidos e acessibilidade, sendo essencial criar critérios que definam a suscetibilidade e identifiquem casos que necessitam de maiores investigações (MURTAUGH *et al.*, 2013; OKOMO-ADHIAMBO *et al.*, 2012).

Devido à dependência do isolamento viral, os ensaios fenotípicos não são ensaios imediatos, não sendo ideais para diagnósticos rápidos. Visando melhorar o rendimento do ensaio fenotípico, está em desenvolvimento o iART (*Influenza Antiviral Resistance Test*), uma alternativa de ensaio fenotípico voltada para pesquisa, capaz de ser realizado diretamente sobre as amostras clínicas e de detectar o vírus influenza com inibição reduzida ou inibição altamente reduzida ao oseltamivir, o que otimizaria o acompanhamento no tratamento com o antiviral (HODGES *et al.*, 2019; LEE, HURT, 2018; OKOMO-ADHIAMBO *et al.*, 2012). Ao realizar preferencialmente o ensaio fenotípico, é possível realizar a detecção de resistência independentemente de ser causada por uma mutação comum, rara ou até mesmo por uma nova mutação, independente da realização do ensaio genotípico (KRAMMER *et al.*, 2018; LAPLANTE, ST. GEORGE, 2014; LEE, HURT, 2018; TREURNICHT *et al.*, 2018).

Os valores de IC₅₀ não podem ser diretamente relacionados à concentração de fármaco necessária para inibir a replicação viral no paciente infectado, visto que os



parâmetros clínicos ainda precisam ser estabelecidos e a identificação de resistência nos isolados virais é para vigilância do vírus influenza (DUWE, 2017; LEE, HURT, 2018; LINA *et al.*, 2017). A versatilidade dos ensaios e dos substratos utilizados no isolamento viral e a ausência de *cut off*, além de amostras que tenham a presença combinada de vírus resistentes e sensíveis, são fatores que impedem a correlação direta entre IC₅₀ e resistência clínica (LINA *et al.*, 2017; OKOMO-ADHIAMBO *et al.*, 2012; ZAMBON, 2012). Embora o valor de *cut off* não tenha sido definido para classificar a resistência clínica, a OMS e os GISRS adotam que o valor de IC₅₀ de 10 a 100 vezes maior em comparação com a atividade da neuraminidase não tratada com o antiviral, apresentam suscetibilidade reduzida e, se maior que 100 vezes, suscetibilidade altamente reduzida, como referência para caracterização da suscetibilidade do vírus através da concentração de inibição (AIT-AISSA *et al.*, 2017; BRAGSTAD *et al.*, 2019; DUWE, 2017; LAPANTE, ST. GEORGE, 2014; LEE, HURT, 2018; KIM *et al.*, 2020; OH *et al.*, 2023).

Para a vigilância do uso de NAIs a prioridade dos laboratórios deve ser em estabelecer uma metodologia padronizada, realizar a investigação quanto à resistência natural, sem histórico de uso prévio do antiviral e a caracterização dos vírus circulantes (KIM *et al.*, 2020; ZAMBON, 2012). Com a baixa cobertura vacinal e baixa efetividade das vacinas, o monitoramento constante do tratamento através do ensaio de suscetibilidade aos inibidores de neuraminidase torna-se crucial, devendo ser realizado principalmente, porém não exclusivamente, em pacientes imunocomprometidos, pacientes que apresentam alto risco de desenvolver casos graves e crianças que não estejam obtendo resposta ao tratamento, por conta dos altos riscos e da rapidez que a resistência pode ser desenvolvida durante o tratamento ou devido ao aumento da população viral que apresenta a resistência (BRAGSTAD *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2020; KRAMMER *et al.*, 2018; LAMPEJO, 2020; LAPLANTE, ST. GEORGE, 2014; OH *et al.*, 2023; TREURNICHT *et al.*, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o monitoramento do influenza, é importante que sejam realizados os ensaios de resistência, para uma amostragem significativa de todos os tipos e subtipos de influenza detectados, tanto por ensaios genotípicos quanto fenotípicos, para melhor estruturação e historicidade das mutações virais, potencializando as medidas coletivas de imunização e delineando com maior embasamento e precisão as ações frente a possíveis surtos. Além de contribuir para a vigilância da resistência aos inibidores de neuraminidase (NAI), que até então, são a principal classe medicamentosa para profilaxia e tratamento de influenza, por mais que novas classes de antivirais e fármacos têm sido desenvolvidos e outros introduzidos no mercado. Não excluindo a necessidade de reforçar as campanhas anuais de imunização contra influenza, a fim de auxiliar a diminuição do uso de antivirais e conseqüentemente os casos de resistência.

As informações concebidas por esses ensaios podem auxiliar na gestão de recursos para obtenção de medicamentos eficazes para o tratamento das cepas circulantes, de forma a garantir a segurança do paciente tornando, seu tratamento mais bem direcionado e preciso. Por fim, o investimento na implementação dos ensaios de resistência aos antivirais no IAL fortalecerá a vigilância laboratorial do vírus Influenza na sua área de abrangência e produzirá informações relevantes que preencherão lacunas sobre o fenótipo viral que a vigilância genômica não pode responder isoladamente, as quais são essenciais para o planejamento de estratégias para proteger a saúde da população.



REFERÊNCIAS

AIT-AISSA, A.; DERRAR, F.; HANNOUN, D.; GRADI, EL.A.; SCARAVELLI, D.; BOUSLAMA, Z. Surveillance for antiviral resistance among influenza viruses circulating in Algeria during five consecutive influenza seasons (2009-2014). **Journal of Medical Virology**, Argel, v.90, n.5, p.844-853, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.25029>. Acesso em: 10 out. 2023.

BRAGSTAD, K.; HUNGNES, O.; LITLESKARE, I.; NYREROD, H.C.; DORENBERG, D.H.; HAUGE, S.H. Community spread and late season increased incidence of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses in Norway. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, Oslo, v.13, n.4, p.372-381, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/irv.12637>. Acesso em: 05 ago. 2023.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Guia para a Rede Laboratorial de Vigilância de Influenza no Brasil** [recurso eletrônico]. Brasília, 2016. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_laboratorial_influenza_vigilancia_influenza_brasil.pdf. Acesso em: 21 jun. 2023.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Protocolo de tratamento de influenza: 2017**. Brasília, 2018. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_tratamento_influenza_2017.pdf. Acesso em: 26 maio 2023.

Brasil. Ministério da Saúde. **Gripe (Influenza)**. [s.d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/g/gripe-influenza>. Acesso em: 26 maio 2023.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Influenza (Flu). What you need to know. Atualizado em: 24/10/222. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/keyfacts.htm>. Acesso em: 26 maio 2023.

CDC. Centers for Disease Control and prevention. Antiviral Drug Resistance among Influenza Viruses. Guidance on the Use of Influenza Antiviral Agents. Atualizado 03/11/2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/antiviral-drug-resistance.htm>. Acesso em: 14 ago. 2023.

DUWE, S. Influenza viruses - antiviral therapy and resistance. **GMS Infectious Disease**, Berlim, v.5, doc.4, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.3205/id000030>. Acesso em: 26 maio 2023.

HODGES, E.N.; MISHIN, V.P.; DE LA CRUZ, J.; GUO, Z.; NGUGYEN, H.T.; FALLOWS, E.; *et al.* Detection of oseltamivir-resistant zoonotic and animal influenza A viruses using the rapid influenza antiviral resistance test. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, Atlanta, v.13, n.5, p.522-527, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/irv.12661>. Acesso em: 07 ago. 2023.

KRAMMER, F.; SMITH, G.J.D.; FOUCHIER, R.A.M.; PEIRIS, M.; KEDZIERSKA, K.; DOHERTY, P.C.; *et al.* Influenza. **Nature Reviews Disease Primers**, Nova Iorque, v.4, n.1, p.3, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>. Acesso em: 04 out. 2023.



- KIM, H.M.; LEE, N.J.; KIM, M.S.; KANG, C.; CHUNG, Y.S. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza virus isolates from immunocompromised patients in the Republic of Korea. **Virology Journal**, Cheongju-si, v.17, n 94, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01375-1>. Acesso em: 24 ago. 2023.
- LAMPEJO, T. Influenza and antiviral resistance: an overview. **European Journal of Clinical microbiology & Infectious Diseases**. Londres, v.39, n.7, p.1201-1208, Epub 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s0096-020-03840-9>. Acesso em: 31 maio 2023.
- LAPLANTE, J.; ST. GEORGE, K. Antiviral Resistance in Influenza Viruses: Laboratory Testing. **Clinics in Laboratory Medicine**, Nova Iorque, v.34, n.2, p.387-408, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.02.010>. Acesso em: 10 out. 2023.
- LEE, N.; HURT, A.C. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza: a clinical perspective. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Edmonton, v.31, n.6, p. 520-526, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.1097/QCO.0000000000000498>. Acesso em: 30 jun. 2023.
- LINA, B.; BOUCHER, C.; OSTERHAUS, A.; MONTA, A.S.; SCHUTTEN, M.; WHITLEY, R.J.; NGUYEN-VAN-TAM, J.S. Five years of monitoring for the emergence of oseltamivir resistance in patients with influenza A infections in the Influenza Resistance Information Study. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, Lyon, v.12, n.2, p.267-278, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/irv.12534>. Acesso em: 08 jun. 2023.
- MURTAUGH, W.; MAHAMAN, L.; HEALEY, B.; PETERS, H.; ANDERSON, B.; TRAN, M.; *et al.* Evaluation of Three Influenza Neuraminidase Inhibition Assays for use in a Public Health Laboratory Setting During the 2011–2012 Influenza Season. **Public Health Reports**, Baltimore, v.128, Suppl 2(Suppl 2), p.75-87, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1177/00333549131280S212>. Acesso em: 06 jun. 2023.
- OH, D.Y.; MILDE, J.; HAM, Y.S.; CALDERÓN, J.P.R.; WEDDE, M.; DUREWALD, R.; *et al.* Preparing for the Next Influenza Season: Monitoring the emergence and spread of antiviral resistance. **Infection and Drug Resistance**, Berlim, v.16, p.949-959, 2023. DOI: <https://doi.org/10.2147/IDR.S389263>. Acesso em: 06 set. 2023.
- OKOMO-ADHIAMBO, M.; SHEU, T.G.; GUBAREVA, L.V. Assays for monitoring susceptibility of influenza viruses to neuraminidase inhibitors. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, Atlanta, v.7, n.1; p.44-49, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/irv.12051>. Acesso em: 05 set. 2023.
- TREURNICHT, *et al.* Replacement of neuraminidase inhibitor-susceptible influenza A(H1N1) with resistant phenotype in 2008 and circulation of susceptible influenza A and B viruses during 2009-2013, South Africa. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, Joanesburgo, v.13, n.1, p.54-63, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/irv.12611>. Acesso em: 25 set. 2023.
- WHO. World Health Organization. 70 years of GISRS – the Global Influenza Surveillance & Response System. Publicado 19/09/2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/seventy-years-of-gisrs---the-global-influenza-surveillance---response-system>. Acesso em: 17 ago. 2023.



WHO. World Health Organization. Laboratory methodologies for testing the antiviral susceptibility of influenza viruses: Neuraminidase inhibitor (NAI). c2023. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/laboratory-network/quality-assurance/antiviral-susceptibility-influenza/neuraminidase-inhibitor>. Acesso em: 22 ago. 2023.

ZAMBON, M.C. Surveillance for antiviral resistance. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, Londres, v.7, n.s1, p.37-43, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/irv.12050>. Acesso em: 10 out. 2023.



Capítulo 25

DOI: 10.53934/20242-25

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS TRANS EM ÓLEOS DE SOJA

Tatiane Santos Conceição Machado¹; Mahyara Markievicz Mancio Kus Yamashita²

¹Estudante do Curso de Especialização Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - NQSA – IAL; E-mail: tatianesc2023@gmail.com.

²Docente/pesquisador do Núcleo de Química, Física e Sensorial – NQSA – IAL

Resumo: Os impactos causados com o consumo de ácidos graxos *trans* (AGT's) na alimentação tem motivado uma série de estudos em relação aos malefícios associados ao seu alto consumo, este estudo reforça a importância de manter os níveis de AGT's dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA como medida de saúde pública. O objetivo deste estudo foi avaliar os teores de AGT's em óleos de soja, com ênfase nas regulamentações vigentes. Foram analisadas 36 amostras de óleos de soja, de diferentes marcas e lotes, coletadas pela Vigilância Sanitária durante Programas de Monitoramento entre 2022 e 2023. A metodologia envolveu a transesterificação alcalina de hidróxido de potássio (KOH) metanólico 2 mol.L⁻¹, conforme o método IUPAC 2301, com modificações do Instituto Adolfo Lutz. Foi utilizada a cromatografia gasosa como técnica analítica para determinar os teores de AGT's, com coluna capilar de sílica fundida. A identificação dos componentes foi realizada com o auxílio de padrões cromatográficos, e a quantificação seguiu a metodologia descrita no Livro de Normas do Instituto Adolfo Lutz. Os resultados indicaram variações nos teores de AGT's entre diferentes marcas de óleos de soja, com algumas amostras excedendo os limites permitidos de 2,0g. No entanto, houve uma diminuição notável nos teores de AGT's em comparação com estudos anteriores, sugerindo a eficácia das medidas regulatórias em curso.

Palavras-chave: Gorduras trans; legislação; óleo vegetal

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, uma atenção crescente tem sido voltada para os impactos do consumo de gorduras trans (AGT) na saúde, o que tem motivado uma série de estudos e discussões a respeito dos malefícios associados ao seu alto consumo. As gorduras trans, também conhecidas como ácidos graxos de isomeria *trans*, são provenientes de gorduras parcialmente hidrogenadas e estão presentes em uma variedade de produtos alimentares, abrangendo desde óleos vegetais e margarinas industriais até sorvetes, chocolates, pipocas, bolachas, *fast food* e até mesmo carnes e seus derivados, provenientes de animais ruminantes (MARTIN et al., 2004).

Os AGT's são um tipo de gordura insaturada que pode ser encontrada em óleos vegetais parcialmente hidrogenados, produzidas durante o processo de hidrogenação, um método industrial para transformar óleos líquidos em gorduras sólidas, como na produção de margarina e gorduras usadas em produtos de panificação. A utilização específica de óleos vegetais parcialmente hidrogenados na indústria alimentícia é motivada para melhorar a textura e a durabilidade dos alimentos (FREIRE et al., 2013).



Os AGT's podem ser de origem biológica, ou seja, quando são sintetizados naturalmente por animais ruminantes, ou produzidos pelo homem por meio de diferentes processos tecnológicos. Alimentos obtidos de animais ruminantes, como carne, leite e seus derivados, contém AGT naturais como vacênico, rumênico e palmítico. Já os AGT de origem industrial são formados a partir da isomerização de ácidos graxos *cis* presentes em óleos vegetais em dois processos induzidos termicamente: a) pela desodorização industrial, que é um processo comum na indústria de óleos vegetais, onde os óleos são aquecidos a altas temperaturas para remover componentes voláteis de sabor e odor indesejáveis; b) pela reutilização prolongada de óleos vegetais na fritura de alimentos em altas temperaturas (MERÇON, 2010; BRASIL, 2019).

Os AGT's podem ser encontrados em óleos vegetais refinados devido às altas temperaturas utilizadas durante o procedimento de desodorização, podendo induzir a isomerização geométrica em especial do ácido linoléico (C18:2 9c,12c) e do ácido linolênico (C18:3 9c,12c,15c). Tasan e Demirci (2003) observaram que o conteúdo do isômero trans C18:2 aumentou 13,8 vezes ao final do processo de refino.

No Brasil, como estratégia para diminuir o consumo de AGT, foi publicada pela ANVISA a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 632, de 24 de março de 2022 que dispõe sobre a restrição de uso de gorduras trans em alimentos, limitando a quantidade de AGT em óleos vegetais em 2 gramas por 100 gramas de gordura total. A partir de 1º de janeiro de 2023, ficam proibidos a produção, a importação, o uso e a oferta de óleos e gorduras parcialmente hidrogenados para uso em alimentos e de alimentos formulados com estes ingredientes (BRASIL, 2022).

Existem alimentos que possuem nos rótulos a descrição zero e de acordo outra resolução da ANVISAÇÃO, a RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003:

(...) na informação nutricional será expressa como 'zero' ou '0' ou "não contém" para valor energético e ou nutrientes quando o alimento contiver quantidades menores ou iguais as estabelecidas como 'não significativas' (BRASIL, 2003).

As gorduras trans produzidas industrialmente são consideradas particularmente prejudiciais para a saúde devido ao seu impacto negativo no perfil lipídico sanguíneo, aumentando os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), diminuindo os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e aumentando assim o risco de doenças cardíacas. A eliminação dessas gorduras da cadeia alimentar é vista como uma medida eficaz para reduzir a carga global de doenças cardiovasculares (SANTOS et al., 2013; BRASIL, 2019).

O objetivo do trabalho foi avaliar os teores de ácidos graxos trans em óleos vegetais e verificar sua adequação à legislação vigente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 36 amostras de óleos de soja, de 12 diferentes marcas, coletadas pela Vigilância Sanitária durante Programas de Monitoramento entre 2022 e 2023. As amostras analisadas de mesma marca eram de lotes diferentes. Na Tabela 1 constam os dados das amostras analisadas.

Tabela 1 – Características das amostras de óleo de soja analisadas nos anos de 2022 e 2023

Identificação	Amostra	Marca	Fabricação	Teores de AGT no rótulo (g/100g)
OS1	Óleo de Soja	A	23/03/2022	0 g
OS2	Óleo de Soja	A	18/03/2022	0 g
OS3	Óleo de Soja	A	25/02/2022	0 g



OS4	Óleo de Soja	A	01/05/2022	0 g
OS5	Óleo de Soja	C	22/03/2022	0 g
OS6	Óleo de Soja	D	22/12/2022	0 g
OS7	Óleo de Soja	D	18/03/2022	0 g
OS8	Óleo de Soja	D	02/02/2022	0 g
OS9	Óleo de Soja	D	23/05/2022	0 g
Identificação	Amostra	Marca	Fabricação	Teores de AGT no rótulo (g/100g)
OS10	Óleo de Soja	D	02/02/2022	0 g
OS11	Óleo de Soja	F	26/02/2022	0 g
OS12	Óleo de Soja	H	25/03/2022	0 g
OS13	Óleo de Soja	H	07/05/2022	0 g
OS14	Óleo de Soja	H	07/04/2022	0 g
OS15	Óleo de Soja	H	29/03/2022	0 g
OS16	Óleo de Soja	H	13/05/2022	0 g
OS17	Óleo de Soja	H	20/04/2022	0 g
OS18	Óleo de Soja	H	31/03/2022	0 g
OS19	Óleo de Soja	I	09/03/2022	0 g
OS20	Óleo de Soja	I	12/04/2022	0 g
OS21	Óleo de Soja	I	24/05/2022	0 g
OS22	Óleo de Soja	I	28/03/2022	0 g
OS23	Óleo de Soja	J	22/02/2022	0 g
OS24	Óleo de Soja	J	23/03/2022	0 g
OS25	Óleo de Soja	K	06/03/2022	0 g
OS26	Óleo de Soja	K	26/04/2022	0 g
OS27	Óleo de Soja	K	22/05/2022	0 g
OS28	Óleo de Soja	K	17/03/2022	0 g
OS29	Óleo de Soja	L	10/10/2022	0 g
OS30	Óleo de Soja	L	25/10/2022	0 g
OS31	Óleo de Soja	L	24/11/2022	0 g
OS32	Óleo de Soja	L	17/09/2022	0 g
OS33	Óleo de Soja	M	09/05/2022	0 g
OS34	Óleo de Soja	M	07/06/2022	0 g
OS35	Óleo de Soja	N	04/05/2022	0 g
OS36	Óleo de Soja	O	14/04/2022	0 g

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

As análises foram realizadas no Núcleo de Química, Física e Sensorial do Centro de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz. A técnica analítica utilizada foi a cromatografia em fase gasosa, que consiste na separação de compostos químicos. Os óleos vegetais contêm ácidos graxos que por reação de transesterificação são convertidos em seus ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) correspondentes.

Os ácidos graxos foram convertidos em ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG), conforme descrito em Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Os EMAG foram analisados pela técnica de cromatografia em fase gasosa (cromatógrafo Focus GC, Thermo) com detector de ionização de chama (DIC) e separados em coluna capilar de sílica fundida, modelo HP-88 marca Agilent (100m, 0,25mm; 0,25µm). Foram empregadas as seguintes condições cromatográficas: temperatura programada da coluna: 180°C (65 min) e rampa de aquecimento de 15°C.min⁻¹ até 215°C (18 min). Temperatura do injetor e detector: 250°C, pressão na coluna: 170 kPa, gás de arraste: hidrogênio, volume de injeção: 1 µL.

Para a identificação dos componentes foram utilizados padrões cromatográficos: mistura de 37 EMAG do C4 ao C24, mistura de isômeros cis/trans do ácido linoleico, mistura de



isômeros cis/trans do ácido α -linolênico, padrões individuais do ácido elaídico e trans vacênico.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 2 são apresentados os resultados dos teores de AGT obtidos nas análises. Os valores de AGT nos óleos de soja variaram de 0,34 a 3,04 g/100g, que diferenciam entre as marcas e lotes.

Tabela 2. Teores de ácidos graxos trans (AGT) em óleos de soja analisados nos anos 2022 e 2023.

Marca	Amostras (Qtd.)	AGT (g/100g)
A	Óleo de soja (4)	0,76, 0,76, 1,1 e 1,18
C	Óleo de soja (1)	1,61
D	Óleo de soja (5)	0,34, 0,34, 0,42, 0,42 e 0,76
F	Óleo de soja (1)	0,68
H	Óleo de soja (7)	1,61, 1,61, 1,86, 1,94, 2,03, 2,62 a 3,04
I	Óleo de soja (4)	0,59, 0,85, 0,93 e 1,18
J	Óleo de soja (2)	0,85 e 1,69
K	Óleo de soja (4)	0,68, 0,76, 0,85 e 1,01
L	Óleo de soja (4)	1,35, 1,69, 2,2 e 2,11
M	Óleo de soja (2)	1,52 e 1,61
N	Óleo de soja (1)	0,93
O	Óleo de soja (1)	2,03

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Dos 36 óleos de soja avaliados, seis (17%) amostras, das marcas H, L e O, apresentaram valores acima de 2g/100g de AGT. Os valores mais elevados de AGT foram verificados nos óleos de soja da marca H, atingindo 3,04 g/100g. Verifica-se que mesmo dentro de uma mesma marca há variação entre lotes, para a marca H, por exemplo, em que foram analisadas sete amostras, foi observado valores variando de 1,61 a 3,04 g/100g, sugerindo que não houve uma padronização no controle do processo de desodorização.

Em estudo desenvolvido por Hou et al. (2011) foram avaliadas 29 amostras e 17 amostras (58,6%) apresentaram teores acima de 2 g/100g de AGT, com concentrações variando de 0,23 e 3,11 g/100g, valores similares aos verificados no presente estudo.

Em pesquisa realizada por AUED-PIMENTEL et al. (2009) com amostras de óleo de soja comercializadas no estado de São Paulo, verificou-se que, das 34 amostras analisadas, 16 (47%) apresentaram níveis acima 2 g/100g T, valores superiores aos verificados neste, demonstrando uma melhoria ao longo dos anos da qualidade do processo de desodorização e adequação da rotulagem quanto à quantidade de AGT.

Na composição dos ácidos graxos trans, foram identificados predominantemente os isômeros de AGT dos ácidos graxos C18:2t (ácido linoleico) e o C18:3t (ácido linolênico), incluindo C18:2 9c,12t e C18:2 9t, 12c, C18:3 9t,12t,15c, C18:3 9t,12c,15t, C18:3 9c,12t,15t, C18:3 9c,12t,15c, C18:3 9t,12c,15c. Já Hou et al. (2011) encontraram também isômeros C18:1 9t.

A variabilidade considerável nos teores de AGT entre as amostras de óleos de soja analisadas pode estar relacionada ao processo de produção e refino de cada marca e também da qualidade do processo de fabricação (RIBEIRO et al., 2007). Mas é notável que os níveis



de AGT vem diminuindo consideravelmente com os anos, e essa redução também é associada às medidas de monitoramento que estão sendo empregadas por parte da ANVISA e OMS, governos e organizações da sociedade civil, na restrição do uso de gorduras trans nos alimentos, com o objetivo de reduzir os riscos à saúde pública. As regulamentações e diretrizes devem ser levadas em conta a fim de eliminar as gorduras trans em alimentos processados, no objetivo de proteger a saúde da população. O trabalho junto à legislação é essencial para proteger a saúde pública, destacando na pesquisa a importância de continuar a vigilância para garantir a conformidade dos óleos vegetais com os padrões estabelecidos.

CONCLUSÕES

Os resultados das 36 amostras de óleos de soja indicaram variações significativas entre as marcas, e seis (17%) estavam com valores de AGT acima do permitido (2 g/100g). Embora os resultados indiquem uma redução substancial nos níveis de AGT em comparação com outros estudos, algumas amostras ultrapassaram os limites aceitáveis destacando a necessidade de monitoramento contínuo destas amostras.

Esta pesquisa enfatiza o papel vital da regulamentação na proteção da saúde pública e ressalta a necessidade de vigilância persistente para garantir a adesão dos óleos vegetais aos padrões estabelecidos. A conscientização sobre os riscos à saúde associados ao consumo de AGT em alimentos processados continua sendo fundamental na promoção de escolhas alimentares mais saudáveis.

REFERÊNCIAS

AUED-PIMENTEL, Sabria et al. Trans fatty acids in refined polyunsaturated vegetable oils commercialized in the city of São Paulo, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 646-651, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/FDqSjxwLNP46DGKTLkFpJjy/?lang=pt>. Acesso em: 15 Mai. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Relatório de análise de impacto regulatório sobre ácidos graxos trans em alimentos**. Brasília, jul. 2019. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/regulamentacao/air/analises-de-impacto-regulatorio/2019/25351-906891_2017-15-acidos-graxos-trans-em-alimentos.pdf. Acesso em: 11 Out. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003**. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 23 dez. 2003. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/rdc0360_23_12_2003.html. Acesso em: 11 Out. 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 632, de 24 de março de 2022**. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, 30 mar. 2022. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-632-de-24-de-marco-de-2022-389596926>. Acesso em: 11 Out. 2023.

FREIRE, Poliana Cristina Mendonça; MANCINI-FILHO, Jorge; FERREIRA, Tânia Aparecida Pinto de Castro. Major physical and chemical changes in oils and fats used for



deep frying: Regulation and effects on health. **Revista de Nutrição**, v. 26, n. 3, p. 353-358, 2013. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/rn/a/LzJ7Wc4c5zNhcpJFsmSKYLz/?lang=pt>. Acesso em: 21 Jul. 2023.

HOU, Jun-Cai et al. Assessment of trans fatty acids in edible oils in China. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 211-215, 2012. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511004622>. Acesso em: 17 Out. 2023.

MARTIN, Clayton Antunes; MATSHUSHITA, Makoto; SOUZA, Nilson Evelázio de. Trans fatty acids: nutritional implications and sources in the diet. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 351-359, 2004. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/aabc/a/hXdDqpqxwmySjrPKcMPBSkx/>. Acesso em 22 Set. 2023.

MERÇON, Fábio. O que é uma gordura trans. **Revista Química nova na escola**, v. 32, n. 2, 2010. Disponível em:

http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/artigos_teses/2010/Quimica/artigos/o_que_e_gordura_trans.pdf. Acesso em: 09 Out. 2023.

RIBEIRO, Ana Paula Badan et al. Chemical interesterification: alternative to production of zero trans fats. **Química Nova**, v. 30, p. 1295-1300, 2007. Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500043>. Acesso em 08 Jul. 2023.

SANTOS, Raul Dias et al. Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, p. 1-40, 2013. Disponível em:

http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2013/Diretriz_Gorduras.pdf. Acesso em: 27 Out. 2023.

TASAN, Murat; DEMIRCI, Mehmet. Trans FA in sunflower oil at different steps of refining. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 8, p. 825-828,

2003. Disponível em: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1007/s11746-003-0779-9>. Acesso em: 17 Out. 2023.



Capítulo 26

DOI: 10.53934/20242-26

MÉTODOS UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA CISTICERCOSE HUMANA

Gabriel Luiz da Silva¹; Cyro Alves de Brito²

¹Estudante do curso de especialização em vigilância laboratorial em saúde pública.- CIM – IAL; E-mail: gabrielluizsilva690@gmail.com

²Docente/pesquisador do Centro de Imunologia – CIM – IAL.

Resumo: O diagnóstico da neurocisticercose (NCC) é complexo e requer a combinação de vários elementos, incluindo características clínicas e epidemiológicas, exames de imagem e testes imunológicos para detectar antígenos ou anticorpos específicos do parasita. Esta revisão propõe apresentar os principais métodos laboratoriais atualmente empregados no diagnóstico da cisticercose humana. Com os dados da literatura foi possível observar um destaque maior para as metodologias imunoenzimática-ELISA e de imunoeletrotransferência ligada à enzima, além disso, os trabalhos encontrados indicam que os testes rápidos podem ser uma alternativa promissora para o diagnóstico da NCC em áreas com recursos limitados, mas ainda precisam de mais estudos para aprimorar seu desempenho analítico. É possível concluir que o desenvolvimento de testes rápidos mais sensíveis e específicos e o emprego antígenos recombinantes e sintéticos são metas importantes na área de diagnóstico da cisticercose humana.

Palavras-chave: *Taenia solium*; Neurocisticercose; Diagnóstico laboratorial; Antígenos; Metodologias.

INTRODUÇÃO

A *Taenia solium* (*T.solium*) é um parasita zoonótico que possui distribuição global, com alta taxa de transmissão na América Central, América do Sul, Sudeste Asiático e África subsaariana. As infecções por *T. solium* (teníase/cisticercose) constituem um grande problema de saúde pública devido a sua alta endemicidade em países de baixa renda. A criação de suínos domésticos junto às más condições sanitárias permite o estabelecimento do ciclo de vida do parasita. A neurocisticercose (NCC) ou cisticercose humana ocorre quando o homem acidentalmente entra no ciclo como hospedeiro intermediário ao ingerir os ovos infectantes de *T.solium* pela via fecal-oral. Após a ingestão desses ovos, os embriões são liberados, atravessam a mucosa intestinal, migram pelo sistema circulatório e desenvolvem-se em cisticercos em múltiplos tecidos. Porém, o parasita geralmente é destruído pelo sistema imunológico do hospedeiro nesses tecidos, sendo capaz de sobreviver principalmente em locais imunologicamente privilegiados, como o cérebro e os olhos (GARCIA et al., 2018a, DIXON et al., 2021).

A NCC, uma das principais causas de epilepsia adquirida no mundo, é responsável por cerca de 30% dos casos em áreas endêmicas da doença. (WHO, 2021) A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o total de pessoas com neurocisticercose sintomática ou assintomática é de 2,56 a 8,30 milhões. No entanto, a base de dados relacionada à



epidemiologia do complexo teníase/cisticercose, mais especificamente da NCC, é bastante escassa, com dados pouco genuínos e carência de informações atualizadas em relação à real situação epidemiológica dessa enfermidade no Brasil e no mundo. Demonstrando assim, a indiferença em relação à doença e ao seu monitoramento, considerada negligenciada.

O diagnóstico da NCC não é fundamentado exclusivamente em um único exame, mas sim na combinação de diversos elementos, incluindo a análise das características clínico-epidemiológicas, os achados em exames de imagem, como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, e o diagnóstico laboratorial para a detecção de antígenos ou anticorpos específicos do metacésteioide de *T.solium* (fase larval) em amostras de soro ou líquido cefalorraquidiano (LCR) (GARCIA et al., 2014, ZAMMARCHI et al., 2017). Nesse contexto, surgiu a necessidade de explorar alternativas mais específicas e precisas para o diagnóstico da cisticercose humana, com a finalidade de apresentar nesta revisão os seus principais métodos sorológicos utilizados.

MATERIAL E MÉTODOS

O levantamento bibliográfico foi realizado em três bases de dados — PubMed, SciELO e Scopus, com os seguintes descritores — *Taenia solium*, *Cysticercus cellulosae*, cisticercose, neurocisticercose, diagnóstico, antígenos, biomarcadores e epidemiologia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos sorológicos para detectar anticorpos contra antígenos de *T. solium* em amostras de soro ou LCR, descritos a seguir, são ferramentas importantes para diagnóstico da NCC, dentre os quais se destacam os testes de imunoabsorção enzimática (ELISA) e de imunoelectrotransferência ligada a enzima (EITB). Apesar de menos empregados, os ensaios para detecção de antígenos também são encontrados na literatura.

Hemaglutinação indireta

A técnica de hemaglutinação indireta ou passiva (HP) se baseia na capacidade dos anticorpos em aglutinar as hemácias sensibilizadas com o antígeno de interesse. Foi desenvolvida por Karl Landsteiner, imunologista austríaco-americano, na primeira metade do século XX. Desde então, esse método foi padronizado para a aplicação em muitas enfermidades, sendo bem estabelecido para o diagnóstico da cisticercose humana (FERREIRA et al., 1997, UEDA et al., 1988). Estudos realizados no Instituto Adolfo Lutz (IAL), empregando a técnica de HP com antígeno de extrato bruto de *T. solium* em amostras de LCR de pacientes com NCC, distúrbios neurológicos diversos e pessoas aparentemente saudáveis, mostraram sensibilidade e especificidade acima de 81,7% e 94,4%, respectivamente (PIALARISSI et al. 1987; UEDA et al., 1988). Por se tratar de um ensaio com razoável sensibilidade, baixo custo, fácil aplicação e de execução rápida, até recentemente, a HP foi bastante utilizada como suporte do diagnóstico da neurocisticercose.

Imunofluorescência indireta

O teste de imunofluorescência indireta (IFI) é amplamente utilizado no diagnóstico laboratorial de vírus, bactérias, protozoários ou outros componentes celulares. A IFI foi desenvolvida na década de 40, inicialmente com o objetivo principal de permitir a visualização e a identificação de componentes específicos em células e tecidos pela aplicação de anticorpos marcados com fluoróforos, que emitem fluorescência quando



expostos à luz ultravioleta. Desde então, essa metodologia foi aplicada com êxito no diagnóstico de diversas patologias, incluindo a neurocisticercose (VIANNA et al., 1992). Em uma avaliação de desempenho desta técnica implantada no IAL, obteve-se a sensibilidade de 97,6% e especificidade de 98,9% (PIALARISSI et al., 1987). Juntamente com o ELISA, atualmente é um dos métodos utilizados no IAL para o diagnóstico de cisticercose humana.

Imunoabsorção Enzimática

O ensaio de imunoabsorção enzimática, conhecido como ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), se baseia na detecção de ligações antígeno-anticorpo através de reações enzimáticas. O ensaio surgiu como um método alternativo à técnica de radioimunoabsorção (RIST), apresentando diversas vantagens em comparação a este. No contexto do diagnóstico laboratorial da neurocisticercose, o ELISA pode ser empregado para a detecção de anticorpos contra *T. solium* ou de antígenos do parasita (COSTA, 1986, TÉLLEZ-GIRÓN et al., 1987).

Diversos trabalhos relatam a pesquisa de anticorpos por ELISA no diagnóstico de NCC, como na pesquisa de Carod et al. (2012) que avaliaram o desempenho analítico de cinco kits comerciais em amostras de soro de pacientes com a doença, positivos para outras parasitoses e grupo controle. Foi encontrada alta especificidade (acima de 90%) em três dos cinco testes e baixa sensibilidade em todos (42,9% a 71,4%). Em uma investigação mais ampla a respeito de dois kits de ELISA do estudo anterior, foi observado menor desempenho tanto na sensibilidade quanto na especificidade (GARCIA et al., 2018b). A baixa sensibilidade pode estar relacionada ao número e viabilidade dos cistos, visto que o grau da resposta imune pode variar muito em cada um dos casos, ocorrendo uma resposta mais branda em situações de cistos únicos e para aqueles com presença de cistos calcificados, a resposta imune diminui com o tempo. Em ambos os estudos, os soros de pacientes com *Echinococcus spp* apresentaram altas taxas de reações cruzadas.

A detecção de antígeno pelo ELISA (Ag-ELISA) também é considerada uma importante ferramenta diagnóstica pela sua capacidade em detectar pacientes com parasitas viáveis. Desta forma, a pesquisa de antígenos torna-se útil aos indivíduos que se beneficiam do medicamento anti-helmíntico, por permitir o acompanhamento do tratamento e da cura clínica (PARKHOUSE et al., 2018). No entanto, Ag-ELISA apresenta desvantagens, como sua moderada sensibilidade, especialmente em indivíduos com um único cisto, e o alto custo associado ao uso de anticorpos monoclonais específicos (HERNÁNDEZ et al., 2019). Este ensaio é realizado no formato "sanduíche," e os principais antígenos pesquisados são B158/B60 e HP10, que a princípio foram desenvolvidos para a detecção de antígenos cisticerciais de *Taenia saginata*. Posteriormente, estes foram adaptados para uso em casos de cisticercose humana em função de suas reações cruzadas. Atualmente, o ELISA B158/B60 é o único ensaio disponível comercialmente para o diagnóstico de NCC (CASTILLO et al., 2023).

Teste de imunoeletrotransferência ligada à enzima

A imunoeletrotransferência ligada à enzima (EITB) é um ensaio de *Western blot* (WB) para detecção de anticorpos em amostras de soro ou LCR, em que são utilizadas glicoproteínas purificadas por meio de cromatografia de afinidade em lectina de lentilha em extrato bruto do metacestóide. Composta por sete glicoproteínas (GP13, GP14, GP18, GP21, GP24, GP39-42 e GP50), a reatividade em qualquer uma das sete bandas, o resultado da amostra é positivo. Criada com o objetivo de auxiliar nos resultados dos exames de imagem, a EITB é considerada padrão de referência no diagnóstico da NCC pela alta sensibilidade e



especificidade (GARCIA et al., 2018b). No entanto, há dificuldades na obtenção do antígeno, necessidade de um estoque constante de antígenos oriundos de suínos naturalmente infectados e, por se tratar de uma metodologia sofisticada e cara, precisa de equipamentos específicos e profissionais qualificados.

Teste rápido

Para ser considerado um bom método de diagnóstico, algumas características desejáveis incluem acessibilidade, simplicidade metodológica, sensibilidade e especificidade. (MUBANGA et al., 2019). Nesse contexto, uma alternativa que tem sido destaque na comunidade científica é o teste rápido (TR), conhecido como “*point of care*” (diagnóstico no local de atendimento), com tecnologia de imunocromatografia de fluxo lateral para detecção de anticorpos circulantes. Esse ensaio é notavelmente simples, cuja execução, leitura e interpretação ocorrem em até 30 minutos e não necessita de infraestrutura laboratorial. Pode ser implementado em serviços de saúde de baixa complexidade e, frequentemente, é a primeira linha de contato para pacientes de áreas endêmicas. Isso permite que indivíduos com suspeita de NCC possam ser diagnosticados de forma rápida e acessível.

Dentre os artigos que abordam esse tema, um deles relata sensibilidade de 49% e especificidade de 91%. As amostras foram provenientes de pacientes com crises epiléticas ou dor de cabeça grave e progressiva recrutados de três hospitais no sul da Tanzânia. Todos os pacientes com TR positivo e cada décimo paciente com resultado negativo foram submetidos ao exame de tomografia computadorizada do cérebro e aos testes de referência para cisticercose (STELZLE et al., 2023). Enquanto no estudo de MUBANGA et al. (2021) foram selecionados 1.200 participantes da província oriental da Zâmbia, área conhecida pela endemicidade de *T. solium*. A sensibilidade foi de 35% e a especificidade de 87%. O primeiro artigo sugere que os resultados são promissores, o segundo considera os seus insuficientes para o uso na triagem da neurocisticercose. No entanto, é importante observar que esse tipo de teste pode ser extremamente útil na triagem de pacientes suspeitos da doença em áreas com recursos limitados, que frequentemente correspondem às regiões endêmicas.

Antígenos

Vale ressaltar, que nos ensaios que buscam a detecção de anticorpos, como os mencionados anteriormente, a escolha do antígeno desempenha um papel fundamental na eficácia do método diagnóstico. Dentre os trabalhos encontrados, uma solução altamente promissora, para superar os desafios relacionados aos antígenos naturais de *T. solium*, envolve o emprego de antígenos sintéticos ou recombinantes. (RODRIGUES et al., 2012).

CONCLUSÕES

Com base na análise da literatura científica, foi possível identificar os principais testes e antígenos estudados e amplamente utilizados no diagnóstico laboratorial da neurocisticercose. É evidente que, embora o EITB seja considerado o teste imunológico de referência para auxiliar no diagnóstico definitivo da NCC, outros métodos, como o ELISA, a HP e a IFI, ainda desempenham um papel crucial, particularmente em áreas onde a realização do EITB pode ser inviável. O cenário ideal no campo dos imunoenaios para a cisticercose humana envolve o desenvolvimento de testes rápidos mais sensíveis e específicos, como também, o emprego de antígenos sintéticos ou recombinantes nos testes sorológicos.



REFERÊNCIAS

CAROD, J.F. et al. Evaluation of the performance of 5 commercialized enzyme immunoassays for the detection of *Taenia solium* antibodies and for the diagnosis of neurocysticercosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 72, n. 1, p. 85–89, 2012. [doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.014](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.014).

CASTILLO, Y. et al. Consistent measurement of parasite-specific antigen levels in sera of patients with neurocysticercosis using two different monoclonal antibody (mAb)-based enzyme-linked immunosorbent assays. **Pathogens**, v. 12, n. 4, p. 566, 2023. [doi: 10.3390/pathogens12040566](https://doi.org/10.3390/pathogens12040566).

COSTA, J. M. Teste imunoenzimático (Elisa) no diagnóstico da neurocisticercose: estudo de diferentes extratos antigênicos na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro e de líquido cefalorraqueano. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 44, n. 1, p. 15–31, 1986. doi.org/10.1590/S0004-282X1986000100002

DIXON, M. A. et al. *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From parasite biology and immunology to diagnosis and control. Em: **Advances in Parasitology**, v. 112, n.1, p. 133–217, 2021. [doi: 10.1016/bs.apar.2021.03.003](https://doi.org/10.1016/bs.apar.2021.03.003).

FERREIRA, A. P. et al. Hemagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: Development of a stable reagent using homologous and heterologous antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39,n.1, p. 29-33, 1997. [doi: 10.1590/s0036-46651997000100006](https://doi.org/10.1590/s0036-46651997000100006).

GARCIA, H. H.; NASH, T. E.; DEL BRUTTO, O. H. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. **Lancet Neurology**, v. 13, n. 12, p. 1202–1215, 2014. [doi: 10.1016/S1474-4422\(14\)70094-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70094-8).

GARCIA, H. H. Neurocysticercosis. **Neurologic Clinics**, v. 36, n. 4, p. 851–864, 2018a. [doi: 10.1016/j.ncl.2018.07.003](https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.07.003).

GARCIA, H. H. et al. Low sensitivity and frequent cross-reactions in commercially available antibody detection ELISA assays for *Taenia solium* cysticercosis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 23, n. 1, p. 101–105, 2018b. [doi: 10.1111/tmi.13010](https://doi.org/10.1111/tmi.13010).

HERNÁNDEZ, M. et al. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis: comparative performance of serum diagnostic tests in Mexico. **Parasitology Research**, v. 118, n. 10, p. 2891–2899, 2019. [doi: 10.1007/s00436-019-06425-4](https://doi.org/10.1007/s00436-019-06425-4).

MACHADO, A. DE J.; CAMARGO, M. E.; HOSHIMO, S. Reação da imunofluorescência para a cisticercose com partículas de *Cysticercus cellulosae* fixadas a lâminas de microscopia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 7, n. 3, p. 181–183, 1973. doi.org/10.1590/S0037-86821973000300004

MUBANGA, C. et al. Progress on the development of rapid diagnostic tests for foodborne neglected zoonotic helminthiases: A systematic review. **Acta Tropica**, v. 194, n. 1, p. 135–147, 2019. [doi: 10.1016/j.actatropica.2019.03.030](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.03.030).



MUBANGA, C. et al. Evaluation of an antibody detecting point of care test for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in a Zambian rural community: A prospective diagnostic accuracy study. **Diagnostics (Basel)**, v. 11, n. 11, p. 2121, 2021. [doi: 10.3390/diagnostics11112121](https://doi.org/10.3390/diagnostics11112121).

PARKHOUSE, R. M. E. et al. Reciprocal contribution of clinical studies and the HP10 antigen ELISA for the diagnosis of extraparenchymal neurocysticercosis. **Acta Tropica**, v. 178, n. 1, p. 119–123, 2018. [doi: 10.1016/j.actatropica.2017.11.005](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.005).

PIALARISSI, C.S.M. et al. Estudo comparativo de testes sorológicos no diagnóstico imunológico da neurocisticercose. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, n.6, p. 367–373, 1997. doi.org/10.1590/S0036-46651987000600006

RODRIGUEZ, S.; WILKINS, P.; DORNY, P. Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. **Pathogens and Global Health**, v. 106, n. 5, p. 286–298, 2012. [doi: 10.1179/2047773212Y.0000000048](https://doi.org/10.1179/2047773212Y.0000000048)

STELZLE, D. et al. Evaluation of a point-of-care test for the diagnosis of *Taenia solium* neurocysticercosis in rural southern Tanzania: a diagnostic accuracy study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n.1, p. 98–106, 2023. [doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00378-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00378-X)

TÉLLEZ-GIRÓN, E. et al. Detection of *Cysticercus cellulosae* antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) and standard ELISA. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, n. 1, p. 169–173, 1987. [doi: 10.4269/ajtmh.1987.37.169](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.37.169)

UEDA, M. et al. Passive haemagglutination test for human neurocysticercosis immunodiagnosis: II - Comparison of two standardized procedures for the passive haemagglutination reagent in the detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in cerebrospinal fluids. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 1, p. 57–62, 1988. [doi: 10.1590/s0036-46651988000100010](https://doi.org/10.1590/s0036-46651988000100010)

VIANNA, L. G. et al. Estudo comparativo dos testes imunoenzimáticos elisa-g e elisa-m, imunofluorescência indireta e fixação do complemento no diagnóstico da cisticercose humana. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 50, n. 3, p. 302–308, 1992. doi.org/10.1590/S0004-282X1992000300007

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Guidelines on management of *Taenia solium* neurocysticercosis. **Report**. Geneva, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240032231>. Acesso em: 1 nov. 2023.

ZAMMARCHI, L. et al. Screening, diagnosis and management of human cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis: technical recommendations by the COHEMI project study group. **Tropical Medicine & International Health**, v. 22, n. 7, p. 881–894, 2017. [doi: 10.1111/tmi.12887](https://doi.org/10.1111/tmi.12887).



Capítulo 27

DOI: 10.53934/20242-27

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA A REGIÃO LTR DO HIV-1.

Lorena Fernandes Conceição¹; Cintia Mayumi Ahagon²; Jaqueline Helena da Silva Santos²; Luís Fernando de Macedo Brigido²

¹ Estudante do Curso de Especialização da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais (NDSS) do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz. E-mail: lorenafernandes80@gmail.com

² Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais (NDSS) do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz

Resumo: As repetições terminais longas (LTR) do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) desempenham papel na promoção e regulação da transcrição proviral. A região promotora viral é responsável pela ativação do provírus HIV-1. Este trabalho trata-se de um estudo qualitativo, descritivo e experimental. A detecção da região LTR foi realizada em 60 amostras, sendo 54 de indivíduos infectados com HIV-1 e 6 de voluntários soronegativos. O *Nested* PCR Convencional da região LTR do HIV-1 foi padronizado com intuito de detectar o DNA proviral do HIV-1 e auxiliar no diagnóstico de pacientes infectados para elucidar casos que não fornecem resultados consistentes. O ensaio apresentou sensibilidade de 61,11% e especificidade de 100%. Com o objetivo de aprimorar a sensibilidade deste, foi proposto um ensaio de *Nested* qPCR que combina a precisão e exatidão do qPCR com a sensibilidade do *Nested* Convencional. Como resultado, observou-se uma significativa redução no valor do *Cycle threshold* (Ct) no ensaio de *Nested* qPCR, aumentando significativamente a probabilidade de detecção da região de interesse, especialmente quando os alvos são baixos.

Palavras-chave: hiv-1; LTR; *Nested* PCR; qPCR; repetições terminais longas

INTRODUÇÃO

O diagnóstico do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) apresenta uma série de desafios, especialmente quando considerado os diferentes estágios da infecção, uso de antirretrovirais e sistema imunológico controlado, que podem produzir resultados inconclusivos ou indeterminados. Os testes laboratoriais têm o objetivo de aprimorar a qualidade dos testes diagnósticos de infecções pelo HIV-1 e garantir um resultado seguro. Atualmente, os testes sorológicos e a quantificação de carga viral (CV) são os mais comumente utilizados para a confirmação diagnóstica de infecção por HIV-1. Entretanto, existem alguns casos em que a sorologia e a quantificação de CV não permitem um diagnóstico conclusivo, como se observa entre indivíduos conhecidos como controladores de elite, que se caracterizam por terem contagem de linfócitos T-CD4+ estável e carga viral indetectável. Da mesma forma, o diagnóstico duvidoso pode ser observado durante o período de janela imunológica, quando há supressão viral por tratamento com antirretrovirais, em indivíduos em fase aguda da infecção e em neonatos infectados por transmissão vertical,



onde a passagem transplacentária de anticorpos maternos interfere no diagnóstico sorológico (WERSOM et al., 2017).

A repetição terminal longa (LTR) do HIV-1 promove e modula a transcrição proviral. A função do LTR é transcreever o RNA em DNA proviral, levando à expressão e a integração do genoma viral na célula hospedeira. O DNA proviral é flanqueado pela região LTR em suas extremidades, região esta altamente conservada e que constitui uma característica importante para ser alvo de métodos como a PCR (OPIJNEN et al., 2004).

O protocolo *Nested* PCR Convencional para a região LTR do HIV-1 foi padronizado para a detecção do DNA proviral utilizando 54 amostras de indivíduos infectados com HIV-1 e 6 de voluntários soronegativos para o HIV-1. O objetivo deste trabalho é melhorar os testes moleculares de detecção da região LTR do HIV-1 existentes, fazendo uma combinação de *Nested* Convencional e qPCR e, comparar o desempenho dos testes.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o ensaio de *Nested* PCR Convencional, no 1º PCR foram utilizados 12,5µL do Kit GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega), que contém enzimas, tampão, dNTPs e corante. Para amplificação do DNA, foram utilizados 1µL (10pm) dos primers F1 (F) (5'-CTACAAGGGACTTCCGCTG-3'- 342→361) e MZ9 (R) (5'-AGGGTACTAGTAGTTCCTGC-3'- 1517 → 1498) (ZAZZI et al., 1992), 8 µL de água livre de nuclease (Invitrogen) e 2,5 µL de amostra de DNA. A amplificação foi executada no termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler. As condições de reação padrão foram: incubação a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para o *Nested* 2º PCR, foram utilizados 12,5µL do Kit GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega), 1µL (10pm) dos primers Seq1f (F) (5'-TTTTCGCCTGTACTGGGTCTC-3'- 440→460) (EDELMANN et al., 2010), e SK431 (R) (5'-TATGTCAGTCCCCTTGGTCTC-3'- 1497 → 1475) (LADA et al., 2018), 8 µL de água livre de nuclease (Invitrogen) e 2,5 µL do produto amplificado do 1ºPCR. A amplificação foi executada no termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler. As condições de reação padrão foram: incubação a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com extensão final a 72°C por 7 minutos. O ensaio inclui controle negativo (água livre de nuclease) e controle positivo (células 8E5 - ARP-95).

O sistema TaqMan® (ThermoFisher, EUA) foi usado para detecção de DNA proviral HIV-1 por qPCR, com alvo na região LTR do genoma do HIV-1. Como controle interno endógeno, foi usado o gene humano CC quimiocina receptor 5 (CCR5). (MALNATI et al., 2008). Os primers foram LTR-F (TCTCGACGCAGGACTCG- 682→698) e LTR-R (TACTGACGCTCTCGCACC- 791→808) e probe foi LTR probe (FAM-CTCTCTCCTTCTAGCCTC-MGB-770→787) (MALNATI et al., 2008). Ambos, primers e probes, foram sintetizados pela Life Technologies (ThermoFisher, EUA). Para o controle interno, foram utilizados 0,6µL dos primers CCR5-F (ATGATTCCTGGAGAGACGC), CCR5-R (AGCCAGGACGGTCACCTT) e CCR5 probe (VIC-AACACAGCCACCACCAAGTCATCA-MGB). (MALNATI et al., 2008).

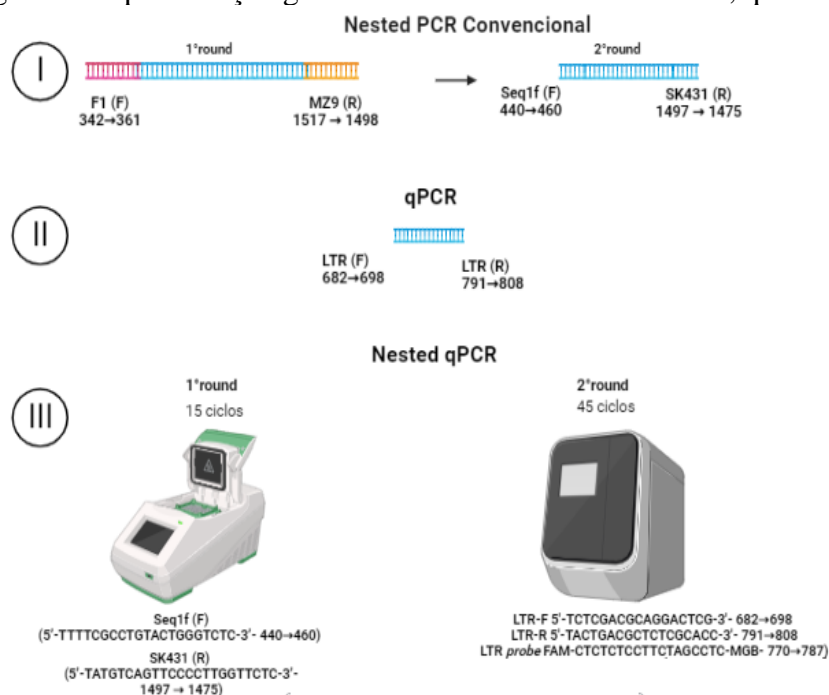
Os ensaios foram conduzidos utilizando o Kit GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, EUA), com GoTaq® Hot Start Polymerase (10µL), MgCl₂, dNTPs e o tampão de reação. Além disso, também inclui 0,05 µL do corante de referência carboxi-rodamina



(CXR), que é fornecido separadamente do Master Mix. As reações ocorreram na seguinte ciclagem: 95°C por 2 minutos, seguida por 45 ciclos de amplificação, cada uma consistindo em 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O procedimento foi executado no equipamento Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System e as análises foram feitas usando o software 7500 v.2.3 (TermoFisher, USA).

Os ensaios de *Nested* qPCR foram conduzidos combinando o protocolo de *Nested* PCR Convencional com o de qPCR. O *Nested* PCR Convencional foi executado a partir do 2º PCR. As condições de reação padrão foram: incubação a 94°C por 3 minutos, 15 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com extensão final a 72°C por 7 minutos. Foi acrescentado 5µL do produto amplificado do 2º PCR para uma segunda amplificação no qPCR (Figura 1).

Figura 1. Representação gráfica dos ensaios de *Nested* PCR, qPCR e *Nested* qPCR.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 54 amostras dos pacientes selecionados para o estudo foram avaliadas no protocolo selecionado para a detecção do DNA proviral. Dos ensaios conduzidos, 33/54 amostras apresentaram amplificação para a região LTR por *Nested* PCR convencional. Dentro da análise dos grupos, foi observado que, entre os pacientes com viremia alta, 10/16 apresentaram amplificação. No grupo dos pacientes com viremia baixa, 10/20 amostras amplificaram. Entre os pacientes pediátricos infectados por transmissão vertical, 11/14 apresentaram amplificação. Já entre os pacientes avirêmicos, 2/4 amostras amplificaram no ensaio (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultado do ensaio de *Nested* PCR Convencional em relação aos grupos de pacientes.



<i>Nested</i> PCR Convencional	Positivo	Negativo	Total
Avirêmicos	2	2	4
Transmissão Vertical	11	3	14
Viremia Alta	10	6	16
Viremia Baixa	10	10	20
Total	33	21	54

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

As amostras que apresentaram amplificação (n=33) foram avaliadas quanto à concentração de DNA (com o critério de seleção para continuidade dos testes um valor mínimo de 20ng/μL) e pureza (entre 1,8 e 2,0). A mediana de concentração de DNA das amostras positivas foi de 32,25 ng/μL (IQR 19,25 – 76,35). Em relação à pureza (razão 260/280) do DNA, a mediana foi de 1,8 (IQR 1,8 – 1,9).

Dos resultados negativos, 21/54 (31,89%) dos pacientes sabidamente infectados não apresentaram amplificação para o método *Nested* PCR Convencional. A não amplificação dessas amostras pode estar relacionada a uma série de fatores técnicos e características intrínsecas das amostras. Dentre esses fatores, a concentração e a pureza do DNA desempenham um papel crucial na eficiência da reação de amplificação. Variações nesses parâmetros podem afetar diretamente a sensibilidade do ensaio.

Além disso, a qualidade da amostra está diretamente relacionada à condição das células antes da extração. O método de preservação, o número de congelamentos e descongelamentos, bem como as condições de armazenamento a longo prazo, são elementos críticos que influenciam na integridade do DNA proviral.

Para melhorar a sensibilidade, um protocolo de *Nested* qPCR foi avaliado para combinar a exatidão e precisão do qPCR com a sensibilidade do *Nested* Convencional. Seis amostras com alvos LTR detectados analisados em qPCR foram selecionadas para testar o ensaio de *Nested* qPCR. No ensaio de *Nested* qPCR, foi observado que o Ct diminuiu significativamente, aumentando a probabilidade de detecção quando os alvos são escassos (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultado do primeiro ensaio de *Nested* qPCR comparado aos ensaios de *Nested* Convencional e qPCR.

ID	CV (cópias/mL)	Concentração de DNA (ng/μL)	Pureza (260/280)	<i>Nested</i> PCR	Ct qPCR	<i>Nested</i> qPCR
1523	19152	108,4	1,9	Positivo	32,6	10,5
14523	15089	166,6	1,9	Positivo	36,5	ND
14823	2255412	49,9	1,9	Positivo	31,9	6,9
17323	<L. Mín	87,5	1,9	Positivo	33,3	18,0
17423	198	29,4	1,9	Positivo	34,5	7,0
18923	155	279,9	1,9	Positivo	30,0	11,7

Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Legenda: CV- Carga Viral; ND- Não detectado; <L. Mín- abaixo do limite mínimo de detecção.

Posteriormente, foi realizado um novo ensaio de *Nested* qPCR, cujos resultados consolidados indicaram que a média do Ct das amostras que apresentaram amplificação (n=28) foi de 26,36. Amostras que apresentaram o Ct >39,0 (n=2) foram consideradas inconclusivas. Em relação às amostras que não amplificaram (n=24), é plausível considerar a possibilidade de degradação do DNA como uma das causas. Observou-se uma redução nos valores de Ct para as amostras que apresentaram amplificação em comparação com o ensaio



de qPCR. Notavelmente, o ensaio de *Nested* qPCR demonstrou uma capacidade de recuperação, identificando positividade em cinco amostras que não foram detectadas no *Nested* PCR Convencional, além de duas amostras que não positivaram no ensaio de qPCR. É observado o Ct tardio das amostras recuperadas, a concentração de DNA presente na amostra é um fator considerável, quanto menor a concentração, maior a probabilidade de se obter Cts tardios.

As diferenças quanto capacidade de detecção do DNA proviral nos três ensaios destacam que, ao serem utilizados de forma combinada, aumentam a probabilidade de amplificação do alvo.

CONCLUSÃO

A metodologia *Nested* PCR Convencional apresentou sensibilidade de 61,11% e especificidade de 100%. Além disso, revelou ser uma opção para a detecção de DNA proviral do HIV-1, principalmente em pacientes infectados por transmissão vertical e pacientes com viremia alta, onde houve o maior número de amostras amplificadas.

O ensaio de *Nested* qPCR apresentou redução dos Cts durante os ensaios conduzidos, aumentando a chances de detecção do alvo, sendo uma opção complementar para diagnóstico.

REFERÊNCIAS

EDELMANN, A. *et al.* Improvement of an ultrasensitive human immunodeficiency virus Type 1 real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction targeting the long terminal repeat region. **Transfusion Complications**, Berlin, v. 50, p. 685-692, 2010.

DIANE V. HAVLIR. *et al.* Prevalence and Predictive Value of Intermittent Viremia with Combination HIV Therapy. **Jama**, California, v. 286, n. 2, p. 171-179, 11 jul. 2001. DOI doi:10.1001/jama.286.2.171. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/193996>. Acesso em: 30 nov. 2023.

KARLSSON, ANNIKA. *et al.* Immunologic and virologic evolution during periods of intermittent and persistent low-level viremia. **Basic Science**, California, v. 18, ed. 7, p. 981-989, 30 abr. 2004. DOI 10.1097/01.aids.0000125906.75228.f5. Disponível em: https://journals.lww.com/aidsonline/fulltext/2004/04300/immunologic_and_virologic_evolution_during_periods.5.aspx. Acesso em: 30 nov. 2023.

LADA, STEVEN M. *et al.* Quantitation of Integrated HIV Provirus by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Droplet Digital PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, California v. 56, n. 12, p. 1-10, 27 nov. 2018. DOI 10.1128/jcm.01158-18. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.01158-18>. Acesso em: 23 jun. 2023.

LIMA, ANA CAROLINA MARIA ARAÚJO CHAGAS COSTA. Booklet for knowledge and prevention of HIV mother-to-child transmission: a pilot study of a randomized clinical trial. **Revista Da Escola De Enfermagem Da USP**, São Paulo, v. 56, p. 1-9, 21 set. 2022. DOI <https://doi.org/10.1590/1980-220X-REEUSP-2021-0560en>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/re USP/a/P8Ydg6W58YfnRTYxkLStQZN/?lang=en#>. Acesso em: 30 nov. 2023.



MALNATI, MAURO. *et al.* A universal real-time PCR assay for the quantification of group-M HIV-1 proviral load. **Nature Protocols**, Milan, v. 3, p. 1240–1248, 3 jul. 2008. DOI <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.108>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2008.108#citeas>. Acesso em: 16 out. 2023.

OPIJNEN, TIM VAN. *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes Have a Distinct Long Terminal Repeat That Determines the Replication Rate in a Host-Cell-Specific Manner. **Journal of Virology**, Amsterdam, v. 7, n. 78, p. 3675-3683, ano 2004. DOI 10.1128/JVI.78.7.3675-3683.2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC371093/>. Acesso em: 15 out. 2023.

WERSOM, ELAINE SANAE SUMIKAWA. *et al.* **MANUAL TÉCNICO PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HIV**, 2013. 56 p. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_infeccao_hiv.pdf. Acesso em: 9 out. 2023.

ZAZZI, MAURIZIO. *et al.* Nested Polymerase Chain Reaction for Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA in Clinical Specimens. **Journal of Medical Virology**, Rome, v. 38, p. 172-174, 22 abr. 1992. DOI 10.1002/jmv.1890380304. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.1890380304?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 23 jun. 2023.

ISBN 978-658506211-4



AGRON FOOD
ACADEMY