

SAÚDE PÚBLICA EM FOCO: PESQUISAS E INOVAÇÕES

Coletânea de capítulos da VI Mostra dos Trabalhos de Conclusão de Curso da Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública

Organizadores

Cristiane Bonaldi Cano

Elaine Lopes de Oliveira

Jackson Andson de Medeiros



Venda proibida



Open access



Revisado por pares

Conselho editorial

EDITOR CHEFE

Jackson Andson de Medeiros

CORPO EDITORIAL

Cristiane Bonaldi Cano
Elaine Lopes de Oliveira

REVISÃO FINAL

Cristiane Bonaldi Cano
Elaine Lopes de Oliveira

CAPA

Jackson Andson de Medeiros

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Cano, Cristiane Bonaldi [outros organizadores]. Saúde Pública em Foco: Pesquisas e Inovações – Coletânea de capítulos da VI Mostra dos Trabalhos de Conclusão de Curso da Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública / Cristiane Bonaldi Cano, Elaine Lopes de Oliveira, Jackson Andson de Medeiros [organizadores]. Jardim do Seridó - RN: AGRONFY, 2025.

Formato digital.

ISBN: 978-65-85062-22-0

Vigilância Laboratorial 2. Saúde Pública 3. Epidemiologia 4. Doenças Infecciosas 5. Microbiologia 6. Patógenos 7. Diagnóstico 8. Segurança Alimentar 9. Análises Clínicas 10. Controle de Qualidade 11. Zoonoses 12. Imunologia 13. Resistência Antimicrobiana 14. Biologia Molecular I. Cano, Cristiane Bonaldi II. Oliveira, Elaine Lopes de III. Medeiros, Jackson Andson de IV. Agron Food Academy (Brasil).

CDD 610

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02

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

AGRONFY
AGRONFY.COM.BR

APRESENTAÇÃO

Este livro reúne uma coletânea de capítulos apresentados na VI Mostra dos Trabalhos de Conclusão de Curso da Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública do ano letivo de 2024, trazendo estudos inovadores e relevantes sobre as áreas de vigilâncias epidemiologia, sanitária e ambiental em diferentes temas abordados nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz.

Com uma abordagem científica e aplicada, os capítulos exploram o diagnóstico laboratorial, caracterização epidemiológica, impacto em saúde pública e novas estratégias de controle e prevenção de agravos em saúde, destacando a importância da atuação dos laboratórios na detecção e mitigação de surtos, que estão relacionados a atuação laboratorial em respostas às demandas dos Sistemas Estadual e Nacional de Vigilância em Saúde, aprimorando o processo de formação de profissionais, de modo a desenvolver uma compreensão ampla e integrada das ações do sistema de saúde do SUS.

Esta obra é uma referência essencial para profissionais da saúde, pesquisadores e estudantes interessados no fortalecimento da vigilância laboratorial e no avanço das estratégias de combate a doenças.

SUMÁRIO

Capítulo 01	5
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-01	5
ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NO CORAÇÃO, BAÇO, FÍGADO E INTESTINO DE <i>CALOMYS CALLOSUS</i> INFECTADOS PELO <i>TRYPANOSOMA</i> <i>CRUZI</i> NAS FASES AGUDA, CRÔNICA E APÓS IMUNOSSUPRESSÃO QUÍMICA	5
Capítulo 02	21
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-02	21
COINFECÇÃO LEISHMANIOSE VISCERAL E VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA NO BRASIL	21
Capítulo 03	28
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-03	28
EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE E DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA-IgG PARA DETECÇÃO DE <i>Rickettsia rickettsii</i>	28
Capítulo 04	35
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-04	35
ANÁLISE DE RESISTÊNCIA AOS TRATAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS EM MULHERES VIVENDO COM HIV	35
Capítulo 05	41
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-05	41
SURTOS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA ENVOLVENDO VÍRUS ENTÉRICOS: EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO EM SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL, 2000-2023	41
Capítulo 06	48
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-06	48
PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS SURTOS DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR CAUSADOS POR <i>SALMONELLA</i> spp., BRASIL, 2004 A 2023.	48

Capítulo 07	55
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-07	55
RESISTÊNCIA DE LARVAS DE PRIMEIRO ESTÁGIO (L1) DE <i>ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS</i> EM FEZES DE <i>RATTUS NORVEGICUS</i> EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS, FRENTE A DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS	55
Capítulo 08	61
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-08	61
DETECÇÃO MOLECULAR DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE MAMÍFEROS SILVESTRES E SUAS IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA	61
Capítulo 09	68
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-09	68
DESFECHOS VIRO LÓGICOS E IMUNOLÓGICOS APÓS 10 ANOS DA GENOTIPAGEM REALIZADA ENTRE 2011 E 2014 EM CRIANÇAS DE 5 A 15 ANOS VIVENDO COM HIV EM SÃO PAULO	68
Capítulo 10	75
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-10	75
UMA VISÃO CRÍTICA COM O OBJETIVO DE COMPARAR AS VACINAS BEXSERO E TRUMENBA PARA <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> B MUNDIALMENTE UTILIZADAS	75
Capítulo 11	81
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-11	81
CARACTERIZAÇÃO DOS EXAMES DE CARGA VIRAL DO VÍRUS DA HEPATITE C REALIZADOS NO CENTRO DE LABORATÓRIO REGIONAL INSTITUTO ADOLFO LUTZ SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – X, NO PERÍODO DE JANEIRO DE 2022 A DEZEMBRO DE 2023	81
Capítulo 12	87
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-12	87
GELADOS COMESTÍVEIS: QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO	87

Capítulo 13	93
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-13	93
LEPTOSPIROSE: ESTUDO DE UMA DÉCADA DOS CASOS DE ÓBITOS CONFIRMADOS POR PESQUISA IMUNO-HISTOQUÍMICA PELO NÚCLEO DE ANATOMIA PATOLÓGICA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ	93
Capítulo 14	101
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-14	101
CONTROLE DE QUALIDADE E ASPECTOS REGULATÓRIOS DOS PRODUTOS DE CANNABIS PARA FINS MEDICINAIS NO BRASIL	101
Capítulo 15	107
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-15	107
CRONOBACTER SPP.: FONTE DE CONTAMINAÇÃO, RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E ESTRATÉGIAS DE CONTROLE	107
Capítulo 16	113
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-16	113
CO-INFECÇÕES E IMPLICAÇÕES DAS ARBOVIROSES DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA: UMA BREVE REVISÃO	113
Capítulo 17	120
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-17	120
RECARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DO COMPLEXO <i>SPOROTHRIX SCHENCKII</i> DO NÚCLEO DE COLEÇÕES DE MICRO-ORGANISMOS POR MEIO DA METODOLOGIA MALDI-TOF COM CONSTRUÇÃO DE BANCO IN-HOUSE	120
Capítulo 18	126
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-18	126
ESCOMBROTOXICOSE: UM OLHAR SOBRE A FORMAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADOS	126
Capítulo 19	131
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-19	131
FRAUDES EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS: MÉTODOS DE DETECÇÃO, MITIGAÇÃO DAS FRAUDES E SEUS DESAFIOS	131

Capítulo 20 _____	138
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-20 _____	138
DETECÇÃO MOLECULAR DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE MAMÍFEROS SILVESTRES E SUAS IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA _____	138
Capítulo 21 _____	145
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-21 _____	145
PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. E <i>E. coli</i> EM CARNE DE FRANGO CRUA REFRIGERADA COMERCIALIZADA EM SÃO PAULO _____	145
Capítulo 22 _____	152
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-22 _____	152
AVALIAÇÃO DO TEOR DE GORDURA TOTAL EM BISCOITOS: IMPLICAÇÕES PARA A SAÚDE DO CONSUMIDOR _____	152
Capítulo 23 _____	157
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-23 _____	157
DETERMINAÇÃO DE PROLINA NOS MÊIS DO ESTADO DE SÃO PAULO _____	157
Capítulo 24 _____	163
DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-24 _____	163
CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>PARACOCIDIODES</i> ssp DO ACERVO DO NÚCLEO DE COLEÇÃO DE MICRO- _____	163

Capítulo 01

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-01

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS NO CORAÇÃO, BAÇO, FÍGADO E INTESTINO DE *CALOMYS CALLOSUS* INFECTADOS PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* NAS FASES AGUDA, CRÔNICA E APÓS IMUNOSSUPRESSÃO QUÍMICA

Caroline Correia Jorge Pires¹; Profa. Dra. Gislene Miitsue Namiyama Nishina²; Noemi Nosomi Taniwaki²

¹ Instituto Adolfo Lutz, Núcleo de Microscopia Eletrônica, Centro de Formação de Recursos Humanos SUS/SP "Dr. Antônio Guilherme de Souza", São Paulo-SP, e-mail: pircarol@gmail.com

² Núcleo de Microscopia Eletrônica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (SP)

Resumo: A doença de Chagas (DC) é uma doença crônica humana, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que acomete milhões de indivíduos globalmente. Configurando-se como uma séria questão de Saúde Pública no Brasil, esta doença lidera entre as doenças tropicais negligenciadas. Neste estudo, investigamos um modelo experimental da doença de Chagas em *Calomys callosus* (roedor da família *Cricetidae*) e acompanhamos sua evolução em diferentes fases da doença. *Calomys callosus* foram infectados pelo *T. cruzi* da cepa G (*T. cruzi* I) e coração, fígado, baço e intestino foram processados em parafina, cortados e corados, a fim de identificar padrões lesionais histopatológicos nas fases aguda, crônica e em animais cronicamente infectados e imunossuprimidos. Investigamos se haviam diferenças nas lesões teciduais, isto é, se havia relação entre o infiltrado inflamatório, a presença ou não de ninhos e a agressão ou não aos órgãos relacionados com este parasita em cada fase da doença. Na fase aguda, foram identificadas lesões inflamatórias acompanhadas pela presença de formas amastigotas no coração, fígado e baço. Na fase crônica, houve predominância de infiltrado mononuclear e de eosinófilos no coração, baço e intestino. Nos animais cronicamente infectados e imunossuprimidos, observaram-se fibrose no coração, presença de ninhos no baço e infiltrado mononuclear e eosinófilos no coração, baço e intestino. As interações complexas entre células e fatores humorais durante a infecção revelaram-se fundamentais para o curso da doença, destacando-se a atuação de macrófagos, plasmócitos, fibroblastos e eosinófilos nas lesões desses órgãos. Este estudo reafirma a relevância na pesquisa da doença de Chagas e a utilização de modelos experimentais, para a investigação da dinâmica da DC, que sugerem respostas imunológicas diferenciadas e se padrões lesionais específicos relacionam-se às distintas fases da doença. Tais achados oferecem uma compreensão aprofundada da patogênese da DC e abrem perspectivas para futuras intervenções terapêuticas.

Palavras-chave: doença de Chagas; patologia veterinária; *Trypanosoma cruzi*; *Calomys callosus*.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é a infecção humana crônica causada por um protozoário, o *Trypanosoma cruzi*. A doença de Chagas afeta de 8 a 10 milhões de pessoas mundialmente (MILLS, 2020). No Brasil, é um problema persistente de Saúde Pública. Esta doença foi a principal causa de incapacidade entre todas as doenças tropicais negligenciadas, seguida pela esquistossomose e pela dengue. No estudo de GONÇALVES *et al.* (2021) verificou-se que no período de 2010 a 2019 foram registrados 45.409 óbitos nas cinco regiões brasileiras, indicando também uma relação entre a vulnerabilidade social e o acometimento da DC.

A DC também é um desafio devido à qualidade dos sistemas de saúde, além do número de doenças subdiagnosticadas e subtratadas em indivíduos de áreas não endêmicas. O diagnóstico depende do estágio da doença – aguda e crônica. Sendo a primeira difícil de caracterizar clinicamente, pois seus sinais clínicos geralmente são assintomáticos e, se houver manifestações são transitórias e inespecíficas, portanto, tendem a ser negligenciados (DURÃES-OLIVEIRA *et al.*, 2024). Entre 2003 e 2018, foram notificados 4.556 casos da forma aguda da doença de Chagas (SANTOS *et al.*, 2020). A fase crônica geralmente está associada a alterações permanentes nos sistemas nervoso e digestivo, assim como modificações cardíacas graves que podem durar por toda a vida do paciente (DURÃES-OLIVEIRA *et al.*, 2024).

A DC é uma zoonose, sendo que o *T. cruzi* tem a capacidade de infectar diversas espécies de mamíferos, como por exemplo, guaxinins, gambás, ratas e cães (GONÇALVES *et al.*, 2021). O ciclo peridomiciliar do parasita desempenha um papel importante uma vez que, a infecção dessa espécie pode indicar a presença de uma transmissão ativa de *T. cruzi* e, representam um risco aumentado à infecção humana (DURÃES-OLIVEIRA *et al.*, 2024).

Calomys callosus é um roedor pertencente à família *Cricetidae*, nativa da América do Sul, de tamanho semelhante ao camundongo. É um hospedeiro natural tolerante ao *T. cruzi*, devido a sua alta permissividade à infecção, e sua capacidade de manter uma parasitemia regular e de longo prazo (ROSA *et al.*, 2022). Comparando-se a infecção em camundongos e *Calomys sp.*, os camundongos apresentam lesões inflamatórias e fibrose no miocárdio persistentes, decorrente de uma colonização por formas amastigotas. *Calomys* embora inicialmente, tenham lesões inflamatórias e fibrose, eventualmente apresentam regressão das lesões com reconstituição tecidual (ANDRADE *et al.*, 1994).

Acredita-se que, as complexas interações que ocorrem entre células e fatores humorais durante a infecção pelo *T. cruzi*, desempenhem um papel crítico no curso da doença (SANTOS *et al.*, 2008). BORGES *et al.* (1992) observaram que, as principais células envolvidas nas lesões induzidas pela presença de formas amastigotas de *T. cruzi* eram os macrófagos e os fibroblastos. Em outro estudo, SANTOS *et al.* (2004) confirmou as peculiaridades de respostas de *C. callosus* quando infectados por diferentes cepas do *T. cruzi*.

Neste trabalho, desenvolvemos um modelo experimental da doença de Chagas em *Calomys callosus* e acompanhamos sua evolução em diferentes fases da doença. Através da histopatologia com colorações específicas e técnicas de imunohistoquímica, foram identificados os tipos de lesões presentes no coração, baço, fígado e intestino destes animais nas fases aguda, crônica e em animais cronicamente infectados e imunossuprimidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Calomys callosus (Borges *et al.*, 1982), fêmeas, com 4 a 6 semanas de idade foram infectadas com *T. cruzi* da cepa G (isolado de um marsupial da família *Didelphidae*, da região Amazônica) com 1×10^5 tripomastigotas/ animal por via intraperitoneal. Os animais foram divididos em 3 grupos:

- a. Animais na fase aguda de infecção;
- b. Animais na fase crônica após 12 meses de infecção;
- c. Animais crônicos e imunossuprimidos (com ciclofosfamida) após 12 meses de infecção.

Processamento histopatológico

Os órgãos (coração, baço, fígado e intestino) foram retirados e fixados em solução de formaldeído (4%) em tampão fosfato salina (PBS), desidratados em concentração crescente de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo e colhidos em lâmina.

Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)

Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de álcool e lavados com água. Os cortes ficaram imersos em Hematoxilina de Harris por 1 minuto e após foram lavados com água. Em seguida foram mergulhados rapidamente em álcool-ácido, lavados em água, e mergulhados rapidamente em água amoniacal e lavados em água. Após este processo foram corados com Eosina por 1 minuto. Logo após, foram desidratados em álcool em concentração crescente e diafanizados em xilol e montados com lamínula.

Coloração de Tricrômico de Masson

Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em álcool e lavados em água corrente por 5 minutos. Em seguida, foram mordentados em solução de Bouin por 1 hora a 60°C e lavados novamente em água corrente até remover o pigmento amarelado, sendo então imersos em água destilada. Posteriormente, os cortes foram corados com Hematoxilina Férrica de Weigert, seguidos de nova lavagem. Após, foram corados em solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos, seguidos por lavagem em água destilada, e diferenciados em solução de ácido fosfotúngico-fosfomolibdico por 15 minutos, com outra lavagem em água destilada. Foram então corados com azul de anilina por 5 minutos, lavados em água destilada, tratados com ácido acético glacial 1% por 3-5 minutos, lavados novamente e, por fim, desidratados em álcool e diafanizados em xilol e montados em resina sintética.

O Tricrômico de Masson realça as fibras de colágeno em azul ou verde. A queratina e fibras musculares ficam coradas em vermelho claro ou rosa e o núcleo em preto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

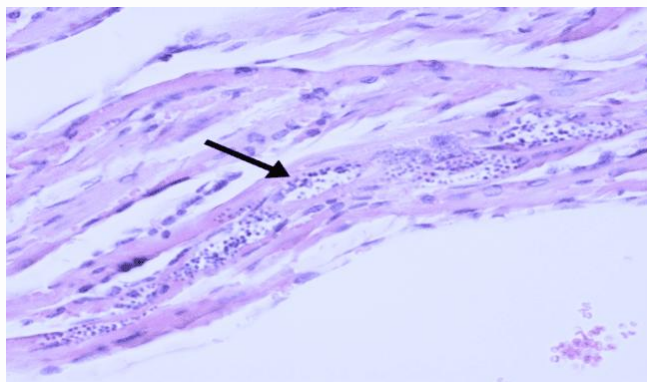
Neste estudo, foram observadas as alterações histopatológicas de coração, baço, fígado e intestino de *Calomys callosus*, infectados pelo *T. cruzi* da cepa G, em diferentes fases de infecção. As lesões foram classificadas na descrição microscópica de BARROS (2021), que direciona a nomenclatura utilizada como: focal, multifocal, multifocal a coalescente e difusa. Também foram registradas a presença ou ausência de células inflamatórias, tais como linfócitos, eosinófilos, macrófagos, células gigantes multinucleadas, entre outras. Também foram avaliadas a presença de fibrose, necrose, perda da estrutura tecidual e presença ou não de ninhos de amastigotas.

Fase aguda

Em humanos, a doença de Chagas (DC) apresenta uma variabilidade clínica, começando com uma breve fase aguda, caracterizada por alta parasitemia. No entanto, essa fase aguda geralmente passa despercebida na maioria dos casos, devido à escassez ou ausência de manifestações clínicas. Embora o coração seja o principal órgão afetado, a presença de amastigotas também é observada em outros órgãos (LANDSGAARD *et al.*, 2023). Neste estudo, observou-se que o coração e o baço apresentaram maior quantidade de amastigotas em pseudocistos.

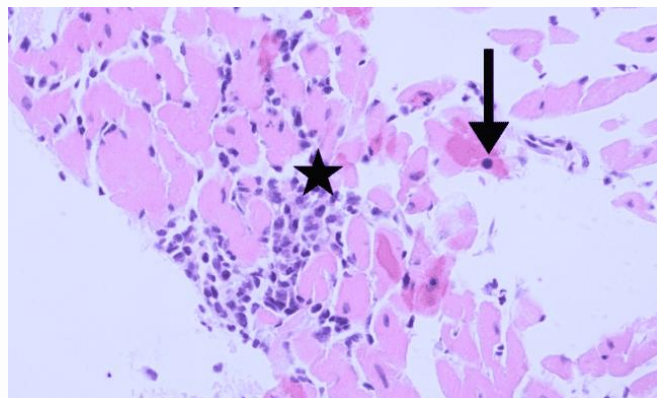
No coração, o miocárdio foi a região mais afetada, seguido pelas aurículas. Foram observados pseudocistos únicos ou múltiplos em alguns animais na fase aguda, como demonstrado na Figura 1. Os cardiomiócitos continham pseudocistos, que exibiam numerosas formas diminutas de amastigotas, caracterizadas por citoplasma basofílico com núcleo central e cinetoplastos pouco discerníveis. Observou-se infiltrado inflamatório marcante composto por linfócitos e histiócitos. Adicionalmente, observou-se degeneração nos cardiomiócitos, alguns apresentando citoplasma altamente eosinofílico e necrose, como ilustrado na Figura 2. No estudo de DA SILVA (2011), foram observados achados semelhantes relacionados ao infiltrado inflamatório, com um grande número de macrófagos nos animais infectados pela cepa G. MAGALHÃES-SANTOS (2005) relatou um infiltrado inflamatório elevado e lesões necróticas predominantemente no miocárdio. No entanto, essas lesões cardíacas diminuíram em intensidade após 25 a 35 dias, sendo substituídas por necrose focal e infiltrações mononucleares focais.

Figura 1 - Corte de coração (miocárdio) de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G na fase aguda. Observa-se um grande pseudocisto com amastigotas identificados pela seta, entremeados aos cardiomiócitos que se apresentam em degeneração. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.



Fonte: Acervo pessoal (2024)

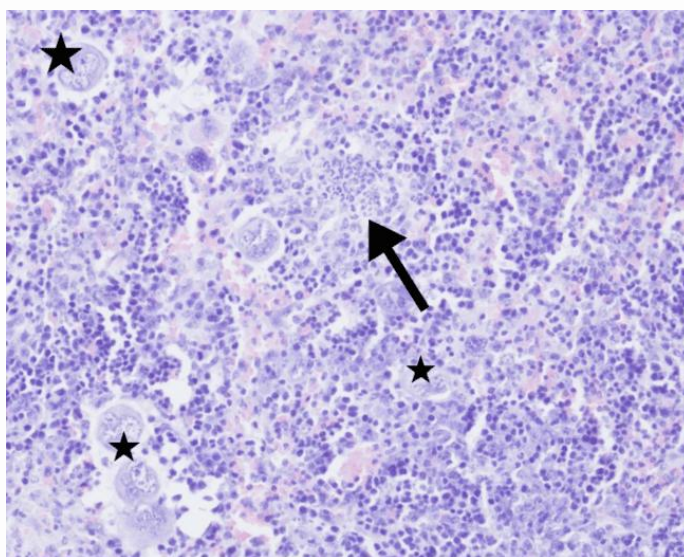
Figura 2- Corte de coração (miocárdio) de *C. callosus* infectado com *T. cruzi* da cepa G na fase aguda. Observa-se um infiltrado inflamatório focal (estrela) com presença de células mononucleares compostas por linfócitos e histiócitos. Cardiomiócitos adjacentes apresentam-se necróticos com aumento de eosinofília e núcleos picnóticos (seta). Aumento de 200x.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

No baço, a inflamação granulomatosa foi predominante, com a presença de células gigantes multinucleadas, identificadas na fase aguda. Além disso, notou-se aglomerados de amastigotas, com macrófagos fagocitando ativamente os parasitas, como mostrado nas figuras 3. Segundo ZACHARY (2018), a inflamação granulomatosa é um padrão distinto de inflamação crônica, sendo uma tentativa celular de conter agentes agressores de difícil erradicação, como o *T. cruzi*.

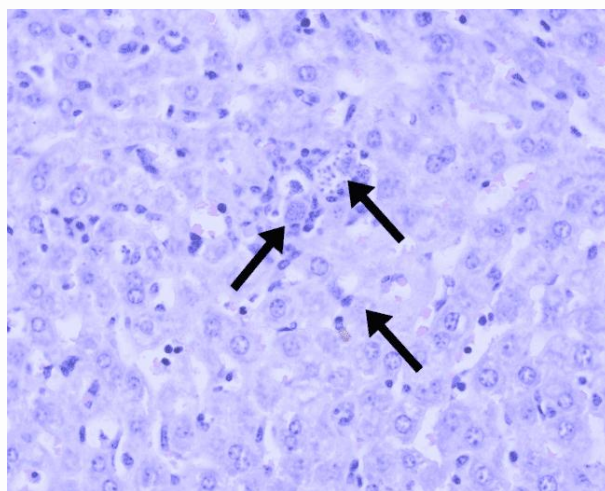
Figura 3 – Corte de baço de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G na fase aguda. Notam-se aglomerados de amastigotas (seta) entremeados por células mononucleares e áreas hemorrágicas. Observam-se células gigantes multinucleadas (estrela). Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 200x.



Fonte: Acervo pessoal (2024)

Entre todos os animais estudados na fase aguda, apenas um apresentou alteração no fígado, com presença de amastigotas nos sinusóides dos hepatócitos e inflamação multifocal mononuclear, composta predominantemente por linfócitos, conforme ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Corte de fígado de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G na fase aguda. Observa-se um infiltrado inflamatório multifocal com presença de células mononucleares compostas por linfócitos e histiócitos. É possível encontrar amastigotas nos sinusóides dos hepatócitos e amastigotas aglomerados (seta) no citoplasma de um hepatócito. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.



Fonte: Acervo pessoal (2024)

Não foram observados focos inflamatórios ou alterações significativas no intestino durante a fase aguda.

Fase crônica

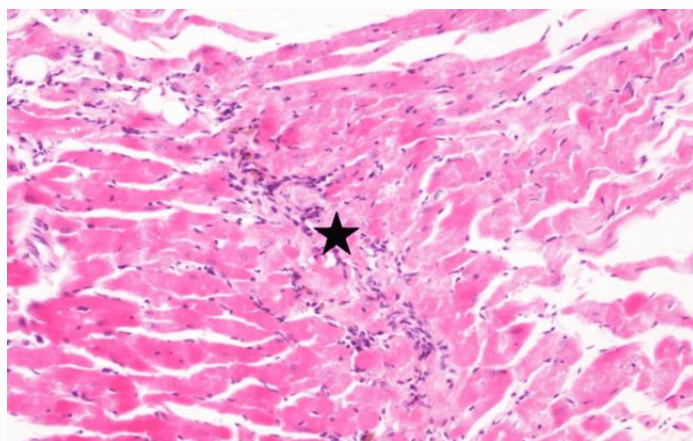
Em humanos, a fase aguda da infecção geralmente se resolve espontaneamente; contudo, os pacientes permanecem cronicamente infectados. O envolvimento cardíaco é a manifestação mais frequente e grave da doença, enquanto, o comprometimento gastrointestinal é menos comum (PÉREZ-MOLINA, 2018). A carga parasitária na fase aguda, influencia diretamente a gravidade das manifestações na fase crônica. Dessa forma, o controle da parasitemia na fase aguda está intimamente relacionado, à severidade da patologia na fase crônica (MARINHO *et al.*, 1999). Durante a fase crônica, a inflamação é o principal fator que determina a progressão da doença (PÉREZ-MOLINA, 2018).

Na fase crônica deste estudo, os achados histopatológicos foram significativos, com presença de fibrose, necrose significativa e perda moderada da estrutura tecidual. Diferentemente da fase aguda, não foram observados pseudocistos ou amastigotas, após 12 meses de infecção. Além disso, o padrão inflamatório apresentou variações, com aumento moderado de eosinófilos, principalmente, no baço e nos intestinos.

A fase crônica no coração foi caracterizada por inflamação multifocal, composta predominantemente por linfócitos, histiócitos e fibroblastos, como visto na Figura 5 e pela presença de fibrose, degeneração de fibras cardíacas e elevados níveis de necrose (Figura 6). O estudo de MARINHO *et al.* (1999) também relataram infiltrado inflamatório e fibras cardíacas degeneradas. Segundo ÁLVAREZ *et al.* (2014), a ausência de ninhos de

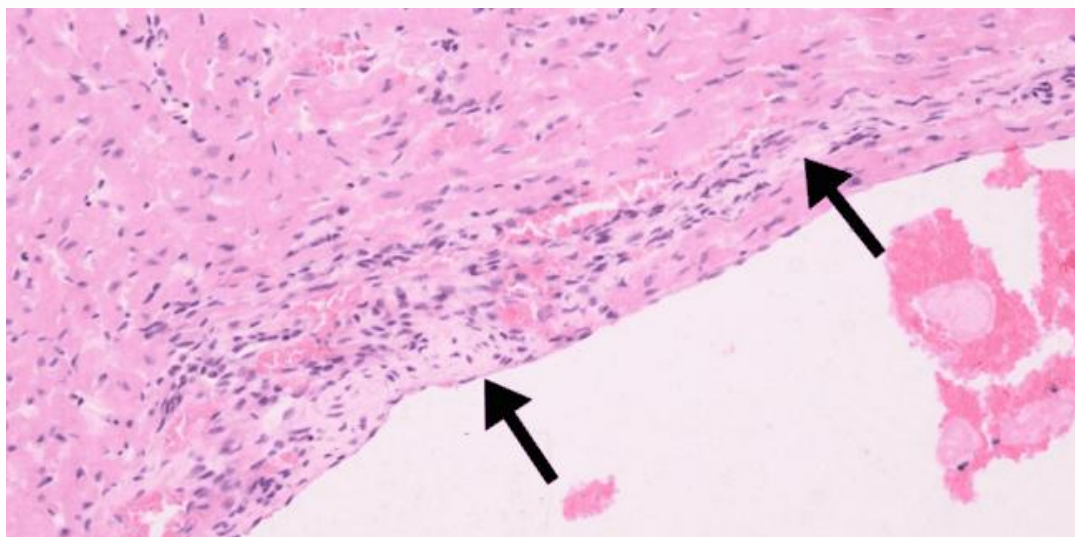
amastigotas, pode contribuir para a perpetuação do parasita e a patologia cardíaca na fase crônica. Esse processo provavelmente exibe um elevado grau de variabilidade, refletindo a interação entre o hospedeiro e o parasita.

Figura 5 – Corte de coração (miocárdio) de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G na fase crônica. Infiltrado inflamatório multifocal a coalescente moderado de linfócitos, plasmócitos e menos histiócitos (estrela), que frequentemente separam e cercam os cardiomiócitos; fibroblastos e depósitos de matriz também são vistos. Também é possível ver cardiomiócitos necróticos que apresentam sarcoplasma fragmentado, eosinofílico e contém núcleos picnóticos. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 200x.



Fonte: Acervo pessoal (2024)

Figura 6 - Corte de coração (miocárdio) de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G na fase crônica. Mostrando infiltrado mononuclear intersticial, fibroblastos e depósitos de matriz e fibrose (seta). Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 200x.

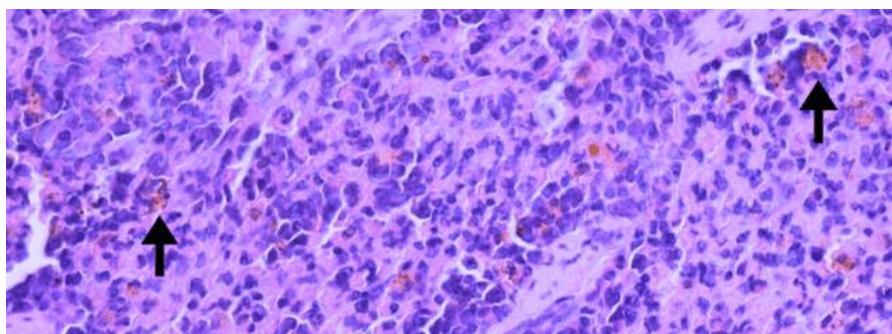


Fonte: Acervo pessoal (2024)

No baço, o achado principal da fase crônica foi um aumento significativo de eosinófilos. Diferente da fase aguda, não houve presença de células gigantes multinucleadas. Outro achado não específico foi a pigmentação marrom a dourada multifocal na polpa branca

esplênica, conforme ilustrado na Figura 7. OLIVEIRA *et al.* (1993) observaram, no baço de camundongos após 300 dias de infecção, infiltrado composto por plasmócitos.

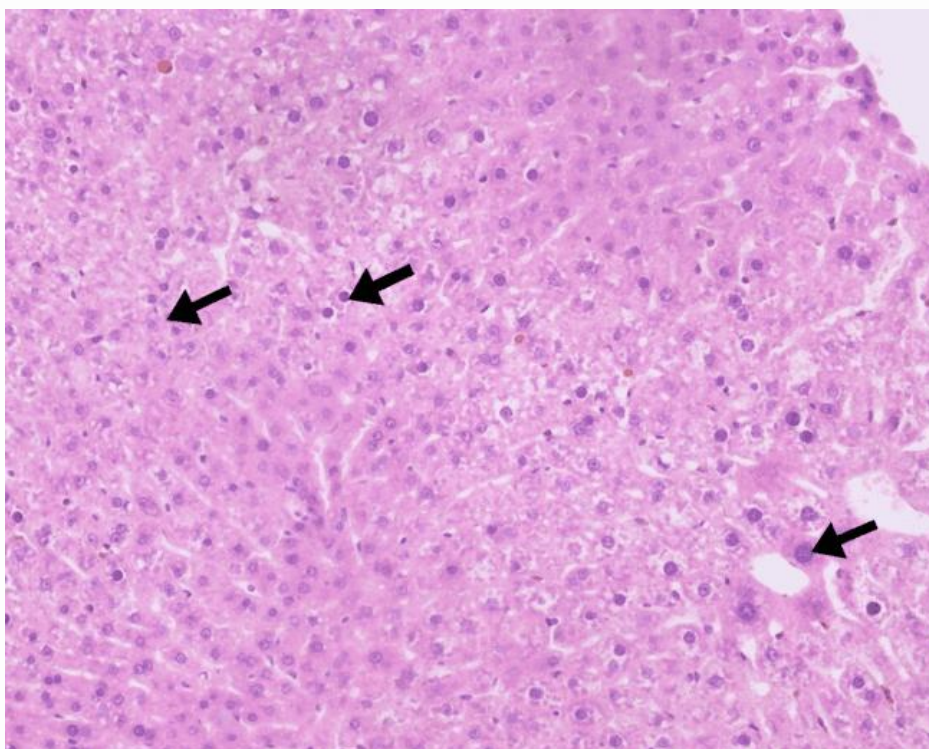
Figura 7 - Corte de baço de *C. callosus* infectado com *T. cruzi* da cepa G na fase crônica. É possível ver aumento de eosinófilos entremeando a polpa vermelha e branca. Também é possível ver pigmentação marrom a dourado multifocal (seta) dentro da polpa branca esplênica. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.



Fonte: Acervo pessoal (2024)

No fígado (Figura 8), houve perda moderada da estrutura, com degeneração de hepatócitos, necrose e infiltrado composto principalmente por linfócitos. Observou-se também perda dos bordos dos hepatócitos, anisocariose e anisocitose acentuadas, com alguns núcleos apresentando aumento de basofilia.

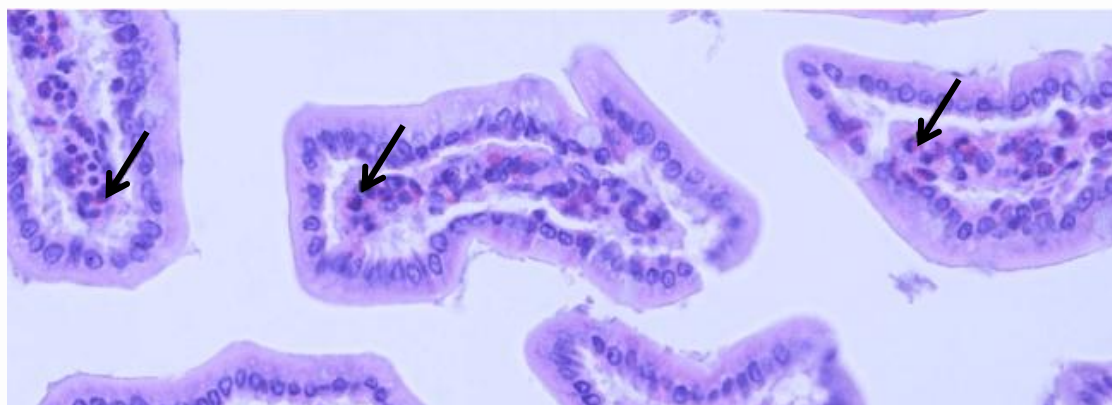
Figura 8 - Corte de fígado de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G na fase crônica. Mostrando perda de estrutura, com hepatócitos em degeneração, necrose. Hepatócitos com perda dos bordos dos hepatócitos (seta), alta anisocariose e anisocitose. Além de núcleos com aumento de basofilia. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 200x.



Fonte: Acervo pessoal (2024)

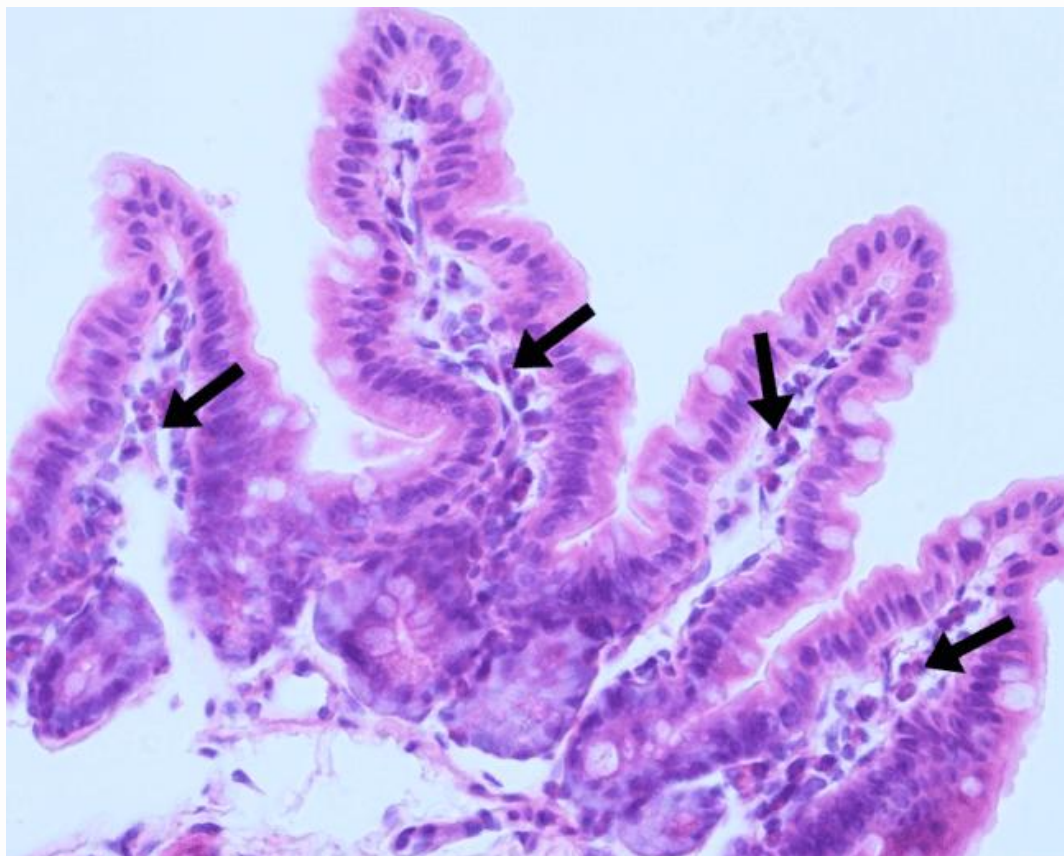
O intestino exibiu infiltração eosinofílica difusa, predominantemente na lâmina própria, seguida pelas criptas e camada muscular da mucosa. Infiltrados esparsos entre as células também foram observados, como mostrado nas Figuras 9 e 10. Segundo ÁLVAREZ *et al.* (2014), o cólon é um local onde o *T. cruzi* persiste cronicamente; no entanto, em nosso estudo, não foram encontrados parasitas visíveis em qualquer região intestinal.

Figura 9 - Corte de intestino de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G na fase crônica. Infiltrado inflamatório difuso composto por eosinófilos (seta) na lâmina própria. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.



Fonte: Acervo pessoal (2024)

Figura 10 - Corte de intestino de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G na fase crônica. Na região das criptas, camada muscular da mucosa e lâmina própria é possível ver infiltrado de eosinófilos (seta). Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.



Fonte: Acervo pessoal (2024)

Animais cronicamente infectados e imunossuprimidos

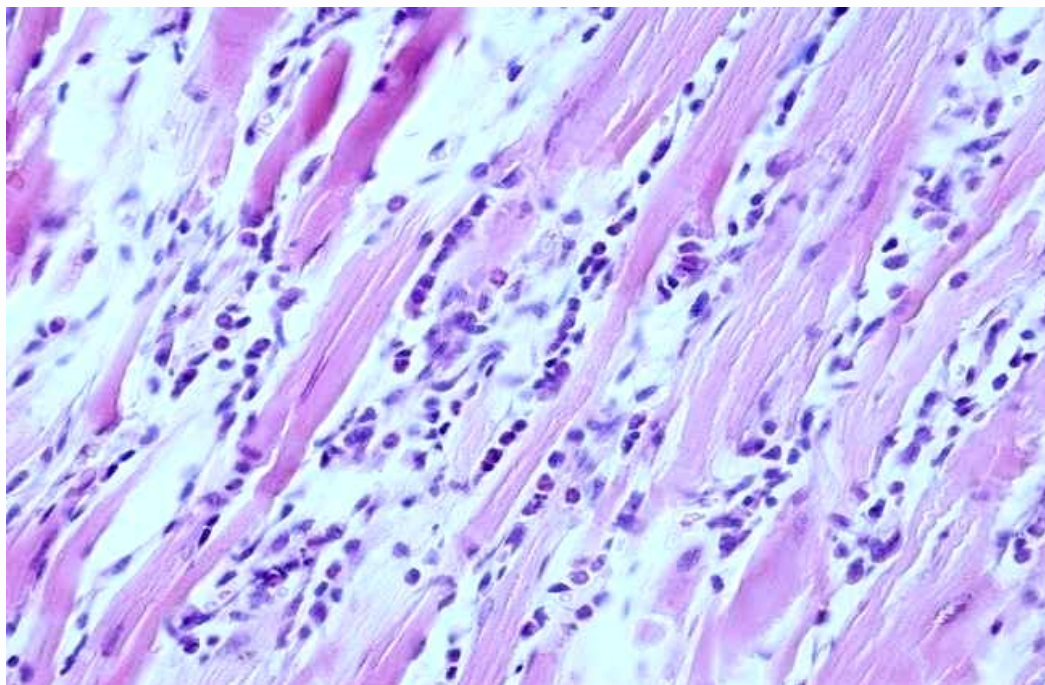
A reativação da infecção em indivíduos na fase crônica pode ocorrer em várias condições de imunossupressão, como durante tratamentos com medicamentos imunossupressores para prevenir rejeição de transplantes ou em doenças imunossupressoras, como leucemia e AIDS (SARTORI *et al.*, 1998).

Em animais cronicamente infectados e imunossuprimidos deste estudo, os achados histopatológicos mais intensos estavam relacionados à necrose, com acentuada perda da estrutura tecidual no coração e no fígado. Além disso, foram observados um padrão inflamatório caracterizado pela presença de eosinófilos em todos os quatro órgãos estudados, com maior destaque no coração, intestino e baço.

No coração, o principal achado foi o infiltrado inflamatório composto predominantemente por eosinófilos e células mononucleares (Figura 11), na maioria dos casos apresentado de forma difusa, e raramente de maneira multifocal a coalescente. Também foi observada necrose significativa, com perda das margens celulares e degeneração tecidual.

Figura 11 - Corte de coração (miocárdio) de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G após imunossupressão. Observa-se infiltrado inflamatório difuso, composto

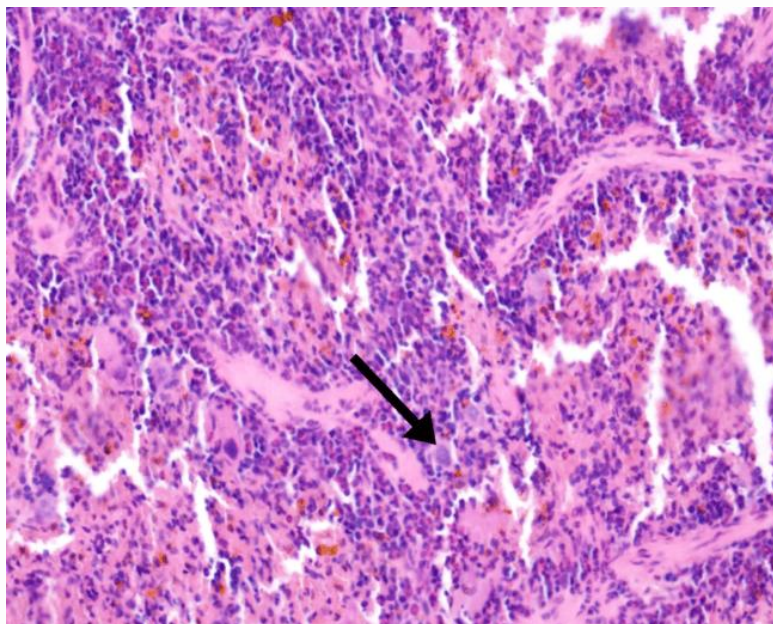
predominantemente por eosinófilos, linfócitos e plasmócitos. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.



Fonte: Acervo pessoal (2024)

Os achados no baço em animais imunossuprimidos revelaram um infiltrado inflamatório difuso, com eosinófilos presentes na polpa branca e vermelha, conforme ilustrado na figura 12. No estudo de ANDRADE *et al.* (2003), camundongos infectados com *T. cruzi* e submetidos ao tratamento com imunossuppressores mantiveram sua resposta leucocitária, mesmo sob influência dessas drogas ou em tratamento com benzonidazol, apresentando hiperplasia leve a moderada dos folículos linfóides, sem proliferação das células dos centros germinativos. Isso demonstra que, *C. callosus* exibe uma resposta imunológica diferenciada, em relação a outras espécies.

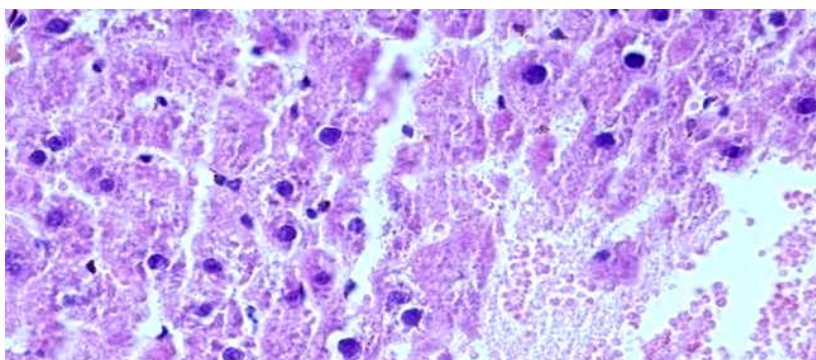
Figura 12 – Corte de baço de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G após imunossupressão. Observam-se células gigantes (seta) presentes na polpa vermelha. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 200x.



Fonte: Acervo pessoal (2024)

O fígado foi o órgão que apresentou maior perda estrutural e necrose, com destruição celular dos hepatócitos, anisocariose e anisocitose acentuados, além de aumento da basofilia nuclear, como visto na Figura 13.

Figura 13 - Corte de fígado de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G após imunossupressão. Observa-se perda estrutural e necrose, com destruição celular dos hepatócitos, anisocariose e anisocitose acentuados. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.

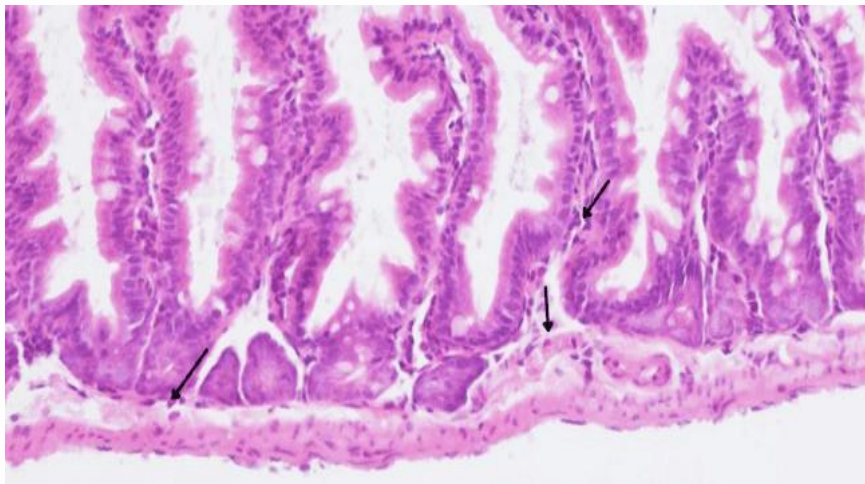


Fonte: Acervo pessoal (2024)

As alterações observadas no intestino em animais imunossuprimidos foram semelhantes às da fase crônica (Figura 14), caracterizadas por inflamação eosinofílica difusa. Infiltrados dispersos entre as células foram notados, assim como na fase crônica.

Figura 14 – Cortes de intestino de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G após imunossupressão. Observa-se infiltrado inflamatório difuso, composto predominantemente

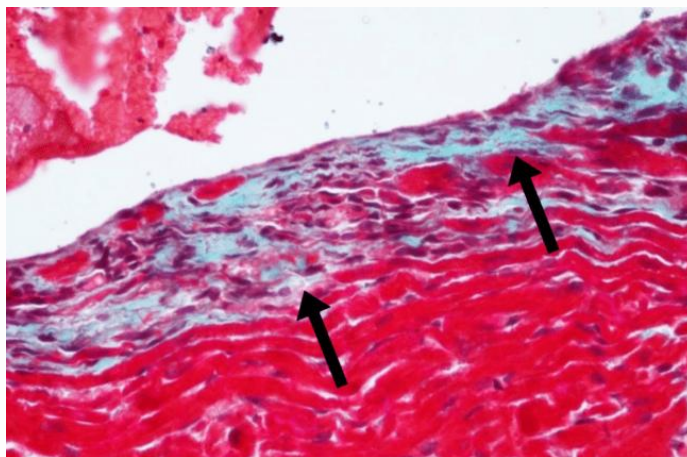
por eosinófilos (setas) na lâmina própria, criptas e camada muscular. Coloração de Hematoxilina-Eosina. Aumento de 400x.



Fonte: Acervo pessoal (2024)

Adicionalmente, foi realizada a coloração de Tricrômico de Masson, que permitiu visualizar o padrão de fibrose característico da DC. Foi possível observar fibrose intersticial e focal em animais cronicamente infectados após 12 meses e, extensa fibrose intersticial no coração de animais imunossuprimidos, como ilustrado na Figura 15.

Figura 15 – Corte de coração de *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* da cepa G na fase crônica. Observa-se fibrose intersticial focal. Coloração de Tricrômico de Masson. Aumento de 400x.



Fonte: Acervo pessoal (2024)

Não houveram alterações significativas relacionadas à fibrose na fase aguda, assim como alterações em outros órgãos.

CONCLUSÕES

O estudo realizado demonstrou que a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* apresenta variações significativas na resposta inflamatória e na gravidade das lesões em diferentes

órgãos, dependendo da fase da doença e do estado imunológico do hospedeiro. A fase aguda foi marcada pela presença de pseudocistos de amastigotas, especialmente no coração, no baço e no fígado, com inflamação granulomatosa, predominante no baço. Por outro lado, os animais cronicamente infectados e imunossuprimidos apresentaram maior intensidade de fibrose, necrose e perda de estrutura tecidual, sem a presença de parasitas visíveis, refletindo a complexidade da resposta imunológica prolongada.

Os achados histopatológicos do coração, baço, fígado e intestino reforçam a variabilidade da resposta inflamatória e a importância dos macrófagos como mediadores da patologia tanto nas fases aguda quanto após imunossupressão. O envolvimento cardíaco, com inflamação difusa e fibrose progressiva, foi consistente com as manifestações observadas em humanos, destacando a relevância deste modelo animal, para o estudo da doença de Chagas. Ademais, o estudo confirmou a importância da carga parasitária na fase aguda e provavelmente, a cepa do parasita (cepa G), como determinantes da gravidade das manifestações crônicas, alinhando-se com as conclusões de estudos prévios. Após a imunossupressão, observou-se a reativação da infecção em alguns órgãos, com maior intensidade de fibrose, necrose e perda de estrutura tecidual, sugerindo que, a imunossupressão pode agravar as lesões causadas pela doença.

Em resumo, este trabalho contribuiu para o entendimento das complexas interações entre o parasita *T. cruzi* e o sistema imunológico do hospedeiro. Os achados reforçam a importância de se aprofundar no estudo das respostas inflamatórias, durante as diferentes fases da doença e dos mecanismos que, modulam a progressão da patologia. Futuras pesquisas poderiam focar na exploração de terapias, que visem controlar a inflamação, prevenindo a progressão dos danos teciduais e melhorando o prognóstico de pacientes chagásicos.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ, J. M. *et al.* Chagas disease: still many unsolved issues. **Mediators of inflammation**, v. 2014, n. 1, p. 912965, 2014.

ANDRADE, S. G.; KLOETZEL, J. K.; MONAMARIS, M. B.; FERRANS, V. J. Morphological aspects of the myocarditis and myositis in *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: Fibrogenesis and spontaneous regression of fibrosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 379-393, 1994.

ANDRADE, S. G. *et al.* Treatment with benznidazole in association with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: investigation into the possible development of neoplasias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 441-447, 2003.

BARROS, C. SL; RISSI, D. R. Down the rabbit hole: a quick guide for histopathology description. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, p. e06927, 2021.

BORGES, M. M.; MELLO, D. A.; TEIXEIRA, M. L. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia Cricetidae) com *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Saúde Pública**, v. 16, p. 233-242, 1982.

BORGES, M. M.; ANDREDA, S. G.; PILATTI, C. G.; PRADO, Jr, J. C.; KLOETZEL, J. K. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 493-502, 1992

DA SILVA, C. A. F.; TANIWAKI, N. N. Perfil de células do infiltrado inflamatório de *Calomys callosus* infectados pelo *Trypanosoma cruzi* na fase aguda da infecção. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz-BIAL**, p. 25-26, 2011.

DE ALBA ALVARADO, M. C. *et al.* Main Cardiac Histopathologic Alterations in the Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* Infection in a Murine Model. **Pathogens**, v. 12, n. 9, p. 1084, 2023.

DURÃES-OLIVEIRA, J. *et al.* Chagas disease: a silent threat for dogs and humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 7, p. 3840, 2024.

GONÇALVES, W. *et al.* Caracterização epidemiológica das mortes por doença de Chagas ocorridas no Brasil no período de 2010 a 2019. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e592101019096-e592101019096, 2021.

LANDSGAARD, K. A. *et al.* Protozoal meningoencephalitis and myelitis in 4 dogs associated with *Trypanosoma cruzi* infection. **Veterinary pathology**, v. 60, n. 2, p. 199-202, 2023.

MAGALHÃES-SANTOS, I. F.; ANDRADE, S. G. Participation of cytokines in the necrotic-inflammatory lesions in the heart and skeletal muscles of *Calomys callosus* infected with *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 555-561, 2005.

MARINHO, C. R. F *et al.* Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infection and immunity**, v. 67, n. 1, p. 308-318, 1999.

MILLS, R. M. Chagas disease: epidemiology and barriers to treatment. **The American journal of medicine**, v. 133, n. 11, p. 1262-1265, 2020.

OLIVEIRA, E. C. de *et al.* *Trypanosoma cruzi* and experimental Chagas' disease: characterization of a stock isolated from a patient with associated digestive and cardiac form. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, p. 25-33, 1993.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

ROSA, R. B. *et al.* *Calomys callosus*: an experimental animal model applied to parasitic diseases investigations of public health concern. **Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 369, 2022.

SANTOS, C. D. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: effects of social stress in *Calomys callosus* a natural reservoir of infection. **Experimental parasitology**, v. 119, n. 2, p. 197-201, 2008.

SANTOS, E. F. *et al.* Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: a nationwide spatiotemporal analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 8, p. e0008445, 2020.

SANTOS, I. F. M. *et al.* **Infection of *Calomys callosus* (Rodentia Cricetidae) with Strains of different *Trypanosoma cruzi* biotopes: pathogenicity, histotropism, and fibrosis induction.** 2004.

SARTORI, A. M. C. *et al.* Reactivation of Chagas' disease in a human immunodeficiency virus-infected patient leading to severe heart disease with a late positive direct microscopic examination of the blood. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 59, n. 5, p. 784-786, 1998.

Capítulo 02

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-02

COINFECÇÃO LEISHMANIOSE VISCERAL E VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA NO BRASIL

Ana Beatriz Ribeiro Tomcix¹; Gabriela Motoie²

¹Estudante do Curso de Vigilância Epidemiológica em Saúde Pública – IAL CLR III Campinas-SP; E-mail: beatomcix11@gmail.com

²Docente/pesquisadora do Núcleo de Ciências Biomédicas – IAL CLR III Campinas-SP.

A leishmaniose visceral (LV) é causada no Brasil pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida pela picada de insetos flebotomíneos. A LV é grave em indivíduos não tratados, crianças desnutridas e imunossuprimidos, como portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). A coinfeção LV/HIV resulta em maior propensão a recidivas e falha no tratamento. O objetivo deste trabalho foi realizar revisão bibliográfica da coinfeção LV/HIV. Foram selecionados artigos do Pubmed, SciELO, Google acadêmico, Lilacs, dados de manuais do Ministério da Saúde e do DATASUS. A revisão foi limitada a casos no Brasil e indicou que essa coinfeção é um problema no país, especialmente nas regiões Nordeste, parte do Centro-Oeste e grande parte do Sudeste. Isso destaca a importância de medidas eficazes de controle, prevenção e tratamento, especialmente em áreas endêmicas e em grupos de risco.

Palavras-Chave: vírus da imunodeficiência humana; Leishmaniose visceral, *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* e coinfeção.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* e transmitidas através da picada de flebotomíneos fêmeas da família Psychodidae (OPAS, s.d.a.). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (MS), cerca de 72.290 casos de Leishmaniose Visceral (LV) foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, no período de 2000 a 2020. No início, a LV era uma condição restrita à área rural, mas devido à urbanização, tornou-se mais frequente, sobretudo em áreas com baixos indicadores socioeconômicos e grande concentração de cães domésticos, uma vez que são reservatórios urbanos de *L. (L.) infantum*. Como outras doenças, tem alta letalidade em indivíduos não tratados, crianças desnutridas e indivíduos imunocomprometidos como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BRASIL, 2024c).

Em 2023, havia 39,9 milhões de pessoas infectadas com HIV no mundo, das quais 434.803 foram notificadas no Brasil no período de 2007 a 2023 (BRASIL, 2023a). O HIV, causador da aids (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), enfraquece o sistema imunológico do portador, pois tem como alvo células TCD4+, propiciando o indivíduo infectado a adquirir novas doenças, como a LV (BRASIL, 2024b; DE BARROS DANTAS, 2022).

A coinfeção LV/HIV é uma condição emergente, de alta gravidade, presente em 42 países e que, desde os anos 1990, tem apresentado aumento no número de casos. No Brasil,

3.337 casos da coinfeção foram relatados entre 2011 e 2020. A coinfeção LV/HIV aumenta a mortalidade, causada por falhas terapêuticas, e o número de recidivas, além de provocar manifestações clínicas incomuns nos tratos gastrointestinal, respiratório, cardíaco, renal, adrenal, sinovial e cerebral (BRASIL, 2015; OPAS, s.d.a; SANTOS et al., 2022).

O objetivo deste trabalho foi realizar revisão bibliográfica acerca do tema e selecionar artigos em base de dados. A revisão foi limitada a casos no Brasil, no período de 2007 a 2022, que abordam a coinfeção LV/HIV.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estabelecidas as seguintes etapas: levantamento bibliográfico; classificação das pesquisas; análise dos estudos; interpretação dos resultados e consolidação dos conteúdos. Neste processo, surgiram os seguintes questionamentos: qual a prevalência de coinfeção LV/HIV em diferentes regiões do Brasil? Existem áreas onde a coinfeção é mais comum? Quais os sinais e sintomas clínicos da coinfeção por LV e HIV? A busca nas bases de dados foi realizada entre maio e outubro de 2024 nos acervos PubMed, SciELO, Google acadêmico, Lilacs, Science Direct manuais do MS e no DATASUS. Considerou-se artigos publicados na íntegra, no período de 1990 a 2024, nos idiomas português ou inglês, por meio dos descritores Leishmaniose Visceral, HIV e coinfeção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Leishmaniose Visceral

No Brasil, *L. (L.) infantum* é a espécie causadora de LV e seu principal vetor é o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Este parasito tem duas formas morfológicas: promastigota e amastigota (OLIVEIRA, 2007).

Quando as fêmeas de flebotomíneos se alimentam do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado (cães, homem e animais silvestres), estas ingerem amastigotas que, no inseto, transformam-se em promastigotas. Ao picar outro hospedeiro, o inseto regurgita parasitos que entram na corrente sanguínea e são fagocitados por células fagocíticas. No interior dessas células, as promastigotas se transformam novamente em amastigotas, se reproduzem, rompem as células hospedeiras e infectam novas células (BRAZ, 2021; OKU, 2023). Além da transmissão pelo vetor, a doença pode ser adquirida através do compartilhamento de agulhas, materiais perfurocortantes contaminados e transfusão de hemoderivados. Seus sintomas incluem: febre irregular e de longa duração; astenia; adinamia; anemia; esplenomegalia; hepatomegalia; leucopenia; trombocitopenia (BRASIL, 2023c).

O diagnóstico laboratorial da LV pode ser feito através de técnicas sorológicas, moleculares, parasitológicas e cultura, sendo os testes sorológicos os mais indicados. O teste imunocromatográfico de LV, quando reagente, exclui a necessidade de testes adicionais, indicando positividade na amostra do paciente. Os medicamentos utilizados para o tratamento são antimoniato de meglumina, a anfotericina B e a sua forma lipossomal, sendo que a escolha varia de acordo com faixa etária, presença de gravidez e comorbidades como o HIV (AGUIAR; RODRIGUES, 2017; BRASIL, 2024a).

Vírus Da Imunodeficiência Humana

O HIV ataca, principalmente, células T CD4+, macrófagos e células da micróglia. Se não tratado, o referido vírus destrói o sistema imunológico, evoluindo para a aids e facilitando

infecções oportunistas (VAN HEUVEL et al., 2022). Sua transmissão ocorre através do contato sexual, pela via parenteral, de forma congênita e pela amamentação. O diagnóstico pode ser realizado através de métodos sorológicos ou moleculares (BRASIL, 2024a). Sem tratamento, a infecção pelo HIV pode progredir para a fase aguda, com sintomas como febre, mal-estar e dor de cabeça. Ademais, pode haver candidíase oral, neuropatia periférica e outras complicações. Na fase de latência, a redução das células T CD4⁺ permite a reativação de doenças secundárias e a evolução para a aids. (BRASIL, 2024a; DE BARROS DANTAS et al., 2022).

No Brasil, a terapia antiretroviral, preconizada pelo MS, é baseada no uso de tenofovir com lamivudina e dolutegravir. A medicação auxilia na recuperação do sistema imunológico, melhora a qualidade de vida e reduz carga viral (BRASIL, 2024a; BRASIL, 2024d; VAN HEUVEL et al., 2022). A Profilaxia Pré-Exposição (PrEP) é uma estratégia de prevenção contra o HIV disponível no SUS, que baseia-se no uso de antiretrovirais antes da exposição ao vírus. A Profilaxia Pós-Exposição (PEP), por sua vez, é utilizada em situações de urgência após a exposição ao vírus (BRASIL, s.d.; ZUCCHI et al., 2018).

Coinfecção LV/HIV

A coinfecção LV/HIV é um desafio para o controle e prevenção da doença. Portadores do HIV são mais suscetíveis à infecção por LV devido à baixa imunidade. O HIV ataca as células T CD4⁺ e macrófagos, enquanto a leishmaniose destrói neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Após a redução do número de células, a resposta imunológica Th1 é substituída pela resposta Th2. Essa condição provoca maior falha terapêutica, alta mortalidade e aumento das recidivas, quando comparadas a pacientes com LV, apenas (TAKELE et al., 2022; VIANA et al., 2017). Os pacientes coinfectados, por terem mais recidivas que o comum, podem, gradualmente, parar de responder ao tratamento e progredir ao óbito (ABONGOMERA et al., 2017).

A coinfecção e posterior imunossupressão causam alteração na sensibilidade dos testes laboratoriais. Como exemplo, é possível citar a imunofluorescência indireta que, em pacientes com LV, apresenta sensibilidade de 80 a 95%, enquanto, nos coinfectados é de 50 a 60%. O diagnóstico molecular torna-se uma boa alternativa, visto que busca alvos específicos do DNA do microrganismo, assim como o exame parasitológico que se sustenta na visualização do parasito. (LINDOSO et al., 2018; VIANA et al., 2017).

A coinfecção é mais prevalente em homens de 30 a 39 anos (COSTA et al., 2023) e, de modo geral, os sintomas são semelhantes àqueles da LV. Todavia, podem ser relatados sintomas atípicos, como tosse e diarreia (DHULIPALLA; CHOUHAN, 2024).

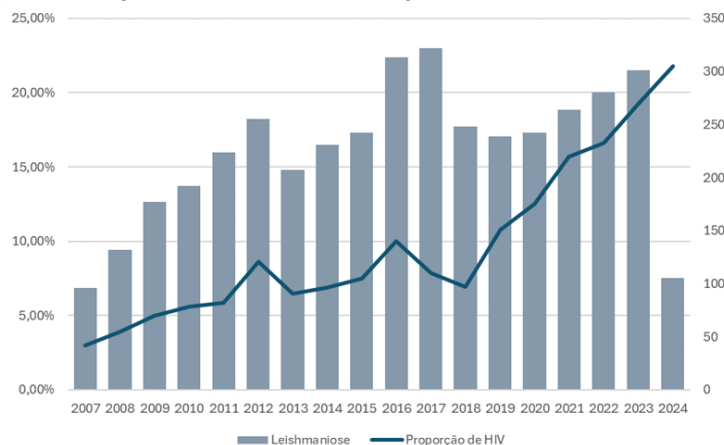
O gráfico 1 demonstra a evolução de casos de coinfecção LV/HIV de 2007 até agosto de 2024 (BATISTA et al., 2021). Avalia-se a tendência no aumento de casos de HIV, pois, apenas em 2014, o HIV passou a ser de notificação compulsória em casos não associados à aids (BRASIL, 2024a). Como medida preventiva contra o HIV, o PrEP e o PEP foram implementados no Sistema Único de Saúde (SUS) a partir do final de 2017, sendo instalados, oficialmente, em 2018. O aumento de casos de HIV, a partir de 2019, pode ter influência pela desistência da PrEP devido a efeitos adversos como dores de cabeça, náuseas e falta de apetite. Pode estar relacionado também ao esquecimento do uso da medicação, uso de drogas e bebidas alcoólicas, estigma social, desconfiança do parceiro e não utilização do preservativo (ANTONINI et al., 2023; ZUCCHI et al., 2018).

Na figura 1, é possível observar a distribuição dos casos exibidos no gráfico 1 (até o ano de 2022) da coinfecção pelo país, demonstrando os locais com maior prevalência da doença e áreas mais vulneráveis. Os estados com maiores prevalências absolutas da doença

são: Maranhão (829 casos), Minas Gerais (718 casos), Ceará (691 casos) e Mato Grosso do Sul (576 casos). É provável que a realidade verificada seja decorrente de fatores ambientais e socioeconômicos, como o agronegócio, e da alta prevalência da LV nos referidos estados. Nos estados do Acre e de Rondônia, no período 2007-2022, os dados em branco podem indicar subnotificações ou registros inconsistentes. Regiões do Sul, partes do Sudeste e estados do Norte, mostram um número muito menor de casos de coinfeção. Isto pode estar relacionado à menor incidência de LV nesses locais devido a: fatores climáticos - por apresentarem temperaturas mais baixas, há influência na dispersão do vetor; medidas efetivas de vigilância; acesso ao diagnóstico das infecções e à informação referente aos casos ou, por outro lado, a ocorrência de subnotificações e de falhas no diagnóstico. Por ser uma condição que pode gerar resultados falsos e/ou inespecíficos em testes sorológicos, é necessário que se dê mais atenção ao diagnóstico do paciente (BRASIL, 2023b; DA SILVA et al., 2023; NINA et al., 2023; VIANA et al., 2017).

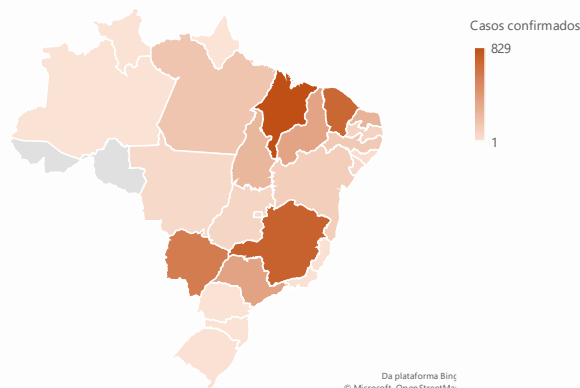
A distribuição, mostrada na figura 1, demonstra a necessidade de atenção específica em regiões endêmicas para LV, especialmente onde a prevalência do HIV, também, é preocupante, como no Nordeste, em parte do Centro-Oeste em grande parte do Sudeste. Faz-se necessária uma atenção maior a populações de cidades mais remotas do país com altos índices de pobreza, desigualdade social, falta de oportunidades econômicas e pouca fiscalização, cujas condições precárias favorecem o turismo/exploração sexual de adultos, adolescentes e crianças que podem contrair o HIV e não receber suporte adequado do sistema de saúde para diagnóstico e tratamento (IBGE, 2003; MOREIRA, 2020).

Gráfico 1 – Evolução dos Casos de Coinfeção de Leishmaniose Visceral e HIV por Ano



Fonte: (BRASIL, 2024d)

Figura 1 – Casos confirmados de coinfeção LV/HIV no Brasil 2007 a 2022.



Fonte: BRASIL, 2023b.

CONCLUSÕES

Deste modo podemos concluir que a coinfeção LV/HIV é um grande problema de saúde pública que tem sido negligenciado, em relação a outras doenças de notificação compulsória. Este é um problema multifatorial e multiprofissional, no qual devem ser considerados fatores socioeconômicos e psicológicos e a qualidade de vida do indivíduo, com vistas a compreender os determinantes da doença. Os portadores dessa condição encontram-se em risco de vida devido a grande depleção do sistema imunológico, o consequente surgimento de infecções secundárias oportunistas, os altos índices de recidivas e falhas no tratamento a longo prazo. É necessário que o diagnóstico laboratorial detenha processos mais rigorosos de testagem, pelos quais os pacientes soropositivos para HIV, assim que diagnosticados, também sejam testados para leishmanioses e vice-versa. No que se refere aos testes sorológicos atuais, estes, ainda, apresentam interferências significativas em situações de coinfeção, o que pode, deste modo, produzir resultados discrepantes daqueles que, de fato, estariam mais próximos da realidade.

REFERÊNCIAS

- ABONGOMERA, C. et al. **The Risk and Predictors of Visceral Leishmaniasis Relapse in Human Immunodeficiency Virus-Coinfected Patients in Ethiopia: A Retrospective Cohort Study.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 65, n. 10, p. 1703–1710, 30 out. 2017.
- AGUIAR, P. F.; RODRIGUES, R. K. **LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL: ARTIGO DE REVISÃO.** *Revista Unimontes Científica*, v. 19, n. 1, p. 191–204, 2017.
- ANTONINI, M. et al. **Barreiras para o uso da Profilaxia Pré-Exposição (PrEP) ao HIV: uma revisão integrativa.** *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 76, p. e20210963, 26 jun. 2023.
- BATISTA, F. M. DE A. et al. **Perfil epidemiológico e tendência temporal da leishmaniose visceral: Piauí, Brasil, 2008 a 2018.** *Cadernos de Saúde Pública*, v. 37, p. e00340320, 1 dez. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral - Notificações de Casos Confirmados.** 2023b. Disponível em: <http://tabnet.datas.dadosus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>. Acesso em: 02 out 2024
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Estado de Saúde. Governo do Estado Mato Grosso do Sul. **Boletim Epidemiológico Leishmaniose Visceral 2022 [recurso eletrônico].** Brasília - DF, 2023c. Disponível em: https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2023/02/Boletim_leish_visceral_023-Final.pdf Acesso em: 11 set. 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Ações Estratégicas de Epidemiologia e Vigilância em Saúde e Ambiente. **Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2022. [recurso eletrônico].** Brasília - DF, 2024c. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica/publicacoes/lv-casos.pdf/view>. Acesso em: 8 ago. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Ações Estratégicas de Epidemiologia e Vigilância em Saúde e Ambiente. **PAINEIS DE MONITORAMENTO DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL. Brasília [recurso eletrônico]** - DF, 2024b. Disponível em: [https://leishmanioses.aids.gov.br/app/dashboards?auth_provider_hint=anonymous1#/view/041e37d7-6f08-463e-8dd0-e43c5c2b34c4?embed=true&_g=\(\)&show-top-menu=false](https://leishmanioses.aids.gov.br/app/dashboards?auth_provider_hint=anonymous1#/view/041e37d7-6f08-463e-8dd0-e43c5c2b34c4?embed=true&_g=()&show-top-menu=false). Acesso em: 19 set. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de HIV, Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **PEP (Profilaxia Pós-Exposição de Risco à Infecção pelo HIV, ISTs e Hepatites Virais) [recurso eletrônico]**. Brasília - DF, s.d. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/assuntos/prevencao-combinada/pep-profilaxia-pos-exposicao-ao-hiv/campanhas-da-saude>. Acesso em: 26 set. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV [recurso eletrônico]**. 1ª ed., Brasília - DF, 2015. Disponível em: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_diagnostico_leishmania_hiv.pdf. Acesso em: 10 ago. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Ações Estratégicas de Epidemiologia e Vigilância em Saúde e Ambiente. **Guia de Vigilância em Saúde [recurso eletrônico]**. 6ª ed., vol. 2, Brasília - DF, 2024a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigilancia/guia-de-vigilancia-em-saude-volume-2-6a-edicao/view>. Acesso em: 11 set. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis – DCC. **HIV/Aids |2023 [recurso eletrônico]**. Número Especial, Brasília - DF, 2023a. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2023/hiv-aids/boletim-epidemiologico-hiv-e-aids-2023.pdf>. Acesso em: 2 out. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Ações Estratégicas de Epidemiologia e Vigilância em Saúde e Ambiente. **Protocolo Clínico E Diretrizes Terapêuticas Para Manejo Da Infecção Pelo HIV Em Adultos [recurso eletrônico]**. Módulo I – Tratamento. 1ª ed., Brasília - DF, 2024d. Disponível em: https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/pcdts/pcdt_hiv_modulo_1_2024.pdf. Acesso em: 8 set. 2024.

BRAZ, C. A. **Planejamento e desenvolvimento de novos compostos com atividade frente a Leishmania spp: Síntese, avaliação da atividade e toxicidade de derivados 5-nitro-2-furfurilidênicos e estudos de relações estrutura-atividade**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9135/tde-13052022-105310/publico/Carolina_Arruda_Braz_DO_Corrigida.pdf. Acesso em: 25 ago. 2024.

COSTA, L. D. L. N. et al. **Factors associated with relapse and hospital death in patients coinfectd with visceral leishmaniasis and HIV: a longitudinal study**. BMC Infectious Diseases, v. 23, n. 1, p. 141, 7 mar. 2023.

DA SILVA, É. M. T. et al. **PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL NO BRASIL. Revista ft**, 3 jun. 2023

DE BARROS DANTAS, H et al. **Leishmaniose Visceral Em Pacientes Co-Infetados Pelo Vírus Da Imunodeficiência Humana: Uma Revisão Integrativa**. International Journal Of Health Science, V. 2, N. 1, 2022.

DHULIPALLA, M.; CHOUHAN, G. **O nexo entre Leishmania e HIV: Debilitando a imunidade do hospedeiro e acelerando a carga de doenças comórbidas**. Experimental Parasitology, v. 265, p. 108826, 1 out. 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Brasileiro de 2003**. Rio de Janeiro: IBGE, 2003. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/mg/pesquisa/36/0?tipo=ranking&ano=2003>. Acesso em: 15 out. 2024.

LINDOSO, J. et al. **Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives**. HIV/AIDS - Research and Palliative Care, v. Volume 10, p. 193–201, out. 2018.

MOREIRA, R. B. D R. **As estratégias e ações de políticas públicas para a erradicação da exploração sexual comercial nos municípios brasileiros no contexto jurídico e político da teoria da proteção integral dos direitos da criança e do adolescente**. 2020.

NINA, L. N. DA S. et al. Distribuição espaço-temporal da leishmaniose visceral no Brasil no período de 2007 a 2020. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 47, p. e160, 14 nov. 2023.

OKU, V. J. A. **Análise da distribuição dos flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) no Estado de São Paulo**. 2023. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, P. A. de et al. **Leishmaniose visceral em pacientes infectados por HIV: estudo de casos observados em Campo Grande, MS, 2000-2006**. 2007. Tese de Doutorado.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), Organização Mundial da Saúde (OMS). **Leishmaniose**. Brasília: OPAS; s.d.a Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em: 13 ago. 2024.

SANTOS, M. P. DOS et al. **Leishmaniose visceral humana: letalidade e tempo da suspeição ao tratamento em área endêmica no Brasil**. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 12, n. 4, 2022.

TAKELE, Y. et al. **Immunological factors, but not clinical features, predict visceral leishmaniasis relapse in patients co-infected with HIV**. *Cell Reports Medicine*, v. 3, n. 1, 18 jan. 2022.

VAN HEUVEL, Y. et al. **Infectious RNA: Human Immunodeficiency Virus (HIV) Biology, Therapeutic Intervention, and the Quest for a Vaccine**. *Toxins*, v. 14, n. 2, p. 138, fev. 2022.

VIANA, G. M. DE C. et al. **Epidemiological profile of patients co-infected with visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Northeast, Brazil**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 50, p. 613–620, out. 2017.

ZUCCHI, E. M. et al. **Da evidência à ação: desafios do Sistema Único de Saúde para ofertar a profilaxia pré-exposição sexual (PrEP) ao HIV às pessoas em maior vulnerabilidade**. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 34, p. e00206617, 23 jul. 2018.

Capítulo 03

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-03

EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE E DESENVOLVIMENTO DE UM ELISA-IgG PARA DETECÇÃO DE *Rickettsia rickettsii*

Adrian Pecina Sartorio¹; Carlos Roberto Prudêncio²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – CIM – Instituto Adolfo Lutz; E-mail: adrianp.sartorio@gmail.com

²Docente/pesquisador do Centro de Imunologia – CIM – Instituto Adolfo Lutz.

Resumo: A Febre Maculosa (FM) é uma zoonose causada pela *Rickettsia rickettsii*, transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma*. O quadro clínico varia de febre aguda leve a formas graves com risco de morte. Dados recentes mostram um aumento significativo de casos, especialmente no Sudeste do Brasil, com uma taxa de letalidade de 33,4%. Em 2023, o número de casos confirmados cresceu 87% em relação ao ano anterior. A identificação de biomarcadores, como proteínas recombinantes, é essencial para melhorar o diagnóstico precoce e reduzir a mortalidade. O objetivo deste trabalho foi expressar a proteína recombinante PhenAl de *Rickettsia rickettsii* e desenvolver um ensaio ELISA-IgG com a proteína recombinante OmpA para detecção de anticorpos em soro de camundongos imunizados. Neste contexto, utilizou-se *Escherichia coli* para expressão da proteína, que foi avaliada por SDS-PAGE e a rOmpA em ensaios ELISA. Os resultados mostraram que a proteína recombinante foi expressa com sucesso e que a proteína recombinante OmpA para *R. rickettsii* apresentou reatividade imunológica, demonstrando do mesmo modo potencial como biomarcador. O ensaio ELISA também foi eficaz na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro. Concluímos que o ELISA-IgG baseado em proteínas recombinantes pode ser uma ferramenta promissora para o diagnóstico precoce da febre maculosa.

Palavras-chave: Febre Maculosa; *Rickettsia rickettsii*; ELISA; proteína recombinante

INTRODUÇÃO

A Febre Maculosa (FM) é uma doença infecciosa de um grupo de zoonoses causada por bactérias do gênero *Rickettsia*, transmitidas pela picada de carrapatos. A doença apresenta um quadro febril agudo e pode variar em gravidade, desde casos leves e atípicos até formas graves com alto risco de morte. No Brasil, duas espécies de riquetsias estão relacionadas à febre maculosa, como a *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira (FMB), considerada a forma mais grave da doença e a *Rickettsia parkeri*, que geralmente leva a quadros clínicos menos severos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

De acordo com Oliveira et al. (2016), no Brasil, os vetores responsáveis pela transmissão da *Rickettsia rickettsii* são os carrapatos do gênero *Amblyomma* e das espécies *A. sculptum* e *A. aureolatum*. Para a cepa Mata Atlântica de *Rickettsia parkeri*, o carrapato associado é o *Amblyomma ovale*.

A febre maculosa, registrada pela primeira vez no Brasil em 1929, ocorre em vários estados, com maior incidência em Santa Catarina e São Paulo. A doença, de notificação obrigatória, possui uma taxa de letalidade média de 32,9%, chegando a 50% no Sudeste, e apresenta mortalidade entre 20% e 30% devido a dificuldades no diagnóstico e tratamento. Esses desafios, agravados por sintomas inespecíficos que se confundem com outras doenças, tornam a febre maculosa uma importante questão de saúde pública. (Wyatt et al., 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

O número de casos confirmados cresceu 62% de 2013 a 2023, com um aumento notável de 87% em 2023 comparado a 2022. Entre 2013 e 2023, foram confirmados 761 óbitos associados à febre maculosa, com uma média anual de 69 mortes. A taxa média de letalidade foi de 33,4%, caindo para 19,3% em 2023, o menor valor registrado. É importante notar que essas taxas de letalidade são calculadas com base no total de casos confirmados, incluindo tanto a febre maculosa brasileira (causada por *R. rickettsii* e associada a alta morbimortalidade) quanto a febre maculosa causada por *R. parkeri* (que não tem associação conhecida com formas graves ou óbitos). Isso pode ter influenciado na diminuição da letalidade ao longo dos anos. Portanto, devido à dificuldade de distinguir entre os casos e óbitos atribuídos a cada espécie, a letalidade específica e a avaliação global da letalidade devem ser consideradas no contexto das febres maculosas no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

O método sorológico mais comum para o diagnóstico das rickettsioses é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), considerada o padrão-ouro. O diagnóstico laboratorial por RIFI é confirmado pelo surgimento de anticorpos específicos, que aumentam em título com a progressão da doença, no soro dos pacientes. A primeira amostra de soro deve ser coletada nos primeiros dias da doença (fase aguda) e a segunda amostra entre 14 a 21 dias após a primeira coleta. Outra possibilidade para tal desafio consiste no ensaio imunoenzimático (ELISA). Este é um teste com alta sensibilidade e especificidade, além de possuir uma automação mais fácil. Todavia, sua precisão depende de um antígeno de alta qualidade e do laboratório que executa as análises. Não há atualmente no Brasil um teste comercial de ELISA para o diagnóstico de febre maculosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024; Oliveira, 2017).

Conforme Oliveira (2017), podemos verificar um potencial biomarcador para diagnóstico clínico da febre maculosa. Ensaio imunoenzimáticos com a proteína *phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain* (phenyl), demonstraram 100% de homologia para uma sequência já descrita de *R. rickettsii* e bons resultados de *ranking* na biosseleção contra IgG de soro contra *R. rickettsii*. Sendo assim, o ensaio de ELISA indireto pode ser utilizado para verificar o potencial da proteína recombinante Phenyl como antígeno para o diagnóstico da febre maculosa, devido sua fácil execução e reprodutibilidade da técnica. Este estudo tem como objetivo expressar uma proteína recombinante de *R. rickettsii* e desenvolver um ensaio imunoenzimático (ELISA) baseado em proteínas recombinantes de *R. rickettsii* (RR-IgG-ELISA), com potencial para o diagnóstico da febre maculosa brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Expressão proteica

1.1 Transformação bacteriana

Nesta etapa, foi utilizado células quimiocompetentes de *Escherichia coli* BL21 e vetor plasmidial PhenAl_tRNA_Pet-32a(+) da empresa GenScript. Para a transformação, foi

inoculado 1 µL de vetor plasmidial para 200 µL de bactéria. Logo após a inoculação, o microtubo foi incubado em recipiente contendo gelo picado por 30 minutos. Posteriormente, realizou-se o choque térmico a 42 °C por 90 segundos em banho seco, seguida de outra incubação em gelo picado por mais 5 minutos. Foi acrescido no microtubo 1 mL de meio de cultura SOC da Invitrogen (composto por glicose e meio *Super Optimal Broth* – SOB), ficando sob agitação a 250 rpm por 1 hora a 37 °C. Após o tempo determinado, a cultura bacteriana foi plaqueada em placa de Petri contendo meio de cultura LB e carbenicilina. A placa foi incubada *overnight* a 37 °C em estufa bacteriana. As colônias crescidas foram isoladas em meio LB e carbenicilina e crescidas novamente a 37 °C sob agitação de 250 rpm até o dia seguinte. Por fim, as alíquotas de bactérias transformadas foram armazenadas a -80 °C, com *Glycerol* (Promega, USA) na proporção de 1:1, sendo 500 µL de meio em que as bactérias transformadas cresceram com 500 µL de glicerol.

1.2 Avaliação da expressão

A expressão da proteína recombinante foi avaliada através de um teste de expressão utilizando um extrato bruto de bactérias *E. coli* BL21. Foi realizado um pré-inóculo a partir das bactérias armazenadas no -80 °C com glicerol. Utilizou-se 5 mL de meio LB com 5 µL de carbenicilina e um raspado das bactérias, crescido sob agitação constante de 250 rpm a 37 °C *overnight*. No dia seguinte, 1 mL do pré-inóculo foi inoculado em 100 mL de meio LB com 100 µL de carbenicilina, seguindo-se de incubação sob agitação de 250 rpm a 37 °C por 1 hora. Após esse tempo, o crescimento celular foi acompanhado até atingir DO600 nm entre 0,5 e 0,8. Neste instante, foi retirada uma alíquota de 2 mL (tempo zero) e adicionado ao restante da cultura IPTG 1 mM incubando-se novamente a 37 °C, sob agitação de 250 rpm. Três alíquotas foram retiradas após 60, 120 e 180 minutos correspondendo ao tempo 1, 2 e 3 respectivamente. Centrifugou-se as amostras a 12000 x g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em tampão de amostra 2x SDS-PAGE (Tris/HCl pH 6,8 100 mM, 4% de SDS, 0,2% de azul de bromofenol e 20% de glicerol). Para a avaliação das proteínas recombinantes, o gel de SDS-PAGE foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 até a visualização completa das bandas e, em seguida, descorado com solução descorante (10% metanol e 10% ácido acético glacial).

1.3 Expressão das proteínas recombinantes

A expressão da proteína recombinante PhenAl foi realizada seguindo um protocolo adaptado de Sambrook (2012). Foi adicionado 2,5 mL de um pré-inóculo de células de *E. coli* BL21 transformadas foram cultivadas em 250 mL de meio LB com 250 µL de ampicilina e induzidas com 250 µL de IPTG (1 mM) após atingir DO600 nm de 0,7. Após 1 hora de indução, a cultura foi centrifugada a 10000 x g, por 10 minutos, a 4 °C e lavadas uma vez com tampão PBS 1x. O sedimento foi armazenado a -80 °C até sua utilização e o sobrenadante descartado.

2. Ensaio de ELISA baseado em proteínas recombinantes de *R. rickettsii* (RR-IgG-ELISA)

Um ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado com a proteína recombinante OmpA para a detecção de anticorpos da classe IgG de camundongos imunizados seguindo o protocolo de Loza (2023). Placas de poliestireno MaxiSorp de 96 poços (Nunc®, Rochester, NY, USA) foram revestidas com 0,5 µg/poço de proteína recombinante diluídas em 50 µL de tampão carbonato/bicarbonato por poço e incubada *overnight* a 4 °C. No próximo dia as placas foram lavadas 6 x com PBST 0,5% (PBS com adição de 0,5% Tween 20 [v/v]) utilizando a lavadora de placa Washwell™ (Robonik, Thane, Índia). Os poços foram tratados com 150 µL/poço de tampão de bloqueio (PBST 0,5% contendo 5% de leite desnatado em pó [m/v]) por 1 hora a 37 °C. As placas foram lavadas novamente 6 x com PBST 0,5% e

incubadas com 50 µL de amostra de soro de camundongos imunizados e não imunizados com uma diluição inicial de 1:100 e final de 1:312500 em PBST 0,5% suplementado com 1% de leite desnatado em pó. Após a incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram lavadas 6 vezes. Em seguida, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com 50 µL de IgG anti-camundongo (Santa Cruz Biotechnology™, Dallas, TX, EUA), conjugada com peroxidase diluída a 1:5000 em PBST 0,5% suplementado com 1% de leite desnatado em pó (p/v). Após 6 lavagens, a reação foi executada pela adição de 50 µL por poço da solução One-Step—substrato colorimétrico Linear TMB (Scienco Biotech, Santa Catarina, Brasil). Por fim, a reação foi interrompida com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico 1 M, e a absorbância foi medida a 450 nm e 630 nm utilizando o leitor ELISA MB-580 (Heales®, Shenzhen, China). O valor de corte (*cut off*) foi calculado como a média da OD_{450/630} das amostras de soro negativas, somada a 3 desvios padrão. Os níveis de anticorpos foram expressos como índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = OD \text{ da amostra} / OD \text{ do valor de corte (cut off)}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Expressão da proteína recombinante PhenAl

As proteínas produzidas por *E. coli* BL21 passaram por um teste de expressão que foi avaliado através de SDS-PAGE 12% em diferentes intervalos de tempo. Estes foram antes da indução por IPTG (1mM) e após a indução. Foi possível identificar a presença da proteína apenas após a indução, mas estavam ausentes na cultura celular não induzida. Isso acontece porque o IPTG é um indutor baseado no *operon lac*, onde este análogo da alolactose se liga ao repressor *LacI*, impedindo a repressão do gene *LacZ* que codifica a β -galactosidase. Sendo assim, o IPTG vai impedir a repressão da codificação da proteína de interesse (Rozendo, 2014). Percebeu-se que após 1 hora de indução, a proteína já alcançou uma alta intensidade de expressão, sendo MW o peso molecular, T0 a cultura não induzida e T1, T2 e T3 as horas de indução respectivamente (Figura 1). A proteína recombinante de interesse tem um peso molecular de cerca de 103 kDa como indicado pela seta. O sedimento foi ressuspensionado em tampão PBS 1x e levado ao sonificador para a ruptura da estrutura bacteriana e liberação da rPhenAl. Após avaliação por SDS-PAGE, foi possível observar a proteína se apresentava na porção solúvel e insolúvel (Figura 2).

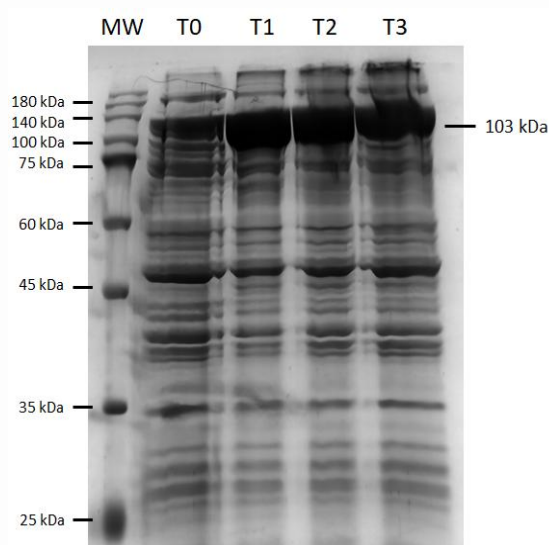


Figura 1. Gel de SDS-PAGE confirmando a expressão da proteína recombinante PhenAl após IPTG (1mM).
Fonte: do autor, 2024.

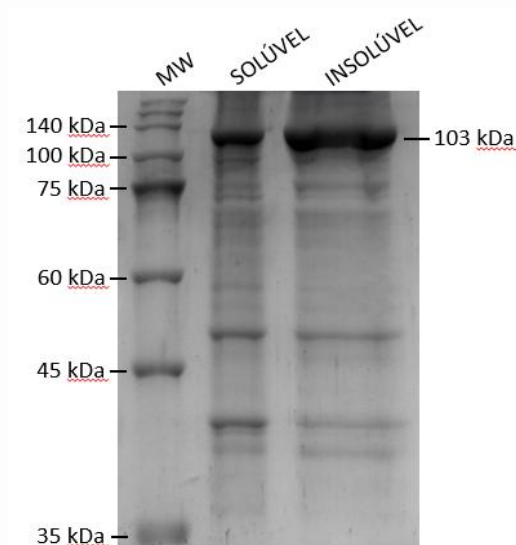


Figura 2. Gel de SDS-PAGE confirmando a presença da proteína recombinante PhenAl na porção solúvel e insolúvel.
Fonte: do autor, 2024.

Proteínas recombinantes geralmente precisam do auxílio de moduladores de dobramento, como as chaperonas, durante a expressão em *E. coli*. Em sistemas de superexpressão a taxa de agregado proteico costuma ser maior do que a de dobramento correto. Esses agregados são conhecidos como corpos de inclusão. Ajustes nas condições de cultivo, como a temperatura, concentração do indutor e tempo de indução, podem reduzir essa fração insolúvel das proteínas. Também foi relatado que alguns aditivos químicos, como sorbitol, arginina e trealose podem contribuir para a expressão da proteína recombinante na forma solúvel (Yamaguchi, 2014).

Foram realizadas algumas tentativas de purificação, no entanto, sem sucesso. Não houve tempo hábil para finalizar esta etapa e por este motivo, para o ensaio ELISA, optou-se por utilizar outra proteína recombinante de *R. rickettsii* com potencial diagnóstico para a doença, a rOmpA, que além de testada e descrita anteriormente, demonstrando resultados promissores, estava purificada e pronta para ser utilizada (Loza, 2023).

2. ELISA com proteína recombinante

Um ELISA foi realizado usando a proteína recombinante OmpA adsorvida na placa. Esta proteína possui comprovada importância imunogênica, pois é capaz de induzir tanto a resposta imune humoral quanto a resposta imune celular contra *Rickettsia rickettsii* (Brito, 2016). Utilizou-se amostra de soro de camundongos imunizados com esta proteína para este ensaio. Foram feitas diluições seriadas de 5x com o soro dos camundongos pré-imunes, pós-imunes e imunizados apenas com adjuvante como mostra o gráfico 1, plotado no *software* GraphPad Prism 8.0.1.

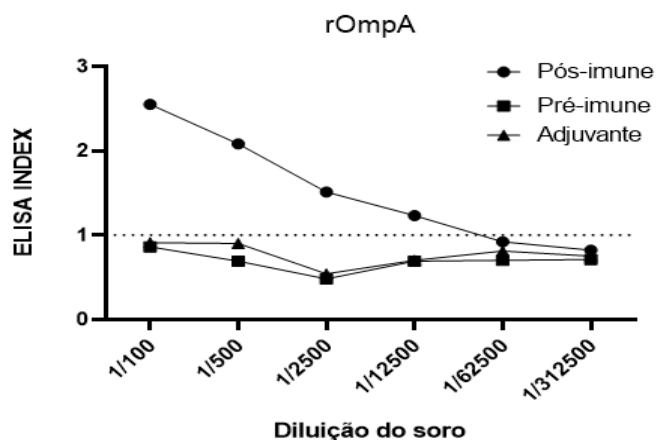


Gráfico 1: Índice ELISA frente a diluições de 5x do soro de camundongos imunizados com a rOmpA.
Fonte: do autor, 2024.

Como observado no gráfico acima, as amostras de soro de camundongos pós-imune permaneceram reativas contra a rOmpA até a faixa de diluição 1/12500, dando margem na confiabilidade do teste em diluições mais concentradas, como 1/100 que é mais comumente usada. Foi possível perceber que os soros dos camundongos pré-ímmunes e imunizados apenas com adjuvante não reagiram contra a proteína recombinante como esperado.

CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou a expressão de uma proteína recombinante de *Rickettsia rickettsii* e o desenvolvimento de um ELISA-IgG para detectar anticorpos específicos, mostrando potencial para o diagnóstico de febre maculosa. O estudo é relevante para a saúde pública brasileira, especialmente em áreas com alta incidência de doenças, e pode ajudar a reduzir a mortalidade com um diagnóstico mais preciso. Embora promissor, o trabalho envolveu desafios de purificação proteica e necessidade de validação em amostras humanas. Estudos futuros devem aprimorar o ensaio para uso em laboratórios de saúde pública, contribuindo para o controle da febre maculosa no Brasil.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Ações Estratégicas de Epidemiologia e Vigilância em Saúde e Ambiente. **Guia de Vigilância em Saúde**. 6. ed. Brasília, DF, 2024. p. 1019-1038.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Ministério da Saúde, v. 55, n. 9, 19 jun. 2024.
- BRITO. M. de O. **Expressão, purificação e caracterização da proteína OmpA de *Rickettsia rickettsii***. 2016. 33 f. Dissertação (Especialização) – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2016.

GREEN, M.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

LOZA, M. L. et al. Production and immunochemical characterization of *Rickettsia rickettsii* recombinant proteins. **Veterinary Research**, 2023.

OLIVEIRA, E. L. de. **Prospecção de Antígenos de Rickettsia rickettsii por phage display**. 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2017.

OLIVEIRA, S. V. et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1-8, 2016.

WYATT, T. M. et al. Febre maculosa: relato de caso. **Residência Pediátrica**. Vila Velha, Espírito Santo, Brasil, Ahead of Print, 2020. Disponível em: 10.25060/residpediatr-2020.v10n3-82. Acesso em 19 ago. 2024.

YAMAGUCHI, H.; MIYAZAKI, M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 235-251, 2014. DOI: 10.3390/biom4010235. Acesso em: 23 out. 2024.

Capítulo 04

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-04

ANÁLISE DE RESISTÊNCIA AOS TRATAMENTOS ANTIRRETROVIRAIS EM MULHERES VIVENDO COM HIV

Mayrla Costa Correia¹; Luís Fernando de Macedo Brígido²

¹ Aluno do Curso de Especialização. Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, mayrlacostacorreia12@gmail.com

² Pesquisador Científico, Diretor Técnico, Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, lubrigido@gmail.com

Resumo: O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um dos principais desafios para a saúde pública mundial. A terapia antirretroviral (TARV) iniciada precocemente está associada ao bom prognóstico da doença, porém as mutações genéticas podem impactar a eficácia dos antirretrovirais (ARVs). Os primeiros casos de HIV-1 estavam mais relacionados aos homens, porém a transmissão heterossexual é um dos fatores responsáveis pelo o envolvimento das mulheres na epidemia. Foi realizado um estudo envolvendo 1278 casos de pacientes adultos jovens (18-49 anos) que viviam com HIV-1 na região metropolitana de São Paulo que tiveram solicitação de genotipagem enviadas ao Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais (NDSS) do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz no período de 10 anos (2014-2023). Dentre o total de casos 548 eram mulheres e 730 homens, dos quais 78% das mulheres e 83% dos homens ($p=0,0082$) apresentaram mutações (principais e/ ou acessórias) aos ARVs. Dos casos que apresentaram mutações, 26% das mulheres e 28% dos homens foi para Inibidores de Protease (IP) ($p=0,2709$) 79% das mulheres e 87% dos homens para Inibidores Análogos de Nucleos(tí)deos (NRTI) ($p<0,0001$) e 58% das mulheres e 80% dos homens para Inibidores Não Análogos de Nucleos(tí)deos (NNRTI) ($p=0,0013$). Dentre as 548 mulheres analisadas, 39 (7%), eram gestantes das quais 22 apresentaram alguma mutação associadas ao vírus e, dentre elas 17 mostraram algum grau (implicação clínica) de resistência aos antirretrovirais. Os resultados indicam que, como esperado, há alta prevalência de mutações (principais e acessórias) associadas à resistência aos ARVs em pacientes em falha terapêutica, sendo maior nos homens. Os dados destacam a importância do monitoramento contínuo da carga viral, essencial para identificar falhas terapêuticas e possibilitar a realização da genotipagem, garantindo que as adaptações terapêuticas sejam implementadas.

Palavras-chave: Aids; HIV; mutação; resistência

INTRODUÇÃO

O HIV é um retrovírus que pertence à família retroviridae e ao gênero lentivírus, tem formato esférico, com aproximadamente 120 nanômetros de diâmetro, com nucleocapsídeo cônico e envelopado, que codifica proteínas que podem ser classificadas em: estruturais, reguladoras e acessórias (JUNIOR, 2017). O vírus ataca o sistema imunológico, enfraquecendo-o e tornando o corpo vulnerável a doenças e infecções oportunistas (FRANKEL; YOUNG, 1998). As mutações são alterações no genoma do vírus que afetam

a eficácia dos ARVs de forma parcial ou completa (CHAVES, 2021). Dentre os genes do HIV, a região da polimerase (pol) é a mais acometida pelas mutações, pois é onde atua a maioria dos ARVs. A classificação dos subtipos é realizada através das sequências genéticas do vírus, sendo classificados de A, B, C, D, E, F, G, H, I e recombinantes. No Brasil, o subtipo mais expressivo é o B, F e C (SIMON et al. 2010). No Brasil, foram notificados ao SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) pouco mais de 20 mil casos de HIV em 2023, sendo 26% em mulheres (BRASIL1, 2023). Segundo os Indicadores e Dados Básicos do HIV/AIDS nos Municípios Brasileiros, no estado de São Paulo a taxa de diagnóstico de HIV em mulheres diminuiu 28%, de 2014 até o primeiro semestre de 2023, mostrando a eficácia do sistema de saúde da região (BRASIL2, 2024). As estratégias globais da Organização Mundial da Saúde (OMS), do Fundo Global e do UNAIDS (Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids) visam erradicar a epidemia de HIV até 2030. Até 2025, a meta é que 95% das pessoas vivendo com HIV sejam diagnosticadas, 95% destas recebam tratamento antirretroviral e 95% destas atinjam uma carga viral suprimida (Meta 95/95/95) (OMS, 2024). A transmissão heterossexual é apontada como um dos fatores para a feminização da epidemia de HIV/AIDS e a transmissão materno-infantil cresce como consequência do envolvimento feminino. Fatores biológicos, culturais e socioeconômicos contribuem para a elevada incidência e prevalência da infecção por HIV-1 entre as mulheres (GALVÃO et al. 2004). A transmissão da doença ocorre, principalmente via sexual, compartilhamento de perfuro cortantes contaminados como agulhas e alicates e de mãe para filho (durante o parto ou aleitamento materno) (BRASIL3, 2016). A infecção não tratada evoluirá para Aids (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) facilitando o acometimento por infecções oportunistas. A implementação precoce da terapia antirretroviral (TARV) é associada a uma significativa redução na morbimortalidade, a interrupção da cadeia de transmissão, ao aumento na expectativa de vida dos pacientes e ao favorecimento da recuperação da função imune (BRASIL4, 2024). O teste de genotipagem é realizado para avaliação e manejo de resistência viral em indivíduos vivendo com HIV (PVHIV). A técnica identifica mutações genéticas do HIV-1, que podem afetar a eficácia dos antirretrovirais (ARVs) e deste modo facilita a personalização dos esquemas terapêuticos (BRASIL5, 2024). Este trabalho visa levantar informações sobre mulheres vivendo com HIV para compreender e abordar as especificidades da epidemia que afetam esse grupo. Os objetivos foram identificar os padrões de resistência aos ARVs, avaliar a prevalência de diferentes mutações genéticas na região da polimerase e transcriptase reversa e investigar o desenvolvimento de resistência aos ARVs em amostras de rotina de pacientes adultos jovens da região metropolitana de São Paulo que deram entrada no Laboratório de Genotipagem do Instituto Adolfo Lutz Central no período de 2014 a 2023.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas genotipagens de adultos jovens de 18 a 49 anos que tiveram solicitações de genotipagens encaminhadas ao Laboratório de Genotipagem do HIV-1 disponíveis nos bancos de dados oficiais do Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais (NDSS) do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz– Central. Em cumprimento às disposições da Lei Geral de Proteção de Dados (LGPD), todos os dados dos pacientes apresentados neste estudo foram devidamente anonimizados. Nenhuma informação pessoal ou qualquer outro dado que possa direta ou indiretamente identificar um indivíduo foi incluída. A metodologia utilizada é o descritivo longitudinal. Foram incluídos resultados de

genotipagem de pacientes de 18 a 49 anos, caracterizados pelos seus médicos em falha terapêutica e que apresentaram histórico terapêutico de no mínimo três meses que deram entrada no Laboratório no período de 2014 a 2023 (10 anos). Os casos foram estratificados pelos resultados de genotipagem para a região da polimerase (Protease e Transcriptase Reversa). Foram excluídas reentradas, casos sem histórico de tratamento antirretroviral e casos que não apresentavam sequenciamento genético. As análises das amostras foram realizadas pela equipe do Laboratório em momento oportuno a partir da data de sua entrada. A quantificação da viremia plasmática foi feita através da reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com os protocolos do fabricante (Abbott M2000 RealTime HIV-1, Alinity e COBAS 5800). As amostras foram submetidas à genotipagem para identificação de mutações genéticas, para o grau de suscetibilidade aos antirretrovirais foi utilizada a plataforma Stanford University HIV Drug Resistance Database para a leitura dos resultados em arquivo fasta gerado pelo sistema Bioedit (software utilizado para o alinhamento dos genes). O banco de dados foi gerado a partir do REDCap (Research Electronic Data Capture), uma ferramenta para gerenciamento de banco de dados onde é preenchido a partir da ficha do paciente enviada pelo médico ao NDSS contendo informações básicas como sexo, nome, idade e dados de carga viral, contagem de células imunológicas TCD4 e tratamento terapêutico. Para consistência dos dados foi utilizado o SISCEL/SICLOM (Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral). Para a análise de dados foi utilizado o software STATA® (versão 14.0). A análise descritiva foi via tabelas de frequência (variáveis qualitativas). Para as variáveis quantitativas foram calculadas as medianas e interquartile ranger (IQR 25-75). As comparações entre as categorias foram realizadas por meio do teste Qui-quadrado para variáveis categóricas, e testes t Student, não paramétrico de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para as variáveis contínuas, quando aplicável.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O banco de dados do RedCap apresentava 9011 entradas, sendo de homens e mulheres. Preenchendo os critérios de inclusão: 1278, dos quais 548 eram mulheres e 730 homens. A idade mediana dos pacientes não foi semelhante entre os sexos, com as mulheres apresentando mediana de 39 anos e os homens 40 ($p=0,0054$). Em relação à contagem de células TCD4 ($p=0,5297$), ambos os grupos apresentaram valores comparáveis, sendo 278 para mulheres e 277 para homens. Sobre a mediana da carga viral ($p=0,0571$) o valor para mulheres foi de 3,85 e 3,72 para homens. Embora o valor de p não seja estatisticamente significativo, a proximidade ao limiar sugere uma possível associação que pode não ter sido detectada devido à alta variabilidade dos dados ou outras limitações, porém ao contrário dos dados sobre carga viral deste estudo, outras pesquisas (LOUPA et al, 2006; NICASTRI, 2005; TAMBWE et al, 2024) apontam que há diferença entre carga viral e sexo, onde normalmente, os homens costumam ter os níveis de carga viral mais elevado que as mulheres, provavelmente, por hormônios. O tempo de tratamento antirretroviral (TARV) foi significativamente ($p<0,0001$) maior entre as mulheres que apresentaram mediana de 10 anos e os homens 7. Os indicadores clínicos mostram que, na cidade de São Paulo, o percentual de diagnóstico tardio costuma ser maior entre as mulheres desde 2014, porém o percentual de indivíduos elegíveis para TARV que iniciaram tratamento em até um mês após a realização do primeiro CD4 é maior entre as mulheres desde 2009 a 2017, o cenário muda a partir de 2018, passando pela pandemia onde houve muitos casos de subnotificação de

doenças (BRASIL6, 2024). Quanto à prevalência de subtipos de HIV-1, ($p < 0,0051$) o subtipo B foi o mais comum em ambos os grupos, 72% nas mulheres e 78% dos homens. A predominância do subtipo B é bem documentada na literatura brasileira desde 1960. A estabilização da soroprevalência no Brasil pode ser explicada pelo tempo atuante (já que o subtipo B foi um dos primeiros detectados), variações comportamentais referentes a prática sexual e a conscientização da população (BELLO et al. 2007). Ao analisar as mutações (principais e acessórias), observa-se que as mutações relacionadas aos inibidores de protease (IP) ocorreram em ambos os grupos de forma homogeneia, 112 mulheres e 168 homens ($p=0,2709$). No que diz respeito às mutações associadas aos inibidores análogos de nucleos(t)ídeos (NRTI) e não análogos (NNRTI), os dados indicam que há uma proporção maior de homens em comparação às mulheres, o percentual para NRTI para mulheres foi de 79% e 87% dos homens, e NNRTI 58% das mulheres e 80% dos homens. Provavelmente, pode estar relacionado à baixa barreira genética dessas classes e ser as principais utilizadas nos esquemas terapêuticos, enquanto que a classe de IP apresenta alta barreira genética, onde é necessário tempo maior de tratamento para que elas apareçam (ZAZZI, 2010). A análise de resistência genotípica evidenciou que entre os casos que tinham alguma mutação 96% das mulheres eram resistentes a algum antirretroviral, e 97% dos homens ($p=0,0027$). A alta taxa de resistência neste banco foi esperada por se tratar de pacientes que, provavelmente, não têm boa adesão ao tratamento, apresenta falhas na terapia e fatores genéticos do vírus (CHAVES, 2021). O acompanhamento de mulheres grávidas com HIV é crucial, pois a transmissão vertical do vírus pode ser prevenida com intervenções adequadas. Além disso, a saúde da mãe e do bebê pode ser impactada pelo manejo do HIV-1 durante a gestação. A Tabela 3 a seguir apresenta dados sobre o perfil de grávidas com HIV-1. 39 das mulheres analisadas eram gestantes e 22 delas apresentava alguma mutação, dentre as que tinham mutação 77% tinham resistência a algum ARV. Isso não apenas aumenta o risco de transmissão vertical do HIV-1, mas também compromete a saúde materna e neonatal (BRASIL7, 2022).

CONCLUSÃO

Os resultados indicam uma alta prevalência de mutações associadas à resistência aos ARVs em pacientes em falha com histórico de uso de antirretroviral que ressalta a importância de monitoramento contínuo e de adaptações terapêuticas personalizadas. O longo tempo de tratamento observado sugere problema de adesão e consequente desenvolvimento de resistência, o que enfatiza a necessidade de estratégias que promovam a adesão, garantindo que pessoas vivendo com HIV-1, especialmente mulheres (pela transmissão vertical) tenham acesso a cuidados adequados e eficazes. O monitoramento contínuo da carga viral é fundamental para a detecção de falhas terapêuticas, viabilizando a genotipagem e garantindo a implementação de ajustes necessários no tratamento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter colocado pessoas excepcionais ao meu lado, que me apoiaram em todas as etapas deste trabalho. Agradeço especialmente a Giselle Lopez e Norberto Campos pela minuciosa revisão deste trabalho. Manifesto também minha gratidão a Tainá Xavier, pela assistência na separação das sequências e no uso do programa STATA, e a Giovanna Jackelyne, pela organização e complementação do banco de dados. Deixo um agradecimento sincero ao meu orientador, Lula, por sua paciência e compreensão

ao longo de todo o processo. Por fim, expresso minha profunda gratidão ao meu marido, Jefferson Moreira, por seu apoio incondicional em todos os momentos. Meu muito obrigada a todos.

REFERÊNCIAS

BELLO, Gonzalo, et al. “Demographic History of HIV-1 Subtypes B and F in Brazil.” **Infection, Genetics and Evolution**, 1 Mar. 2007, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.11.002>. Acesso em: 22 Out. 2024.

BRASIL1. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2023. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2023/hiv-aids/boletim-epidemiologico-hiv-e-aids-2023.pdf/view>. Acesso em: 20 ago. 2024.

BRASIL2. Indicadores de AIDS. **Indicadores AIDS**. Disponível em: <http://indicadores.aids.gov.br/>. Acesso em: 23 Ago. 2024.

BRASIL3. Ministério da Saúde. HIV e Aids. **Biblioteca Virtual em Saúde**, Nov.2016.Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/hiv-e-aids/>. Acesso em: 12 dez. 2024.

BRASIL4. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 2024. Disponível em: https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/pcdts/pcdt_hiv_modulo_1_2024.pdf. Acesso em: 19 Ago. 2024.

BRASIL5. Ministério da Saúde. Manual Técnico para Avaliação de Exames de Genotipagem. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/publicacoes/2019/manual-tecnico-para-avaliacao-de-exames-de-genotipagem-do-hiv#:~:text=O%20exame%20de%20genotipagem%20do,medicamentos%20das%20diferentes%20classes%20terap%C3%AAuticas>. Acesso em: 19 Ago. 2024.

BRASIL6. Ministério da Saúde. **Indicadores clínicos do HIV e AIDS**. Disponível em: <https://indicadoresclinicos.aids.gov.br/>. Acesso em: 12 Dez. 2024.

BRASIL7. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para prevenção da transmissão vertical de HIV/aids, sífilis e hepatites virais. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2022. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_hiv_sifilis_hepatites.pdf. Acesso em: 22 Out. 2024.

CHAVES, Yuri Oliveira. “Diversidade Genética Do HIV-1 E Mutações de Resistência Adquiridas Em Pessoas Vivendo Com HIV.” **Fiocruz.br**, 2021, www.arca.fiocruz.br/handle/icict/50689#collapseExample, <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/50689>. Acesso em: 22 Out. 2024.

FRANKEL, Alan D. ; YOUNG, John AT HIV-1: Quinze proteínas e um RNA. *Annual Review of Biochemistry* , v. 67, n. 1, p. 1–25, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9759480/> . Acesso em: 23 Ago. 2024.

GALVÃO, Marli Gimenez; ABREU, Ana Teresa de; CERQUEIRA, Ramos; et al. Medidas contraceptivas e de proteção da transmissão do HIV por mulheres com HIV/Aids. *Contraceptive measures and HIV transmission protection among women with HIV/AIDS. Rev Saúde Pública*, v. 38, n. 2, p. 194–200, 2004. Disponível em: <<https://www.scielo.org/pdf/rsp/2004.v38n2/194-200/pt>>. Acesso em: 23 Ago. 2024.

JUNIOR, S. Prevalência e fatores associados à falha virológica em pacientes com HIV. *Fiocruz.br*, 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/47487>. Acesso em 23 Ago. 2024.

Lei n.º 13.709, de 14 de agosto de 2018. Dispõe sobre a proteção de dados pessoais e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 15 ago. 2018.

LOUPA, C.V., et al. “Gender Differences in Human Immunodeficiency Virus (HIV) RNA and CD4 Cell Counts among New Entrants to HIV Care.” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 12, no. 4, Apr. 2006, pp. 389–391, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01368.x>. Acesso em: 12 Dez. 2024.

NICASTRI, Emanuele, et al. “Gender Differences in Clinical Progression of HIV-1-Infected Individuals during Long-Term Highly Active Antiretroviral Therapy.” *AIDS*, vol. 19, no. 6, 8 Apr. 2005, pp. 577–583, <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000163934.22273.06>. Acesso em: 12 Dez. 2024.

Organização Mundial da Saúde (OMS). 2024. HIV e AIDS. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>. Acesso em: 19 Ago. 2024.

SIMON, Daniel; BÉRIA, Jorge Umberto; TIETZMANN, Daniela Cardoso; et al. Prevalência de subtipos do HIV-1 em amostra de pacientes de um centro urbano no sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 44, n. 6, p. 1094–1101, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/tHLSmmqbwbjPZghNthVhhkP/?lang=pt>. Acesso em: 15 Out. 2024.

TAMBWE, Willy Muzumbukilwa, et al. “Evaluating Compliance with Quality Indicators of HIV and AIDS Clinical Care and Analyzing Those Associated with Mortality in the Democratic Republic of Congo.” *BMC Infectious Diseases*, vol. 24, no. 1, 28 Nov. 2024, [pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11603654/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11603654/), <https://doi.org/10.1186/s12879-024-10253-y>. Acesso em: 12 Dez. 2024.

ZAZZI, Maurizio. “High Genetic Barrier Antiretroviral Drugs in Human Immunodeficiency Virus–Positive Pregnancy.” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 50, no. 6, 15 Mar. 2010, pp. 895–897, <https://doi.org/10.1086/650748>. Acesso em 12 Dez. 2024.

Capítulo 05

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-05

SURTOS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA ENVOLVENDO VÍRUS ENTÉRICOS: EPIDEMIOLOGIA E IMPACTO EM SAÚDE PÚBLICA NO BRASIL, 2000-2023

Micheli de Oliveira Santana¹; Jaqueline Calça Assis²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - Vigilância Sanitária - CLR-X - IAL; micheli.veisan@gmail.com

²Assistente Técnico de Pesquisa Científica e Tecnológica do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas - CLR-X - IAL; jaqueline.calca@ial.sp.gov.br

Resumo: A água pode ser contaminada por microrganismos patogênicos, como bactérias, vírus e parasitas, principalmente devido ao esgoto não tratado, resultando em doenças graves. Os vírus entéricos humanos são responsáveis por muitas dessas infecções. O controle sanitário deve considerar o perfil epidemiológico das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA), e os registros de vigilância são fundamentais para monitorar a frequência desses patógenos ao longo do tempo. O objetivo foi analisar o perfil epidemiológico dos surtos de doenças causadas por vírus transmitidos através de água contaminada e descrever as principais causas associadas a esses eventos no Brasil no período de 2000 a 2023. O presente estudo é uma revisão bibliográfica sobre surtos de DTHA no Brasil, com foco na transmissão hídrica por vírus entéricos, no período de 2000 a 2023. Foram selecionados estudos a partir de fontes como o Ministério da Saúde (MS), PubMed, SciELO, Google Acadêmico e ScienceDirect. A análise dos dados revelou que a distribuição dos surtos de DTHA no Brasil está relacionada à desigualdade no acesso ao saneamento básico, com a Região Nordeste concentrando a maior parte dos surtos (56%), seguida pela Sudeste (38%). Observou-se uma diminuição no número de casos ao longo dos anos, possivelmente atribuída à introdução de vacinas e a melhorias pontuais em infraestrutura. Apesar dessa redução, a gravidade do problema persiste, reforçando a necessidade de investimentos contínuos em saneamento básico e no controle da qualidade da água para prevenir novos surtos e proteger a saúde pública.

Palavras-chave: contaminação da água; doença de transmissão hídrica; saneamento básico; surtos de doença; vigilância sanitária

1. Introdução

A água, representando 70% do corpo humano, é essencial para processos biológicos, produção de alimentos e sistemas de saneamento (MITCHELL et al., 1945). Sua contaminação, especialmente em países em desenvolvimento, é uma preocupação crescente (WHO, 2023). No Brasil, apesar de avanços, a falta de infraestrutura em áreas rurais e periurbanas ainda resulta em surtos de doenças gastrointestinais graves, como cólera e hepatite A e E (MS, 2018).

Os vírus entéricos, como *norovírus*, *rotavírus* e *adenovírus*, são responsáveis por muitas infecções transmitidas pela água, podendo causar hospitalizações e mortes, especialmente em grupos vulneráveis. Eliminados nas fezes, esses vírus podem permanecer viáveis por longos períodos, resistindo a condições adversas e a tratamentos convencionais, o que torna a água destinada ao consumo humano um vetor de contaminação. A investigação epidemiológica é fundamental para entender suas causas e melhorar as estratégias de prevenção (PULIDO et al., 2005; TAVARES et al., 2007).

Este estudo visa analisar o perfil epidemiológico dos surtos causados por vírus transmitidos por água, fornecendo dados para políticas de saúde pública e melhorias em saneamento, com o objetivo de reduzir a carga de doenças e promover a segurança alimentar e hídrica e descrever as principais causas associadas a esses eventos no Brasil no período de 2000 a 2023.

2. Material e Métodos

Este estudo é uma revisão bibliográfica dos dados sobre surtos de Doenças Transmitidas por Água e Alimentos (DTHA) no Brasil, focando na transmissão hídrica de vírus entéricos entre 2000 e 2023. Os dados foram coletados no banco de dados públicos do Ministério da Saúde e de artigos científicos em bases como PubMed, Scielo, Google Acadêmico e ScienceDirect, utilizando descritores como “Contaminação da Água”; “Doença de Transmissão Hídrica”; “Saneamento Básico”; “Surtos de Doença” e “Vigilância Sanitária”.

Os critérios de inclusão abarcaram artigos e dados públicos do Ministério da Saúde que abordaram surtos notificados e análises de vigilância sanitária, permitindo a extração de dados sobre incidência, agentes patogênicos e impactos em saúde pública. A análise qualitativa dos dados possibilitou identificar padrões e tendências nos surtos, além de relacionar as condições de saneamento básico com a ocorrência dessas doenças.

3. Resultados e Discussão

Com base no banco de dados públicos do MS (2024) os dados revelaram que, entre 2000 e 2023, foram registrados 16.839 surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA), dos quais 1.144 (aproximadamente 6,8%) estavam associados ao consumo de água contaminada ocasionando as Doenças de Transmissão Hídrica (DTH). Dentre os surtos relacionados à água, 155 (13,5%) foram causados por vírus, acometendo 18.347 pessoas e causando 37 óbitos, e 417 surtos foram classificados como "ignorados", correspondendo a aproximadamente 36,5% do total, o que destaca a necessidade de melhorar a coleta e a precisão dos dados para compreender melhor as causas dos surtos.

A **Figura 1** mostra a distribuição dos surtos de vírus por veiculação hídrica nas diferentes regiões do Brasil entre 2000 e 2023, com 155 surtos registrados em total. A região Nordeste foi a mais afetada, com 86 surtos (56%), possivelmente devido a fatores socioeconômicos e infraestrutura de saúde. O Sudeste registrou 59 surtos (38%), influenciado pela alta densidade populacional e urbanização. O Sul teve 5 surtos (3%), o Norte 3 surtos (2%), e o Centro-Oeste 2 surtos (1%), com esses baixos índices podendo ser atribuídos a características regionais e desafios de notificação.

A escassez de dados sobre vírus em águas residuais em países em desenvolvimento é preocupante, pois a poluição hídrica advinda do esgoto inadequado é uma fonte significativa de contaminação viral (OKOH et al., 2010; ROSE E MOLLOY, 2007). No Brasil, 85,8% da população tem acesso à água, mas apenas 66,3% têm coleta de esgoto (IBGE, 2018), expondo riscos de doenças em áreas com saneamento deficiente.

Dados do Trata Brasil (2022) mostram que as regiões Norte e Nordeste apresentam as maiores deficiências em saneamento: no Norte, 37,6% da população carece de água potável e 85,7% não têm coleta de esgoto; no Nordeste, esses índices são de 24,4% e 69,1%, respectivamente. Nas demais regiões, embora o acesso à água seja maior, a coleta de esgoto ainda é insuficiente, indicando desafios contínuos para o saneamento básico e a saúde pública.

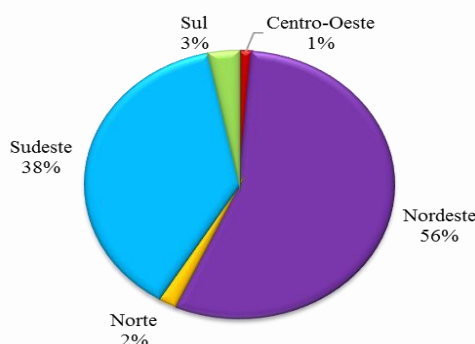


Figura 1- Distribuição, por região, dos surtos de transmissão hídrica envolvendo vírus entéricos, Brasil, 2000-2023.

Fonte: elaborada pelos autores (Dados do Ministério da Saúde, 2024)

A **Figura 2** mostra a variação do número de casos de doenças causadas por vírus veiculados por água entre 2000 e 2023. A análise revela grandes flutuações, com picos em 2006 e 2011. Após o aumento em 2006, houve uma queda, possivelmente relacionada à introdução da vacina contra o rotavírus no Brasil, em 2006 (ASSIS et al., 2013). Em 2011, o número de casos subiu novamente, mas, após esse pico, a tendência foi de redução até 2021. Esse declínio pode ter sido influenciado pela introdução da vacina monovalente contra a hepatite A em 2014, o que resultou em uma significativa diminuição de surtos e contribuiu para a redução geral dos casos (BRITO E SOUTO, 2020). A queda nos casos após 2022 pode ser atribuída a uma redução efetiva nos surtos, embora fatores como surtos regionais e a retomada das notificações após a pandemia de Covid-19 também possam ter influenciado os números (BATISTA et al., 2022).

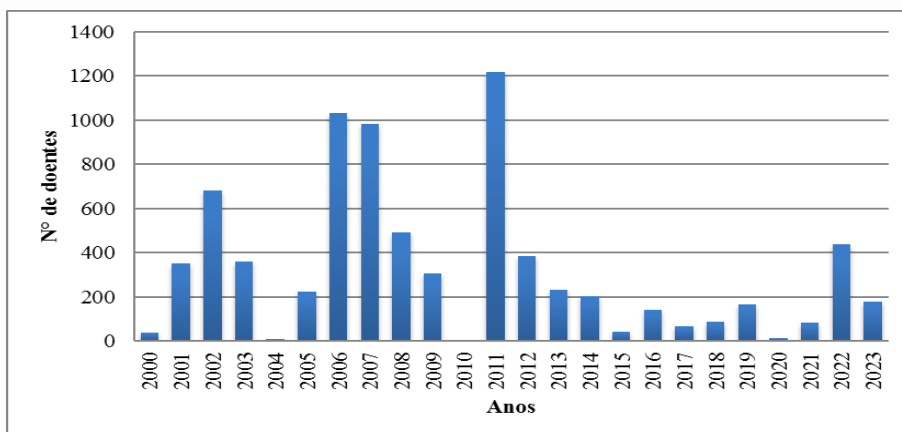


Figura 2- Distribuição anual do número de afetados nos surtos de transmissão hídrica envolvendo vírus entéricos, Brasil, 2000-2023.

Fonte: elaborada pelos autores (Dados do Ministério da Saúde, 2024)

A **Figura 3** apresenta os surtos de diferentes vírus transmitidos por água contaminada entre 2000 e 2023, incluindo adenovírus, enterovírus, vírus da hepatite A (VHA), norovírus e rotavírus. Os locais de ocorrência incluem alojamentos, asilos, casos dispersos, creches, eventos, hospitais, residências e locais não especificados.

Nos alojamentos e locais de trabalho, o norovírus foi responsável por 62,5%, VHA por 25% e enterovírus por 12,5%. O norovírus é especialmente transmissível em ambientes com alta interação, como demonstrado em estudos de Menezes et al. (2010).

No asilo, o agente causador do surto foi o norovírus. Trivedi et al. (2013) destacam que pessoas acima de 90 anos em instituições de longa permanência apresentam um risco 20% a 30% maior de morte e hospitalização durante surtos de norovírus.

Em casos dispersos no município, houve uma diversidade de vírus, com o VHA (40,9%) e norovírus (27,2%) sendo os mais frequentes. Apesar da melhora nas condições de higiene, surtos ainda ocorrem devido a alimentos contaminados e contato em hospitais (PEREIRA E GONÇALVES, 2003).

Em creches e escolas, os surtos causados foram predominantemente causados pelo VHA (64,7%). A hepatite A é comum em crianças pequenas, que muitas vezes não apresentam sintomas (NESTI E GOLDAUM, 2007). Anualmente, a gastroenterite viral causa mais de 200.000 mortes infantis, com rotavírus e adenovírus como principais responsáveis (KONUKSEVER E KARAKAYA, 2024).

Nos eventos, o número de surtos foi baixo, tendo como causa o rotavírus, que provoca diarreia severa em crianças menores de 5 anos e resulta em muitas mortes (ARAKAKI et al., 2021).

Nos hospitais e unidades de saúde, foram registrados surtos causados pelo norovírus. Altamente contagioso, ele pode provocar diarreia aguda em locais com grande aglomeração de pessoas, como escolas, universidades e hospitais (MORILLO E TIMENETSKY, 2011).

Em 28 surtos em locais não especificados, a maioria dos surtos foi atribuída ao VHA. A falta de investigação contribuiu para a escassez de dados. A vigilância epidemiológica é essencial para o controle de doenças infecciosas, mas muitos casos não são notificados devido à leveza dos sintomas (GAMA et al., 2024; POULSEN, 2015).

As residências apresentaram o maior número de surtos, sendo o VHA e o rotavírus os responsáveis pela maioria das ocorrências. Em 2018, as residências representaram 37%

dos casos de DTHA no Brasil. A educação sobre boas práticas de manipulação de alimentos é essencial para mitigar esses riscos (FERRARI E FONSECA, 2019).

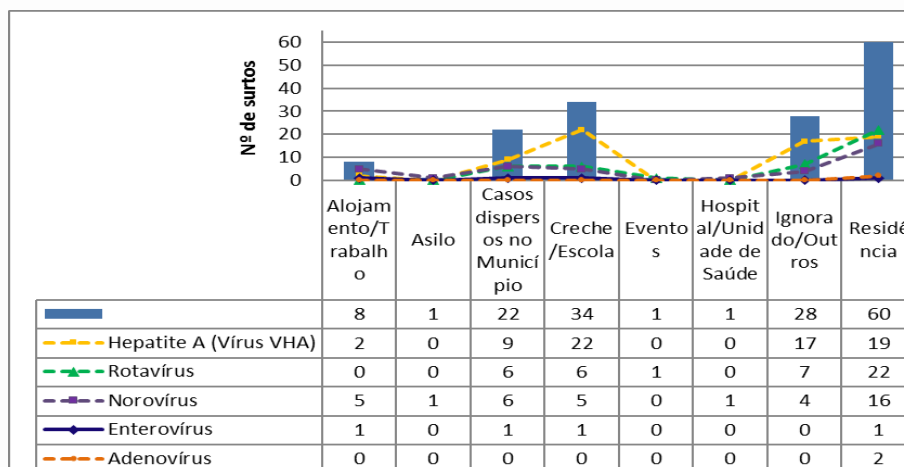


Figura 3- Distribuição, segundo local de ocorrência e agentes etiológicos, dos surtos de transmissão hídrica envolvendo vírus entéricos, Brasil, 2000-2023.

Fonte: elaborada pelos autores (Dados do Ministério da Saúde, 2024)

4. Conclusões

Em conclusão, embora o número de surtos relacionados à veiculação hídrica tenha diminuído nos últimos anos, a gravidade do problema persiste. A vigilância epidemiológica e sanitária é crucial para mitigar esses surtos, especialmente em regiões com infraestrutura deficiente. A adoção de novas tecnologias de purificação, o fortalecimento da vigilância da qualidade da água e a capacitação dos profissionais são essenciais. Além disso, é fundamental promover campanhas de conscientização e investir em políticas públicas para melhorar a infraestrutura hídrica e o saneamento, visando a prevenção de surtos e a proteção da saúde pública.

5. Referências

- ARAKAKI, L. et al. Prevalence of rotavirus among older children and adults with diarrhea: A systematic review and meta-analysis. **Vaccine**, v. 39, n. 33, p. 4577–4590, jul. 2021. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.06.073
- ASSIS, A. S. F. et al. Rotavirus epidemiology before and after vaccine introduction. **Jornal de Pediatria**, v. 89, n. 5, p. 470–476, 1 set. 2013. DOI: 10.1016/j.jpedp.2013.02.005
- BATISTA, J. D. DE S. et al. Intoxicações por alimentos e bebidas e ocorrência das doenças de transmissão hídrica e alimentar no Brasil. **Saúde e Pesquisa**, v. 15, n. 4, p. 1–21, 7 dez. 2022. DOI: 10.17765/2176-9206.2022v15n4.e11170
- BRITO, W. I. DE; SOUTO, F. J. D. Vacinação universal contra hepatite A no Brasil: análise da cobertura vacinal e da incidência cinco anos após a implantação do programa. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 23, 2020. DOI: 10.1590/1980-549720200073

FERRARI, A. M.; FONSECA, R. V. Conhecimento de consumidores a respeito de doenças transmitidas por alimentos. **UNESC em Revista**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2019. Disponível em: <http://revista.unesc.br/ojs/index.php/revistaunesc/article/view/56/34>.

GAMA, K. M. da, et al. Strategies for control and prevention of emerging infectious diseases: lessons learned and future directions. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 10, n. 3, p. 38-44, 1 mar. 2024. DOI: 10.51891/rease.v10i3.13103

IBGE. **IBGE | Portal do IBGE**. 2018. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>>.

KONUKSEVER, D.; KARAKAYA, S. P. Y. Fecal leukocyte frequency in children with acute viral gastroenteritis: a single-center experience. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 70, n. 4, 2024. DOI: [10.1590/1806-9282.20230972](https://doi.org/10.1590/1806-9282.20230972)

MENEZES, F. de G. et al. Surto de infecção por norovírus em instituição de longa permanência no Brasil An outbreak of norovirus infection in a long-term care facility in Brazil. **artigo original einstein**, v. 8, n. 4, p. 410-413, 2010. Disponível em: https://journal.einstein.br/wp-content/uploads/articles_xml/1679-4508-eins-8-4-0410/1679-4508-eins-8-4-0410-pt.pdf?x56956

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dados Surtos de DTHA - 2000 a 2023. 2024. Disponível em: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1XT4iffaWUcMgU_t-Q0mKZhX1UHUJsJxi/edit?usp=sharing&ouid=116458023964399756371&rtpof=true&sd=true>.

MINISTERIO DA SAUDE. Qualidade da água para consumo humano: cartilha para promoção e proteção da saúde. 1. Ed. 2018. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/qualidade_agua_consumo_humano_cartilha_promocao.pdf>.

MITCHELL, H. H. et al. The chemical composition of the adult human body and its bearing on the biochemistry of growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 158, n. 3, p. 625-637, maio 1945. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)51339-4

MORILLO, S. G.; TAVARESTIMENETSKY, M. DO C. S. Norovírus: uma visão geral. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 4, p. 462-467, jul. 2011. DOI: 10.1590/S0104-42302011000400023

NESTI, M. M. M.; GOLDBAUM, M. Infectious diseases and daycare and preschool education. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 4, p. 299-312, 1 jul. 2007. DOI: 10.2223/JPED.1649

OKOH, A. I.; SIBANDA, T.; GUSHA, S. S. Inadequately Treated Wastewater as a Source of Human Enteric Viruses in the Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 6, p. 2620-2637, 14 jun. 2010. DOI: 10.3390/ijerph7062620

PEREIRA, F. E. L.; GONÇALVES, C. S. Hepatite A. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 387–400, jun. 2003. DOI:10.1590/S0037-86822003000300012

POULSEN, L. K. Hints for diagnosis. **Hints of diagnosis**, p. 59–67, 2015. DOI: 10.1159/000371674

PULIDO, M. D. P. A. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. 2005. DOI: 10.22490/24629448.338.

ROSE, J. B.; MOLLOY, S. L. Globalization effects on water quality: monitoring the impact on and control of waterborne disease. **Cambridge University Press eBooks**, p. 92–119, 2007. DOI: 10.1017/CBO9780511542183.008

TAVARES, T. de M.; CARDOSO, D. das D. de P.; DE BRITO, W. M. E. D. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, Goiânia, v. 34, n. 2, 2007. DOI: 10.5216/rpt.v34i2.1914.

TRATA BRASIL. Saneamento é Saúde. 2022. Disponível em: <<https://tratabrasil.org.br/>>.

TRIVEDI, T. K. et al. Clinical characteristics of norovirus-associated deaths: A systematic literature review. **American Journal of Infection Control**, v. 41, n. 7, p. 654–657, jul. 2013. DOI: 10.1016/j.ajic.2012.08.002

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drinking Water**. 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>>.

Capítulo 06

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-06

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS SURTOS DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR CAUSADOS POR *SALMONELLA* spp., BRASIL, 2004 A 2023.

Taimara Câmara Guedes¹; Jacqueline Tanury Macruz Peresi²

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

²Pesquisador do Núcleo de Ciências Química e Bromatológicas do CLR X IAL - São José do Rio Preto

Resumo: Dentre as doenças transmitidas por água e alimentos (DTHA) registradas no mundo, *Salmonella* está entre os quatro maiores agentes envolvidos. Este estudo teve por objetivo avaliar o perfil epidemiológico dos surtos de DTHA por *Salmonella* no período de 2004 a 2023, no Brasil. Trata-se de trabalho de revisão elaborado com base no banco dados público do Ministério da Saúde, em artigos científicos, livros, manuais e portais eletrônicos, sendo utilizadas as seguintes bases de dados: PubMed, MEDLINE, LILACS, SciELO, Biblioteca Virtual de Saúde e Google Acadêmico. Dos 13.954 surtos de DTHA causados por diversos agentes etiológicos no período avaliado, 1.031 (7,4%) foram ocasionados por *Salmonella*, totalizando 26.522 doentes. Em 73 (7,1%) dos surtos foi identificado o sorotipo, sendo *S. Enteritidis* responsável por 54 (74%) deles. Os veículos de transmissão mais envolvidos em relação aos 1.031 surtos foram ovos/produtos à base de ovos (34,6%), seguido de alimentos mistos (16,3%) e múltiplos alimentos (13,4%). Os locais de maior ocorrência dos surtos foram residências (46,2%), seguido de restaurantes/padarias e similares (20,1%) e outras instituições, alojamentos e trabalho (8,9%). A região Sul registrou o maior número de episódios (64,5%), seguida pelo sudeste (16,7%) e nordeste (12,5%). Em 74% do total das ocorrências não houve a confirmação por meio de análise dos alimentos. Diante do exposto enfatiza-se o impacto da *Salmonella* como agente de DTHA e a importância do conhecimento do perfil epidemiológico destes agravos para melhor compreender a proporção dessa problemática no país e para implantação/implementação de Programas de prevenção e controle destas doenças.

Palavras-chave: contaminação de alimentos; doenças transmitidas por alimentos; perfil epidemiológico; *Salmonella*; sorotipo

INTRODUÇÃO

Doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) são aquelas resultantes do consumo de água e alimentos contaminados. Para que seja considerado como surto de DTHA é necessário que duas ou mais pessoas adoecem após consumir alimentos em comum, geralmente de um mesmo local, apresentando sinais e sintomas semelhantes. Entretanto, quando se trata de doenças graves, como a cólera, apenas um caso é necessário para se considerar um surto de DTHA (Ministério da Saúde, n.d.-a). De acordo com dados públicos do Ministério da Saúde, no Brasil, 16.839 surtos de DTHA foram notificados entre 2000 e 2023 totalizando 304.147 doentes e 262 óbitos (Ministério da Saúde, 2024).

Salmonella spp. é um patógeno responsável por causar surtos de DTHA no Brasil e no mundo, podendo provocar graves infecções e levar ao óbito.

Dentre todos os tipos de DTHA já registrados no mundo, o gênero *Salmonella* está entre os quatro mais frequentemente associados a ocorrências de doenças diarreicas (WHO, 2018).

Considerando que os registros de vigilância são essenciais para observar os níveis de mudança destes agravos (NEWELL, 2010) e que os dados epidemiológicos sobre estas doenças permanecem escassos, principalmente em países em desenvolvimento (WHO, 2015), este estudo poderá subsidiar ações em saúde pública voltadas à prevenção de novos episódios incluindo a conscientização da população, em especial a importância das práticas corretas quanto a manipulação, preparo e conservação dos alimentos.

Diante do panorama global acerca dos casos de doenças envolvendo *Salmonella* spp., esse estudo tem por objetivo geral realizar estudo epidemiológico dos surtos de doenças transmitidas por alimentos causadas por *Salmonella* no período de 2004 a 2023, no Brasil e, como específicos: avaliar a frequência das fontes alimentares, dos sorotipos envolvidos, dos critérios de confirmação dos surtos causados por este patógeno e do local e região geográfica de ocorrência. Ainda, tem como objetivos específicos avaliar a distribuição dos sorotipos em relação às fontes de transmissão no período avaliado e identificar as possíveis alterações epidemiológicas ao longo do período avaliado.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de estudo de revisão elaborado com base no banco de dados público do Ministério da Saúde-MS (onde constam os episódios de DTHA notificados no Brasil no período de 2000 a 2023). Adicionalmente, artigos referenciados nos estudos encontrados foram utilizados nesta revisão, ampliando, dessa forma, o campo da pesquisa. Para a seleção de textos acadêmicos foram utilizadas as seguintes bases de dados: PubMed, MEDLINE, LILACS, SciELO, Biblioteca Virtual de Saúde e Google Acadêmico, os quais forneceram uma base inicial de referências utilizando os descritores: “*Salmonella* spp.”, “DTHA”, “epidemiologia” e “sorotipo”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo as informações obtidas no banco de dados referente aos surtos de DTHA disponibilizados pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2024), constatou-se que no período analisado (2004 a 2023) foram notificados 13.954 surtos causados por diversos agentes etiológicos. Desse total, 1.031 (7,4%) surtos foram ocasionados por bactérias do gênero *Salmonella* acometendo um total de 26.522 pessoas e 30 óbitos. No entanto, esse valor pode não representar a quantidade real dos surtos provocados por *Salmonella*, visto que em 9.171 (65,7%) episódios do total descrito não foi informado o agente etiológico causador da doença.

A subnotificação leva a desinformação da população quanto ao conhecimento e às consequências provenientes de DTHA, o que diminui a procura por unidades de saúde e impossibilita o diagnóstico e tratamento adequado. Além disso, a subnotificação enfatiza o cenário de descaso e subestimação no registro de dados (Oliveira & Ferreira, 2021).

Os veículos de transmissão envolvidos em relação aos 1.031 surtos de *Salmonella* estão distribuídos na Figura 1.

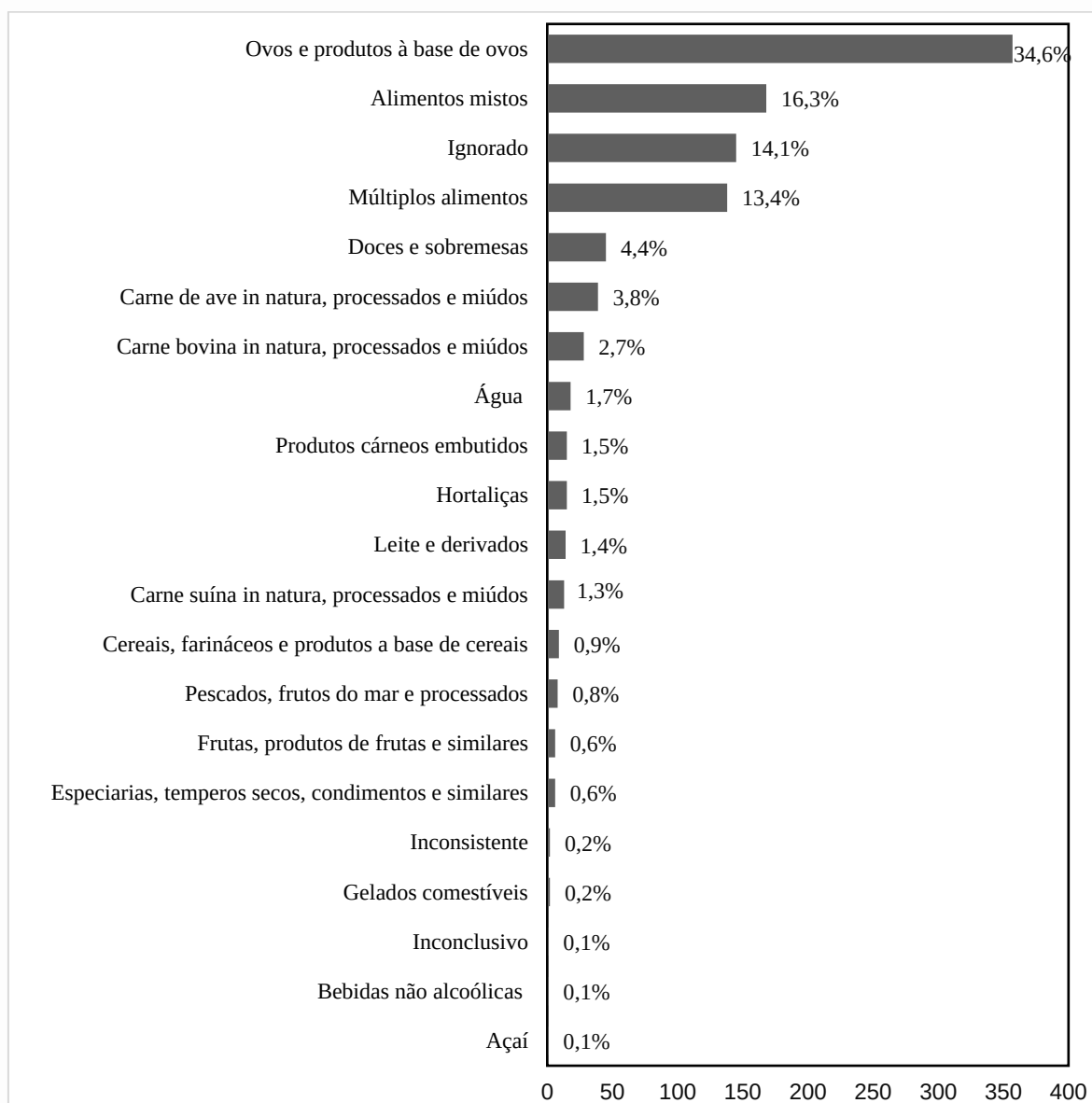


FIGURA 1 – Distribuição dos surtos de DTHA por *Salmonella* de acordo com o tipo de alimento envolvido, Brasil, 2004-2023.

Fonte: elaborada pelo autor, 2024 (Dados do Ministério da Saúde)

Dos 1.031 episódios de DTHA por *Salmonella*, apenas em 73 (7%) deles foi revelado o sorotipo envolvido e nas seguintes frequências: *S. Enteritidis* em 54 (74%) surtos, *S. Typhi* em dez (13,7), *S. Typhimurium* em quatro (5,5%), *S. Newport* em dois (2,7%) e *S. Diarizonae*, *S. Johannesburg* e *S. Paratyphi*, com um (1,4%) surto cada.

Observou-se que os sorotipos apresentaram diferenças na distribuição, estando mais associados a determinadas fontes alimentares, sendo *S. Enteritidis* mais associada a ovos e produtos à base de ovos (38,9% dos casos), seguido de alimentos mistos (18,5%) e doces e sobremesas (11,1%), ressaltando que 44,4% dos surtos por este sorotipo ocorreram entre os anos de 2004 e 2005, e em 2019 foram notificados os dois últimos episódios por este agente. *S. Typhi* teve a maior parte dos veículos de transmissão ignorados (40%), no entanto, dos que constam descritos, a água foi o veículo mais frequente (30%). Quatro surtos (40%)

causados por este sorotipo ocorreram no ano de 2004, um em 2007, dois em 2008, dois em 2016 e o último em 2019. *S. Typhimurium* teve sua distribuição semelhante em todos os veículos identificados (frutas/produtos de frutas e similares; ovos/produtos à base de ovos; leite e derivados e múltiplos alimentos), com 25% cada. Quanto aos demais sorotipos, *S. Newport* foi associada a múltiplos alimentos nos dois surtos em que foi identificada, *S. Paratyphi* foi associada a especiarias, temperos secos e similares, *S. Johannesburg* a hortaliças e o veículo de transmissão de *S. Diarizonae* não foi identificado. A ausência de informações sobre os sorotipos demonstra deficiência na investigação que pode ser atribuída a fatores como não envio de amostras de alimentos aos laboratórios, limitação de métodos laboratoriais de identificação bacteriana e preenchimento incompleto do agente etiológico por parte do órgão de vigilância envolvido. Tal situação se estende também aos surtos por outras etiologias, dos quais 65,7% não apresentavam a informação referente ao agente etiológico.

Certos sorotipos de *Salmonella* apresentam uma forte correlação com determinados alimentos (Tavechio et al., 2002) e a compreensão da epidemiologia destes patógenos, que envolve a diversidade, a frequência dos sorotipos e os padrões regionais de ocorrência tem extrema importância para o controle e monitoramento do comportamento da bactéria.

Os surtos de DTHA foram confirmados por meio dos seguintes critérios: clínico-epidemiológico (observação dos sintomas dos pacientes e análise do padrão de ocorrência dos casos, como padrão geográfico, início dos sintomas e ligação entre os casos), laboratorial bromatológico (análise laboratorial do alimento associado ao surto), laboratorial clínico (exames laboratoriais com amostras biológicas dos pacientes afetados) e laboratorial clínico-bromatológico (combina aspectos de análise laboratorial clínica e bromatológica).

A distribuição percentual quanto aos critérios de confirmação dos surtos por *Salmonella* está apresentada na Figura 2.

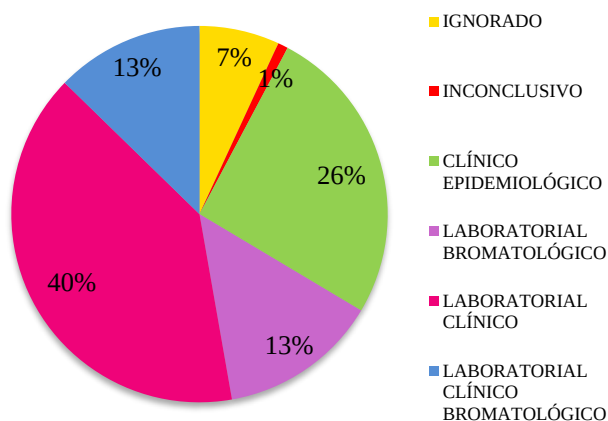


Figura 2 – Distribuição dos critérios de confirmação dos surtos de DTHA por *Salmonella* spp, Brasil, 2004-2023.

Fonte: elaborada pelo autor, 2024 (Dados do Ministério da Saúde)

Ressalta-se que em 8% dos surtos esta informação apresentou-se inconclusiva ou foi ignorada, comprometendo, desse modo, uma análise mais precisa dos dados. A baixa notificação, associada à utilização apenas do critério clínico-epidemiológico pode ser limitante para realização do diagnóstico de DTHA de maneira efetiva (Godoy et al., 2021). Ressalta-se que ausência dos critérios laboratoriais dificulta a elucidação do surto, afinal,

muitos sintomas são semelhantes em infecções causadas por diferentes patógenos (Batista et al., 2022).

Os locais de maior ocorrência dos surtos foram residências correspondendo a 46,2% do total, seguido de restaurantes/padarias e similares (20,1%), outras instituições-alojamentos e trabalho (8,9%) e eventos (8,3%).

A Tabela 1 apresenta a distribuição geográfica dos surtos de DTHA, no período analisado. A discrepância entre os resultados nas diferentes regiões do país traz o questionamento acerca da real dimensão do problema, pois não se sabe se refletem a verdadeira situação do local ou é consequência da subnotificação dos surtos, ressaltando que falhas na investigação, comprometem diretamente a elucidação laboratorial dos possíveis patógenos e alimentos envolvidos, e contribuem para o elevado número de processos não concluídos (Oliveira & Ferreira, 2021).

TABELA 1 – Distribuição dos surtos de DTHA por *Salmonella* de acordo com a região geográfica e número de afetados, Brasil, 2004-2023.

Região	Nº de surtos		Nº de afetados
	Nº	%	
Sul	665	64,5	13.042
Sudeste	172	16,7	6515
Nordeste	129	12,5	3733
Centro-Oeste	33	3,2	2060
Norte	32	3,1	1.172
TOTAL	1.031	100%	26.522

Fonte: elaborada pelo autor, 2024 (Dados do Ministério da Saúde)

Observando-se a ocorrência dos surtos de DTHA por *Salmonella*, constatou-se que na primeira década (2004 a 2013) foram registrados 80% dos episódios e 79,7% dos afetados, sendo 2007 o ano com maior número de acometidos, 3.375 (12,7%). Por outro lado, a segunda década (2014-2023) representou 20% do total, com 5.371 (20,3%) acometidos, e em 2014 houve o maior número de afetados, 1.235 (4,7%).

No período avaliado foi possível observar uma redução gradual do número de surtos de DTHA por *Salmonella*. A diminuição das frequências pode ser atribuída aos resultados das campanhas de conscientização, as medidas sanitárias tomadas diante dos números de afetados na primeira década e, ainda, a ausência de notificação das ocorrências.

CONCLUSÕES

Considerando a reconhecida subnotificação dos surtos de DTHA e que a etiologia dos patógenos envolvidos tem sofrido mudanças temporais e regionais, o estudo epidemiológico destes agravos é de extrema importância para compreender a dinâmica da DTHA, identificar tendências e padrões e subsidiar ações em saúde pública para controle dos riscos associados.

Os resultados revelados enfatizam o impacto da *Salmonella* como agente de DTHA no Brasil e a necessidade da implantação/implementação de Programas de vigilância para a melhoria do sistema de investigação e de notificação de surtos, uma vez que enfermidades de origem alimentar constituem um grande problema em saúde pública e afetam a economia mundial.

REFERÊNCIAS

BATISTA, J. D. de S. *et al.* Intoxicações por alimentos e bebidas e ocorrência das doenças de transmissão hídrica e alimentar no Brasil. **Saúde e Pesquisa**, v. 15, n. 4, p. 1–21, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.17765/2176-9206.2022v15n4.e11170>>. Acesso em: 01 out. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA). MINISTÉRIO DA SAÚDE, n.d.-a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha>. Acesso em: 30 set. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA). Publicações. Dados Surtos DTHA-2000-2023. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024. Disponível em: https://docs.google.com/spreadsheets/d/1XT4iffaWUcMgU_t-Q0mKZhX1UHUJsJxi/edit?gid=1026946243#gid=1026946243. Acesso em: 30 jul. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Salmonella* (Salmonelose). MINISTÉRIO DA SAÚDE, n.d.-b. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/salmonella>>. Acesso em: 30 jul. 2024.

GODOY, J. P. A. *et al.* Surtos notificados de origem alimentar em Alagoas de 2015-2019. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 6, p. 27394–27406, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.34119/bjhrv4n6-302>>. Acesso em: 01 out. 2024.

NEWELL, D. G. *et al.* Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, 2010. Available at: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510000383>>. Accessed: 2 set. 2024.

OLIVEIRA, J. A. da S.; FERREIRA, L. C. Subnotificação de Doenças Transmitidas por Alimentos em Januária-MG. **UNICIÊNCIAS**, v. 25, n. 2, p. 77–79, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.17921/1415-5141.2021v25n2p77-79>>. Acesso em: 01 set. 2024.

TAVECHIO, A. T. *et al.* Sorotipos de *Salmonella* isolados de fontes não humanas em São Paulo, Brasil, de 1996 a 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 6, p. 1041–1044, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.6.1041>>. Acesso em: 01 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Salmonella* (non-typhoidal). WHO, 20 fev. 2018. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Acesso em: 11 set. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization (WHO), 2015. Available at:

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Accessed: 15 set. 2024.

Capítulo 07

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-07

RESISTÊNCIA DE LARVAS DE PRIMEIRO ESTÁGIO (L1) DE *ANGIOSTRONGYLUS CANTONENSIS* EM FEZES DE *RATTUS* *NORVEGICUS* EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS, FRENTE A DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS

**Quéren Hapuque de Castro Novelli¹; Amanda de Oliveira Baccin²; Leyva Cecília
Vieira de Melo²**

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Epidemiológica - CPM – IAL; E-mail:
queren.hapu@gmail.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Enteroparasitas – CPM – IAL

Resumo: *Angiostrongylus cantonensis*, nematódeo causador da neuroangiostrongilíase, possui ciclo de vida heteroxeno complexo, envolvendo roedores como hospedeiros definitivos e diversas espécies de moluscos como hospedeiros intermediários e a expansão geográfica do parasito está diretamente relacionada à sua baixa especificidade em relação aos hospedeiros. Neste contexto, este estudo busca avaliar a resistência das larvas L1 de *A. cantonensis* em fezes de *Rattus norvegicus*, considerando diferentes tempos de exposição, temperaturas e níveis de umidade. O estudo foi conduzido utilizando três temperaturas: 4°C, temperatura ambiente, e 37°C, também foram estabelecidas condições distintas de umidade, sendo seco e úmido. Para tanto, as amostras foram expostas a essas condições em diferentes intervalos de tempo, o material foi processado pela técnica de Rugai para obtenção de larvas vivas e mortas, as quais foram contabilizadas separadamente. Como resultado, o número de larvas vivas recuperadas foi maior em 48 horas, a 4°C, na presença de umidade. No entanto foi possível recuperar larvas ainda vivas até o 21º dias, nessas condições. Desta forma, em experimentos controlados, foi possível constatar considerável resistência desta forma evolutiva do parasito fora do corpo de seu hospedeiro. Esse achado abre novas perspectivas para estudos futuros sobre a dinâmica do ciclo de vida do parasito em diferentes ambientes, especialmente em áreas urbanas.

Palavras-chave: *Angiostrongylus cantonensis*; estudos de viabilidade, infecções por nematoides

INTRODUÇÃO

O nematódeo *Angiostrongylus cantonensis*, pertencente a superfamília *Metastrongyloidea*, é conhecido como "verme do pulmão do rato" e é um patógeno zoonótico (Wang et al., 2008). Este parasito é o principal agente etiológico da neuroangiostrongilíase, uma condição amplamente associada à meningite eosinofílica no mundo (Re III e Gluckman, 2003). *A. cantonensis* possui ciclo de vida heteroxeno, envolvendo roedores como hospedeiros definitivos e diversas espécies de moluscos como hospedeiros intermediários (Mendonça, 2002).

Em seu ciclo, roedores ingerem larvas infectantes (L3), que migram para o sistema nervoso e, depois, para as artérias pulmonares, onde se tornam adultos e se reproduzem. As larvas (L1) são eliminadas nas fezes e infectam hospedeiros intermediários (Bolanos et al., 2020). Já em humanos, que são hospedeiros acidentais, a infecção ocorre principalmente

pela ingestão de hospedeiros intermediários e paratênicos crus ou mal cozidos (Cowie, 2013). Os sintomas comuns de *A. cantonensis* incluem cefaleia, rigidez de nuca, parestesia, náuseas, vômitos e febre. Em casos graves, ocorrem alterações motoras, digestivas e urinárias, podendo evoluir para diplopia, cegueira, ataxia, coma e morte, dependendo da localização das larvas e do dano neurológico (Pien e Pien, 1999).

O diagnóstico presuntivo de infecção por *A. cantonensis* baseia-se em critérios clínicos, como meningite, eosinofilia e histórico de exposição aos hospedeiros com a larvas infectantes. No entanto, o diagnóstico definitivo ocorre com a identificação de larvas ou a detecção de DNA do parasito no líquido (Ansdell et al., 2021), o que pode depender da carga parasitária adquirida ou estágio da doença. O tratamento e o diagnóstico da neuroangiostrongilíase são desafiadores, agravados pela rápida expansão global do parasito tendo casos na Ásia, Austrália, Américas, Europa e África (Pryor et al., 2003; Wang et al., 2008; Barrat et al., 2016; Morgan et al., 2021; Chan et al., 2024).

A expansão de *A. cantonensis* está ligada à sua baixa especificidade de hospedeiros, podendo infectar moluscos de mais de 50 famílias, tanto terrestres quanto de água doce, o que facilita sua disseminação. Sua adaptação a diversos ambientes e hospedeiros torna o controle mais desafiador, especialmente em áreas de alta interação entre humanos e hospedeiros (Kim et al., 2014; Bargues et al., 2023). Os principais hospedeiros definitivos do parasito são os roedores *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*, embora mais de 15 espécies de roedores também possam ser naturalmente infectadas e liberar larvas L1 nas fezes (Yong e Eamsobhana, 2013; Barratt et al., 2016).

Dada à ampla distribuição de hospedeiros intermediários e definitivos, é essencial investigar a resistência das larvas L1 no ambiente, pois esta parece ser a fase mais vulnerável do parasita. Durante essa etapa, fatores ambientais podem impactar de forma significativa a continuidade de seu ciclo de vida, tanto positiva quanto negativamente. Portanto, compreender os riscos de transmissão da doença em diferentes condições ambientais, como temperatura, umidade e tempo de permanência fora do hospedeiro, é crucial para o controle e desenvolvimento de estratégias eficazes no combate a essa parasitose.

Nesse sentido, analisar a resistência das larvas pode facilitar a prevenção de infecções e a elaboração de métodos de controle mais eficientes, permitindo a identificação de áreas de risco e grupos populacionais suscetíveis.

Assim, com o intuito de compreender a dinâmica das infecções em hospedeiros naturais, especialmente em ambientes urbanos, onde as variações de temperatura e umidade são mais imprevisíveis, este estudo tem como objetivo avaliar a resistência das larvas L1 de *A. cantonensis* em fezes de *R. norvegicus*, levando em conta diferentes tempos de exposição, temperaturas e níveis de umidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho está vinculado ao projeto “Infecção experimental de *Biomphalaria glabrata* por *A. cantonensis*: Aspectos histológicos e imunológicos da resposta de defesa no hospedeiro intermediário,” aprovado pelo CTC: CTC-IAL 30-P/2023, não necessitando de aprovação do Comitê de Ética, pois foram coletadas apenas as fezes de roedores utilizados no ciclo experimental, mantido no Núcleo de Enteroparasitas do IAL, para obtenção de antígenos e DNA para a realização dos diagnósticos imunológico e molecular de rotina.

Um total de 300 gramas de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais para a realização do estudo. Dez fragmentos fecais foram pesados individualmente

para calcular a média do peso. O material coletado foi homogeneizado, acondicionado em moldes de 1 g e modelado em três pequenos cíbalos, simulando o peso e formato naturais.

O material foi acondicionado em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, devidamente identificadas, com tampas perfuradas para ventilação. As amostras marcadas com “U” continham papel filtro para manter a umidade e foram mantidas em câmaras úmidas. Após o período de exposição de cada amostra, as fezes foram submetidas à técnica de Rugai, com adaptações, para a obtenção das larvas L1.

O material foi transferido para uma gaze com um palito de madeira e submergido em um tubo Falcon identificado, contendo 45 mL de água declorada, por duas horas em temperatura ambiente. Foram recolhidos 8 mL do sedimento com uma pipeta Pasteur e transferidos para outro tubo Falcon, que foi centrifugado por 5 minutos a 1.500 rotações por minuto. O sobrenadante foi removido, mantendo 1 mL do material no tubo. Em uma lâmina, foram pipetados 20 µL de água declorada e 20 µL do material homogeneizado, cobertos com uma lamínula. Usando um microscópio com aumento de 4x, foram contadas as larvas vivas e mortas em toda a lâmina, e os valores foram extrapolados para 1 mL e registrados em uma tabela para análise posterior.

Condições ambientais: O estudo foi realizado em três temperaturas: 4°C, temperatura ambiente (variando de 21 a 27°C) e 37°C. As condições de armazenamento foram classificadas da seguinte forma: “F” para material mantido na geladeira a 4°C; “A” para temperatura ambiente; e “Q” para material em estufa a 37°C. Condições distintas de umidade foram estabelecidas no estudo: a letra “S” representa o material mantido seco, enquanto “U” indica amostras mantidas úmidas, onde houve a adição de 2 mL de água declorada em papel filtro conforme a necessidade de cada amostra.. As amostras foram expostas às condições estabelecidas por diferentes intervalos de tempo, categorizados em zero (0), seis (1), 24 (2), 48 (3), 72 (4) e 96 horas (5), além de sete (6), 14 (7) e 21 dias (8). Esses intervalos foram numerados de zero a oito, respectivamente, para facilitar a identificação (Figura 1).

Figura 1 - Classificação das amostras.

tempo	4°C		25°C		37°C	
	seco	úmido	seco	úmido	seco	úmido
0h	0SF	0UF	0SA	0UA	0SQ	0UQ
6h	1SF	1UF	1SA	1UA	1SQ	1UQ
24h	2SF	2UF	2SA	2UA	2SQ	2UQ
48h	3SF	3UF	3SA	3UA	3SQ	3UQ
72h	4SF	4UF	4SA	4UA	4SQ	4UQ
96h	5SF	5UF	5SA	5UA	5SQ	5UQ
7d	6SF	6UF	6SA	6UA	6SQ	6UQ
14d	7SF	7UF	7SA	7UA	7SQ	7UQ
21d	8SF	8UF	8SA	8UA	8SQ	8UQ

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em amostras mantidas a 4°C sem umidade, a taxa de sobrevivência variou de 10% a 98%. Destacam-se as amostras 0SF, 1SF e 2SF, com 95%, 97% e 98% de larvas vivas, respectivamente, enquanto as amostras 5SF a 8SF tinham 100% de larvas mortas. Nas amostras com umidade, a taxa de sobrevivência foi mais alta, com várias amostras apresentando 100% de larvas vivas, como 0UF, 1UF, 3UF e 6UF. A menor taxa de sobrevivência em amostras com umidade foi 56% (amostra 8UF). A presença de umidade favoreceu a sobrevivência das larvas.

Em amostras mantidas à temperatura ambiente sem umidade, as taxas de sobrevivência variaram de 96% a 100% nas amostras 0SA a 2SA, com destaque para 1SA, que teve 100% de larvas vivas. A partir da amostra 3SA, todas as larvas estavam mortas. Nas amostras com umidade, a maioria teve sobrevivência entre 95% e 98%, como nas amostras 0UA (98%) e 1UA (99%). A sobrevivência caiu para 87% na amostra 5UA e 95% na 6UA, enquanto as amostras 7UA tinha 100% de larvas mortas e 8UA não houve recuperação de larvas.

Em amostras mantidas a 37°C sem umidade, as amostras 0SQ e 1SQ apresentaram taxas de sobrevivência de 97% e 95%, respectivamente. A partir da amostra 2SQ, todas as larvas estavam mortas. Nas amostras com umidade, as taxas de sobrevivência foram altas em 0UQ (98%) e 1UQ (100%). A amostra 2UQ teve uma queda para 74% de larvas vivas, enquanto as amostras 3UQ a 7UQ apresentaram 100% de mortalidade, sendo que 8UQ não houve recuperação de larvas.

Tabela 1 - Quantidade de larvas obtidas nas amostras

Tempo	4°C Seco (SF)		4°C Úmido (UF)		Ambiente Seco (SA)		Ambiente Úmido (UA)		37°C Seco (SQ)		37°C Úmido (UQ)	
	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas	Vivas	Mortas
0h	70(95%)	4(5%)	65(100%)	0(0%)	67(96%)	3(4%)	79(98%)	2(2%)	62(97%)	2(3%)	62(98%)	1(2%)
6h	125(97%)	4(3%)	97(100%)	0(0%)	45(100%)	0(0%)	78(99%)	1(1%)	62(95%)	3(5%)	33(100%)	0(0%)
24h	83(98%)	2(2%)	163(99%)	2(1%)	108(99%)	1(1%)	39(95%)	2(5%)	0(0%)	3(100%)	17(74%)	6(26%)
48h	14(78%)	4(22%)	34(100%)	0(0%)	0(0%)	5(100%)	59(95%)	3(5%)	0(0%)	8(100%)	0(0%)	4(100%)
72h	2(11%)	17(89%)	24(89%)	3(1%)	0(0%)	11(100%)	39(95%)	2(5%)	0(0%)	15(100%)	0(0%)	25(100%)
96h	0(0%)	25(100%)	25(96%)	1(4%)	0(0%)	2(100%)	26(87%)	4(13%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	9(100%)
7d	0(0%)	25(100%)	5(100%)	0(0%)	0(0%)	10(100%)	35(95%)	2(5%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	1(100%)
14d	0(0%)	6(100%)	12(92%)	1(8%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	2(100%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	1(100%)
21d	0(0%)	8(100%)	5(56%)	4(44%)	0(0%)	2(100%)	-	-	0(0%)	2(100%)	-	-
Total	294(70%)	95(30%)	430(98%)	11(2%)	220(86%)	35(14%)	355(95%)	18(5%)	124(73%)	46(27%)	112(70%)	47(30%)

Fonte: Elaborado pelos autores, 2024.

CONCLUSÕES

O índice de recuperação de larvas foi maior em 48 horas, a 4°C, na presença de umidade. No entanto foi possível recuperar larvas ainda vivas até o 21º dias, nessas condições. Desta forma, em experimentos controlados, foi possível constatar considerável resistência desta forma evolutiva do parasito fora do corpo de seu hospedeiro. Esse achado abre novas perspectivas para estudos futuros sobre a dinâmica do ciclo de vida do parasito em diferentes ambientes, especialmente em áreas urbanas.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Formador de Pessoal Para a Saúde – CEFOR/São Paulo, ao Centro de Parasitologia e Micologia e ao Núcleo de Enteroparasitas do IAL pela oportunidade de realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ANSDELL, V. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of neuroangiostrongyliasis: updated recommendations. *Parasitology*, v. 148, n. 2, p. 227–233, fev. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32729438/>. Acesso em: 15 de junho de 2024.

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. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27225800/>. Acesso em: 13 de outubro de 2024.

BOLANOS, Fernando et al. Abdominal angiostrongyliasis, report of two cases and analysis of published reports from Colombia. *Biomédica*, n. 40, 2020. Disponível em: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/5043>. Acesso em: 11 de junho de 2024.

CHAN, A. H. E. et al. Insights into the genetic diversity of *Angiostrongylus* spp. causing human angiostrongyliasis and implications for molecular identification and diagnosis. *Food and Waterborne Parasitology*, v. 35, p. e00230, jun. 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S240567662400012X>. Acesso em: 16 de agosto de 2024.

COWIE, R. H. Pathways for transmission of angiostrongyliasis and the risk of disease associated with them. *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health: a journal of Asia Pacific Medicine & Public Health*, v. 72, n. 6 Suppl 2, p. 70–74, 2013. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3689478/>. Acesso em: 11 de junho de 2024.

EAMSOBHANA, P.; LIM, P. E.; YONG, H. S. Genetic diversity of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, the major cause of eosinophilic meningitis. *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health: A Journal of Asia Pacific Medicine & Public Health*, v. 72, n. 6 Suppl 2, p. 15–17, jun. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23901375/>. Acesso em: 23 de julho de 2024.

HOWE, K. et al. Water transmission potential of *Angiostrongylus cantonensis*: Larval viability and effectiveness of rainwater catchment sediment filters. *PLOS ONE*, v. 14, n. 4, p. e0209813, 25 abr. 2019. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0209813>. Acesso em: 13 de outubro de 2024.

JAUME-RAMIS, S. et al. Potential intermediate hosts of *Angiostrongylus cantonensis* in the European Mediterranean region (Mallorca, Spain). *One Health (Amsterdam, Netherlands)*, v. 17, p. 100610, dez. 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10448469/>. Acesso em: 11 de junho de 2024.

KIM, J. R. et al. Diverse Gastropod Hosts of *Angiostrongylus cantonensis*, the Rat Lungworm, Globally and with a Focus on the Hawaiian Islands. PLoS ONE, v. 9, n. 5, p. e94969, 2 maio 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0094969#references>. Acesso em: 13 de julho de 2024.

MODRÝ, D. et al. Alternative pathways in *Angiostrongylus cantonensis* (Metastrongyloidea: Angiostrongylidae) transmission. Parasitology, v. 148, n. 2, p. 167–173, fev. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32981541/>. Acesso em: 13 de junho de 2024.

MOREIRA, Vera Lúcia Coimbra et al. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. Acta Tropica, v. 125, p. 90-97, jan. 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/11593>. Acesso em: 13 de junho de 2024.

MORGAN, E. R. et al. Angiostrongylosis in Animals and Humans in Europe. Pathogens, v. 10, n. 10, p. 1236, 25 set. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/10/1236>. Acesso em: 29 de junho de 2024.

PIEN, F. D.; PIEN, B. C. *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis. International Journal of Infectious Diseases, v. 3, n. 3, p. 161–163, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10460929/>. Acesso em: 19 de junho de 2024.

PRYOR, D. S. et al. First report of human angiostrongyliasis acquired in Sydney. Medical Journal of Australia, v. 179, n. 8, p. 430–431, out. 2003. Disponível em: <https://www.mja.com.au/journal/2003/179/8/first-report-human-angiostrongyliasis-acquired-sydney>. Acesso em: 19 de setembro de 2024.

RE, V. L.; GLUCKMAN, S. J. Eosinophilic meningitis. The American Journal of Medicine, v. 114, n. 3, p. 217–223, fev. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12637136/>. Acesso em: 26 jun. 2024.

WANG, Q.-P. et al. Human angiostrongyliasis. The Lancet Infectious Diseases, v. 8, n. 10, p. 621–630, out. 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1473309908702299?via%3Dihub>. Acesso em: 29 jul. 2024.

Capítulo 08

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-08

DETECÇÃO MOLECULAR DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE MAMÍFEROS SILVESTRES E SUAS IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA

Laís Ferreira Inácio¹; Vanessa Campos Paizan²; Luciana da Silva Ruiz Menezes³; Virgínia Bodelão Richini Pereira⁴

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública- NCBM– IAL- Bauru;
E-mail: lais.f.inacio@unesp.br

²Mestranda do Programa de Doenças Tropicais, FMB-UNESP-Botucatu; ³Pesquisador Científico VI e Diretor Técnico I, CLR II Bauru; ⁴Pesquisador Científico VI e Diretor Técnico de Saúde II, CLR II Bauru

Resumo: A saúde única engloba a saúde animal, humana e ambiental, tornando-se cada vez mais relevante diante do crescente contato entre humanos e animais e às mudanças ambientais. Nesse contexto, o estudo das zoonoses é crucial e emerge como um desafio global, com ferramentas moleculares e análise espacial contribuindo para a compreensão da epidemiologia das doenças de importância em saúde pública. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de micobactérias, agentes causadores de diversas doenças, em animais silvestres mortos por atropelamento em duas regiões brasileiras: Sul e Sudeste. Foram analisadas 43 amostras de pulmão, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, utilizando *primers* da região da sequência repetitiva IS6110 do gênero *Mycobacterium*. Foi possível a amplificação de sete amostras, sendo três de Botucatu-SP e quatro de Santa Catarina. As amostras positivas foram sequenciadas, confirmando ser do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), em *Cerdocyon thous*; *Leopardus tigrinus*; *Didelphis albiventris*; *Cavia* sp.; *Akodon montensis*; roedor sem identificação e *Oligoryzomys* sp., demonstrando que a tuberculose pode circular em diversas espécies, aumentando o risco de transmissão. Portanto, a identificação de micobactérias em diferentes espécies e regiões ressalta a importância de estudos epidemiológicos para melhor compreensão da doença, além de reforçar a importância de implementar medidas de prevenção e controle da tuberculose zoonótica.

Palavras-chave: Reação em Cadeia da Polimerase, Saúde Única e Zoonoses

INTRODUÇÃO

A saúde humana, animal e ambiental estão interligadas e, as doenças emergentes e zoonóticas evidenciam essa relação. Essas doenças representam uma ameaça à saúde pública, economia e segurança global (NARROD *et al.*, 2012; RUPASINGHE; CHOMEL; MARTÍNEZ-LÓPEZ, 2022;). Segundo a organização mundial da Saúde (OMS), mais de 60% dos patógenos humanos têm origem zoonótica, incluindo bactérias, vírus, fungos, helmintos e protozoários sendo, seu surgimento e distribuição influenciadas por diversos fatores, como mudanças climáticas, urbanização, migração, comércio, turismo, biologia de vetores, além de fatores naturais e antropogênicos (KARESH, 2012).

O aumento do contato entre humanos e outras espécies, somados a mudanças no uso da terra e intensificação da agricultura, facilita a emergência de novas doenças em escala global. Isso ressalta a importância da abordagem de Saúde única para prevenção e controle de zoonoses (RUPASINGHE; CHOMEL; MARTÍNEZ-LÓPEZ, 2022). Dentre as zoonoses, aquelas causadas por micobactérias são especialmente relevantes.

As micobactérias são pertencentes à família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium* com mais de 180 espécies com características diversas (GUPTA; LO; SON, 2018). Há três grupos principais: o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis*, além das micobactérias não tuberculosas (MNT) (HAN *et al.*, 2008; JAGIELSKI *et al.*, 2016). MTBC inclui agentes causadores da tuberculose, como *M. tuberculosis*, responsável pela tuberculose humana, além de diversas espécies adaptadas a diferentes hospedeiros como *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium caprae*, causadores da tuberculose zoonótica que pode infectar humanos especialmente por meio do consumo de leite contaminado, destacando a interconexão entre saúde humana, animal e ambiental (GHIELMETTI *et al.*, 2021; MATOS *et al.*, 2016; CARNEIRO *et al.*, 2022).

A análise de animais atropelados é uma ferramenta valiosa para compreender a epidemiologia desses microrganismos, além de, contribuir para a conservação da fauna silvestre, uma vez que, é uma abordagem menos invasiva que permite utilizar técnicas moleculares para a detecção de patógenos (RICHINI-PEREIRA *et al.*, 2008; COBAMALES *et al.*, 2023), oferecendo informações relevantes para saúde pública visto que, fornece dados sobre a diversidade de patógenos presente na fauna silvestre brasileira.

Com base nisso, a vigilância epidemiológica é essencial para prevenir e controlar doenças somadas à epidemiologia espacial, que analisa a distribuição geográfica e os fatores que influenciam a disseminação das doenças (ELLIOTT; WARTENBERG, 2004).

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi analisar amostras de animais atropelados em Botucatu - SP e diversos municípios de Santa Catarina, utilizando biologia molecular na identificação de micobactérias do complexo tuberculose (MTCB), sendo extremamente relevante para o controle da tuberculose zoonótica. Além disso, investigar interações ecoepidemiológicas que podem auxiliar na compreensão da transmissão e distribuição das doenças, permitindo a implementação de medidas de controle mais eficazes e informando políticas públicas voltadas à saúde e manejo da fauna nas regiões estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 43 amostras de pulmão de diferentes espécies de animais silvestres coletadas no período de 2009 à 2012 em Botucatu - SP e de diversos municípios catarinenses (Blumenau, Dr. Pedrinho, Gaspar, Indaial, Navegantes, Águas de Chapecó, Chapecó, Itapoá) que estão de acordo com a Instrução normativa nº119, de 11 de outubro de 2006, Capítulo VI, Art. 26 do IBAMA. O projeto foi aprovado pelo Conselho Técnico Científico (CTC) do Instituto Adolfo Lutz (CTC-IAL 42-P/2023).

As amostras foram maceradas e, em seguida submetidas a extração do material genético utilizando o kit Illustra tissue & cells genomic Prep Mini Spin (Cytiva, USA), conforme instruções do fabricante. Após, foram quantificadas em espectrofotômetro (Epoch-Biotek, USA) a fim de verificar a qualidade das amostras. A análise do DNA foi realizada pela Reação em cadeia da polimerase (PCR) e, para avaliar a qualidade endógena, foi amplificada uma região conservada do gene β -globulina (DNA nuclear) de vertebrados que resulta em um produto de 140 pares de bases (pb) com o uso dos *primers*: β -1 (5'-ACCACCAACTTCATCCACGTTTAC-3') e β -2 (5'-

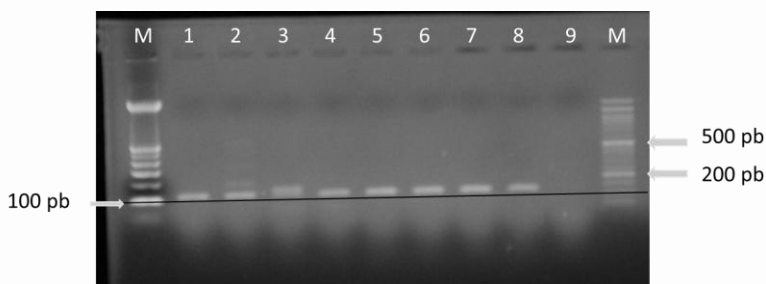
CTTCTGACACAACCTGTGTTCCTAGC-3'), ou com o uso do gene gliceraldeído 3-fosfato, com os *primers* GAPDH-4F (5'-AGGCTGAGAACGGGAACTT-3') e GAPDH-4R (5'-ATTAAGTTGGGGCAGGGACT-3'), que amplificam um produto de 911pb. Já para detecção de micobactérias foram utilizados *primers* da sequência repetitiva IS6110, IS6110-F (5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3') e IS6110-R (5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3'), resultando em um produto de 123 pb.

As amostras amplificadas foram purificadas com 4 µl da enzima ExoSap (GE) - USB ExoSap-IT® (USB Affymetrix, USA) e 10µl do produto da PCR, conforme instruções do fabricante. Após esse procedimento as amostras foram sequenciadas pelo método Sanger no Instituto de Biotecnologia (IBTEC-UNESP - Botucatu), como serviço de terceiros. As sequências obtidas foram visualizadas no *software* Chromas 2.6.6, alinhadas no programa MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (KUMAR *et al.*, 2018) e, comparadas com as sequências presentes no banco de dados NCBI via Blastn. Para os estudos ecoepidemiológicos, as informações de georreferenciamento foram coletadas via localização GPS (Sistema de Posicionamento Global).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo analisou 43 amostras de pulmão de animais silvestres mortos por atropelamentos no período de 2009 a 2012, sendo 20 da região de Botucatu - SP e 23 da região de Santa Catarina (Blumenau, Dr. Pedrinho, Gaspar, Indaial, Navegantes, Águas de Chapecó, Chapecó, Itapoá). Foi realizada a quantificação do material genético e a análise de genes constitutivos de mamíferos para validar a técnica e assegurar a confiabilidade dos resultados, passando pela análise molecular para detecção do gênero *Mycobacterium*, obtendo-se, sete animais foram positivos, como demonstrado na Figura 1.

Figura 1- Gel de agarose a 1,5% utilizando os *primers* *Mycobacterium* IS6110 F e R de 123 pb.



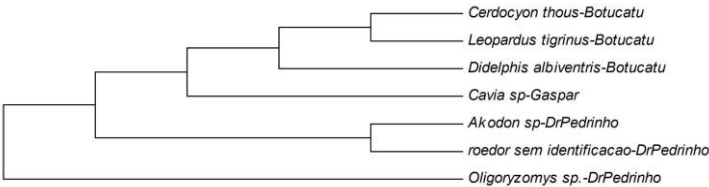
Legenda: M - DNA Ladder 100pb; 1 - *C. thous*; 2 - *L. tigrinus*; 3 - *D. albiventris*; 4 - *Cavia* sp.; 5 - *A. montensis*; 6 - roedor sem identificação;; 7 - *Oligoryzomys* sp.; 8 - DNA positivo utilizando cepa de MTBC; 9 - controle negativo; M- DNA Ladder 50pb. **Fonte:** Elaborada pela autora (2024)

A detecção de *Mycobacterium* em diferentes regiões do Brasil, como Sul e Sudeste destaca a influência de fatores ecoepidemiológicos na dispersão dessas bactérias (VERA *et al.*, 2020; CONCEIÇÃO *et al.*, 2021). Embora a tuberculose humana causada por *Mycobacterium tuberculosis* seja priorizada, a tuberculose zoonótica torna-se uma preocupação importante e reemergente em saúde pública (COUTO *et al.*, 2022). O presente trabalho confirmou, por meio do sequenciamento, a presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em diversas espécies (Figura 2), sendo a porcentagem de identificação observada na tabela 1, sugerindo que estratégias de controle e vigilância devem incluir a fauna silvestre na prevenção e manejo da doença.

Portanto, das 43 amostras analisadas 16,28% (7 amostras) foram positivas para micobactérias, destas, três eram da região de Botucatu-SP e, quatro do Médio Vale do Itajaí e

Oeste de Santa Catarina. O DNA de *Mycobacterium* spp. foi detectado em 20% (1/5) das amostras de *Cercyon thous* (cachorro-do-mato) de Botucatu - SP. Em um estudo anterior, não foi encontrado *M. leprae* em animais atropelados nesta espécie (PEDRINI *et al.*, 2010). Porém, outros estudos identificaram *M. bovis* em canídeos silvestres atropelados (MATOS *et al.*, 2016). O DNA também foi encontrado no único exemplar de *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato) e em 14,28% (1/7) das amostras de *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca), corroborando com achados de Abdala e colaboradores (2015). Além desses animais, o DNA de *Mycobacterium* foi identificado em roedores como *Cavia* sp. (preá), *Akodon montensis* (rato-do-mato), *Oligoryzomys* sp. (rato) e roedor sem identificação, embora esses roedores sejam considerados reservatórios de patógenos zoonóticos, há poucos trabalhos da presença de micobactérias naturalmente nessas espécies (ABDALA *et al.*, 2015; VALOIS *et al.*, 2024)

Figura 2: Árvore genética com a análise evolutiva inferida usando o método Neighbor-Joining, de amostras sequenciadas para *Mycobacterium* sp. em animais silvestres mortos por atropelamento.



Fonte:Elaborado pela autora, utilizando o MEGA X (2024)

Tabela 1 - Porcentagem de identidade de *Mycobacterium* nas amostras sequenciadas

Espécie	Município	% identidade	Acesso GenBank
<i>Cercyon thous</i>	Botucatu-SP	98,37%	CP069065.1*/CP096840.1+
<i>Leopardus tigrinus</i>	Botucatu-SP	100,00%	CP069065.1*/CP096840.1+
<i>Didelphis albiventris</i>	Botucatu-SP	95,89%	CP041872.1*/CP096848.1+
<i>Cavia</i> sp.	Gaspar-SC	98,68%	CP018302.1*/CP008744.1+
<i>Akodon serrensis</i>	Dr.Pedrinho-SC	99,20%	CP018302.1*/CP008744.1+
Roedor sem identificação	Dr. Pedrinho-SC	94,51%	CP130809.1*
<i>Oligoryzomys</i> sp.	Águas do Chapecó-SC	97,60%	CP018302.1*/CP008744.1+

Legenda: **M. tuberculosis*; *M. bovis* + **Fonte:** Elaborada pela autora (2024)

Diversos trabalhos identificaram *Mycobacterium* em animais silvestres pelo mundo (AKHTAR *et al.*, 2023), sendo a presença de *M. tuberculosis* em animais silvestres em cativeiro comum, devido ao contato frequente com humanos, levando a preocupações sobre zoonose reversa (LOPES *et al.*, 2021; ZACHARIAH *et al.*, 2017). Logo, a detecção de MTBC ressalta a interconexão entre humanos, animais silvestres e o meio ambiente enfatizando a necessidade de uma abordagem de saúde única (COUTO *et al.*, 2022). Além disso, o presente estudo contribui para a vigilância epidemiológica da tuberculose e destaca o potencial de usar animais silvestres atropelados para monitorar a circulação de patógenos, fornecendo uma alternativa para investigar a distribuição de doenças infecciosas.

CONCLUSÕES

O presente estudo identificou a presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) em amostras de animais silvestres atropelados em Santa Catarina e São Paulo, indicando a presença de patógenos na fauna brasileira. Além disso, ressalta a importância da

utilização de ferramentas moleculares e de georreferenciamento nos estudos epidemiológicos, contribuindo significativamente para a saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Keila Zaniboni Siqueira Batista e Sérgio Luiz Althoff, da FURB Blumenau, pelo fornecimento do material biológico de Santa Catarina para a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABDALA, A. A. et al. [Mycobacterium bovis in wildlife of the dairy regions of Santa Fe (Argentina)]. **Revista Argentina De Microbiologia**, v. 47, n. 3, p. 174–182, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.04.005> .Access in: 29 ago. 2024
- AKHTAR, K. et al. Molecular identification and infection pathology of Mycobacterium spp. in captive wild animals in Pakistan. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 17, n. 8, p. 1107–1113, 31 ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3855/jidc.17287> .Access in: 29 ago. 2024
- ALVES-PALMEIRA, A. R. DE O. Análise espacial e detecção molecular de Leishmania spp. e Trypanosoma spp. em animais silvestres mortos por atropelamento no estado de Santa Catarina, Brasil. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/153292> .Access in: 29 ago. 2024
- CARNEIRO, P. A. M. et al. Milk Contamination by Mycobacterium tuberculosis Complex, Implications for Public Health in Amazonas, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 85, n. 11, p. 1667–1673, 1 nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/JFP-21-303> Access in: 29 ago. 2024
- COBA-MALES, M. A. et al. From roads to biobanks: Roadkill animals as a valuable source of genetic data. **PLOS ONE**, v. 18, n. 12, p. e0290836, 7 dez. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290836> . Access in: 10 set. 2024
- CONCEIÇÃO, E. C., et al., Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Brazil before the whole genome sequencing era: a literature review. **Memórias do Instituto Oswaldi Cruz**, v. 116, e200517, Mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760200517> . Access in: 28 ago. 2024
- COUTO, R. M, et al., One Health and surveillance of zoonotic tuberculosis in selected low-income, middle-income and high-income countries: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 6, e0010428. 6 jun. 2022 Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010428> . Access in: 15 set. 2024
- ELLIOTT, P., WARTENBERG, D. Spatial epidemiology: current approaches and future challenges. **Environmental Health Perspectives**. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1289/ehp.6735> . Access in: 28 ago. 2024
- GHIEMMETTI, G. et al. Mycobacterium microti Infections in Free-Ranging Red Deer (Cervus elaphus). **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 8, p. 2025–2032, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2708.210634> .Access in: 20 ago. 2024
- GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus Mycobacterium into an Emended Genus Mycobacterium and Four Novel Genera. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 13 fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067> . Access in: 20 ago. 2024
- HAN, X. Y. et al. A New Mycobacterium Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 6, p. 856–864, 1 dez. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1309/AJCPP72FJZZRRVMM> . Access in: 20 ago. 2024

- JAGIELSKI, T. et al. Methodological and Clinical Aspects of the Molecular Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis and Other Mycobacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 239–290, abr. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00055-15>. Access in: 25 ago. 2024
- KARESH, William B. et al. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. **The Lancet**, v. 380, n. 9857, p. 1936–1945, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(12\)61678-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(12)61678-x). Access in: 25 ago. 2024
- KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol**. 2018 Jun 1;35(6):1547-1549. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>. Access in: 23 ago. 2024
- LOPES, B. C. et al. Molecular identification of Mycobacterium spp. isolated from Brazilian wild boars. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 1, p. 1025–1031, 1 jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06118-7>. Access in: 23 ago. 2024
- LOSNAK, D. O. et al. Molecular detection of fungi of public health importance in wild animals from Southern Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 455–463, jul. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.12767>. Access in: 23 ago. 2024
- MATOS, A.C., et. al, New insights into Mycobacterium bovis prevalence in wild mammals in Portugal. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.63, p. 5, e313-e322. 7 dec. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.12306>. Access in: 23 ago. 2024
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tuberculose**. Disponível em: <<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiaWY0YTk1MTMtNWU1ZWU0YUQzLWU1MmItNDg2Mi1hMzZmLTg0ZDg1MWU1YzZmNSJ9>> Access in: 23 out. 2024
- NARROD, C.; ZINSSTAG, J.; TIONGCO, M. A one health framework for estimating the economic costs of zoonotic diseases on society. **EcoHealth**, v. 9, p. 150-162, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10393-012-0747-9>. Access in: 23 ago. 2024
- PEDRINI, S. C. B. et al. Search for Mycobacterium leprae in wild mammals. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 47–53, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702010000100010>. Access in: 10 out. 2024
- RICHINI-PEREIRA, V. B. et al. Molecular detection of Paracoccidioides brasiliensis in road-killed wild animals. **Medical Mycology**, v. 46, n. 1, p. 35–40, 1 fev. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13693780701553002>. Access in: 10 out. 2024
- RUPASINGHE, R.; CHOMEL, B. B.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, B. Climate change and zoonoses: A review of the current status, knowledge gaps, and future trends. **Acta Tropica**, v. 226, p. 106225, 1 fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106225>. Access in: 8 out. 2024
- VALOIS, E.M.S, et. al., Molecular and spatial evaluation of small rodents and Didelphimorphis infected with Mycobacterium leprae in the southern Amazon, Brazil. **Zoonoses and public health**, v. 71, p. 736-743. Sep. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/zph.13160> Access in: 20 out. 2024
- VERA, M., et al., Genomic epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Santa catarina, Southern Brazil. **Scientific reports**. v. 10, 128971, 30 jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69755-9>. Access in 15 out. 2024
- ZACHARIAH, A. et al. Mycobacterium tuberculosis in Wild Asian Elephants, Southern India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 504–506, mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2303.161741>. Access in: 15 out. 2024

Zoonoses. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>>.
Acesso em: 8 ago. 2024.

Capítulo 09

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-09

DESFECHOS VIRO LÓGICOS E IMUNOLÓGICOS APÓS 10 ANOS DA GENOTIPAGEM REALIZADA ENTRE 2011 E 2014 EM CRIANÇAS DE 5 A 15 ANOS VIVENDO COM HIV EM SÃO PAULO.

Giovanna Jackelyne Bernardo dos Santos¹; Luís Fernando de Macedo Brígido²

¹Aluno do Curso de Especialização, Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, jackelynebernardo@gmail.com

²Pesquisador Científico, Diretor Técnico, Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, lubrigido@gmail.com

Resumo: Crianças vivendo com HIV enfrentam desafios significativos devido à dependência de cuidadores para um tratamento adequado, à progressão acelerada da doença e à necessidade de adaptações nos antirretrovirais (ARV) para essa faixa etária. Este estudo teve como objetivo analisar os desfechos virológicos e imunológicos de crianças que fizeram teste de genotipagem no Instituto Adolfo Lutz entre 2011 e 2014 após uma década. A pesquisa incluiu 84 crianças e adolescentes, cujas sequências genéticas foram analisadas pela plataforma HIV Drug Resistance Database em conjunto com dados disponíveis no banco de dados do laboratório. A evolução da carga viral (CV) e a contagem de células TCD4⁺ foram avaliadas a partir de exames realizados recentemente, e comparados com os dados iniciais. Das 84 crianças virêmicas na época do teste, 36% (30/84) apresentaram supressão viral no último teste, com 47% (27/58) dos que realizaram teste de CV no último ano suprimidos. Metade apresenta uma contagem de TCD4⁺ superior a 500 céls/mm³, contudo 64% tiveram redução nesse número. A presença de resistência foi associada a menores taxas de supressão ($p=0,005$), e 65% mostraram resistência a pelo menos duas das três classes de ARV analisadas, evidenciando um desafio persistente. Os achados ressaltam a necessidade de aprimorar o regime terapêutico para melhorar o controle virológico e imunológico, bem como a importância de políticas públicas voltadas para a prevenção da transmissão vertical do HIV e a ampliação do acesso a opções terapêuticas adaptadas para crianças, visando superar as barreiras do tratamento e melhorar os desfechos clínicos dessa população vulnerável.

Palavras-chave: AIDS; crianças; genotipagem do HIV; HIV

INTRODUÇÃO

Em 1981, foram identificados os primeiros casos de AIDS entre homens que faziam sexo com homens, marcados por doenças oportunistas como sarcoma de Kaposi e candidíase oral, inicialmente atribuídas ao citomegalovírus. Posteriormente, determinou-se que a condição era causada pelo Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), identificado entre 1983 e 1984 (GOTTlieb et al., 1981; DE COCK; JAFFE; CURRAN, 2021). Apesar disso, os primeiros tratamentos só surgiram após uma década (FAUCI; EISINGER, 2018). A propagação assintomática do vírus permitiu que milhões fossem infectados antes do reconhecimento da doença (DE COCK; JAFFE; CURRAN, 2021). O HIV é um retrovírus

de RNA com cerca de 9 kb, contendo genes estruturais (gag, pol, env), reguladores (Tat, Rev) e acessórios (Vpu, Vpr, Vif, Nef), que auxiliam na replicação e evasão imunológica (GREENE, 2007; LIU et al., 2019). Ele infecta células TCD4⁺ ao integrar seu DNA à cromatina do hospedeiro, criando reservatórios virais latentes que dificultam a erradicação do vírus (ENGELMAN; ENGELMAN, 2021). Desde o início da pandemia, o HIV causou mais de 40,4 milhões de mortes entre os 85,6 milhões de infectados. Em 2022, havia 39 milhões de pessoas vivendo com HIV, incluindo 1,3 milhão de novos casos, sendo que 76,41% estavam em TARV (UNAIDS, 2022). Na África, a epidemia atingiu níveis alarmantes, com mais de 30 milhões de infectados em 2003, incluindo três milhões de crianças, e em alguns países, um terço da população adulta era soropositiva (“Fact Sheet: The President’s Emergency Plan for AIDS Relief”, 2003). No Brasil, mais de um milhão de casos foram registrados até junho de 2023, incluindo 18.327 crianças menores de 5 anos. Houve uma redução de 14,7% nos novos casos totais e de 52,6% em crianças entre 2011 e 2022 (BRASIL, 2024). A transmissão vertical, principal via de infecção infantil, pode ocorrer durante a gestação, parto ou amamentação, com riscos que variam de 5% a 20% dependendo da fase e do uso de TARV (CARDENAS et al., 2023; YANG; CAMBOU; NIELSEN-SAINES, 2023). Cesárea eletiva e a abstenção do aleitamento em locais com acesso a água potável reduzem significativamente os riscos (NDUATI R, 2000). Sem TARV, a mortalidade infantil por infecção perinatal ultrapassa 50% antes dos dois anos. A TARV precoce aumenta a sobrevida e melhora os desfechos clínicos, mas não elimina os reservatórios virais, exigindo um tratamento vitalício. Além disso, a adesão ao tratamento em crianças e adolescentes é desafiadora e a exposição prolongada ao vírus pode levar a comorbidades e falhas virológicas (BERENDAM et al., 2020). Estudos mostram alta prevalência de resistência a antirretrovirais, especialmente aos ITRNN e ITRN, com mutações comuns como M184V, M41L e T215Y (ITRN), K103N e G190A (ITRNN), e 154V e V82A (IP) (Arrais et al., 2021). O esquema terapêutico inicial recomendado inclui dois Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos (ITRN) e um terceiro medicamento, sendo da classe dos Inibidores da Integrase (INI) ou Inibidores de Protease (IP), dependendo da faixa etária do paciente (BRASIL, 2023). Este estudo analisa a resistência aos antirretrovirais, além de desfechos virológicos e imunológicos em crianças e adolescentes, considerando as dificuldades de adesão à TARV e a necessidade de ampliar as opções terapêuticas para melhorar a eficácia do tratamento em populações pediátricas.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo analisou amostras de crianças entre 5 e 15 anos de idade vivendo com HIV, residentes do Estado de São Paulo, que foram encaminhadas ao Laboratório de Retrovírus do Instituto Adolfo Lutz para teste de genotipagem por falha virológica ou pré-tratamento. Foram selecionadas sequências genéticas de amostras coletadas entre 2011 e 2014, excluindo pacientes sem genotipagem realizada e aqueles com dados insuficientes para análise. A quantificação da viremia plasmática foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com resultados expressos em cópias/mL e escala logarítmica, utilizando um sistema fechado e automatizado da Abbott. A extração do RNA viral para genotipagem foi realizada com o kit QIAmp Viral RNA Mini Qiagen, e a amplificação foi feita por One Step RT-PCR, confirmada por eletroforese em gel e sequenciada pelo método de Sanger, com análise dos cromatogramas no RECall (V2.32). A susceptibilidade aos antirretrovirais (ARV) foi avaliada com o algoritmo da Stanford HIV Drug Resistance Database (<https://hivdb.stanford.edu/>), que indicou mutações e gerou escores de resistência aos

medicamentos. A análise estatística foi conduzida no software STATA® (versão 14.0), utilizando análises descritivas, testes qui-quadrado para variáveis categóricas e testes t de Student ou Mann-Whitney para variáveis contínuas. Os dados de Carga viral e Contagem de células TCD4⁺ foram avaliados a partir de dados do Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4⁺/CD8⁺ e Carga Viral (SISCEL).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os anos de 2011 até 2014, 3625 pacientes tiveram amostra analisada no Laboratório de Retrovírus do Instituto Adolfo Lutz para a realização do exame de genotipagem, sendo 129 crianças e adolescentes com idades entre 5 e 15 anos de idade. Destas 129, apenas 84 de fato fizeram genotipagem e possuem os dados necessários para a realização da pesquisa. A média de idade dos pacientes foi de 12 anos (IQ 11–14) e, o grupo possui a mesma quantidade de pessoas do sexo masculino e feminino. Excetuando-se os 15 pacientes pré-tratamento, os demais já estavam em tratamento há 8 anos em média, com mediana entre 2 e 11 anos; o subtipo viral predominante foi o subtipo B. A média dos valores de CV foi de 3,74 (2,86 – 4,53) log¹⁰ e a média da contagem de células TCD4⁺ foi 509 (326 – 742) céls/mm³. As mutações principais mais frequentes foram V82 (37%), I54 (37%), M46 (31%), e L90 (14%) que estão ligadas à redução da susceptibilidade aos IPs usados na clínica. No entanto, mutações isoladas geralmente causam apenas uma leve redução na susceptibilidade, exceto por algumas, como D30N, I47A, G48V e I50L/V. Assim, para superar a barreira genética dessa classe de medicamentos, são necessárias múltiplas mutações (SVICHER et al., 2005). Mais da metade dos pacientes do estudo ainda apresentava sensibilidade aos medicamentos desta classe, isso se explica devido à alta barreira genética dos IPs (AOKI et al., 2018). As mutações principais mais frequentes para esta classe são a M184 (54%), T215 (50%), M41 (40%) e D67 (44%), que foram significativamente associadas à diminuição da suscetibilidade a um ou mais ITRNs (MELIKIAN et al., 2012). Na classe dos ITRNs, há um maior número de pacientes com alta resistência. Os medicamentos desta classe foram os primeiros medicamentos ARV a serem aprovados para o tratamento do HIV, sendo a Zidovudina (AZT) o primeiro medicamento, portanto, mutações de resistência associadas ao uso desta classe predominam no Brasil e no mundo. A mutação M184V é uma mutação principal associada a um alto nível de resistência à Lamivudina (3TC), o que explica a grande quantidade de pessoas com essa resistência (39/70) (WHITCOMB et al., 2003; Moura, 2014). A mutação predominante nesse grupo para os Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos (ITRNN) é a K103 (52%), G190 (22%), K101 (17%) e P225 (15%), que de acordo com estudos, foi a mutação de resistência ITRNN mais frequentemente observada em amostras de pacientes expostos ao Efavirenz (EFV) e que apresentaram um rebote significativo na carga viral. Essa mutação foi detectada em mais de 90% dos casos de falha no tratamento com EFV (BACHELER et al., 2000). O alto índice dessa mutação no presente estudo pode ser explicado pelo fato de que 44% do grupo estudado foi exposto ao EFV. A K103N é uma mutação de resistência selecionada em pessoas que recebem Nevirapina (NVP) e EFV. Ela reduz a suscetibilidade a NVP e EFV em cerca de 50 e 20 vezes, respectivamente (HIV drug resistance database, 2024), o que explica a alta resistência a esses medicamentos (33/46). Vale destacar que esta foi a mutação mais frequente na população avaliada no presente estudo. As mutações identificadas em pacientes pré tratamento foram: para IP, M36I; para ITRN, E44D, M184V, T215Y/F, S68G

e M41L; e para ITRNN, K103N, Y181C, E138A, Y188L e V106I. Essas mutações foram observadas em 5 dos pacientes pré tratamento, que indicam que essas mutações foram transmitidas ou representam polimorfismo do vírus, o que não é incomum, como por exemplo a mutação E138A que é uma mutação polimórfica que acontece em 2% a 5% dos pacientes naives (HIV drug resistance database, 2024). A tabela a seguir apresenta a faixa de carga viral e de células TCD4⁺ atuais dos pacientes, visando apresentar se houve ou não melhora desses pacientes.

Tabela 1 – Faixa de CV e TCD4⁺ na última observação

	Todos	Pré Tratamento	Tratados	Em acompanhamento*
n	84 (100)	15 (100)	69 (100)	58 (100)
CV <Lim. Min. (log<1.3)	30 (36)	8 (53)	22 (32)	27 (47)
CV baixa (log 1.3 - 3)	20 (24)	2 (13)	18 (26)	12 (21)
Virêmicos (log>3)	34 (40)	5 (33)	29 (42)	19 (33)
TCD4⁺ Entrada (80)	500 (326,5 – 742)	512 (274 – 593)	506 (332 – 783)	549 (381 – 805,5)
TCD4⁺ atual	474 (158 – 817)	585 (258 – 973)	422 (154 – 790)	608,5 (243 – 862)
TCD4⁺ delta (80)	-99 (-304,5 – 219,5)	1 (-256 – 515)	-170 (-315 – 161)	-83,5 (304,5 – 297)

*inclui apenas aqueles com dados de retirada de medicação e testes de CV no último ano (set/23 a set/24).

Fonte: Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais - Centro de Virologia – IAL, 2024

A Tabela 1 apresenta os dados de supressão viral e contagem de células TCD4⁺ dos 84 pacientes analisados. Podemos evidenciar que atualmente 36% dos pacientes possuem carga viral suprimida, enquanto 50% apresentam uma contagem de células T CD4⁺ acima de 500 céls/mm³. Em comparação com os dados de entrada no estudo, onde nenhum paciente havia atingido a supressão viral, isso demonstra progresso no controle da infecção. No entanto, a contagem de TCD4⁺ se manteve estável ao longo do tempo, com 51% (41/80) dos pacientes já com >500 céls/mm³ na entrada. Entre aqueles que realizaram exames recentemente, 47% (27/58) apresentam supressão viral, e 57% (33/58) apresentam uma contagem de TCD4⁺ satisfatória, mostrando que, apesar de avanços no tratamento, ainda há uma parcela significativa de pacientes sem supressão viral adequada. Já nos pacientes que deram entrada pré - tratamento, mais da metade atingiram a supressão viral e conseguiram manter a contagem de células TCD4⁺. Mas esses valores ainda estão bem menores que a meta 95-95-95 da UNAIDS que visa acabar com a pandemia do HIV ao estabelecer que 95% das pessoas vivendo com HIV (PVHIV) saibam de sua condição, 95% das PVHIV diagnosticadas estejam em TARV e 95% das pessoas em tratamento alcancem supressão viral (Brasil, 2023). No Brasil, os índices atingidos são de 91%-81%-95%, respectivamente (UNAIDS, 2023). Dos 30 pacientes suprimidos, (37%) não possui resistência a nenhuma classe, enquanto dos 54 pacientes não suprimidos, 89% tem 2 ou mais mutações de

resistência, o que mostra uma relação entre a presença de mutações e a supressão viral ($p=0,005$).

CONCLUSÕES

De acordo com o nosso estudo, podemos concluir que dos 15 pacientes pré-tratamento, 5 (33%) têm alguma mutação do vírus HIV, o que indica que há um índice de transmissão de DRM ou polimorfismos. Contudo, entre os pacientes previamente tratados, 90% apresentou resistência a múltiplas classes de medicamentos, especialmente aos ITRNs e ITRNNs, com mutações como M184 e K103 altamente prevalentes, o que reflete o uso prolongado dessas classes de fármacos no tratamento inicial do HIV. No caso dos IPs, embora muitos pacientes ainda apresentem susceptibilidade a esses medicamentos, a presença de mutações como V82 e I54, além da necessidade de acúmulo de mutações para o desenvolvimento de resistência significativa, ressalta a importância da escolha criteriosa de terapias combinadas para evitar a perda de eficácia dessa classe. Além disso, os dados de supressão viral e contagem de células TCD4⁺ mostram que apenas 36% dos pacientes estão atualmente suprimidos e 50% possuem valores de TCD4⁺ que sugerem um estado imunológico adequado, embora uma parte significativa continue sem atingir os parâmetros desejados. Esses achados sublinham a importância de monitorar e ajustar continuamente os tratamentos, bem como de desenvolver novas abordagens terapêuticas para combater a resistência em longo prazo. Sendo assim, é importante que se invista mais em políticas públicas que ofereçam informações claras e acessíveis às gestantes vivendo com HIV sobre como prevenir a transmissão vertical. Essas políticas devem incluir a orientação sobre o uso de fórmulas infantis como alternativa à amamentação. Paralelamente, é essencial expandir a oferta e os meios de favorecer a utilização de antirretrovirais (ARV) para crianças, com foco em fórmulas farmacêuticas que facilitem a aceitação e, consequentemente, melhorem a adesão ao tratamento. Apesar dos avanços, ainda são necessárias mais pesquisas para entender melhor o HIV em crianças e aperfeiçoar as estratégias de prevenção e tratamento, promovendo melhores desfechos de saúde para essa população vulnerável.

REFERÊNCIAS

AOKI, M. et al. Mechanism of Darunavir (DRV)'s high genetic barrier to HIV-1 resistance: A key V32I substitution in protease rarely occurs, but once it occurs, it predisposes HIV-1 to develop DRV resistance. **mBio**, v. 9, n. 2, 2018.

ARRAIS, Claudia R. de Andrade et al. HIV-1 subtypes and drug resistance in children during antiretroviral therapy in Brazil. **Journal Of Medical Virology**, [s. l.], 31 mar. 2021. DOI <https://doi.org/10.1002/jmv.26988>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.26988#>. Acesso em: 19 nov. 2024.

BACHELER, L. T. et al. Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing efavirenz combination therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2475–2484, 2000.

BERENDAM, S. J. et al. Pediatric HIV: The potential of immune therapeutics to achieve viral remission and functional cure. **Current HIV/AIDS reports**, v. 17, n. 3, p. 237–248, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Manejo da Infecção pelo HIV em Crianças e Adolescentes Módulo 2: Diagnóstico, manejo e tratamento de crianças e adolescentes vivendo com HIV**. Disponível em: <https://bit.ly/3VC85xD>. Acesso em: 01 out. 2024

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico HIV/Aids 2023**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: < <https://bit.ly/3ZAV6x8> >. Acesso em: 21 nov. 2024.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DEPARTAMENTO DE HIV, AIDS, TUBERCULOSE, HEPATITES VIRAIS E INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS. Indicadores e dados básicos do HIV e AIDS nos municípios brasileiros. Disponível em: < <https://indicadores.aids.gov.br/> >. Acesso em: 27 set. 2024a

CARDENAS, M. C. et al. Prevention of the vertical transmission of HIV; A recap of the journey so far. **Viruses**, v. 15, n. 4, p. 849, 2023.

DE COCK, K. M.; JAFFE, H. W.; CURRAN, J. W. Reflections on 40 years of AIDS. **Emerging infectious diseases**, v. 27, n. 6, p. 1553–1560, 2021.

ENGELMAN, K. D.; ENGELMAN, A. N. Long-acting cabotegravir for HIV/AIDS prophylaxis. **Biochemistry**, v. 60, n. 22, p. 1731–1740, 2021.

Fact Sheet: The President's Emergency Plan for AIDS relief. Disponível em: < <https://georgewbush-whitehouse.archives.gov/news/releases/2003/01/20030129-1.html> >. Acesso em: 27 set. 2024.

FAUCI, A. S.; EISINGER, R. W. PEPFAR - 15 years and counting the lives saved. **The New England journal of medicine**, v. 378, n. 4, p. 314–316, 2018.

GOTTLIEB, M. S. et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **The New England journal of medicine**, v. 305, n. 24, p. 1425–1431, 1981.

GREENE, W. C. A history of AIDS: looking back to see ahead. **European journal of immunology**, v. 37 Suppl 1, n. S1, p. S94-102, 2007.

HIV drug resistance database. Disponível em: < <https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/NNRTI/> >. Acesso em: 27 set. 2024.

LIU, Z. et al. HIV-1 antisense protein of different clades induces autophagy and associates with the autophagy factor p62. **Journal of virology**, v. 93, n. 2, 2019.

MELIKIAN, G. L. et al. Standardized comparison of the relative impacts of HIV-1 reverse transcriptase (RT) mutations on nucleoside RT inhibitor susceptibility. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2305–2313, 2012.

NAÇÕES UNIDAS. UNAIDS. Estatísticas. Disponível em: <
<https://unaids.org.br/estatisticas/>

NDUATI R. et al. Effect of Breastfeeding and Formula Feeding on Transmission of HIV-1: A Randomized Clinical Trial. JAMA. 2000;283(9):1167–1174. doi:10.1001/jama.283.9.1167

SVICHER, V. et al. Novel human immunodeficiency virus type 1 protease mutations potentially involved in resistance to protease inhibitors. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 49, n. 5, p. 2015–2025, 2005.

WHITCOMB, J. M. et al. Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. **The journal of infectious diseases**, v. 188, n. 7, p. 992–1000, 2003.

YANG, L.; CAMBOU, M. C.; NIELSEN-SAINES, K. The end is in sight: Current strategies for the elimination of HIV vertical transmission. Current HIV/AIDS reports, v. 20, n. 3, p. 121–130, 2023.

Capítulo 10

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-10

UMA VISÃO CRÍTICA COM O OBJETIVO DE COMPARAR AS VACINAS BEXSERO E TRUMENBA PARA *NEISSERIA* *MENINGITIDIS B* MUNDIALMENTE UTILIZADAS

Giovanna Santos Oliveira¹; Elizabeth De Gaspari²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública.- Centro de Imunologia – Instituto Adolfo Lutz; E-mail: giovannasantosoli@hotmail.com

² Centro de Imunologia Instituto Adolfo Lutz e Programa de pós graduação Interunidades em Biotecnologia Universidade de São Paulo/SP .

Resumo: A meningite é uma inflamação das meninges e representa um grande desafio de saúde pública devido à sua gravidade e diversidade de agentes etiológicos. O desenvolvimento de vacinas para o sorogrupo B é desafiador. Apesar disso, as vacinas Bexsero® e Trumenba® demonstram eficácia contra esse sorogrupo, proporcionando proteção relevante. Este estudo visou comparar essas vacinas, avaliando a relevância de sua inclusão no calendário vacinal do Brasil. A pesquisa utilizou a base de dados PubMed, site oficiais do governo e bulas dos fabricantes. Ambas as vacinas Bexsero® e Trumenba® são eficazes contra o meningococo B. No Brasil, estão disponíveis apenas no setor privado, e sua inclusão no SUS enfrenta desafios de custo e priorização, apesar da importância para a saúde pública. A meningite do sorogrupo B atualmente inclui vacinas como Bexsero® e Trumenba®. Acreditamos que a inserção no SUS terá que superar barreiras de custo e prioridade. Como é de conhecimento a integração público-privada e campanhas são essenciais para ampliar o acesso e reduzir casos no Brasil.

Palavras-chave: Bexsero; *Neisseria meningitidis* B; OMVs; Trumenba; vacinas

INTRODUÇÃO

A meningite é uma condição caracterizada pela inflamação das meninges, que são as membranas que protegem o cérebro. Essa doença representa um significativo desafio para a saúde pública (BRASIL, 2022).

No Brasil, entre 2007 e 2020, foram registrados 265.644 casos confirmados de meningite, sendo a maioria de origem viral, seguida pela bacteriana. A *Neisseria meningitidis* destacou-se como o principal agente causador nos casos em que a espécie bacteriana foi identificada, e, nesses casos, é apropriado referir-se ao quadro como doença meningocócica (BRASIL, 2021).

A *Neisseria meningitidis* faz parte da família *Neisseriaceae* e é caracterizada por ser uma bactéria não móvel, com uma parede celular gram-negativa. Essa espécie é classificada em sorogrupos com base na composição da cápsula polissacarídica. Os seis sorogrupos mais relevantes para a propagação da doença meningocócica são: A, B, C, W, X e Y. (FINDLOW et al, 2019/ SÁFADI et al, 2012). A *Neisseria meningitidis* também pode ser classificada com base em sorotipos e subtipos, que são determinados pela variação antigênica das

proteínas da membrana externa da bactéria. Esses sorotipos e subtipos são identificados por meio das proteínas PorA e PorB, respectivamente (BRASIL, 2017).

O desenvolvimento de vacinas contra o sorogrupo B da *Neisseria meningitidis* enfrenta desafios devido à baixa imunogenicidade do polissacarídeo deste sorogrupo. Esse polissacarídeo é semelhante ao ácido polisiálico encontrado no tecido cerebral humano, o que pode resultar em reações autoimunes (GASPARINI et al., 2014; LATARO, 2016).

A 4CMenB, também chamada de Bexsero®, desenvolvida pela GlaxoSmithKline, foi a primeira vacina a proporcionar ampla proteção contra o meningococo B (MenB). Sua formulação inclui múltiplos componentes, como OMVs proteínas recombinantes e hidróxido de alumínio, e foi aprovada pela *European Medicines Agency* (EMA) em 2013 e pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2015 (SANTOLAYA, M. E., et al., 2012/FDA, c2024). A vacina rLP2086, comercializada como Trumenba® pela Pfizer, obteve a aprovação da FDA em 2014, comprovando eficácia contra quatro cepas distintas do sorogrupo B do meningococo (PFIZER, 2014).

O objetivo deste estudo foi comparar as vacinas Bexsero® e Trumenba®, examinando seus benefícios e limitações em diferentes aspectos, com a intenção de avaliar o impacto para a inclusão dessas vacinas no calendário vacinal do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Para desenvolver este estudo, foram realizadas pesquisas na base de dados PubMed, utilizando os seguintes termos de busca: Vacinas meningocócicas, "Meningococcus B", "Bexsero & Trumenba", "Trumenba" e "Bexsero". O levantamento abrangeu artigos publicados entre 1985 e 2023, com a seleção focada na relevância em relação aos temas abordados nesta revisão.

Adicionalmente, o site do Ministério da Saúde do Brasil foi consultado para obter dados atualizados sobre a meningite e seu panorama epidemiológico no país. As informações relativas às vacinas Bexsero® (GlaxoSmithKline) e Trumenba® (Pfizer) foram obtidas a partir das bulas disponibilizadas pelos respectivos fabricantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um estudo comparativo das vacinas Bexsero® e Trumenba®, foi observado que a composição e aplicação de faixa etária são distintas entre si, uma vez que a vacina Bexsero® possui múltiplos componentes e aplicação de 2 meses a 50 anos, e a Trumenba® com formulação de duas variações de fHbp e aplicação em faixas etárias de 10 a 25 anos (GSK, 2021/Pfizer, 2022).

As vacinas são uma parte essencial da saúde pública, auxiliando na prevenção de diversas doenças. Atualmente o Brasil tem um programa de imunização bem estruturado, são oferecidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A tabela 1 faz uma relação das vacinas disponíveis gratuitamente dentro do Programa Nacional de Imunização (PNI) do Brasil (BRASIL, 2022).

Tabela 1. Vacinas oferecidas pelo SUS que estão dentro do PNI do Brasil

Vacinas contra doenças virais	Vacinas contra doenças bacterianas
Vacina Rotavírus Humano (VRH)	BCG (contra tuberculose)

Hepatite B	Penta (DTP/Hib/Hep. B)
Febre Amarela	Pneumocócica 10 Valente
Tríplice Viral (Sarampo, Caxumba e Rubéola)	Vacina Inativada Poliomielite (VIP)
Hepatite A	Vacina Oral Poliomielite (VOP)
Tetraviral (Sarampo, Caxumba, Rubéola e Varicela)	Meningocócica C (conjugada)
Varicela	DTP (Tríplice Bacteriana: Difteria, Tétano e Coqueluche)
HPV Quadrivalente	dT (Dupla Adulto: Difteria e Tétano)
	dTpa (DTP Adulto)
	Meningocócica ACWY (conjugada)

Fonte: Adaptado de BRASIL - Ministério da Saúde (2022)

No Brasil a vacina meningocócica contra o sorogrupo C é aplicada em crianças aos 3 e 5 meses de idade, com reforço aos 12 meses, já a vacina Meningocócica ACWY é aplicada em adolescentes entre 11 e 12 anos de idade em dose única. Como observado, não há vacina contra meningococo B no calendário vacinal, podendo somente ser adquiridas em estabelecimentos privados (BRASIL, 2022).

A introdução de vacinas mundialmente é controlada por diferentes órgãos regulatórios, que variam de acordo com o país, como por exemplo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a nível global, FDA nos Estados Unidos e EMA na União Europeia (BRASIL, c2024).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) avalia a qualidade, segurança e eficácia de vacinas antes de conceder autorização para comercialização, outras entidades como o Ministério da Saúde e Secretarias Estaduais/Municipais de Saúde auxiliam na formulação de políticas públicas de saúde e na execução de campanhas de vacinação (ANVISA, c2024).

Por outro lado há algumas etapas e critérios que devem ocorrer para garantir que as vacinas sejam seguras e eficazes antes de serem introduzidas no mercado de um país, entre os já relatados podemos destacar :

1. Pesquisa e Desenvolvimento: Como a identificação de antígenos com potencial para induzir uma resposta imunológica e estudos laboratoriais e de segurança.
2. Ensaios clínicos:
 - Fase 1: Testes iniciais em pequeno grupo para avaliar segurança e dosagem;
 - Fase 2: Testes em grupo maior para verificar eficácia e monitorar efeitos colaterais;
 - Fase 3: Ensaios em uma grande população para confirmar eficácia e segurança em condições reais.
3. Registro e Aprovação: Submissão de dados para as autoridades regulatórias como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil;
4. Aprovação e Licenciamento: A vacina é aprovada para produção, distribuição e comercialização;

5. Monitoramento Pós comercialização: Monitoramento da segurança da vacina para avaliar possíveis efeitos adversos;

6. Atualização do Calendário Vacinal: As autoridades, como o Ministério da Saúde, avaliam a necessidade de introdução de uma nova vacina no calendário vacinal.

A dificuldade para introdução de vacinas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupo B no calendário de vacinação pode compreender alguns fatores como custo e prioridades de saúde pública voltadas para a doença.

. Uma estratégia para introdução destas vacinas seria pautada na avaliação em relação ao custo-benefício, discussão com especialistas, planejamento logístico, campanhas de informação, implementação de projetos piloto para avaliar aceitação da vacina e aplicação em larga escala e posteriormente a introdução ao calendário vacinal por meio de propostas formais junto ao Ministério da Saúde (BRASIL, 2013).

Atualmente alguns países utilizam vacinas contra *Neisseria meningitidis* B, como por exemplo: Reino Unido, Austrália, Canadá, Estados Unidos, Nova Zelândia e alguns países europeus como Itália, Alemanha e Suécia também utilizam vacinas contra meningococo B como as vacinas disponíveis Bexsero® e a Trumenba® (CDC, 2024/ECDC, 2024).

Como prevenção em caso de epidemia de *N. meningitidis* B, é necessário fazer a notificação e monitoramento dos casos registrados, implementar campanhas de vacinação e assegurar que as vacinas como Bexsero® e Trumenba® estejam disponíveis como também realizar a administração de medidas profiláticas para casos confirmados e contatos próximos (BRASIL, 2024).

No caso de uma epidemia certamente irá ocorrer dificuldade quanto ao pagamento em clínicas particulares devido ao alto custo de vacinas. Uma estratégia seria o financiamento externo por organizações internacionais como a OMS para facilitar o acesso às vacinas por um preço reduzido, bem como programas de acesso de imunizações em massa no caso de surtos e/ou estratégias de colaborações dos setores público e privado para facilitar o acesso da população às vacinas (BRASIL, 2013).

CONCLUSÕES

A meningite causada pela *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B é um grande desafio no mundialmente e preocupante no Brasil . Embora as vacinas Bexsero® e Trumenba® sejam eficazes, sua inclusão no calendário vacinal enfrenta barreiras de custo e priorização.

Podemos sugerir a necessidade de promover campanhas de conscientização e colaboração entre governo e iniciativa privada para garantir acesso a essas vacinas, protegendo a população e reduzindo os casos no país.

REFERÊNCIAS

1. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Ensaio Clínicos*. ANVISA, c2024. Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_R6VaZWsqDDzS&p_p_col_id=column-1&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_R6VaZWsqDDzS_groupId=10181&_101_INSTANCE_R6VaZWsqDDzS_urlTitle=ensaios-clinicos&_101_INSTANCE_R6VaZWsqDDzS_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_R6VaZWsqDDzS_assetEntryId=2864110

- &_101_INSTANCE_R6VaZWzQDDzS_type=content. Acesso em: 31 de Outubro de 2024.
2. BRASIL - Ministério da Saúde. *05/8 – Dia Nacional da Vigilância Sanitária*. Biblioteca Virtual em Saúde, c2024. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/05-8-dia-nacional-da-vigilancia-sanitaria-2/>. Acesso em 31 de Outubro de 2024.
 3. BRASIL - Ministério da Saúde. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. Ministério da Saúde, 1º edição, Brasília, DF, 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-tifoide/publicacoes/guia-de-vigilancia-epidemiologica-7a-edicao/view>. Acesso em 20 de Maio de 2024.
 4. BRASIL - Ministério da Saúde. *Ministério da Saúde reforça a importância da vacinação contra meningite*. Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/outubro/ministerio-da-saude-reforca-a-importancia-da-vacinacao-contra-meningite>. Acesso em: 31 de Outubro de 2024.
 5. BRASIL - Ministério da Saúde. *Programa Nacional de Imunizações: 40 anos*. Brasília, Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nacional_imunizacoes_pni40.pdf. Acesso em: 15 de Setembro de 2024.
 6. BRASIL - Ministério da Saúde. *Quais são as vacinas disponíveis?*. Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/campanhas-da-saude/2022/multivacinacao/quais-sao-as-vacinas-disponiveis>. Acesso em: 31 de Outubro de 2024.
 7. BRASIL - Secretaria Municipal da Saúde. *Meningites*. Secretaria Municipal da Saúde, 2024. Disponível em: https://capital.sp.gov.br/web/saude/w/vigilancia_em_saude/doencas_e_agrivos/meningite/6275. Acesso em: 31 de Outubro de 2024.
 8. BRASIL. *Situação Epidemiológica das Meningites*. Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/meningite/situacao-epidemiologica>. Acesso em 20 de Maio de 2024.
 9. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Child and Adolescent Immunization Schedule by Age* (Addendum updated June 27, 2024) CDC. 2024. Disponível em: https://www.cdc.gov/vaccines/hcp/imz-schedules/child-adolescent-age.html?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/vaccines/schedules/hcp/imz/child-adolescent.htm. Acesso em 24 de Outubro de 2024.
 10. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. *Vaccine Scheduler - Meningococcal Disease: Recommended vaccinations*. ECDC. 2024. Disponível em: <https://vaccine-schedule.ecdc.europa.eu/Scheduler/ByDisease?SelectedDiseaseId=48&SelectedCountryIdByDisease=-1>. Acesso em 24 de Outubro de 2024.
 11. FINDLOW, J., NUTTENS, C., KRIZ, P. *Introduction of a second MenB vaccine into Europe – needs and opportunities for public health*. Experts Review of Vaccines, 18(3):225-239, 2019.
 12. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Bexsero Safety Review*. FDA, c2024. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/116060/download>. Acesso em: 06 de Agosto de 2024.
 13. GASPARINI, R. et al. *Neisseria meningitidis B vaccines: recent advances and possible immunization policies*. Experts Review of. Vaccines, v. 13, n. 3, p. 345-364, 2014.

14. GLAXOSMITHKLINE BRASIL. *Bexsero*. GlaxoSmithKline, 2021. Disponível em: <https://br.gsk.com/media/7112/2021-11-22-br-pi-bexsero-11731-master.pdf>. Acesso em: 30 de Julho de 2024.
15. INSTITUTO BUTANTAN. *Ensaio Clínicos Instituto Butantã*. Instituto Butantan, 2024. Disponível em: <https://butantan.gov.br/pesquisa/ensaios-clinicos>. Acesso em: 31 de outubro de 2024.
16. LATARO, T.R.B. *Utilização de anticorpos monoclonais como diferenciais de meningites bacterianas e virais pela técnica de Imuno-histoquímica*. Tese (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB USP. São Paulo, 2016. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-23022017-115134/publico/ThaisReginaBrienzaLataro_Corrigida_Mestrado_I.pdf. Acesso em: 05 de Agosto de 2024.
17. PFIZER. *Pfizer Receives FDA Accelerated Approval for TRUMENBA® (Meningococcal Group B Vaccine) for the Prevention of Invasive Meningococcal B Disease in Adolescents and Young Adults*. Pfizer, 2014. Disponível em: <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-receives-fda-accelerated-approval-for-trumenba-meningococcal-group-b-vaccine-for-the-prevention-of-invasive-meningococcal-b-disease-in-adolescents-and-young-adults>. Acesso em: 06 de Agosto de 2024.
18. PFIZER. *Trumenba: vacina adsorvida meningocócica B (recombinante)*. Pfizer, 2020. Disponível em: https://www.pfizer.com.br/files/Trumenba_Profissional_de_Saude_14.pdf. Acesso em: 30 de Julho de 2024.
19. SÁFADI, M.A.P., BEREZIN, E.N., OSELKA, G.W. *A critical appraisal of the recommendations for the use of meningococcal conjugate vaccines*. *Jornal de Pediatria*, 88 (3), pp 195-202, 2012.
20. SANTOLAYA, M.E. *Immunogenicity and tolerability of a multicomponent meningococcal serogroup B (4CMenB) vaccine in healthy adolescents in Chile: a phase 2b/3 randomized, observer-blind, placebo-controlled study*. *Lancet*. 2012.

Capítulo 11

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-11

CARACTERIZAÇÃO DOS EXAMES DE CARGA VIRAL DO VÍRUS DA HEPATITE C REALIZADOS NO CENTRO DE LABORATÓRIO REGIONAL INSTITUTO ADOLFO LUTZ SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – X, NO PERÍODO DE JANEIRO DE 2022 A DEZEMBRO DE 2023.

Hingrid Gabrielli da Costa Alves¹; Márcia Maria Costa Nunes Soares²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - NCB – CLR - IAL-SJRP; E-mail: hingridalves.biomed@gmail.com

²Pesquisador Científico, Núcleo de Ciências Biomédicas – CLR-IAL-SJRP; E-mail: marcia.soares@ial.sp.gov.br

Resumo: A hepatite C é um problema de saúde pública global, afetando milhões de pessoas em escala internacional. Estima-se que cerca de 50 milhões de indivíduos sejam portadores do vírus da hepatite C (HCV). Desse modo, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil das solicitações de exame de carga viral do HCV, realizadas pelo Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz São José do Rio Preto (CLR IAL SJRP). Foi realizado o levantamento das solicitações de exames através da plataforma de Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL), recebidas no período de janeiro de 2022 a dezembro de 2023. Os dados foram organizados em tabela, levando em consideração características específicas, bem como o resultado da carga viral. Além disso, foi realizado uma análise estatística para avaliar a relevância dos resultados. Os dados coletados mostraram que a maior taxa de exames realizados ocorreu no ano de 2023 (55,8%). A maioria das solicitações pertencia a indivíduos do sexo masculino (52,7%), e 44,5% dos indivíduos na faixa etária de 39-57 anos. A maioria apresentou carga viral indetectável (63,1%), sendo o sexo feminino o perfil que apresentou maior taxa 53,6%. A pesquisa revelou um aumento nas solicitações de exames em 2023, em maior parte por indivíduos do sexo masculino, na fase adulta. O sexo feminino foi predominante nos resultados de carga viral indetectável, apresentando maior taxa de eliminação espontânea. Conhecer o perfil das solicitações dos exames é um importante subsídio para implementação de estratégias de controle, colaborando com a meta de eliminação da hepatite C, até 2030.

Palavras-chave: caracterização; diagnóstico; hepatite C

INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma das infecções consideradas como questão global de saúde pública, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. Cerca de 50 milhões de pessoas são estimadas como portadoras do vírus da hepatite C (HCV). No Brasil, foram notificados 318.916 casos, com 58,1% das testagens positivas provenientes da região Sudeste (Brasil, 2024).

Causada por um vírus de RNA pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*, o HCV infecta seres humanos e apresenta tropismo pelo tecido hepático. A

infecção é caracterizada por resultar em danos hepáticos graves em casos de cronificação da doença. O diagnóstico pode ser feito em duas fases, visto que o HCV estabelece uma infecção aguda que pode evoluir para um quadro crônico (Brasil, 2019; Pietschmann, 2019).

A fase aguda inicia logo após o contato com o vírus, e a soroconversão ocorre nos primeiros seis meses. Na maioria dos casos, os indivíduos podem não apresentar sintomas, dificultando a identificação da infecção. A eliminação do vírus pode ocorrer espontaneamente (Brasil, 2017).

Já a fase crônica, que abrange cerca de 85% dos casos, é marcada pelo seu caráter silencioso, evoluindo ao longo de décadas e sendo diagnosticada habitualmente em estágios mais avançados. Nessa fase, a infecção pelo HCV persiste por mais de seis meses, acompanhada de um processo inflamatório no fígado que pode levar a complicações como cirrose e carcinoma hepatocelular (Brasil, 2022; Abu-Freha, 2022).

A transmissão do HCV pode ocorrer por diferentes meios: via sexual, vertical (de mãe para filho) e parenteral, sendo a última a mais comum, ocorrendo através do contato com sangue infectado, como o compartilhamento de instrumentos não esterilizados (Brasil, 2022).

O diagnóstico laboratorial é realizado por meio de testes sorológicos e imunocromatográficos, como testes rápidos (TR) para detectar a presença de anticorpos anti-HCV. A confirmação da infecção ativa é feita por testes moleculares, como o PCR em tempo real (qPCR), que detecta o genoma viral (HCV-RNA) tanto qualitativo quanto quantitativamente (Brasil, 2017; Abu-Freha, 2022). Além disso, o exame molecular é utilizado para acompanhar a eficácia do tratamento em pacientes infectados e para auxiliar na escolha do medicamento (Brasil, 2016).

A hepatite C é uma doença que causa grande impacto global e nacional na população. Desse modo, os dados que foram analisados são essenciais para a implementação de políticas de saúde pública. Compreender a demanda dos exames realizados e conhecer seu perfil nas diversas regiões do Estado e do Brasil é fundamental para desenvolver estratégias eficazes de controle de saúde pública que busquem prevenir, detectar e tratar essas infecções, colaborando com a meta de eliminação da hepatite C, até 2030 (Brasil, 2018). Assim sendo, os dados apresentados detalham as solicitações de exames, com o objetivo de proporcionar um melhor entendimento da demanda.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados da plataforma de Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) dados de exames realizados no CLR IAL SJRP de janeiro de 2022 a dezembro de 2023. Foram analisados municípios, motivo de solicitação, sexo, idade, gestante e resultado de carga viral, garantindo a privacidade ao excluir nomes e endereços. Os dados foram organizados em tabelas no Microsoft Excel, foi realizada análises estatísticas básicas através do software OpenEpi, considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período avaliado, foram solicitados 567 exames de carga viral (CV) para o diagnóstico da hepatite C. No ano de 2022, a taxa de pedido foi menor que em 2023, com 251 (44,2%) e 316 (55,8%) exames, respectivamente. Quanto à infecção por razão de sexo,

os homens apresentaram maior frequência, com 290 (52,7%) dos casos em relação às mulheres, com 260 (47,2%). Quando consideramos a faixa etária, 44,5% dos exames foram provenientes de indivíduos na faixa etária de 39-57 anos. A maior parte dos indivíduos testados na triagem, apresentaram no diagnóstico molecular, uma carga viral indetectável (63,1%). Notavelmente, os indivíduos do sexo feminino são a maioria dos casos de eliminação espontânea observada, com 186 (53,6%) dos casos, apresentando uma diferença significativa em relação ao sexo masculino ($p < 0,005$).

Tabela 1 – Características epidemiológicas e resultado da carga viral, das solicitações de diagnósticos.

Variáveis	Desfechos	n (%)
Ano	2022	251 (44,2%)
	2023	316 (55,8%)
Sexo	Feminino	260 (47,2%)
	Masculino	290 (52,7%)
	1-19	11 (1,9%)
	20-38	76 (13,4%)
Faixa etária (anos)	39-57	251 (44,5%)
	58-76	200 (35,4%)
	77-95	26 (4,6%)
Resultado carga viral	CV	203 (36,6%)
	ND*	347 (63,1%)
ND por razão de sexo	Feminino	186 (53,6%)
	Masculino	161 (46,4%)

Fonte: Elaborada pelas autoras (2024).

*Não Detectável

O menor número de solicitações no ano de 2022 pode ser devido ao impacto da pandemia da Covid-19. No qual, a população, por incentivo dos serviços de atendimento, deixou de buscar os serviços de saúde rotineiramente, com receio de se infectar com o novo coronavírus. A concentração dos profissionais no atendimento da nova doença resultou em um declínio no acesso dos pacientes aos serviços de saúde, impactando significativamente os programas de vigilância epidemiológica quanto à notificação da hepatite C. Esses fatores podem ter levado a uma queda na realização de diagnóstico e à subnotificação dos casos (Carmo; Souza, 2022)

A análise estatística das solicitações realizadas, em relação ao sexo, foi significativa ($p < 0,05$), com prevalência no sexo masculino. Essa prevalência também foi observada por estudos nacionais e internacionais (Oliveira, 2018; Li *et al.*, 2020), constatando que o perfil de infectados se estabelece de maneira consistente por diversos países. A taxa da infecção por HCV é maior na população masculina devido a apresentarem maior propensão em realizar atividades de risco. Particularmente o uso de drogas injetáveis e inaláveis, as quais são responsáveis pelo surgimento de novos casos todos os anos. Aspectos comportamentais, como a prática de atividades sexuais desprotegidas, principalmente entre homens que fazem sexo com homens, possuem múltiplos parceiros, e a crença de possuírem maior vulnerabilidade são fatores significativos na disseminação do vírus (Melo *et al.*, 2020; Silva, 2023; Nicolau, 2017;).

O perfil das solicitações de carga viral do HCV, segundo faixa etária, também é consistente em outros países, os quais também relataram prevalência em indivíduos acima de 40 anos (Li *et al.*, 2020). A prevalência observada na fase adulta ocorre devido ao percurso lento da doença. Devido a isso, o Ministério da Saúde recomenda que adultos acima dos 40 anos realizem pelo menos uma vez o teste para detecção do HCV (Brasil, 2020).

Ao analisar os resultados da CV, constatou-se que a maior parte dos indivíduos que testaram positivos na triagem, apresentaram no diagnóstico molecular, uma CV indetectável (63,1%), com prevalência no sexo feminino, demonstrando uma possível cicatriz sorológica, enquanto 36,6% apresentou uma CV detectável, confirmando uma infecção ativa pelo HCV. A maioria dos casos de eliminação espontânea relacionado ao sexo feminino, embora ainda não seja bem compreendida, alguns estudos relatam que essa relação pode ter como fator contribuinte diferenças hormonais e de respostas imunológicas em que, frente a uma infecção viral, as mulheres apresentem maior capacidade de uma resposta imune diferenciada e mais robusta, apresentando, então, uma probabilidade significativamente maior que os homens em relação a depuração da infecção (Ruggieri; Gagliardi; Anticoli, 2018).

CONCLUSÕES

A análise revelou que, em 2023, a taxa de exames realizados foi superior ao ano de 2022. Entre os indivíduos atendidos, a maioria das solicitações eram do sexo masculino e faixa etária de 39 a 57 anos. A maioria apresentou resultado de carga viral não detectado, indicando uma possível eliminação espontânea do vírus, sendo que desses, o sexo feminino foi predominante.

É indispensável ter conhecimento sobre a demanda e o perfil dos pacientes atendidos como informações úteis para a implementação de estratégias de controle e tratamento, considerando que a doença é uma importante questão de saúde pública que afeta milhões de pessoas.

REFERÊNCIAS

ABU-FREHA, N. *et al.* Hepatite C crônica: diagnóstico e tratamento facilitados. **European Journal of General Practice**, v. 28, n. 1, p. 102–108, 17 maio 2022. <https://doi.org/10.1080/13814788.2022.2056161>

BRASIL, Ministério da Saúde. Brasil avança no combate à hepatite C. Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2020/outubro/brasil-avanca-no-combate-a-hepatite-c#:~:text=OFERTA%20DE%20TESTES%20R%C3%81PIDOS%20NO,de%20sa%C3%B Ade%20p%C3%BAblica%2C%20at%C3%A9%202030>. Acesso em: 13 ago. 2024

BRASIL, Ministério da Saúde. Departamento de HIV, Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Hepatite C**. Brasília, 2022. Disponível em:

<https://www.gov.br/aids/pt-br/assuntos/hepatites-virais/hepatite-c> Acesso em: 25 maio. 2024.

Brasil, Ministério da Saúde. Departamento de HIV, Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Ministério da Saúde lança plano para eliminar hepatite C até 2030**. Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/publicacoes/2018/ministerio-da-saude-lanca-plano-para-eliminar-hepatite-c-ate-2030/view> Acesso em: 28 nov. 2024

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de HIV, Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais 2024**. Brasília: Ministério da Saúde, Nu. Espacial jul. 2024.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções**. Brasília: Ministério da Saúde, e. 1 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite c coinfeções**. Brasília: Ministério da Saúde, e. 1 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais. **Manual Técnico para o Diagnóstico das Hepatites Virais**. Brasília, Ministério da Saúde, 2016.

CARMO, R. F.; SOUZA, C. D. F. Impacto da pandemia de COVID-19 no diagnóstico de hepatite C no Brasil: A estratégia global de eliminação da hepatite C está em risco? **Journal of Hepatology**, v. 76, n. 2, p. 470-488, fev 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.08.005>

LI, Y. *et al.* Prevalência e características da infecção pelo vírus da hepatite C na cidade de Shenyang, nordeste da China, e previsão da positividade do RNA do HCV de acordo com o nível sérico anti-HCV: revisão retrospectiva de dados hospitalares. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, 16 mar. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01316-y>

MELO, T. R. *et al.* PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA HEPATITE C NO BRASIL NO PERÍODO 2013 - 2018. **Revista interdisciplinar em saúde**, v. 7, n. Único, p. 1358-1370, 9 ago. 2020. <http://dx.doi.org/10.35621/23587490.v7.n1.p1358-1370>

NICOLAU, S. *et al.* PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA HEPATITE B EM UMA REGIONAL DE SAÚDE EM RECIFE. **Revista de Saúde Coletiva da UEFS**, v. 7, n. 3, 21 dez. 2017. <https://doi.org/10.13102/rscdauefs.v0i0.2074>

OLIVEIRA, T. J. B. *et al.* Perfil epidemiológico dos casos de hepatite C em um hospital de referência em doenças infectocontagiosas no estado de Goiás, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 1, p. 51–57, 1 mar. 2018. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232018000100007>

PIETSCHMANN, T.; BROWN, R.J.P. Vírus da hepatite C. **Tendências em Microbiologia**, v. 27, n.4, p. 379-380, abr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.001>

RUGGIER, A.; GAGLIARD, M. C.; ANTICOLI, S. Resultado dependente do sexo das infecções pelos vírus da hepatite B e C: sinergia dos hormônios sexuais e respostas imunológicas? **Frente. Immunol.**, v. 9, 7 out. 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02302>

SILVA, V. C. M. **Homens que fazem sexo com homens e a hepatite C: Prevalência e fatores de risco em 12 capitais brasileiras**. 2023. 107 f. Tese (Doutorado) - Curso de Vigilância em Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2023. Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2023/06/1436445/tese-doutorado-vcms-vanessa-martins.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2024.

Capítulo 12

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-12

GELADOS COMESTÍVEIS: QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO

Matheus Dinelli de Oliveira¹; Tatiana Caldas Pereira²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância em Saúde; Instituto Adolfo Lutz CLR Santos; E-mail: dinellimatheus@outlook.com

²Mestre/Pesquisadora Científica do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas; Instituto Adolfo Lutz CLR Santos; tatina.pereira@ial.sp.gov.br

Resumo: Os gelados comestíveis, popularmente conhecidos como sorvetes, são produtos alimentícios amplamente consumidos em diversas partes do mundo e por diferentes gerações. Apesar do sorvete ser mantido em baixas temperaturas, microrganismos que sobrevivem a essas condições podem proliferar, tornando-o um veículo para doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA). Este estudo teve como objetivo verificar a influência das Boas Práticas de Fabricação na qualidade microbiológica de gelados comestíveis e os principais contaminantes biológicos. Foi realizada uma revisão bibliográfica em bases científicas como SCIELO, BVS e PubMed, abrangendo artigos científicos, legislações vigentes e normas oficiais. Foi observado que falhas nas Boas Práticas de Fabricação (BPF), como higienização inadequada e manuseio impróprio, contribuem para a contaminação microbiológica. A adoção rigorosa das BPF e o monitoramento contínuo dos contaminantes microbiológicos são essenciais para assegurar a qualidade dos produtos. A aproximação da legislação brasileira com normas internacionais também pode contribuir para o controle sanitário destes produtos.

Palavras-chave: gelados comestíveis; microbiologia de alimentos; segurança dos alimentos, boas práticas de fabricação

INTRODUÇÃO

Os gelados comestíveis, popularmente conhecidos como sorvetes, são produtos alimentícios amplamente consumidos em diversas partes do mundo e por diferentes gerações. A fabricação do sorvete envolve uma variedade de ingredientes, incluindo produtos lácteos ou substitutos, corantes, aromatizantes, açúcares, estabilizantes e emulsificantes. As etapas de processamento são geralmente agrupadas em três fases: (1) mistura e aquecimento dos ingredientes, seguido pela pasteurização; (2) congelamento após a homogeneização para a incorporação de ar; e (3) endurecimento, onde a água não congelada se deposita sobre os cristais de gelo, aumentando seu tamanho (SANTOS, 2009; BRASIL, 2003).

Apesar do sorvete ser mantido em baixas temperaturas, microrganismos que sobrevivem a essas condições podem proliferar, tornando-o um meio propício para contaminação microbiológica (HAMÚ, 2019). As doenças de transmissão hídrica e

alimentar (DTHA) são consequências da ingestão de alimentos e água contaminados com microrganismos patogênicos, substâncias químicas ou objetos lesivos, cujos sintomas comuns incluem dores abdominais, diarreia, vômitos e náuseas (WHO, 2015). Os gelados comestíveis podem atuar como veículos de DTHA quando contaminados por microrganismos patogênicos.

Assim, a segurança biológica dos gelados comestíveis é uma questão crucial tanto para a Saúde Pública quanto para a indústria alimentícia. Este estudo teve como objetivo verificar a influência das Boas Práticas de Fabricação na qualidade microbiológica de gelados comestíveis e os principais contaminantes biológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado por meio de um levantamento bibliográfico, utilizando as seguintes bases de dados: SCIELO (Scientific Electronic Library Online), BVS (Biblioteca Virtual em Saúde) e PubMed (U.S. National Institutes of Health's National Library of Medicine - NIH/NLM). Foram selecionados artigos científicos, teses de mestrado e doutorado publicados nos últimos 15 anos. Além disso, foram consultadas legislações e sites de órgãos oficiais, tanto nacionais quanto internacionais. Para a busca dos artigos científicos, foram utilizadas as seguintes palavras-chave: "gelados comestíveis", "microbiologia de alimentos" e "inocuidade dos alimentos".

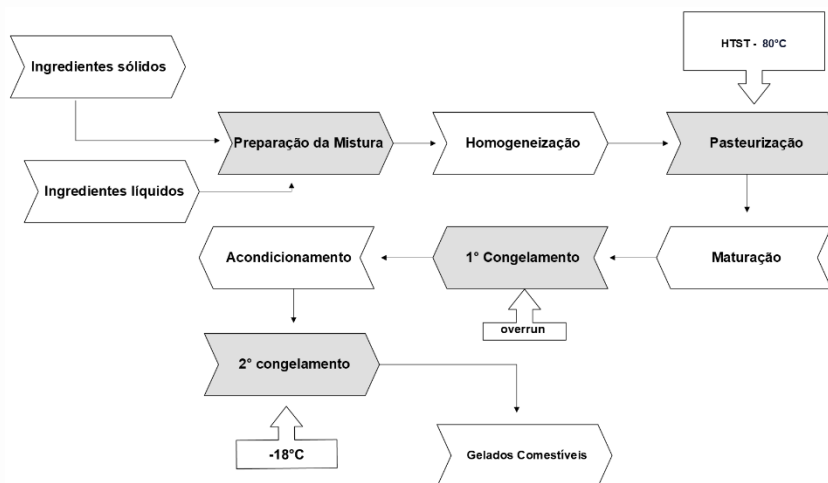
RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de gelados comestíveis exige rigoroso controle de qualidade das matérias-primas e do seu processamento para garantir a segurança alimentar. Estudos apontam que as principais falhas nas indústrias de gelados comestíveis incluem instalações inadequadas, temperaturas inadequadas e condições de armazenamento insatisfatórias (MILIKITA, 2002; LIMA et al., 2016).

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) para gelados comestíveis, regulamentada pela RDC N° 267, de 25 de setembro de 2003, estabelece o processamento dos gelados comestíveis em etapas como mistura, pasteurização, congelamento e maturação, visando a textura, estabilidade e higiene do produto (BRASIL, 2003).

A pasteurização, essencial para reduzir a carga microbiana, ocorre em alta temperatura e tempo curto (HTST), conforme exigido pela ANVISA. O congelamento e a homogeneização, que incluem a incorporação de ar (overrun), são cruciais para a cremosidade e leveza do sorvete. Após o envase, o produto é submetido a um congelamento final em temperatura de -18 °C ou inferior para assegurar a estabilidade até a venda (BRASIL, 2003). A figura 1 apresenta um resumo das etapas de produção dos gelados comestíveis.

Figura 1 - Processamento dos gelados comestíveis



FONTE: Elaborado pelo autor (2024)

Os gelados comestíveis apresentam fatores como alta umidade e pH próximo ao neutro que favorecem o crescimento microbiano (MIKILITA, 2002). O risco de contaminação está frequentemente associado às práticas de manipulação, higienização, qualidade das matérias-primas e armazenamento em temperaturas inadequadas (MIKILITA, 2002; SIQUEIRA et al., 2010; HAMÚ, 2019).

Ferrari (2007) realizou um estudo que avaliou o padrão higiênico-sanitário de alimentos na região de Londrina/PR e, dentre estes, os gelados comestíveis. Foi verificado que 50% das amostras de sorvetes apresentaram contaminação por *E. coli*. Esta contaminação foi justificada pelo processo de pasteurização incompleto e falho e pela alta contaminação das matérias-primas utilizadas no processamento.

Uma das principais matérias-primas utilizadas na produção dos gelados comestíveis é o leite. O *Staphylococcus aureus* é um dos principais microrganismos patogênicos encontrado no leite cru (ZECCONI, 2001). Possui a capacidade de formar biofilmes, resistir ao calor e a desinfetantes. Estas características conferem uma maior capacidade de contaminação em superfícies, utensílios e equipamentos utilizados no preparo de alimentos (BOTELHO, 2017).

A contaminação por bolores e leveduras geralmente indica problemas na área de produção relacionados a práticas de higiene insuficientes e limpeza inadequada de superfícies (JUNQUEIRA et al., 2012; ALLATA et al., 2017; DE AMARANTE et al., 2021). Em um estudo realizado na cidade de Pelotas/RS foram analisadas 30 amostras de gelados comestíveis provenientes de buffets e máquinas expressas de sorvete. Todas as amostras apresentaram contaminação de bolores e leveduras e bactérias mesófilas aeróbias indicando a necessidade de aprimoramentos das BPF (DE AMARANTE et al., 2021).

Allata et al. (2017) realizaram um estudo em uma fábrica de gelados comestíveis localizada na cidade de Mazafroid no norte da Argélia e verificaram altas contagens de bactérias aeróbias mesófilas em sorvetes de chocolate, morango e baunilha. Esta contaminação foi associada a possível utilização de matérias-primas contaminadas, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas e higiene insuficiente no processamento (ALLATA et al., 2017).

L. monocytogenes pode causar uma série de doenças graves como encefalites, septicemias e aborto. Possui capacidade de atingir grupos de risco como crianças, grávidas e idosos (MIKILITA, 2002). Pode sobreviver em temperaturas de refrigeração, proliferar em superfícies e pode ser encontrada em leites e frutas contaminadas devido a falhas de higienização (FDA, 2017). Um estudo realizado por Tinareli et. al (2020) para verificar a presença de *Listeria monocytogenes* na área de produção de uma indústria de sorvetes, constatou a contaminação de *L. monocytogenes* em utensílios utilizados na produção dos gelados comestíveis e em utensílios de limpeza, ocasionando contaminação cruzada e contaminando o produto.

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada RDC N° 724 e a Instrução Normativa IN n° 161 de 1° de julho de 2022 dispõe os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação (BRASIL, 2022). De acordo com a legislação, os limites microbianos para os gelados comestíveis são baseados em contagem de *Enterobacteriaceae*, pesquisa de *Salmonella spp* e contagem de estafilococos coagulase positiva para produtos a base de leite (BRASIL, 2022).

Além dos microrganismos regulamentados no Brasil, países como EUA e a União Europeia monitoram também a bactéria *Listeria monocytogenes* em gelados comestíveis (US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017; UE, 2005). Nos Estados Unidos, o FDA exige a ausência de *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* em sorvetes, além de monitorar a presença de *Escherichia coli* devido à frequência de surtos relacionados ao patógeno no país (US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2023). A União Europeia, através do Regulamento (CE) n° 2073/2005, exige a análise de *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* e *Enterobacteriaceae*, alinhando-se com as práticas de segurança da maioria dos países-membros (EU, 2005). O quadro 1 apresenta uma comparação do que é preconizado na legislação para o controle microbiológico dos gelados comestíveis no Brasil, Estados Unidos e União Europeia.

Quadro 1 - Comparação das Legislações no Brasil, Estados Unidos e União Europeia

Microrganismo	Brasil	EUA	União Europeia
Enterobacteriaceae	Monitorado	Não mencionado	Monitorado
<i>Listeria monocytogenes</i>	Não monitorado	Monitorado	Monitorado
<i>Salmonella spp.</i>	Monitorado	Monitorado	Monitorado
Estafilococos coagulase positivo	Monitorado	Monitorado	Monitorado
<i>Escherichia coli</i>	Monitorado*	Monitorado	Monitorado*

*através da família *Enterobacteriaceae*

Fonte: elaborado pelo autor (2024)

CONCLUSÕES

A segurança biológica em gelados comestíveis é essencial para garantir tanto a qualidade do produto quanto a proteção dos consumidores. Os gelados comestíveis podem ser um meio de proliferação de microrganismos patogênicos e uma fonte de veiculação de doenças alimentares.

Falhas nas Boas Práticas de Fabricação (BPF), como higienização inadequada, manuseio impróprio e uso de matérias-primas de baixa qualidade contribuem para a contaminação microbiológica em gelados comestíveis. O monitoramento microbiológico contínuo aliado às Boas Práticas de Fabricação são ferramentas que podem contribuir com a segurança biológica dos gelados comestíveis.

A atuação das autoridades sanitárias na fiscalização rigorosa dos processos de produção é fundamental para assegurar que os produtos atendam aos padrões de segurança dos alimentos.

Alinhando-se às práticas internacionais, a inclusão de *Listeria monocytogenes* na regulamentação brasileira seria uma medida significativa para elevar a proteção à Saúde Pública, harmonizando as normas nacionais com as práticas seguidas em países como Estados Unidos e União Europeia.

REFERÊNCIAS

ALLATA, S.; VALERO, A.; BENHADJA, L. Implementation of traceability and food safety systems (HACCP) under the ISO 22000:2005 standard in North Africa: The case study of an ice cream company in Algeria. *Food Control*, v. 79, p. 239-253, 2017.

DE AMARANTE, V. C. A. et al. Microbiological quality of artisanal and industrial ice creams sold in the south of Rio Grande do Sul. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 1, p. e57510111744-e57510111744, 2021.

BOTELHO, C. V. *Staphylococcus coagulase positiva e Staphylococcus aureus resistentes a antibióticos em cadeia produtiva de carne suína*. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 267, de 25 de setembro de 2003. Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Industrializadores de Gelados Comestíveis. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 26 set. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 724, de 1º de julho de 2022. Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 6 jul. 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa IN nº 161, de 1º de julho de 2022. Define os padrões microbiológicos específicos mencionados na RDC nº 724/2022. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 6 jul. 2022.

FERRARI, R. G.; WINKLER, S. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação microbiológica de alimentos isentos de registro no Ministério da Saúde. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 28, n. 2, p. 241-250, 2007.

HAMÚ, J. R. P. N.; CARDOSO, A. M. Avaliação microbiológica de sorvetes comercializados em Goiânia-GO. Goiânia, GO: Universidade Federal de Goiás, 2019.

JUNQUEIRA, S. F.; SOUZA, A. O.; REIS, P. M. C. L.; MASCARENHAS, R. J.; YAMAMOTO, M. Contagem microbiológica de gelado comestível de fruta adicionado de ervas. *VII Connepi-Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação*, 2012.

LIMA, L. N. C.; et al. Avaliação microbiológica do leite in natura e pasteurizado comercializado no município de Benevides-PA. *Scientia Plena*, v. 12, n. 6, 2016.

MIKILITA, I. S. Avaliação do estágio de adoção das boas práticas de fabricação pelas indústrias de sorvete da região metropolitana de Curitiba (PR): proposição de um plano de análise de perigos e pontos críticos de controle. 2002. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

SANTOS, C. L. Desenvolvimento de gelado comestível probiótico. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 2009.

TINARELI, A. P. A.; FRABETTI, L. O. Contaminação microbiológica cruzada por *Listeria spp.* na indústria de sorvete. 2020.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) nº 2073/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho de 15 de novembro de 2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos produtos alimentares. Bruxelas: União Europeia, 2005.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Draft guidance for industry: control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Federal Register*, v. 82, p. 4803-4805, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015: WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Genebra: World Health Organization, 2015.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bulletin of IDF*, Brussels, v. 345, p. 15-18, 2001.

Capítulo 13

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-13

LEPTOSPIROSE: ESTUDO DE UMA DÉCADA DOS CASOS DE ÓBITOS CONFIRMADOS POR PESQUISA IMUNO-HISTOQUÍMICA PELO NÚCLEO DE ANATOMIA PATOLÓGICA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Lis Adriana Maldonado¹; Cristina Takami Kanamura²; Silvia D'Andretta Iglesias³; Cinthya dos Santos Cirqueira Borges²

¹Discente do curso de especialização, Centro de Patologia - Núcleo de Anatomia Patológica, Instituto Adolfo Lutz, lis.maldonado@hotmail.com

²Pesquisador docente, Centro de Patologia - Núcleo de Anatomia Patológica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

³Médica Patologista do Centro de Patologia – Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz, silviaiglesias@uol.com.br

Resumo: a leptospirose é uma infecção causada por bactérias do gênero *Leptospira*, transmitida principalmente pelo contato com a urina de animais infectados, especialmente roedores. A infecção pode ser assintomática ou variar de leve a grave com danos sistêmicos. A doença é prevalente em ambientes urbanos, especialmente em regiões com infraestrutura deficiente. O diagnóstico é realizado por meio de testes sorológicos, detecção de DNA e com análises histopatológica e imuno-histoquímica para os casos fatais, realizadas pelo Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz, laboratório de referência. Este estudo retrospectivo e descritivo analisou dados histopatológicos de óbitos confirmados por pesquisa imuno-histoquímica para leptospirose entre 2013 e 2023, coletados de laudos anatomopatológicos disponíveis nos sistemas Gerenciamento de Ambiente Laboratorial - Ministério da Saúde (GAL) e Sistema Integrado de Gestão Hospitalar - Prodesp/SP (SIGH). Foram registrados 182 óbitos por leptospirose no período. As análises histopatológicas realizadas em 141 casos revelaram lesões características no fígado e rins, como desarranjo de hepatócitos e nefrite intersticial, evidenciando a gravidade da infecção. Os achados corroboram a literatura existente, reforçam a importância do diagnóstico precoce e da pesquisa imuno-histoquímica para entender melhor a patologia da leptospirose e suas complicações.

Palavras-chave: *Leptospira spp*, Imuno-Histoquímica, Patologia

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*. A transmissão ao ser humano ocorre pelo contato direto ou indireto com urina de animais infectados. Os roedores são os principais reservatórios, e quando infectados podem transmitir a doença cronicamente pela urina (WHO, 2009; CARABALLO *et al.*, 2024).

Está presente em todos os continentes, exceto Antártica. A leptospirose era inicialmente associada a áreas rurais, mas atualmente é comum em ambientes urbanos, especialmente em países em desenvolvimento. Os fatores como infraestrutura precária, saneamento deficiente e alta densidade populacional favorecem a proliferação de roedores e aumentam o risco de contaminação (BROWNE *et al.*, 2023). Segundo dados do Ministério da Saúde (2024), a leptospirose apresenta letalidade média de 9% no Brasil, e é considerada epidêmica durante períodos de chuva, especialmente em áreas metropolitanas.

A infecção provocada por *Leptospira spp* pode ser assintomática ou variar de leve a grave, com danos sistêmicos (MATEUS *et al.*, 2022).

Os métodos designados para diagnóstico da leptospirose *in vivo* são testes sorológicos específicos, como ELISA-IgM e a microaglutinação (MAT), e detecção de DNA via PCR em sangue. Para critério de confirmação de caso, são considerados o isolamento de *Leptospira spp* em sangue, a pesquisa de DNA por PCR, a análise anatomopatológica e imuno-histoquímica em tecidos. Esses exames devem ser realizados pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública - LACENs (BRASIL, 2014).

O laboratório de Imuno-histoquímica (IHQ) do Núcleo de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz – Central (NAP – IAL/SP), é referência regional para o diagnóstico da leptospirose (BRASIL, 2021), portanto recebe fragmentos de órgãos e tecidos, blocos de parafina, e lâminas para análise histopatológica e estudo imuno-histoquímico, com finalidade de fornecer esclarecimento de óbitos e manter vigilância epidemiológica da doença. Os órgãos analisados para investigar a suspeita histopatológica da doença são coração, pulmão, baço, fígado e rins. Entre os achados anatomopatológicos, a principal alteração histológica observada é uma lesão vascular difusa, que causa comprometimento dos órgãos, resultando em manifestações clínicas severas. (DUARTE *et al.*, 2024). Em relação à pesquisa imuno-histoquímica, o fígado e o rim são os órgãos elencados para a detecção padronizada de antígenos do patógeno. A pesquisa imuno-histoquímica tem como objetivo localizar antígenos e outras substâncias em amostras histológicas. Para isso emprega metodologias baseadas na ligação antígeno-anticorpo, utilizando enzimas, cromógenos e anticorpos (FERRO, 2014). Quando aplicada para diagnóstico de leptospirose, permite observar a presença dos antígenos em células endoteliais vasculares de diversos órgãos, e nos interstícios dos tecidos nos rins, em músculo esquelético e pulmões, permitindo um aprofundamento do estudo dessas lesões e melhor entendimento da patologia da doença. (ALVES, BACHI & VASSALO, 1999).

A infecção por *Leptospira spp* costuma ser subdiagnosticada devido às características inespecíficas de sua fase inicial e ter diagnóstico tardio por conta das particularidades dos métodos convencionais, condições que impactam a conduta de tratamento, e podem contribuir com a progressão de casos leves para formas graves (RODRIGUES, 2017). Nesse contexto, a pesquisa imuno-histoquímica não apenas auxilia na vigilância epidemiológica da leptospirose por meio da investigação de óbitos suspeitos, mas também pode servir como um método alternativo para o diagnóstico precoce da doença (UIP, AMATO NETO & DUARTE, 1992).

Apesar de ser uma doença tratável, a leptospirose é considerada um problema de saúde pública no Brasil e no mundo, e atualmente causa impacto socioeconômico

significativo. Conhecer melhor as características deste agravo é fundamental para melhor compreensão e enfrentamento do problema.

O objetivo deste trabalho foi avaliar dados histopatológicos de óbitos por leptospirose diagnosticados por imuno-histoquímica no NAP - IAL/SP entre 2013 e 2023.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo, transversal e descritivo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, sob o protocolo (CTC05-M/2020) e Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz (CAEE 36158820.0000.0059).

A partir dos registros internos dos casos, requisições originais e laudos anatomopatológicos liberados nos sistemas Gerenciamento de Ambiente Laboratorial - Ministério da Saúde (GAL) e Sistema Integrado de Gestão Hospitalar - Prodesp/SP (SIGH), o trabalho analisou dados histopatológicos de todos os óbitos confirmados por leptospirose, via pesquisa a imuno-histoquímica, entre 2013 e 2023.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre 2013 e 2023, foram contabilizados 182 óbitos com diagnóstico positivo para leptospirose através de exame imuno-histoquímico pelo NAP – IAL/SP. O ano de 2018 apresentou o maior número de casos confirmados no período do estudo, com 33 óbitos (18,1%), seguido por 2019 com 25 (13,8%).

O exame histopatológico foi realizado em 141 (77,5%) casos, aqueles em que as amostras clínicas foram enviadas fixadas em formalina tamponada a 10%, e passaram pelo processamento histológico e inclusão em bloco de parafina no NAP. Nos outros 41 (22,5%) casos, foi realizada apenas a pesquisa imuno-histoquímica.

Foram priorizadas as análises histopatológicas do fígado e rim, pois estes são órgãos que passam por comprometimento significativo na patologia da leptospirose (ALVES *et al.*, 1989), além disso, o anti-soro (anti-Leptospira) empregado nas pesquisas imuno-histoquímicas deste estudo permite identificar as características da infecção especificamente no fígado, rins e músculos (IGLEZIAS *et al.*, 2020).

As características histopatológicas mais frequentes no exame histopatológico do fígado foram o desarranjo de hepatócitos, infiltrado inflamatório, congestão, colestase (Gráfico 1).

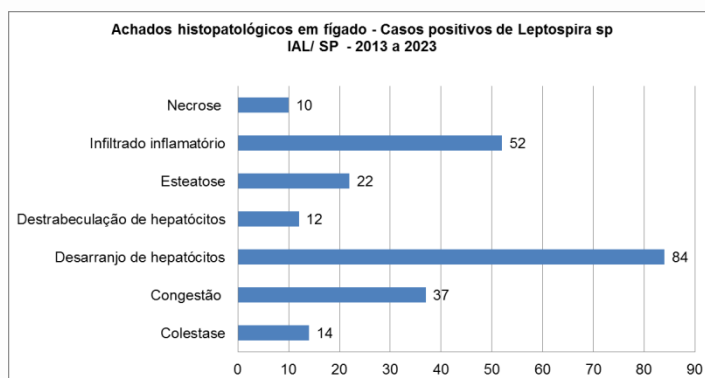


Gráfico 1 – Distribuição quantitativa das características histopatológicas observadas nas amostras hepáticas dos óbitos confirmados pela pesquisa imuno-histoquímica.
Fonte: NAP- IAL/SP (2024)

O desarranjo de hepatócitos é um achado recorrente em necropsias de leptospirose, reconhecido desde os primeiros estudos sobre a doença (Figura 1). Ocorre nas infecções em modelos experimentais e, de acordo com evidências de imuno-histoquímica e microscopia imunoeletrônica, está associado a depósitos de antígenos bacterianos na membrana celular (DE BRITO *et al.*, 2018).

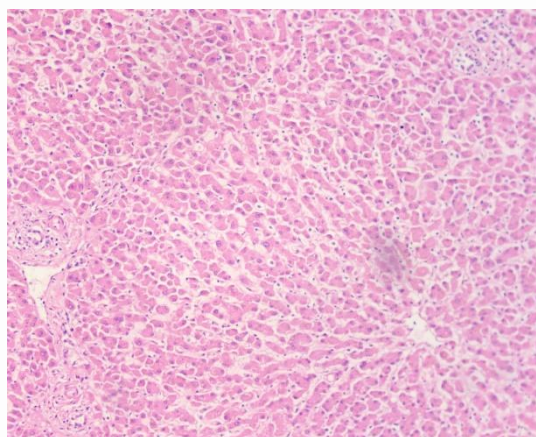


Figura 1 – Amostra de fígado apresentando desarranjo de hepatócitos (H&E, 200X)
Fonte: NAP – IAL/SP (2024)

As características histopatológicas descritas na Tabela 1 e no Gráfico 1 estão de acordo com a literatura e confirmam que as alterações histológicas do fígado observadas na leptospirose são predominantemente degenerativas, com inflamação nos espaços portais, e com reatividade das células de Kupffer, observada em dois casos deste estudo. Além disso, confirmam a presença de colestase e congestão em casos que evoluíram para óbito (DUARTE *et al.*, 2024).

Tabela 1 – Distribuição quantitativa das características histopatológicas observadas nas amostras do fígado dos óbitos confirmados pela pesquisa imuno-histoquímica.

Local de ocorrência	Colestase	Congestão	Infiltrado inflamatório	Desarranjo de hepatócitos
	n	n	n	n
Centrolobular	1	12	-	1
Centrolobular e mediozonal	-	4	-	-
Difuso	1	1	-	38
Mediozonal	1	4	-	2
Periportal	-	-	-	1
Portal	-	-	23	-
Portal e lobular	-	-	1	-
Portal linfomononuclear	-	-	1	-
Portal e mediozonal	1	-	-	1
Portal e sinusoidal	-	-	20	7
Sinusoidal	-	6	2	1
Zona 2 e 3	4	3	-	1
Zona 3	1	-	-	1
Vascular	-	1	-	-
Total	9	31	47	53

Fonte: NAP- IAL/SP (2024)

Entre as lesões histológicas observadas nos rins (Gráfico 2), a maior ocorrência de necrose tubular aguda e nefrite intersticial, fundamentando o fato do comprometimento renal ser uma complicação comum em casos graves de leptospirose, como nos óbitos avaliados, caracterizado por danos intersticiais e tubulares devido à ação nefrotóxica de *Leptospira spp* (DAHER, 2010).

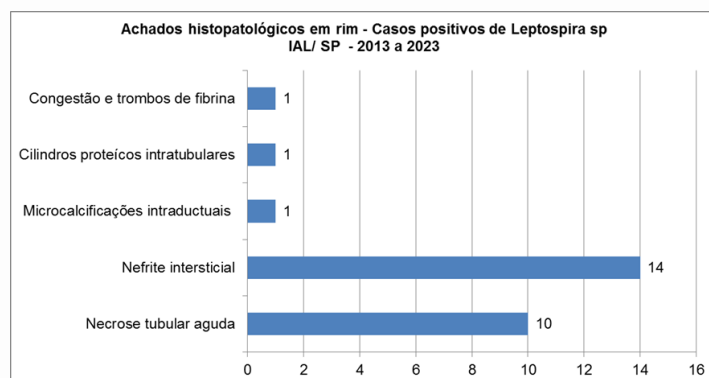


Gráfico 2 – Distribuição quantitativa das características histopatológicas observadas nas amostras renais dos óbitos confirmados pela pesquisa imuno-histoquímica.

Fonte: NAP- IAL/SP (2024)

A pesquisa de Araújo (2010) demonstrou que o uso de marcadores específicos na imuno-histoquímica para *Leptospira spp* não apenas localiza o antígeno nas células, mas também permite uma visualização detalhada da atividade inflamatória e das alterações morfológicas no tecido renal, demonstrando a relevância dos rins como órgãos alvo de investigação para diagnóstico da leptospirose.

Os rins têm importância significativa na evolução da leptospirose, e na epidemiologia da doença, pois a urina contaminada é a principal via de disseminação do patógeno. A colonização renal e a excreção persistente de *Leptospira spp* são comuns em animais reservatório, como roedores, mas já foi detectada em humanos que não apresentavam sintomas clínicos, condição crítica, que pode aumentar risco de contaminação e impactar estratégias de controle e prevenção (GANOZA *et al.*, 2010).

4. CONCLUSÃO

Os achados histopatológicos observados neste estudo corroboram a literatura, atualmente, existente e denotam a importância da pesquisa imuno-histoquímica para entender melhor a patologia da leptospirose e suas complicações.

Fatores como o subdiagnóstico, subnotificação e métodos de diagnóstico tardios ressaltam a necessidade urgente de mais estudos e investimento em pesquisas sobre o tema.

5. AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Cinthya dos Santos Cirqueira Borges, pela oportunidade, pelo apoio e por todos os ensinamentos compartilhados. A equipe do NAP – IAL/SP por todo suporte durante a elaboração deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

ALVES, V.A.F.; SIQUEIRA, S.A.C.; PESTANA, C.B. Patologia da leptospirose. Análise crítica dos aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos relevantes para a compreensão da patogenia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 49 (1)75-80, 1989. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/80/rial_49_1_1989/l662.pdf. Acesso em: 16 out 2024.

ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALLO, J. **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, v. 57, 1999.

ARAÚJO, E.R. *et al.* Acute kidney injury in human leptospirosis: an immunohistochemical study with pathophysiological correlation. **Virchows Archiv**, v. 456, p. 367-375, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00428-010-0894-8>

BRASIL. Ministério da Saúde - Assuntos, Saúde de A a Z, L, Leptospirose, Situação Epidemiológica, 2024. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leptospirose/situacao-epidemiologica>. Acesso em: 04 out. 2024.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Leptospirose diagnóstico e manejo clínico**. Brasília, 2014 <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leptospirose-diagnostico-manejo-clinico2.pdf>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde. Guia para diagnóstico laboratorial em saúde pública: orientações para o sistema nacional de laboratórios de saúde pública. Brasília, 363

p; 2021. Disponível em:
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_laboratorial_sistema_nacional.pdf. Acesso em: 25 out 2024.

BROWNE, E. S. *et al.* Prevalence of human leptospirosis in the Americas: a systematic review and meta-analysis. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 47, p. e126, 2023. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.126>

CARABALLO, L. *et al.* Outbreak of Intermediate Species *Leptospira venezuelensis* Spread by Rodents to Cows and Humans in L. interrogans Endemic Region, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, v. 30, n. 8, p. 1514, 2024. DOI: 10.3201/eid3008.231562

DAHER, E.D.F.; ABREU, K.L.S.; SILVA JUNIOR, G.B. Insuficiência renal aguda associada à leptospirose. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 32, p. 408-415, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-28002010000400010>

DE BRITO, T.; SILVA, A.M.G.; ABREU, P.A.E. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, p. e23, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201860023>

DUARTE, M.I.S. *et al.* **Doenças Infecciosas: Visão Integrada da Patologia, da Clínica e dos Mecanismos Patogênicos**. Artmed Editora, 2024.

FERRO, A.B. Imunohistoquímica. 2014. Disponível em:
<http://hdl.handle.net/10400.21/4569> Acesso em: 14 out 2024.

GANOZA, C.A. *et al.* Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by *Leptospira*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 2, p. e612, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000612>

IGLEZIAS, S. D. *et al.* Immunohistochemical detection of Lp25 and LipL32 proteins in skeletal and cardiac muscles of fatal human leptospirosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, p. e85, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202062085>

MATEUS, L.B.O. *et al.* **Zoonoses tropicais negligenciadas no Brasil**. Congresso Internacional de Saúde Única (Interface Mundial), cap. 111, p. 20 -229, 2022. DOI: 10.29327/icidsuim20221.459678

RODRIGUES, C. M. O círculo vicioso da negligência da leptospirose no Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 2017; 76:e1729. Disponível em:
http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial76_completa/artigos-separados/1729.pdf Acesso em: 06 out 2024.

UIP, D. E.; AMATO NETO, V.; DUARTE, M. S. Diagnóstico precoce da leptospirose por demonstração de antígenos através de exame imuno-histoquímico em músculo da

panturrilha. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 375-381, 1992. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651992000500001>

WHO - World Health Organization. Leptospirose: Fact Sheet. Reference numbers B4221, 2009. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/205437/B4221.pdf?sequence=1>. Acesso em: 02 out. 2024.

Capítulo 14

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-14

CONTROLE DE QUALIDADE E ASPECTOS REGULATÓRIOS DOS PRODUTOS DE CANNABIS PARA FINS MEDICINAIS NO BRASIL

Elaine Moura Ferreira¹; Márcia Lombardo²

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública/
Unidade didática Instituto Adolfo Lutz - CEFOR/SUS – IAL.

E-mail: e.laine1996@hotmail.com

²Docente/Pesquisador do Núcleo de Ensaaios Físicos e Químicos em
Medicamentos/Instituto Adolfo Lutz – NFQM – IAL.

E-mail: marcia.lombardo@ial.sp.gov.br

Resumo: O uso terapêutico dos derivados da Cannabis está causando grande repercussão na comunidade médica e científica. Neste trabalho foi realizada uma revisão bibliográfica narrativa sobre Produtos de Cannabis (PC) para fins medicinais no Brasil, por meio de buscas *online* de artigos científicos, manuais e normas em bases de dados de pesquisa e sites oficiais de agências reguladoras. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária definiu os PC medicinais como uma categoria regulatória temporária e estabeleceu procedimentos para autorizar empresas nacionais a fabricar, importar e comercializar estes produtos no país, além de requisitos de prescrição, monitoramento e fiscalização. É importante que os PC medicinais atendam a limites de canabidiol (CBD) e tetrahidrocanabinol (THC) e os principais métodos analíticos são a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência. Nos últimos anos o Brasil apresentou avanços no tema e criou muitos desafios, especialmente nas áreas regulatória e de produção e controle farmacêutico.

Palavras-chave: Cannabis sativa; legislação farmacêutica; métodos analíticos; segurança do paciente

INTRODUÇÃO

A *Cannabis sativa* L. é uma espécie de grande interesse em pesquisas ao redor do mundo, demonstrando propriedades farmacológicas que auxiliam o tratamento de diversas condições clínicas como epilepsia, fibromialgia, enxaqueca, ansiedade, doença de Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla, transtorno do espectro autista, dentre outras (SBP, 2019; GREGÓRIO; MASCARENHAS, 2022; VIANA et al., 2022; VIANA et al., 2024).

No Brasil, o acesso a Produtos de Cannabis (PC) medicinal se dá por meio de prescrição médica e importação individual, conforme procedimentos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Mais recentemente, o acesso foi facilitado com a Autorização Sanitária (AS) de empresas nacionais para fabricar, importar e comercializar PC no país (ANVISA, 2019, 2022).

A concessão da AS e os requisitos para a fabricação, prescrição, comercialização e fiscalização dos PC medicinal foram estabelecidos pela RDC 327/2019 da ANVISA. Esse documento destaca a importância do uso criterioso e do controle minucioso da composição.

No futuro, estes produtos poderão ser registrados como medicamentos após a apresentação de estudos clínicos completos que comprovem a sua eficácia e segurança (ANVISA, 2019).

O mercado de Cannabis se encontra em ascensão, incentivando a pesquisa e a cadeia produtiva. Trata-se de um tema atual e relevante para a área de desenvolvimento, controle de qualidade e regulação de produtos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica narrativa sobre PC medicinal no Brasil, abordando aspectos regulatórios e de controle de qualidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas buscas de documentos normativos nos sítios eletrônicos oficiais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do *Food and Drug Administration* (FDA, EUA). Além disso, foram realizadas buscas de artigos científicos e técnicos na ferramenta de pesquisa Google Acadêmico. Após uma pesquisa ampla com a palavra “Cannabis” foram selecionados artigos relacionados com uso terapêutico, regulação e controle de qualidade, priorizando-se artigos nacionais publicados a partir de 2019. Buscas complementares foram realizadas nas ferramentas de pesquisa Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e Pubmed (*National Library of Medicine*, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aspectos regulatórios dos Produtos de Cannabis (PC) para fins medicinais

A escolha de tratamento com um PC deve ser indicada a pacientes não responsivos a tratamentos convencionais ou quando não existem alternativas viáveis. O prescritor assume a responsabilidade do tratamento e deve orientar o paciente ou o responsável legal sobre o uso correto, riscos e benefícios, e este deve estar de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A prescrição requer controle especial, que demanda notificação de receita em itens “Notificação A e B” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; ANVISA, 2019).

A comercialização de PC em território nacional somente é permitida para produtos medicinais industrializados de administração por via oral ou nasal, contendo derivados da espécie *C. sativa*, sendo proibida a manipulação de fórmulas magistrais. Assim, para a fabricação no Brasil, a empresa deve importar o insumo a granel (derivado vegetal ou fitofármaco) ou o produto final, sendo vetada a comercialização da planta ou de suas partes, sob qualquer modo de preparo (ANVISA, 2019).

Além disso, os PC para uso medicinal devem atender aos limites de canabidiol (CBD) e tetrahydrocannabinol (THC) em sua composição. O percentual de CBD deve ser maior que o de THC, sendo que este último não deve ultrapassar 0,2%, salvo quando se trata de cuidados paliativos, onde essa porcentagem pode ser maior (ANVISA, 2019).

Até o ano de 2023, nove empresas brasileiras possuíam AS para a fabricação ou importação de extratos à base de Cannabis (espectro completo com CBD padronizado) e treze empresas para soluções de CBD (purificado), sendo estes produtos de uso oral, com concentrações variadas de CBD e menos de 0,2% de THC. Entre 2021 e 2023 foi autorizada a comercialização de onze extratos de Cannabis e dezessete soluções de CBD, sendo o ano 2022 com maior ênfase de autorização dessas duas modalidades de produto (LOMBARDO, 2023a, 2023b).

Futuramente, com os avanços das pesquisas clínicas, os PC para uso medicinal poderão ser reclassificados como medicamento fitoterápico ou medicamento específico (fitofármaco) após a apresentação de informações dos estudos clínicos completos, em um período de cinco anos a partir da obtenção da AS (ANVISA, 2019; SANTOS; VASCONCELOS, 2020). A Figura 1 mostra as categorias regulatórias de medicamentos no Brasil.

Figura 1- Classificação regulatória para o registro de medicamentos no Brasil.

	Produto de matéria-prima vegetal obtido de uma ou mais espécies vegetais (simples ou composta).
Medicamento Fitoterápico	RDC nº 26 de 13/05/2014
	Substância ativa com estrutura química definida, isolada a partir de matéria-prima vegetal. Substâncias obtidas por processos de semissíntese ou modificação molecular não se enquadram nessa categoria.
Medicamento Específico	RDC nº 24 de 14/06/2011
	Medicamento que contenha nova molécula (novo Insumo Farmacêutico Ativo).
Medicamento sintético	RDC nº 753 de 28/09/2022

Fonte: elaborado pelas autoras (2024), segundo a legislação da ANVISA.

O Mevatyl® (solução oral spray) é o primeiro medicamento à base de Cannabis registrado no Brasil. Trata-se de um medicamento específico (fitofármaco), pois contém CBD e THC purificados a 25 e 27 mg/mL, sendo o THC em alta concentração. Conhecido como Sativex em outros países, este medicamento é indicado no tratamento sintomático de pacientes com esclerose múltipla que não respondem a outros fármacos antiespásticos (GREGÓRIO; MASCARENHAS, 2022; MEVATYL, 2023).

Nos Estados Unidos existem alguns produtos de Cannabis medicinal aprovados pelo FDA. O Epidiolex® (solução oral de CBD purificado) é indicado no tratamento da epilepsia refratária em pacientes adultos e pediátricos portadores das síndromes de Lennox-Gastaut, Dravet ou Complexo de Esclerose Tuberosa. O Cesamet® (nabilona), Marinol® e Syndros® (dronabinol) consistem em canabinoides sintéticos indicados no tratamento de náuseas relacionadas à quimioterapia. O dronabinol também pode ser utilizado como auxiliar no tratamento de anorexia em pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (ABU-SAWWA; STEHLING, 2020; FDA, 2023, 2024).

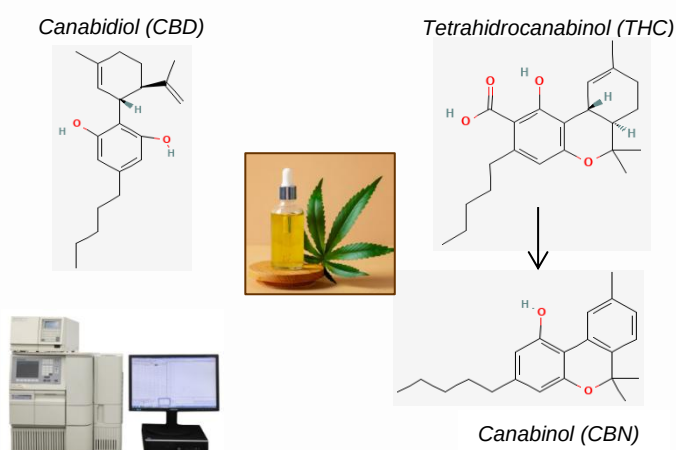
Controle de Qualidade dos Produtos de Cannabis (PC) para fins medicinais

Os PC para uso medicinal apresentam matrizes complexas e heterogêneas e estão inseridos em diferentes contextos regulatórios ao redor do mundo. A qualidade variável torna necessária a padronização de processos produtivos, métodos analíticos e especificações de qualidade, de modo a garantir a segurança do paciente e a reprodutibilidade das pesquisas básicas e clínicas (SARMA et al., 2020).

Segundo a legislação brasileira, os PC para uso medicinal devem apresentar teor de THC reduzido, devido aos seus efeitos alucinógenos, euforizantes e de relaxamento. Extratos ricos em THC podem agravar as crises convulsivas e causar surtos psicóticos em pacientes com determinadas síndromes. Logo, o monitoramento da qualidade desses produtos é essencial para a eficácia e a segurança da terapêutica (CARVALHO et al., 2020; GREGÓRIO; MASCARENHAS, 2022).

Os componentes majoritários da Cannabis (Figura 2) são o ácido tetrahydrocannabinólico (THCA) e o ácido canabidiólico (CBDA), que ao sofrerem descarboxilação são convertidos em suas formas neutras e ativas, THC e CBD. Dependendo das condições de armazenamento, pode ocorrer a degradação do THC em canabinol (CBN). Todos estes canabinoides são marcadores úteis para o controle de qualidade de insumos e produtos (CARVALHO et al., 2020; DANTAS et al., 2023).

Figura 2 – Principais canabinoides de *Cannabis sativa* L.



Fonte: elaborado pelas autoras (2024), utilizando o PubChem (National Library of Medicine, EUA).

A elaboração de monografias oficiais para a avaliação laboratorial de PC para uso medicinal se encontra em discussão em diversos países. Atualmente, os métodos utilizados são aqueles desenvolvidos e validados pelos próprios fabricantes (DANTAS et al., 2023). Diversos programas internacionais voluntários foram iniciados nos últimos anos, visando à elaboração de guias e consensos, desde o cultivo da espécie até a embalagem e rotulagem do produto final (SARMA et al., 2020).

Os métodos descritos na literatura para a determinação de canabinoides incluem a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia em fluido supercrítico. A CLAE representa uma boa opção, e quando é acoplada a espectrometria de massas torna-se muito eficiente para a análise de derivados da Cannabis (CARVALHO et al., 2020; DANTAS et al., 2023).

No Brasil, as principais barreiras enfrentadas no controle de qualidade de PC medicinal são a demora na importação e o alto custo das substâncias químicas de referência, sendo que o transporte e o armazenamento demandam atenção. Além disso, os diferentes veículos oleosos usados na composição dos produtos dificultam a padronização dos métodos de extração e análise (CARVALHO et al., 2020).

Métodos de extração e análise por CLAE em fase reversa já foram propostos para identificar e quantificar canabinoides em diferentes tipos de amostra, como resinas, extratos e soluções orais, de modo a auxiliar as ações de Vigilância Sanitária e contribuir com futuras implementações na Farmacopeia Brasileira. Os autores utilizaram coluna C18, eluição no modo gradiente e detecção no ultravioleta, empregando detector de arranjo de diodos (CARVALHO et al., 2020; DANTAS et al., 2023).

Trabalho desenvolvido por um grupo de especialistas da Farmacopeia Americana sugeriu como atributos de qualidade os aspectos morfológicos da inflorescência da Cannabis, ausência de matérias orgânicas estranhas na droga vegetal, avaliação de cinzas e atividade de água. Os autores também discutiram a avaliação de canabinoides e terpenos quanto à identidade (cromatografia em camada delgada de alta eficiência) e teor (CLAE e CG), considerando diferentes quimiotipos da planta. Além disso, apontaram a necessidade de limites para contaminantes em insumos e produtos, como resíduos de pesticidas, microrganismos patogênicos, micotoxinas e metais pesados. A demanda por métodos capazes de avaliar adulterações com canabinoides sintéticos também foi destacada (SARMA et al., 2020).

CONCLUSÕES

Nos últimos anos o Brasil apresentou avanços na regulação de produtos de Cannabis com finalidade medicinal, especialmente com a autorização sanitária de empresas para fabricar, importar e comercializar esses produtos no país e o estabelecimento de requisitos para a produção, controle e fiscalização. A discussão sobre monografias farmacopeicas e a condução de estudos clínicos se encontram em andamento em vários países, o que é fundamental para a evolução da terapêutica com derivados de Cannabis. Portanto, esta temática está trazendo muitos desafios às áreas da saúde e da vigilância sanitária e pode contribuir fortemente para atender as necessidades de uma população vulnerável.

REFERÊNCIAS

ABU-SAWWA, R.; STEHLING, C. Epidiolex (cannabidiol) primer: frequently asked questions for patients and caregivers. **The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics**, v.25, n.1, p.75-7, 2020.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC n.327 de 9 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para a fabricação e a importação, (...) de produtos de Cannabis para fins medicinais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União** n.239, Brasília, Sec.1:194.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC n.660 de 30 de março de 2022. Define os critérios e os procedimentos para a importação de Produto derivado de Cannabis,...). **Diário Oficial da União** n.62, Brasília, Sec.1:333.

CARVALHO, V.M.; AGUIAR, A.F.L.; BARATTO, L.C.; SOUZA, F.L.C.; ROCHA, E.D. Quantificação de canabinoides em extratos medicinais de Cannabis por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v.43, n.1, p.90-7, 2020.

DANTAS, A.S.C.L.; SOUZA, M.N.; LIMA, P.C.; LIMA, M.E.D.; SANTANA, D.S.; MARANHÃO, R.L.N.; et al. Desenvolvimento de metodologia para determinação de canabinoides em produtos à base de Cannabis para fins medicinais. **Química Nova**, v.46, n.3, p.282-9, 2023.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (EUA). FDA and Cannabis: Research and Drug Approval Process [Internet]. Maryland: U.S. Food and Drug Administration; 2023 [citado 14 ago. 2024]. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-and-cannabis-research-and-drug-approval-process>>

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (EUA). FDA Regulation of Cannabis and Cannabis-Derived Products, Including Cannabidiol (CBD) [Internet]. Maryland: U.S. Food and Drug Administration; 2024 [citado 12 set. 2024]. Disponível em: <<https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-regulation-cannabis-and-cannabis-derived-products-including-cannabidiol-cbd>>

GREGÓRIO, L.E.; MASCARENHAS, N.G. O uso medicinal da *Cannabis sativa* L.: regulamentação, desafios e perspectivas no Brasil. **Revista Concilium**, v.22, n.3, p.191-212, 2022.

LOMBARDO, M. Extrato de *Cannabis sativa* L. para fins medicinais no Brasil. In: Anais do IV Congresso Norte-Nordeste de Saúde Pública (Online) - Resumos Expandidos. Triunfo: Editora Omnis Scientia, v.1, p.522-5, 2023a. Disponível em: <<https://doi.org/10.47094/IVCNNEP.2023/RE>>

LOMBARDO, M. Produtos de Cannabis autorizados no Brasil: solução de canabidiol. In: Anais do IV Congresso Norte-Nordeste de Saúde Pública (Online) - Resumos Expandidos. Triunfo: Editora Omnis Scientia, v.1, p.526-9, 2023b. Disponível em: <https://doi.org/10.47094/IVCNNEP.2023/RE>

MEVATYL. Bula do profissional de saúde. Vargem Grande Paulista/SP: Biopas Brasil Produtos Farmacêuticos Ltda. Bula aprovada pela ANVISA em 13/12/2023. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/>>. Acesso em: 14 ago. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PRT n.344 de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. **Diário Oficial da União** n.91, Brasília, Sec.1:3.

SANTOS, M.J.L.S.; VASCONCELOS, B. Breve histórico da recente regulamentação da Cannabis para fins medicinais e científicos no Brasil. **Revista do Advogado**, v.XL, n.146, p.96-104, 2020.

SARMA, N.D.; WAYE, A.; ELSOHL, M.A.; BROWN, P.N.; ELZINGA, S.; JOHNSON, H.E.; et al. Cannabis Inflorescence for Medical Purposes: USP Considerations for Quality Attributes. **Journal of Natural Products**, v.83, n.4, 1334-51, 2020.

SBP. SOCIEDADE BRASILEIRA DE PEDIATRIA. Departamento Científico de Neurologia e Departamento Científico de Medicina da Dor e Cuidados Paliativos. **Indicações para uso da Cannabis em pacientes pediátricos: uma revisão baseada em evidências**. São Paulo: SBP, 2019. 10p.

VIANA, F.G.A.; FILHO, A.M.; OLIVEIRA, C.R.V.; AUGUSTO, M.F.; SILVA, R.V.M.; ARAUJO, T.R.C.; et al. Cannabis medicinal como conduta terapêutica: uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica Acervo Médico**, v.5, e10059, p.1-8, 2022.

VIANA, T.R.X.; VENUTE, L.; COELHO, A.; SOUZA, D.R.; XAVIER, R.; CESAR, A.C.; et al. Cannabis medicinal: uma revisão sobre as perspectivas atuais e desafios futuros na prática clínica. **Journal of Research in Medicine and Health**, v.2, e202401, p.1-11, 2024.

Capítulo 15

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-15

CRONOBACTER SPP.: FONTE DE CONTAMINAÇÃO, RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E ESTRATÉGIAS DE CONTROLE

Pamella do Nascimento Santos¹; Gleize Villela²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - IAL - CLR Campinas
E-mail: pamellasantos3@hotmail.com

²Docente/pesquisadora do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas – IAL - CLR Campinas

Resumo: *Cronobacter* spp. são bactérias oportunistas que pertencem a família *Enterobacteriaceae*, comumente associadas às contaminações em alimentos desidratados, especialmente as fórmulas infantis e cereais. Sua capacidade de sobreviver em ambientes secos e temperaturas elevadas favorece sua persistência nesses alimentos, tornando-se uma ameaça significativa para neonatos, idosos e imunocomprometidos, grupos mais suscetíveis a infecções graves. Este estudo apresenta uma revisão da literatura destacando as possíveis vias de contaminação que podem ocorrer em diferentes estágios ao longo da cadeia produtiva, ressaltando a capacidade dessa bactéria de sobreviver, se adaptar à hostilidade de diversos ambientes formando biofilmes e sua crescente resistência a antimicrobianos. Além disso, a inclusão de notificação obrigatória das infecções por *Cronobacter* spp., sugerindo reforço na fiscalização, melhoria dos métodos de identificação como o uso de técnicas moleculares e a capacitação de profissionais e ambientes preparados para lidarem com esse microrganismo.

Palavras-chave: fórmulas infantis; doenças transmitidas por alimentos; *Cronobacter* spp.

INTRODUÇÃO

Cronobacter spp. pertence à família *Enterobacteriaceae*, Gram-negativas, catalase positivas, oxidase negativas e anaeróbias facultativas. Foram anteriormente classificadas como variantes de *Enterobacter cloacae* até sua reclassificação como *Cronobacter* spp. em 2007 (CECHIN *et al.*, 2022).

Atualmente são descritas sete espécies: *C. condimenti*; *C. dublinensis*; *C. malonaticus*; *C. muytjensii*; *C. sakazakii*; *C. turicensis* e *C. universalis*. Embora todas as espécies tenham sido isoladas de espécimes clínicos, a maioria das infecções relatadas foram causadas por *C. sakazakii*, *C. malonaticus* e *C. turicensis* (MOUSAVI *et al.*, 2023).

A bactéria está amplamente distribuída no ambiente, sendo isolada do solo, água e fezes de humanos e animais. A principal fonte de contaminação parece ser as plantas, com alta prevalência em alimentos como cereais e produtos prontos para consumo (LIU *et al.*, 2024).

Os casos mais graves estão associados com as variantes *C. sakazakii*, frequentemente associados à meningite, responsáveis por altas taxas de infecções e letalidade em neonatos. *C. malonaticus* está relacionada a casos graves em adultos. (CECHIN *et al.*, 2022).

O tratamento para infecções por *Cronobacter* spp. consiste no uso de antibióticos como ampicilina, gentamicina e cloranfenicol. Embora o uso destes medicamentos apresente bons resultados, já foi identificada resistência à ampicilina e cefalosporinas de primeira e segunda geração, por isso, cefalosporinas de terceira geração são recomendadas. A bactéria possui resistência intrínseca a macrolídeos e clindamicina, além de alguns isolados produzirem β -lactamases, enzimas que inativam a ação de determinados antibióticos β -lactâmicos (CARVALHO *et al.*, 2020).

A virulência de *Cronobacter* spp. é considerada multifatorial e ainda não completamente compreendida. No entanto, já foram identificados fatores importantes, como a produção de fímbrias e proteínas de membrana externa (OmpA e OmpX), que auxiliam na formação de biofilmes, adesão às células intestinais e disseminação pela corrente sanguínea. Além disso, a bactéria produz sideróforos, que captam ferro, essencial para seu crescimento. Outros fatores incluem a produção de toxinas, como uma enterotoxina de 66 kDa e hemolisinas, que contribuem para a patogenicidade (GARBOWSKA *et al.*, 2023).

O presente estudo tem como objetivo realizar uma breve revisão da literatura sobre os diferentes ambientes em que *Cronobacter* spp. já foi isolado, destacando as possíveis vias de contaminação ao longo da cadeia produtiva, e as características mais importantes relacionadas a sua patogenicidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado através de revisão bibliográfica sobre contaminações em alimentos e infecções causadas por *Cronobacter* spp. A pesquisa baseou-se em artigos científicos em português e inglês obtidos de bases de dados como, PubMed e Scielo, tanto em inglês quanto em português. Além disso, foram feitas buscas sobre atualizações das normas e notificações de lotes de alimentos contaminados, bem como sobre o preparo de fórmula infantil, nos bancos de dados de órgãos competentes, como o Ministério da Saúde e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A busca ocorreu entre maio e setembro de 2024, resultando no levantamento de 41 artigos, dos quais 20 foram excluídos e 21 utilizados, especificando as cepas isoladas associadas aos alimentos e infecções.

MÉTODOS DE ISOLAMENTO/IDENTIFICAÇÃO E NORMAS

A legislação brasileira incluiu a análise de *Cronobacter* spp. em alimentos infantis com a publicação da Resolução RDC 331/2019 e a Instrução Normativa IN 60/2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que entrou em vigor em dezembro de 2020 (ANVISA, 2019).

A RDC nº 724, de 01/07/2022, da ANVISA, dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação, estabelecendo limites para microrganismos específicos e orientações sobre a realização das análises com métodos validados e reconhecidos internacionalmente por órgãos competentes, como ISO, AOAC, BAM e entre outros. Utiliza essas referências a fim de garantir a qualidade e segurança alimentar (ANVISA, 2022).

Alguns métodos descritos que apresentam boa acurácia para a identificação das espécies são a reação em cadeia da polimerase (PCR), Multilocus Sequence Typing (MLST), que é eficiente para tipagem e identificação e mais recentemente o MALDI-TOF/MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) (CARVALHO *et al.*, 2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Brasil, uma revisão bibliográfica dos casos de infecções por *Cronobacter* spp. reportados no período de 1997-2013 mostrou maior ocorrência de infecções em neonatos. Entretanto, o número preciso de casos não pôde ser determinado e, em alguns casos, a identificação fidedigna da bactéria foi considerada questionável. Na maioria dos casos relatados o veículo de contaminação não foi investigado ou não pôde ser determinado, não sendo possível especificar se os casos foram transmitidos por alimentos contaminados. Os dados disponíveis na literatura parecem não ser condizentes com a possível realidade, pois os métodos fenotípicos utilizados nos laboratórios clínicos podem não ser adequados levando a subestimação da ocorrência do microrganismo (BRANDÃO *et al.*, 2017).

Em fevereiro de 2022 foi relatado pela agência regulamentadora do departamento de saúde dos Estados Unidos (Food and Drug Administration – FDA), um surto envolvendo a presença de *Cronobacter* em lotes de fórmulas infantis. Em 04/03/2022 a ANVISA emitiu um alerta de recolhimento internacional voluntário dos produtos das marcas Human Milk Fortifier, Similac PM 60/40, Similac, Alimentum e EleCare. A ANVISA recomendou que os consumidores verificassem os números de lote e interrompessem o uso dos produtos inclusos no recall, e posteriormente a representante da Abbott no Brasil relatou que não houve importação dos produtos. Em 2024, a ANVISA novamente emitiu um alerta sobre a contaminação em fórmulas infantis. A marca Nutramigen LGG. A U.S. FDA detectou contaminação por *C. sakazakii* nos lotes ZL3FHG, ZL3FMH, ZL3FPE, ZL3FQD, ZL3FRW e ZL3FX, fabricados pela Reckitt/Mead Johnson e importados pela Mead Johnson Brasil. A ANVISA não identificou esses lotes no Brasil e por precaução a importação e comercialização foram proibidas no país (ANVISA, 2022; ANVISA, 2024).

Houve um aumento significativo na comercialização de fórmulas infantis entre o período de 2005 e 2019 sendo a China o principal consumidor desse produto devido à baixa taxa de amamentação, seguida pelos EUA, Nova Zelândia e América do Sul. Em relação à produção, a China e o Sudeste Asiático são responsáveis por metade da produção mundial, enquanto a União Europeia responde por um terço do total. Devido à comercialização entre países, é recomendado que as agências regulamentadoras optem por aderir às diretrizes para critérios microbiológicos e de fabricação do Codex Alimentarius, recomendadas pela FAO/OMS (MOUSAVI *et al.*, 2023).

Estudos de métodos de biocontrole aplicados a *C. sakazakii* enfatizam opções naturais para controle de crescimento em fórmulas infantis reconstituídas, sendo uma alternativa para o uso de conservantes químicos. Alguns exemplos de compostos com efeito antagonista que podem ser usados no biocontrole são os derivados de plantas (como óleos essenciais e extrato de ervas), os probióticos e os bacteriófagos. Alguns desses compostos bioativos atuam causando a perda da integridade da membrana celular da bactéria, impedindo a formação de biofilmes. Como consequência, ocorre inibição da capacidade de adesão, da resistência ao calor e desidratação e diminuindo as chances de infecções (CHAUHAN *et al.*, 2020).

Embora o uso de probióticos, bacteriófagos e compostos vegetais tenham mostrado eficácia, ainda existem desafios para sua implementação em larga escala, especialmente em termos de padronização de doses e garantia de segurança alimentar, trazendo uma perspectiva sustentável e segura para a indústria de alimentos, especialmente em relação à resistência antimicrobiana crescente. Um ponto importante é que, apesar de algumas estratégias biológicas serem promissoras, nenhuma delas elimina completamente o patógeno. Os resultados indicam que uma abordagem combinada, que associa agentes biológicos com tratamentos físico-químicos, pode ser a chave para garantir uma fórmula infantil segura (CHAUHAN *et al.*, 2020).

Com o objetivo de conhecer as vias de transmissão de *Cronobacter* spp. por meio dos alimentos, as possíveis fontes de contaminação como ambiente doméstico, da indústria de produção e os diferentes alimentos envolvidos tem sido investigado ao redor do mundo, os resultados dos estudos usados como referência nessa revisão estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Relatos de isolamento de *Cronobacter* spp. em alimentos e ambientes no período de 2018 a 2024.

Tipos de amostras e locais de coleta	Nº total de amostras	Espécies isoladas	Total de positivas	Espécies prevalentes (nº)	Referência
Instalações de produção de leite em pó (EUA).	100	<i>Cronobacter</i> spp.	69	–	HAYMAN et al., 2020.
Alimentos vegetais prontos para consumo (Polônia).	24	<i>C. sakazakii</i> <i>C. malonaticus</i>	24	<i>C. sakazakii</i> (15)	GARBOWSKA et al., 2023.
Ambientes internos de residências (EUA).	2810	<i>C. sakazakii</i> <i>C. malonaticus</i> <i>C. turicensis</i>	176	<i>C. sakazakii</i> (122)	SAMADPOUR et al., 2024.
Produtos do varejo (EUA).	4009	<i>C. dublinensis</i> <i>C. muytjensii</i> <i>C. universalis</i>	239	<i>C. sakazakii</i> (204)	
Leite cru e amostras ambientais de fazendas leiteiras (China).	1.115	<i>C. sakazakii</i> <i>C. malonaticus</i> <i>C. dublinensis</i>	40	<i>C. sakazakii</i> (30)	LIU et al., 2024.
Produtos congelados à base de farinha. Carne de frango, pato, bovina, carneiro e porco congeladas (China).	576	<i>C. sakazakii</i> <i>C. malonaticus</i> <i>C. turicensis</i> <i>C. dublinensis</i>	154	<i>C. sakazakii</i> (109)	LI et al., 2023.
Produtos lácteos destinado a adultos imunocomprometidos e idosos.	100	<i>C. sakazakii</i> <i>C. malonaticus</i>	4	<i>C. sakazakii</i> (3)	FLORES et al., 2023.
Saladas prontas para consumo (Brasil).	30	<i>C. sakazakii</i> <i>C. malonaticus</i>	13	<i>C. sakazakii</i> (8)	VASCONCELLOS, 2018.
Comida japonesa de restaurantes (Brasil).	30	<i>C. dublinensis</i>	14	<i>C. sakazakii</i> (10)	
Formulas infantis desidratadas (Brasil e outros países).	77	<i>C. sakazakii</i> <i>C. malonaticus</i>	–	–	CARVALHO, 2020.
Cereais infantis (Brasil).	75		20	<i>C. sakazakii</i> (13)	

Fonte: Próprio autor (2024).

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados na literatura evidenciam da relevância de incluir *Cronobacter* spp. como patógeno emergente, especialmente em razão das infecções graves que causam nos grupos de risco, predominantemente adquiridas por meio de alimentos desidratados, como fórmulas infantis e cereais. A contaminação pode ocorrer em diferentes estágios da cadeia produtiva, desde o cultivo até o produto final e consumo, evidenciando a capacidade do patógeno de sobreviver em ambientes hostis e formar biofilmes em superfícies de difícil higienização. O estudo destaca a necessidade de aprimorar métodos de detecção, como o uso de técnicas moleculares. Reforçando a importância do trabalho da vigilância sanitária e epidemiológica em ambientes hospitalares, industriais e domésticos, além de implementar práticas rigorosas de controle sanitário. Outro ponto destacado é a crescente resistência antimicrobiana do *Cronobacter* spp., que demanda cuidados na escolha de antibióticos e desinfetantes. É sugerido por autores que a inclusão de *Cronobacter* spp. na lista de notificações compulsórias seria fundamental para monitorar e reduzir os riscos de infecções graves principalmente nos grupos de risco.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Anvisa alerta sobre recolhimento de fórmulas infantis das marcas Human Milk Fortifier, Similac PM 60/40, Similac, Alimentum e EleCare**, 2022. Disponível em: www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-alerta-sobre-recolhimento-de-formulas-infantis-marca-similac-alimentum-e-elecare.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Anvisa proíbe lotes da fórmula infantil Nutramigen**, 2024. Disponível em: www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2024/anvisa-proibe-lotes-da-formula-infantil-nutramigen.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 331/2019**, de 23 de dezembro de 2019. Disponível em: www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC N° 724, de 01/07/2022**. Disponível em: https://anvisa.gov.br/legis/datalegis.net/action/UrlPublicasAction.php?acao=abrirAtoPublico&num_ato=00000724&sgl_tipo=RDC&sgl_orgao=RDC/DC/ANVISA/MS&vlr_ano=2022&seq_ato=002&cod_modulo=134&cod_menu=1696

BRANDÃO, M. L. L. et al. ***Cronobacter* spp.: infecções, ocorrência e regulação em alimentos – uma revisão no Brasil**. Braz J Food Technol [Internet]. 2018;21. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.7417>.

CARVALHO, G. G. **Identificação, caracterização molecular e virulência de *Cronobacter* spp. e outros micro-organismos patogênicos em alimentos infantis**

desidratados. 2020. Disponível em:
https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNICAMP30_2a024a5355adf3366d1c18ddb0b48cca.

CECHIN, C. DA F. et al. ***Cronobacter* spp. in foods of plant origin: occurrence, contamination routes, and pathogenic potential.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, p. 1–15, 22 jul. 2022. Disponível em:
<https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2101426>.

CHAUHAN, R. et al. **Trending biocontrol strategies against *Cronobacter sakazakii*: A recent updated review.** Food Research International, v. 137, n. doi:10.1016/j.foodres.2020.109385, p. 109385, nov. 2020. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33233087/>.

FLORES J. P. et al. **Characterization of *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonaticus* Strains Isolated from Powdered Dairy Products Intended for Consumption by Adults and Older Adults.** *Microorganisms*. 2023; 11(12):2841. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/12/2841>.

GARBOWSKA, M. et al. **The Genotyping Diversity and Hemolytic Activity of *Cronobacter* spp. Isolated from Plant-Based Food Products in Poland.** *Foods*, v. 12, n. 20, p. 3873–3873, 23 out. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/20/3873>.

HAYMAN, M. M. et al. **Prevalence of *Cronobacter* spp. and *Salmonella* in Milk Powder Manufacturing Facilities in the United States.** *Journal of Food Protection*, v. 83, n. 10, p. 1685–1692, 18 maio 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32421786/>.

International Organization for Standardization (ISO). (2017). **Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp.** ISO 22964:2017.

LI, Q. et al. ***Cronobacter* spp. Isolated from Quick-Frozen Foods in China: Incidence, Genetic Characteristics, and Antibiotic Resistance.** *Foods*, v. 12, n. 16, p. 3019–3019, 11 ago. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/16/3019>.

LIU, H. et al. **Diverse Genotypes of *Cronobacter* spp. Associated with Dairy Farm Systems in Jiangsu and Shandong Provinces in China.** *Foods*, v. 13, n. 6, p. 871, 13 mar. 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2304-8158/13/6/871>.

MOUSAVI, Z. E. et al. ***Cronobacter* Species in the Built Food Production Environment: A Review on Persistence, Pathogenicity, Regulation and Detection Methods.** *Microorganisms*, v. 11, n. 6, p. 1379, 24 maio 2023. Disponível em:
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11061379>.

VASCONCELLOS, L. **Isolamento, caracterização fenotípica e molecular e perfil de suscetibilidade de *Cronobacter* spp. em saladas prontas para o consumo e alimentos da culinária japonesa.** 2018. Disponível em: <https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/>. Disponível em: <https://www.oasisbr.ibict.br/vufind/Record/>.

Capítulo 16

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-16

CO-INFECÇÕES E IMPLICAÇÕES DAS ARBOVIROSES DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA: UMA BREVE REVISÃO

¹Gabrielli Viana Peres, ²Milena Polotto de Santi, ²Fernanda Modesto Tolentino Binhardi

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

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

Resumo: O manejo clínico das arboviroses dengue, zika e chikungunya, tornou-se um desafio para a saúde pública, devido à similaridade dos sinais e sintomas, o que dificulta o diagnóstico diferencial. Coinfecções entre estas arboviroses já foram relatadas e podem resultar em doenças mais graves. O objetivo deste estudo foi identificar os casos de coinfecções entre os vírus DENV, CHIKV e ZIKV no Brasil e avaliar a evolução clínica. A investigação de casos de coinfecções entre estes arbovírus foi realizada por meio de uma pesquisa exploratória de caráter bibliográfico, no período de janeiro de 2016 a julho de 2024. A análise dos 17 artigos encontrados demonstrou que, embora a maioria dos casos tenha apresentado sintomas leves a moderados, alguns grupos específicos, como gestantes e idosos, foram mais suscetíveis a complicações graves. O diagnóstico laboratorial por meio de métodos moleculares demonstrou ser fundamental para confirmação dos casos e consequente manejo do paciente. O uso da sintomatologia clínica não se mostrou eficaz para diferenciar uma coinfecção de uma monoinfecção e a ausência de respostas claras sobre os impactos das coinfecções destaca a necessidade de mais pesquisas.

Palavras-chave: arbovírus; arboviroses; coinfecções

INTRODUÇÃO

As arboviroses são doenças virais transmitidas por artrópodes frequentemente associadas a surtos em seres humanos e animais, representando um sério problema de saúde pública, com importante impacto econômico e social (Brasil, 2023).

O Brasil é responsável pela maioria das notificações anuais de dengue no mundo, e vem enfrentando diversos surtos relacionados a outras arboviroses, como chikungunya, zika, entre outras (Cerol et al., 2021).

A Dengue é a arbovirose de maior relevância nas Américas, causada pelo *Dengue virus* (DENV), que possui quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (Guimarães, 2019). Estes partilham entre 65%-75% de homologia em suas sequências de material genético e são classificados com base em critérios imunológicos e biológicos. Todos os sorotipos podem provocar uma ampla gama de manifestações clínicas (Guimarães, 2019).

Historicamente, no Brasil, há relatos de dengue desde 1845 e a primeira epidemia, documentada clínica e laboratorialmente, ocorreu entre 1981 e 1982, em Boa Vista-RR, causada por DENV-1 e DENV-4 (Barbosa, 2018). Em 1986, ocorreram epidemias que

atingiram algumas capitais da região Nordeste e o Rio de Janeiro, com a introdução do DENV-2 (Ministério da Saúde, 2009; Brasil, 2024).

O primeiro caso de dengue causado por DENV-3 foi relatado no país em 2000, no Rio de Janeiro (Fares et al, 2015; Nogueira et al., 2001; Ministério da Saúde, 2009; Tumiotto et al., 2014).

O DENV-4 voltou a ser registrado apenas em 2008, quando o vírus foi detectado em três pacientes, que não tinham histórico de viagem Internacional, em Manaus (Souza et al., 2011; Melo et al., 2012).

Outras arboviroses também importantes são a febre Chikungunya, provocada pelo *Chikungunya virus* (CHIKV), um arbovírus artrítogênico que ataca as articulações, e a febre da Zika, causada pelo *Zika virus* (ZIKV), o qual é referenciado como potencial agente teratogênico associado a importantes más formações congênitas (Brasil, 2023).

CHIKV foi primeiramente isolado em 1952 durante uma epidemia na Tanzânia e tem sido relatado em grandes epidemias pelo mundo todo (Weaver e Forrester, 2015; Halstead, 2015). Foi introduzido nas Américas pelo Caribe no final de 2013, e, no Brasil, os primeiros casos foram relatados em 2014, inicialmente no estado do Amapá e depois na Bahia. No ano seguinte, o CHIKV foi detectado na região Sudeste, com o primeiro caso autóctone registrado no estado do Rio de Janeiro (Silva, 2020).

Os primeiros casos da arbovirose causada pelo ZIKV foram registrados nas Américas em fevereiro de 2014, e, em maio de 2015, os primeiros casos de transmissão autóctone do vírus foram reportados no Brasil, principalmente na região Nordeste, a partir de casos suspeitos de Dengue (Barbosa, 2018). No mesmo ano, ocorreu a transmissão autóctone em amostras que foram provenientes do Rio Grande do Norte (RN) (Barbosa, 2018). O ZIKV disseminou rapidamente no país, sendo detectado em dezenove estados já em 2015 (Barbosa, 2018).

As epidemias que ocorreram em 2015 e 2016 no Brasil desencadearam muita preocupação nos órgãos de saúde, pois diversos estudos já associavam a infecção pelo ZIKV com manifestações congênitas em bebês: microcefalia, complicações neurológicas e Síndrome de Guillain-Barré (Barbosa, 2018).

As manifestações clínicas destas arboviroses são muito semelhantes, o que dificulta o diagnóstico (Lage, 2021). Em alguns casos, a doença pode evoluir para gravidade com complicações neurológicas, articulares, hemorrágicas e até mesmo óbito (Lage, 2021). Coinfecções entre essas arboviroses em humanos já foram relatadas, inclusive casos de infecção tripla (Carrillo-Hernández et al., 2018; Villamil-Gómez et al., 2016; Waggoner et al., 2016).

A presença de mais de um arbovírus no organismo pode resultar em doenças mais graves, justaposição de sintomas, e consequentemente, maior desafio no diagnóstico clínico (Chaves et al., 2018). Desta forma, o objetivo deste estudo foi identificar os casos de coinfecções entre os vírus DENV, CHIKV e ZIKV no Brasil e avaliar a evolução clínica.

MATERIAL E MÉTODOS

A abordagem metodológica empregou como instrumento a pesquisa exploratória de caráter bibliográfico, no período de janeiro de 2016 a julho de 2024, utilizando como base de dados PubMed, Google Acadêmico, LILACS e SciELO. Os unitermos selecionados para a pesquisa, associados ou não, foram: Arboviruses, Coinfection, Brazil.

O processo de busca incluiu 17 artigos, portarias e demais investigações baseadas em evidências científicas e/ou de caráter investigativo epidemiológico/operacional. Os critérios de exclusão foram: dados publicados de outros países e/ou fora do período deste estudo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos artigos foi organizada em três categorias de coinfeções distintas, sendo elas: coinfeção entre DENV e CHIKV, entre DENV e ZIKV, e entre CHIKV e ZIKV. Estas coinfeções foram detectadas em diversas regiões do país, com destaque para a região Nordeste (de Lima et al., 2020; dos Santos S. Marinho et al., 2020; Farias et al., 2023; Silva et al., 2019; Azeredo et al., 2018; Estofolete et al., 2019; Pessoa et al., 2016; Siqueira et al., 2020; Brito et al., 2017; Mota et al., 2021; Prata-barbosa et al., 2018; Sardi et al., 2016; Silva et al., 2018).

A maioria dos casos não apresentaram manifestações clínicas relevantes, entretanto, alguns grupos específicos foram mais suscetíveis a complicações graves.

Na região Nordeste, pacientes com distúrbios neurológicos, quando coinfectados por DENV e CHIKV apresentaram maior taxa de mortalidade (93,7%) quando comparado com casos de monoinfecção (73,1%). Entretanto, não foi possível concluir se os óbitos foram provocados por um vírus ou outro ou se houve interação entre os dois (de Lima et al., 2020).

Em outro estudo, com gestantes, realizado em Campo Grande, de onze coinfectadas por DENV e ZIKV, duas apresentaram complicações fetais graves, na qual um dos bebês precisou de internação prolongada em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), e o outro faleceu logo após o nascimento por insuficiência respiratória grave (Azeredo et al., 2018).

Um relato de caso descreveu a ocorrência de morte fetal de gestante coinfectada por ZIKV e CHIKV, em 2016. Não sendo possível concluir qual dos vírus foi responsável pelo óbito (Prata-barbosa et al., 2018). Reforçando, assim, a necessidade de acompanhamento das gestantes, especialmente em casos com coinfeção por arbovírus.

Ainda, um trabalho realizado em Recife, relatou o caso de um idoso de 74 anos, coinfectado por CHIKV e ZIKV, que apresentou complicações neurológicas centrais e periféricas graves. O vírus CHIKV é mais conhecido por afetar o sistema nervoso central, enquanto que o ZIKV tende a afetar mais o sistema periférico. Este estudo sugere que a interação entre estes dois arbovírus pode intensificar a resposta inflamatória e causar casos clínicos ainda mais atípicos (Brito et al., 2017).

Um outro paciente, coinfectado por CHIKV e ZIKV, e portador da doença autoimune Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) foi a óbito, e a presença de infecção pelo CHIKV e ZIKV foi detectado em suas amostras, com viremia e virúria prolongadas. O trabalho sugeriu que a gravidade do caso pode estar associada ao uso dos medicamentos imunossupressores para tratar a doença LES (Silva et al., 2018).

A partir das análises realizadas, evidenciou-se que grande parte dos casos não evoluiu para gravidade, assim como compartilhavam entre si sintomas comumente encontrados em paciente diagnosticado com apenas um arbovírus. Os sintomas clínicos mais descritos foram febre, exantema, cefaleia, mialgia e artralgia, ocorrendo em todas as coinfeções (Azeredo et al., 2018; Brito et al., 2017; de Lima et al., 2020; Estofolete et al., 2019; Pessoa et al., 2016; Silva et al., 2019; Siqueira et al., 2020; Silva et al., 2018). Deste modo, a utilização da sintomatologia como parâmetro para análise de coinfeção mostrou-se inviável.

Com relação ao diagnóstico laboratorial das arboviroses, diversos trabalhos evidenciaram a importância em determinar infecção somente por meio de uma reação positiva ou negativa com PCR em tempo real para evitar a ocorrência de reações cruzadas que podem ocorrer em teste sorológico, além de ser uma metodologia mais específica e sensível (Azeredo et al., 2018; Cabral-castro et al., 2016; dos Santos S. Marinho et al., 2020; Mota et al., 2021).

Contudo, cabe ressaltar que nem todas as unidades que recebem amostras para diagnóstico de arboviroses possuem a técnica de PCR em seus laboratórios, além de ser um exame que requer o uso de amostras, em geral, até o 5º dia de sintomas (Cerol et al., 2021).

CONCLUSÕES

Nesta Revisão Bibliográfica observou-se que casos de coinfeção entre as Arboviroses de maior importância no Brasil (Dengue, Chikungunya e Zika), ocorrem em diversas regiões do país, destacando-se o Nordeste.

A análise dos casos demonstrou que, embora a maioria tenha apresentado sintomas leves a moderados, alguns grupos específicos, como os previamente comprometidos, gestantes, idosos e imunodeprimidos foram mais suscetíveis a complicações graves, como internação em UTI, complicações neurológicas, e óbito.

O uso da sintomatologia clínica não se mostrou eficaz para diferenciar uma coinfeção de uma monoinfeção.

Não foi possível esclarecer a influência e as consequências para o paciente coinfectado por pelo menos dois dos arbovírus, o que ressalta a necessidade de mais estudos.

O diagnóstico laboratorial por meio de métodos moleculares demonstrou ser fundamental para confirmação dos casos e consequente manejo do paciente.

REFERÊNCIAS

AZEREDO, E. L. et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. **PLoS Currents**, 2018.

BARBOSA, L. S. Características clínicas, epidemiológicas e perfil de Citocinas em pacientes naturalmente infectados pelo dengue, zika ou coinfectados durante a epidemia de 2016, Mato Grosso do Sul, Brasil. **ARCA (Repositório Institucional da Fiocruz)**, p. 130, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE.; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE.; DEPARTAMENTO DE ARTICULAÇÃO ESTRATÉGICA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE. **Guia de vigilância em saúde : volume 1 [recurso eletrônico]**. 6a ed. Brasília: [s.n.]. v. 3. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE; DEPARTAMENTO DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **Dengue: Diagnóstico e Manejo Clínico: Adulto e criança. - 6a edição [recurso eletrônico]**. 6a ed. Brasília: [s.n.]. 2024.

BRITO, C. A. A. et al. Central and peripheral nervous system involvement caused by Zika and chikungunya coinfection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, 13 jul. 2017.

CABRAL-CASTRO, M. J. et al. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. **Journal of Clinical Virology**, v. 82, p. 108–111, 1 set. 2016.

CARRILLO-HERNÁNDEZ, M. Y. et al. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, 30 jan. 2018.

CEROL, M. et al. Infecção por Vírus Chikungunya: Revisão para Clínicos. **Medicina Interna**, v. 27, n. 1, p. 55–64, 8 dez. 2021.

CHAVES, B. A. et al. Coinfection with zika virus (ZIKV) and dengue virus results in preferential ZIKV transmission by vector bite to vertebrate host. **Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 4, p. 563–571, 13 jul. 2018.

DE LIMA, E. C. B. et al. Survival analysis in non-congenital neurological disorders related to dengue, chikungunya and zika virus infections in Northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, p. 1–9, 2020.

DOS SANTOS S. MARINHO, R. et al. Detection of coinfection with Chikungunya virus and Dengue virus serotype 2 in serum samples of patients in State of Tocantins, Brazil. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 5, p. 724–729, 1 maio 2020.

ESTOFOLETE, C. F. et al. Co-infection between Zika and different dengue serotypes during DENV outbreak in Brazil. **Journal of Infection and Public Health**, v. 12, n. 2, p. 178–181, 1 mar. 2019.

FARES, R. C. G. et al. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **Biomed Res Int**. 2015; 2015: 321873.

FARIAS, P. C. S. et al. Epidemiological profile of arboviruses in two different scenarios: dengue circulation vs. dengue, chikungunya and Zika co-circulation. **BMC Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, 1 dez. 2023.

GUIMARÃES, G. M. C. **Caracterização fenotípica e funcional de células Natural Killer (NK) durante a monoinfecção e coinfecção pelos vírus Dengue e Zika**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz, 2019.

HALSTEAD, SB. Reappearance of chikungunya, formerly called dengue, in the Americas. **Emerg Infect Dis**. v. 21, n.4, p. 557–561. 2015.

LAGE, S. L. S. **Caracterização dos casos de Dengue, Zika e Chikungunya no município de Montes Claros, Minas Gerais, no ano de 2019**. Diamantina: UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, 2021.

MELO, P. R. S. et al. Molecular surveillance of dengue virus in Bahia State, Brazil. **American Journal of Molecular Biology**, v. 2, p. 42–48, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (2009). **Dengue: diagnóstico e manejo clínico – adulto e criança**. 5th Ed., Brasília. 2009.

MOTA, M. L. et al. Serological and molecular epidemiology of the Dengue, Zika and Chikungunya viruses in a risk area in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2021.

NOGUEIRA R. M. R. et al. Dengue viruses type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 7, p. 925-926, 2001.

PESSOA, R. et al. Investigation into an outbreak of dengue-like illness in pernambuco, Brazil, revealed a cocirculation of Zika, Chikungunya, and dengue virus type 1. **Medicine (United States)**, v. 95, n. 12, 2016.

PRATA-BARBOSA, A. et al. Co-infection with Zika and Chikungunya viruses associated with fetal death—A case report. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 72, p. 25–27, 1 jul. 2018.

SARDI, S. I. et al. Coinfections of zika and chikungunya viruses in bahia, Brazil, identified by metagenomic next-generation sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2348–2353, 1 set. 2016.

SILVA, D. B. **Cocirculação dos vírus Dengue e Zika durante a epidemia de Chikungunya no estado do Ceará em 2017**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Patologia. Programa de PósGraduação em Patologia, 2020.

SILVA, K. R. et al. Fatal Human Case of Zika and Chikungunya Virus Co-Infection with Prolonged Viremia and Viruria. **Diseases**, v. 6, n. 3, p. 53, 21 jun. 2018.

SILVA, M. M. O. et al. Concomitant Transmission of Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses in Brazil: Clinical and Epidemiological Findings from Surveillance for Acute Febrile Illness. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 8, p. 1353–1359, 27 set. 2019.

SIQUEIRA, C. et al. Six cases of Zika/dengue coinfection in a Brazilian cohort, 2015-2019. **Viruses MDPI AG**, , 21 out. 2020.

SOUZA, R. P. et al. Dengue virus type 4 phylogenetics in Brazil 2011: looking beyond the veil. **PLoS Negl Trop Dis** 2011;5: e1439.

TUMIOTO G.L. et al. Laboratory surveillance of dengue in Rio Grande do Sul, Brazil, from 2007 to 2013. **Plos One** 12;9(8):e104394, 2014.

VILLAMIL-GÓMEZ, W. E. et al. Zika, dengue, and chikungunya co-infection in a pregnant woman from Colombia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 51, p. 135–138, 1 out. 2016.

WAGGONER, J. J. et al. Viremia e apresentação clínica em pacientes nicaraguenses infectados com o vírus Zika, vírus Chikungunya e vírus da dengue. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 12, p. 1584–1590, 15 dez. 2016.

WEAVER, S. C, FORRESTER N. L. Chikungunya: evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Res.** v.120, p.32–39. 2015.

Capítulo 17

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-17

RECARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DO COMPLEXO *SPOROTHRIX SCHENCKII* DO NÚCLEO DE COLEÇÕES DE MICRO-ORGANISMOS POR MEIO DA METODOLOGIA MALDI- TOF COM CONSTRUÇÃO DE BANCO IN-HOUSE

Jefferson Santos Gomes Moreira¹; Nicolas Vieira Guerra Castilho²; Tania Sueli de Andrade³; Lumena Pereira Machado Siqueira⁴

¹Estudante do Curso de Especialização em Vigilância Epidemiológica – Núcleo de Coleções de micro-organismos – IAL; E-mail: jefferson.moreira.pro@gmail.com ²Mestrando em Ciências pelo Centro de Controle de Doenças/SES – Núcleo de Coleções de micro-organismos – IAL; E-mail: nicovgcast@gmail.com ³Docente/Pesquisador Científico – Núcleo de Coleções de micro-organismos – IAL; E-mail: tania.andrade@ial.sp.gov.br ⁴Doutoranda em Dermatologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; E-mail: lupmsiqueira@hotmail.com

Resumo: A esporotricose é uma doença zoonótica causada pelo fungo termodimórfico *Sporothrix schenckii*, que afeta principalmente humanos e gatos, mas, pode acometer também outros animais de sangue quente. A transmissão ocorre por contato traumático com fontes contaminadas, como mordeduras ou arranhaduras de animais infectados e vegetação contaminada. O aumento progressivo dos casos levou à sua classificação como notificação compulsória no estado de São Paulo, especialmente devido à emergência do agente etiológico *Sporothrix brasiliensis*, que se mostrou mais patogênico que o *Sporothrix schenckii*. Isso enfatiza a importância do trabalho epidemiológico para rastrear e caracterizar as espécies do complexo *Sporothrix schenckii*. Nos centros de referência, como o Instituto Adolfo Lutz, utiliza-se a metodologia de sequenciamento e PCR de regiões alvo para identificar corretamente as espécies de *Sporothrix sp.* e monitorar o aumento epidemiológico das diferentes linhagens. No entanto, os métodos moleculares, como PCR e sequenciamento Sanger, enfrentam o desafio do alto custo, tornando o MALDI-TOF uma alternativa viável. Contudo, o uso de bancos comerciais é limitado pela similaridade dos perfis proteômicos das espécies e pela falta de atualização com novas linhagens. O objetivo deste estudo foi criar uma biblioteca interna para recaracterizar as espécies *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana* e *Sporothrix schenckii* do acervo do Núcleo de Coleções de Micro-organismos pela metodologia de MALDI-TOF. O banco *in-house* foi criado e obteve sensibilidade de 96,15% na identificação correta dos micro-organismos, comparando com os resultados obtidos por meio de métodos moleculares de PCR multiplex e sequenciamento Sanger, com escore médio de 2,32 na comparação dos espectros das linhagens validadas pelo banco *in-house*, possibilitando desta forma o uso do banco como ferramenta diagnóstica para a vigilância e novos estudos.

Palavras-chave: esporotricose; epidemiologia; espectrometria de massa; MALDI-TOF; *Sporothrix*.

INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença zoonótica causada pelo fungo termodimófico *Sporothrix schenckii* que afeta principalmente humanos e gatos, mas também pode acometer outros animais de sangue quente. Algumas espécies estão presentes em ambientes naturais e tanto na esporotricose zoonótica como a ambiental a transmissão ocorre pelo contato traumático com a fonte infectada (OLIVEIRA et al., 2015; COVISA, 2022; RODRIGUES et al., 2022). O agente causador da esporotricose foi caracterizado inicialmente por Schenck em 1898 e estudado no Brasil por Lutz em 1907, onde suas características morfológicas foram descritas como hifas hialinas, septadas, ramificadas e conídios pequenos agrupados em forma de “margaridas” (SCHENCK APUD LARSSON, 2011; LUTZ ESPLENDORE APUD LARSSON, 2011).

Os casos de esporotricose têm aumentado progressivamente levando a doença a ser classificada como notificação compulsória no estado de São Paulo (SÃO PAULO, 2024). O cenário atual se torna alarmante quando são comparados dados ao longo dos últimos 10 anos que evidenciam o aumento progressivo de casos de esporotricose zoonótica em diversas regiões brasileiras que estão relacionadas ao ciclo vital de infecção nos animais domésticos bem como a capacidade de dispersão geográfica, emergindo o *Sporothrix brasiliensis* em patamar nacional, tornando-se um problema de saúde pública (RODRIGUES et al., 2013; SANCHOTENE et al., 2015; RODRIGUES et al., 2022; POESTER et al., 2024).

O diagnóstico considerado padrão ouro para a esporotricose é a cultura, em centros de referência como o Instituto Adolfo Lutz se utiliza os métodos de identificação de sequenciamento genético, PCR e o MALDI-TOF, auxiliando desta forma, no entendimento da epidemiologia do agente etiológico, rastreando suas linhagens em casos suspeitos e confirmados no estado de São Paulo (COVISA, 2022; DE CAROLIS, 2022). Em centros de referência a tecnologia do MALDI-TOF se torna a mais viável, em comparação ao restante dos métodos moleculares que apresentam um alto custo para a sua realização, entretanto a utilização de bancos comerciais ainda se tornam limitadas na identificação das espécies do complexo *Sporothrix schenckii* devido a sua similaridade no perfil proteômico ribossomal entre as espécies.

O conceito do MALDI-TOF se baseia na análise do perfil proteômico ribossomal dos patógenos. O processo inicia-se por uma lise mecânica e/ou química da amostra, para que as proteínas mais internas possam ser expostas e sobrepostas a uma matriz que absorve a atuação do laser sobre a amostra (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2014). Os íons são acelerados e separados de acordo com sua razão massa/carga, gerando um espectro que é comparado pelo *software* do fabricante com outros espectros de referência já conhecidos, a similaridade designa uma classificação de confiabilidade (JORDANA-LLUCH, 2012; SINGHAL et al., 2015).

A tecnologia MALDI-TOF ainda possibilita criar projetos de bibliotecas internas, que tem se mostrado um recurso valioso para microbiologistas, pois permitem aprimorar o banco de com novos espectros de referência, acrescentando a identificação de linhagens endêmicas e emergentes cujo banco comercial não contempla (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2014; DE CAROLIS, 2022).

A proposta deste estudo foi utilizar a ferramenta de inserção do banco in-house para criar uma biblioteca interna e recharacterizar às espécies; *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix mexicana* e *Sporothrix schenckii* identificadas dentro do complexo *Sporothrix schenckii* pertencentes ao acervo da coleção de fungos do Núcleo de Coleções de Micro-organismos (NCMO) do Instituto Adolfo Lutz (IAL) que já foram caracterizadas por outras metodologias moleculares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram analisadas 32 linhagens isoladas de *Sporothrix* sp.

provenientes de culturas suspeitas para esporotricose humana e felina do sistema de vigilância epidemiológica do estado de São Paulo e mantidas pelo método de liofilização (COSTA E FERREIRA, 1991). As linhagens foram divididas em dois grupos: o primeiro foi composto por 6 linhagens de referência caracterizadas previamente por métodos fenotípicos e moleculares de sequenciamento Sanger, PCR multiplex e MALDI-TOF, utilizados para compor os espectros de referência do banco in-house: *S. brasiliensis* (IAL 10157), *S. globosa* (IAL 7209), *S. mexicana* (IAL 10101/CBS 120.341), *S. schenckii* (IAL 10078), *S. schenckii* (IAL 10068/ATCC 16345), *S. brasiliensis* (IAL 6913/CBS 120.339); o segundo grupo foi composto por 26 linhagens suspeitas de esporotricose, caracterizadas através de identificação polifásica e que serviram de validação do banco in-house criado durante esse estudo.

As 32 linhagens isoladas de *Sporothrix* sp. foram mantidas em tubo ágar Brain Heart Infusion (BHI) e incubados na estufa bacteriológica de 5 a 10 dias a 37°C em fase leveduriforme para protocolo de extração das proteínas e também foram cultivadas em placa e tubo ágar dextrose batata (ADB), incubados de 5 a 10 dias a 27°C na forma filamentosa, para caracterização presuntiva através de colônia gigante e microcultivo.

O protocolo para extração de proteínas de fungos na fase leveduriforme foi adaptado no NCMO do manual: *Cultivation and Sample Preparation for Filamentous Fungi* (BRUKER, 2015 apud UFRGS, 2016) Figura 1.

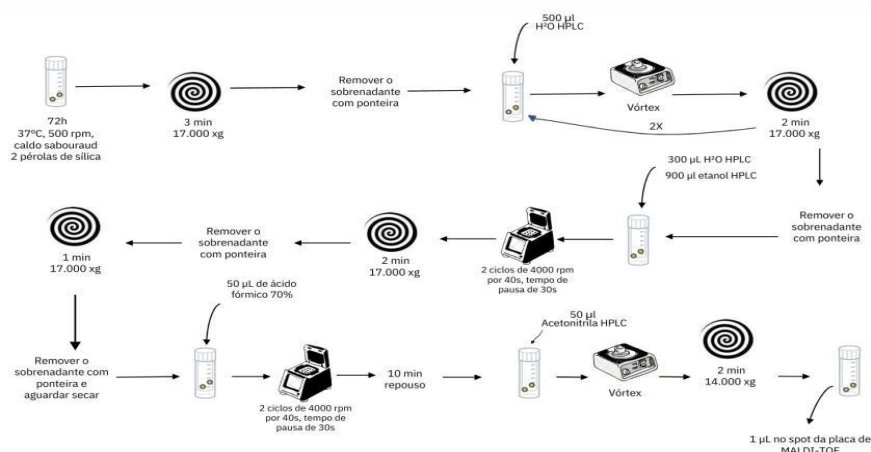


Figura 1 – Fluxograma para extração de proteínas de fungo leveduriforme para análise em MALDI-TOF
Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Após a extração das proteínas, foi realizado em decaplicata e em dias aleatórios a leitura dos espectros no aparelho MALDI-TOF MS Microflex da Bruker®. Os espectros coletados foram analisados no software Bruker Daltonics flexAnalysis™ considerando a razão massa/carga das proteínas capturadas, intensidade, espectros com contagem de picos abaixo de setenta e anomalias como *Flatline* e *Outliers*.

Após a construção do banco *in-house*, a validação foi realizada com as 26 linhagens do segundo grupo caracterizadas com métodos fenotípicos e do protocolo de PCR Multiplex adaptado a partir do estudo de Rodrigues *et al.* (2015) utilizando *primers* específicos para *S. brasiliensis*; *S. schenckii*; *S. globosa* e *S. mexicana*, conforme Figura 2.

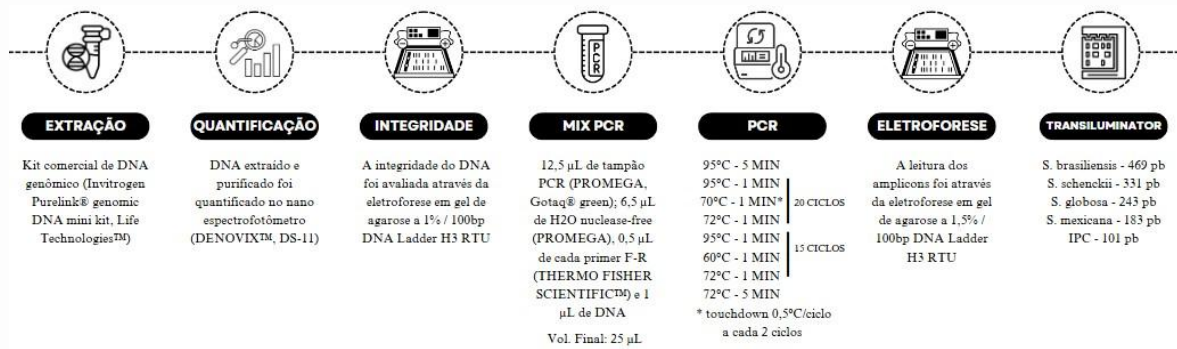


Figura 2 – Fluxograma do protocolo para PCR Multiplex adotado para caracterização molecular das linhagens

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os espectros obtidos com as linhagens de referência e consequentemente usados para criação do banco *in-house* também foram analisadas no banco *Filamentous Fungi* da Bruker®, indicando a identificação fidedigna para gênero e espécie, conforme é demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização polifásica das linhagens de referência pertencentes ao Núcleo de Coleções Biológicas do NCMO para criação da biblioteca *in-house*.

Referência	Identificação Fenotípica	PCR Multiplex	Sequenciamento Sanger	Banco <i>Filamentous Fungi</i>	Banco <i>In-House</i>
IAL 6913	<i>Sporothrix sp.</i>	<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. brasiliensis</i> ^A	<i>S. schenckii</i>	<i>S. brasiliensis</i>
IAL 7209	<i>Sporothrix sp.</i>	<i>S. globosa</i>	<i>S. globosa</i> ^A	<i>S. schenckii</i>	<i>S. globosa</i>
IAL 10068	<i>Sporothrix sp.</i>	<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i> ^A	<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>
IAL 10078	<i>Sporothrix sp.</i>	<i>S. schenckii</i>	Teste inconclusivo	<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>
IAL 10101	<i>Sporothrix sp.</i>	Teste inconclusivo	<i>S. mexicana</i> ^A	<i>S. schenckii</i>	<i>S. mexicana</i>
IAL 10157	<i>Sporothrix sp.</i>	<i>S. brasiliensis</i>	<i>S. brasiliensis</i> ^B	<i>S. schenckii</i>	<i>S. brasiliensis</i>

Fonte: Núcleo de Coleções de Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz
Legenda: ^A Região Internal Transcribed Spacer – ITS1/ITS4 (ITS)
^B Região Calmodulina – CL1/CL2A (CAL)

Os escores banco *Filamentous Fungi* da Bruker® obtiveram média de 2,02 com 3 linhagens próximas ao escore de 2,00 (o limiar de identificação confiável recomendado pelo fabricante) e 1 linhagem abaixo do limiar de identificação, enquanto os escores obtidos dentro do *banco in-house* obtiveram média de 2,66.

Os espectros obtidos das linhagens controle foram analisadas por ambos os bancos a título de comparação com o escore médio de 2,32 no banco *in-house*, enquanto o banco *Filamentous Fungi* da Bruker® obteve escore médio de 1,91, além disso, o banco *in-house* identificou de forma fidedigna 96,15% das linhagens do segundo grupo a nível gênero e espécie quando comparado ao resultado molecular, diferente do banco *Filamentous Fungi* que só identifica em nível de gênero, conforme Gráfico 2.

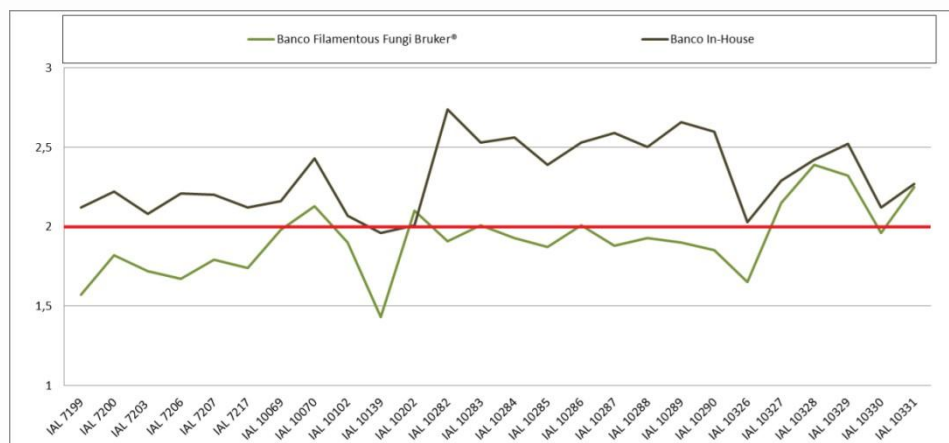


Gráfico 2 – Comparativo do escore das cepas controle obtido no MALDI-TOF em ambos os bancos
Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

O banco *in-house* obteve sensibilidade de 96,15% em identificar de forma confiável gênero e espécie, identificando corretamente 25 das 26 linhagens utilizadas como validação do banco *in-house*, resultado similares foram obtidos para este e outros grupos de fungos (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

CONCLUSÕES

Através do estudo, foi possível atingir o objetivo de recharacterizar, por meio do MALDI-TOF, as linhagens suspeitas de *Sporothrix* sp. do acervo de fungos do NCMO que anteriormente foram identificadas dentro do complexo *Sporothrix schenckii*.

O banco *in-house*, ao final do estudo, foi renomeado como *Sporothrix* dentro da árvore taxonômica de projetos internos do software da Bruker® com sensibilidade de 96,15% em comparação ao método de biologia molecular.

Os resultados apresentados neste trabalho servirão para estudos futuros, com o objetivo de melhorar a identificação de outros fungos também não contemplados nas bibliotecas comerciais do MALDI-TOF, trazendo assim rapidez e confiança nos estudos epidemiológicos e diagnósticos nos centros de referência.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-JUNIOR, J. N.; DI GIOIA, T. S. R.; DOI, A. M.; ROSSI, F.. Aplicação da tecnologia de espectrometria de massa MALDI-TOF em laboratórios de microbiologia clínica. **Microbiologia in foco**, n.3, ano 5, p. 10-16, 2014.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991. Impresso.

COVISA, Coordenadoria de vigilância em saúde. Vigilância e controle da esporotricose em animais no município de São Paulo. **Nota Técnica 01 DVZ/COVISA 2022**, São Paulo-SP, 1ª edição, p. 2-45, Ago 2022.

DE CAROLIS, E.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M. Old and New Insights into *Sporothrix schenckii* Complex Biology and Identification. **Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 297, 25 fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens11030297>. Acesso em: 13 ago. 2024.

JORDANA-LLUCH, E.; MARTRÓ CATALÀ, E.; AUSINA RUIZ, V. La espectrometría de masas en el laboratorio de microbiología clínica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 10, p. 635–644, dez. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.012>. Acesso em: 19 ago. 2024.

LARSSON, C. E. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 250-259, 1 jun. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/S1413-95962011000300010> Acesso em: 23 out. 2024.

OLIVEIRA, M. M. E.; SANTOS, C.; SAMPAIO, P.; ROMEO, O.; ALMEIDA-PAES, R.; PAIS, C. et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 102–110, 1 fev. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.008>. Acesso em: 14 ago. 2024.

POESTER, V. R.; XAVIER, M. O.; MUNHOZ, L. S.; BASSO, R. P.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; FREITAS, D. F. S. et al. *Sporothrix brasiliensis* Causing Atypical Sporotrichosis in Brazil: A Systematic Review. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 4, p. 287–287, 13 abr. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof10040287>. Acesso em: 23 out. 2024.

RODRIGUES, A. M.; GONÇALVES, S. S.; CARVALHO, J. A.; BORBA-SANTOS, L. P.; ROZENTAL, S.; CAMARGO, Z. P. Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, p. 776, 1 ago. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof8080776>. Acesso em: 14 ago. 2024.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. e0004190, 1 dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004190>. Acesso em: 20 set. 2024.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, S.; DE CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 405–412, 1 maio 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.719648>. Acesso em: 24 out. 2024.

SANCHOTENE, K. O.; MADRID, I. M.; KLAFKE, G. B.; BERGAMASHI, M.; TERRA, P. P. D.; RODRIGUES, A. M. et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, n. 11, p. 652–658, 25 set. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/myc.12414>. Acesso em: 24 out. 2024.

SÃO PAULO. Resolução SS nº 88, de 24 de abril de 2024. Dispõe sobre a Lista das Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública de Notificação Compulsória no Estado de São Paulo e das providências e altera a Resolução SS nº 20, de 22 de fevereiro de 2006. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, São Paulo-SP, 24 Abr. 2024.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K.; VIRDI, J. S. MALDI-TOF Mass spectrometry: an Emerging Technology for Microbial Identification and Diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 791, 5 ago. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>. Acesso em: 13 ago. 2024.

Técnicas de análise – Preparação de amostras – Laboratório de análises microbiológicas através de MALDI-TOF. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/malдитoficbs/preparacao-de-amostras/>. Acesso em: 27 ago. 2024.

Capítulo 18

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-18

ESCOMBROTOXICOSE: UM OLHAR SOBRE A FORMAÇÃO DE HISTAMINA EM PESCADOS

Marina Okada Xandó de Oliveira¹; Roberto Carlos Fernandes Barsotti²; Tatiana Caldas Pereira³

¹Estudante do programa de pós-graduação em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública - Instituto Adolfo Lutz –CLR Santos; Email: marinaoxdo@gmail.com

²Pesquisador Científico do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas – Instituto Adolfo Lutz – CLR Santos; Email: roberto.barsotti@ial.sp.gov.br

³Pesquisador Científico do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas – Instituto Adolfo Lutz – CLR Santos; Email: tatiana.pereira@ial.sp.gov.br

Resumo: O pescado é uma excelente fonte de nutriente, porém devido as suas características intrínsecas, como pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água, abundância de nutrientes e alta atividade enzimática, propiciando o rápido crescimento de microrganismos que por sua vez irão converter histidina em histamina, que ao ser consumida, pode causar escombrototoxicose. A prevenção, detecção e controle de histamina é fundamental para garantir a segurança alimentar do consumo de pescados. O presente estudo teve como objetivo coletar e analisar informações que contribuam para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção de histamina em pescados. Foi realizado um levantamento bibliográfico de artigos científicos publicados em português, inglês e espanhol em plataformas de pesquisa acadêmica como PubMed, Scielo, Google acadêmico e Science Direct. Foram consultadas legislações brasileiras vigentes e manuais técnicos nacionais e internacionais. O pescado em decomposição sobre ação de bactérias pode levar a formação de histamina. A histamina é resistente ao calor, não é eliminada pelo cozimento e ao ser consumida, causa sintomas como vermelhidão, coceira, cefaleia, náuseas e vômito. É fundamental manter o pescado em baixas temperaturas e garantir boas práticas de higiene durante todo o processo de manipulação do pescado como forma de prevenir a formação de histamina. A escombrototoxicose é um problema de Saúde Pública que exige atenção especial, já que a detecção precoce e a adoção de medidas preventivas podem evitar grandes consequências para saúde dos consumidores.

Palavras-chave: aminas biogênicas; histamina; pescado; produtos pesqueiros.

INTRODUÇÃO

Pescado é a denominação dada a qualquer animal aquático, seja de água doce ou salgada, destinado à alimentação humana (BRASIL, 2017). É uma das principais fontes de proteína, contudo apresenta uma vida útil mais curta devido às características intrínsecas, como pH próximo a neutralidade, elevada atividade de água, abundância de nutrientes e alta atividade enzimática, propiciando o crescimento de microrganismos e produção de substâncias tóxicas, comprometendo a segurança alimentar (ALTEMIO et al., 2020).

O consumo mundial de pescados apresentou um aumento gradual e constante ao longo das últimas seis décadas, passando de 9,1 kg em 1961 para 20,6 kg em 2021, com uma taxa média anual de crescimento de 1,4%. Essa média global oculta disparidades significativas entre os países, enquanto países como os Estados Unidos apresentam um consumo elevado, entre 30 e 50 kg por ano, o Brasil, por exemplo, apresenta um consumo bem inferior, abaixo de 10 kg por ano (FAO, 2024)

O pescado em decomposição produz histamina por meio da descarboxilação bacteriana do aminoácido L-histidina. Esta reação é catalisada pela enzima histidina-decarboxilase e ocorre principalmente em condições de temperatura e pH favoráveis ao crescimento bacteriano. A histamina é uma amina biogênica termoestável, não volátil e que não é eliminada durante o processo de cozimento. Além disso, apresenta um potencial alergênico conhecido como escombrotóxico, caracterizado por um quadro de intoxicação no ser humano quando consumida (SOUZA et al., 2016; HUNGERFORD et al., 2021).

A formação de histamina é induzida pela combinação de tempo e temperatura, sendo imprescindível o controle das etapas de processamento após o abate do pescado. Temperaturas acima de 4,4°C favorecem o crescimento bacteriano e subsequente produção dessa amina, destacando a importância do controle de temperatura para prevenir a formação desse composto em alimentos (FDA, 2022). Este estudo teve como objetivo coletar e analisar informações que contribuam para estratégias de controle e prevenção na formação de histamina em pescados.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado por meio de um levantamento bibliográfico de artigos publicados em português, inglês e espanhol, com os descritores “aminas biogênicas”, “histamina”, “escombrotóxico”, “pescado” e “produtos pesqueiros” em plataformas de pesquisa acadêmica como PubMed, Scielo, Google Acadêmico e Science Direct. Também foram consultadas legislações brasileiras vigentes de órgãos nacionais como Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e manuais técnicos nacionais e internacionais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entende-se por pescado os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, répteis equinodermos e outros animais aquáticos usados na alimentação humana (BRASIL, 2017). O pescado é uma das principais fontes de proteína na alimentação humana por ser um alimento com alto valor nutricional, contudo apresenta alta susceptibilidade à deterioração devido às características intrínsecas do alimento, o que propicia o crescimento de microrganismos e consequentemente, o comprometimento da segurança alimentar (ALTEMIO et al., 2020).

Após a captura e processamento, o pescado pode ser transportado em diferentes condições de temperatura: fresco com temperatura entre 0 e 4°C com uso de gelo para conservação; resfriado com temperatura entre -0,5 e -2°C, exigindo gelo ou sistemas mecânicos de refrigeração; e congelado com temperatura a -18°C ou menos, com uso de sistemas de refrigeração potentes para manter a cadeia de frio (CRIBB; DE SEIXAS FILHO; MELLO, 2018).

As aminas biogênicas são um subgrupo específico de aminas formadas por processos de decomposição. Em alimentos, podem causar problemas de saúde quando consumidas em altas concentrações, como dores de cabeça, náuseas e reações alérgicas (BARDÓCZ, 1995; GIROTO; MASSOM; HARACEMIV, 2010; SILLA SANTOS, 1996).

A formação dessas aminas ocorre através de um processo de descarboxilação de aminoácidos livres cuja reação é catalisada por enzimas descarboxilases, que podem ser de origem microbiana ou do próprio alimento. A temperatura é um fator crítico, pois altas temperaturas aceleram o crescimento microbiano e a atividade enzimática. Além disso, o tempo de armazenamento e as condições de higiene também influenciam a formação de maiores concentrações de aminas biogênicas (FAO; WHO, 2013).

A histamina é uma diamina biogênica heterocíclica, não volátil e termostável, formada durante a deterioração do pescado. Sua produção ocorre por meio da descarboxilação do aminoácido L-histidina, catalisada pela enzima histidina-decarboxilase, sob condições favoráveis ao crescimento bacteriano, como temperatura inadequada e tempo prolongado de armazenamento (DO CARMO et al., 2010).

Em algumas espécies de pescado há uma maior suscetibilidade na formação de histamina, devido à maior concentração de histidina livre. Dentre estas espécies, destacam-se peixes da família *Scombridae* (atum e cavala), *Clupeidae* (sardinha e arenque), *Engraulidae* (anchova), *Coryphaenidae* (mahimahi) e espadarte (SCHIRONE et al., 2017). O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) estabelece o controle de histamina em espécies formadoras como um dos marcadores de frescor do pescado (BRASIL, 2017; BRASIL 2022). A Instrução Normativa nº161, de 1º de julho de 2022, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece que o limite máximo de histamina deve ser até 100 mg/kg em pescados miúdos crus, temperados ou não, fresco, resfriados ou congelados (BRASIL, 2022).

A histamina é uma molécula versátil, desempenhando papéis cruciais tanto na fisiologia normal do organismo quanto em processos patológicos como é o caso da intoxicação alimentar por escombrotóxicas (HUNGERFORD, 2010). A intoxicação histamínica recebe o nome de escombrotóxicose e, geralmente, tem curta duração. Manifesta-se com sintomas como rubor facial, prurido, cefaleia, náuseas, vômitos e diarreia (HUNGERFORD, 2021; RIDOLO et al., 2016; TAYLOR, 1986).

A prevenção da formação de histamina nos alimentos varia de acordo com a natureza do produto, contudo para o pescado, o armazenamento em baixas temperaturas e a adoção de rigorosas práticas de higiene são cruciais para inibir a atividade bacteriana responsável pela produção de histamina (TAYLOR, 1986).

A determinação quantitativa de histamina e outras aminas em produtos pesqueiros envolve um conjunto de técnicas analíticas. A cromatografia em coluna e a cromatografia em camada delgada foram as técnicas pioneiras nesse campo. A evolução tecnológica impulsionou o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e precisos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com derivação pré ou pós-coluna, e a eletroforese capilar. Paralelamente, kits comerciais de imunoensaio oferecem uma alternativa rápida e prática para análises de rotina (EVANGELISTA, 2015).

O método oficial da *Association of Official Agricultural Chemist* (AOAC) para a determinação de histamina em pescados é o método fluorométrico, que envolve etapas de extração, purificação, derivação e leitura em fluorímetro, um método sensível, porém trabalhoso e demorado (BJORNSDOTTIR-BUTLER; BENCSATH; BENNER, 2015).

CONCLUSÕES

O pescado é um alimento nutricionalmente rico e consumido mundialmente. Sua alta perecibilidade exige cuidados especiais em todas as etapas da produção, desde a captura até o consumo. A refrigeração adequada e as boas práticas de higiene são fundamentais para prevenir a deterioração e garantir a qualidade do produto. O pescado em condições inadequadas pode ter um aumento da produção de histamina e o seu consumo, levar a uma intoxicação histamínica, a escombrotóxicose.

A escombrotóxicose é uma intoxicação alimentar e um problema de saúde pública. A compreensão dos mecanismos dessa intoxicação, associada à importância da manipulação correta do pescado, é fundamental para a prevenção e o controle da histamina. A detecção precoce e a adoção de medidas preventivas podem evitar graves consequências para a saúde dos consumidores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente ao meu saudoso orientador Me. Roberto Carlos F. Barsotti, não apenas por seus conhecimentos e experiência, mas também por sua amizade e apoio. Sua partida foi uma grande perda para todos nós, com certeza teria se orgulhado dos resultados deste trabalho.

Agradeço à minha co-orientadora, Ma. Tatiana Caldas Pereira, por sua valiosa colaboração para este trabalho. Sua paciência e conhecimento foram fundamentais para conclusão deste estudo.

Por fim, agradeço aos meus pais, Tieko e Xandó, pelo amor, incentivo e apoio incondicional durante todos esses anos.

REFERÊNCIAS

- ALTEMIO, A. D. C. et al. Qualidade dos pescados comercializados Durante as Festas do Peixe DE dourados – ms / qualityofcommercializedfishduringthe dourados fishfestivals - ms. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 69854–69864, 2020.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in food science & technology**, v. 6, n. 10, p. 341–346, 1995.
- BJORNSDOTTIR-BUTLER, K.; BENCSATH, F. A.; BENNER, R. A., Jr. Modification and single-laboratory validation of AOAC official method 977.13 for histamine in seafood to improve sample throughput. **Journal of AOAC International**, v. 98, n. 3, p. 622–627, 2015.
- BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022**.
- CRIBB, A. Y.; DE SEIXAS FILHO, J. T.; MELLO, S. C. R. (EDS.). **Manual técnico de manipulação e conservação de pescado**. Brasília: Embrapa, 2018.
- DO CARMO, F. B. T. et al. Histamina em Conservas de Sardinha. **Ciência animal brasileira**, v. 11, n. 1, p. 174–180, 2010.
- EVANGELISTA, W. P. **Controle da qualidade do ensaio de histamina em pescado**. Belo Horizonte, MG: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2015.

- FAO; WHO. **Joint FAO/WHO expert meeting on the public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products**. Roma, Italy: Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2013.
- GIROTO, J. M.; MASSON, M. L.; HARACEMIV, S. M. C. Revisão: Aminas biogênicas em embutidos cárneos e em outros alimentos. **Brazilian journal of food technology**, v. 13, n. 01, p. 01–10, 2010.
- FDA. **Fish and Fishery Products Hazards and Controls**. EUA: FDA, jun. 2022. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/seafood-guidance-documents-regulatory-information/fish-and-fishery-products-hazards-and-controls>>.
- HUNGERFORD, J. M. Scombroid poisoning: a review. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 56, n. 2, p. 231–243, 2010.
- HUNGERFORD, J. M. Histamine and scombrotoxins. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 201, p. 115–126, 2021.
- RIDOLO, E. et al. Scombroid syndrome: it seems to be fish allergy but... it isn't. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 16, n. 5, p. 516–521, 2016.
- SCHIRONE, M. et al. Histamine food poisoning. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 241, p. 217–235, 2017.
- SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **International journal of food microbiology**, v. 29, n. 2–3, p. 213–231, 1996.
- SOUZA, A. L. M. DE et al. Histamina e rastreamento de pescado: revisão de literatura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n. 0, p. 01–11, 2016.
- TAYLOR, S. L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. **Critical reviews in toxicology**, v. 17, n. 2, p. 91–128, 1986.

Capítulo 19

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-19

FRAUDES EM CARNES E PRODUTOS CÁRNEOS: MÉTODOS DE DETECÇÃO, MITIGAÇÃO DAS FRAUDES E SEUS DESAFIOS

Beatriz Albuquerque Marques da Silva¹; Paulo Henrique Leuteviler Pereira²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – IAL – CRL Campinas
E-mail: beatrizalbuquerque.ms@gmail.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas – IAL – CRL Campinas

Resumo: Este estudo revisa práticas fraudulentas em carnes e produtos cárneos, abordando métodos de detecção, mitigação das fraudes e suas consequências para a saúde pública e a integridade do mercado. As fraudes mais comuns incluem a substituição de espécies, adição de ingredientes não declarados e rotulagem enganosa. Como metodologia, foi realizada uma revisão bibliográfica com ênfase nos métodos de detecção, mitigação das fraudes e seus desafios. Entre os resultados, destacam-se métodos de detecção, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a espectrometria de massas, que, embora eficazes, enfrentam desafios de custo e infraestrutura. A pesquisa também aponta o potencial do *blockchain* para rastreabilidade, apesar dos obstáculos econômicos e operacionais. Conclui-se que a mitigação das fraudes exige uma abordagem integrada, combinando avanços tecnológicos e regulamentação da cadeia produtiva.

Palavras-chave: adulteração de alimentos; métodos de análise; produtos da carne; segurança e qualidade dos alimentos.

INTRODUÇÃO

As fraudes em carnes e produtos cárneos têm impacto direto na saúde pública e no mercado, afetando a confiança dos consumidores. É um problema crescente e demanda soluções inovadoras para garantir a integridade da cadeia produtiva (EVERSTINE, 2018; GARCIA & LEE, 2018). Práticas comuns incluem a substituição de espécies e a adição de ingredientes não declarados, como água e amido, sem o conhecimento dos consumidores (CAI & ZHANG, 2019). A pressão por reduzir custos e a complexidade da cadeia de suprimentos criam oportunidades para essas fraudes (BROWN, 2018).

Casos notórios, como a “Operação Carne Fraca” no Brasil em 2017, ilustram como frigoríficos mascararam carnes impróprias para consumo usando produtos químicos como ácido ascórbico e nitratos em excesso (O GLOBO, 2017). Além disso, essas práticas fraudulentas podem causar graves riscos à saúde, incluindo reações alérgicas e intoxicações alimentares (MILLER et al., 2017).

Este estudo revisa as técnicas de detecção e mitigação de fraudes na cadeia produtiva de carnes, destacando a eficácia de métodos como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a espectrometria de massas (THOMPSON et al., 2019). Também é discutido o uso de tecnologias emergentes, como o *blockchain*, que prometem aumentar a rastreabilidade e a

transparência, embora encontrem desafios econômicos e operacionais (LIANOU et al., 2021).

Regulamentações como o Decreto nº 9.013/2017 e a Portaria MAPA nº 672/2024 (BRASIL, 2017; 2024) visam coibir fraudes e ter padrões de inspeções específicas, mas as tecnologias laboratoriais continuam sendo essenciais para garantir a eficácia dessas normas. O presente estudo revisa os principais métodos de detecção e tecnologias emergentes aplicados na mitigação de fraudes alimentares na cadeia de produção de carnes.

MATERIAL E MÉTODOS

A revisão foi realizada a partir de fontes como artigos científicos, relatórios técnicos, livros especializados e reportagens. As bases de dados utilizadas incluem PubMed, ScienceDirect e Google Scholar, a coleta de dados foi feita por meio de buscas eletrônicas, utilizando palavras-chave como “fraudes em carnes”, “adulteração”, “espectrometria de massa”, “PCR”. Foram excluídos artigos que tratassem de fraudes em outros tipos de alimentos e artigos não disponibilizados na íntegra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da revisão indicam que fraudes em carnes e produtos cárneos são uma prática comum em mercados emergentes e desenvolvidos. A indústria de carnes enfrenta um problema sério de fraudes, colocando em risco a saúde dos consumidores e a confiança no setor.

As fraudes mais comuns na indústria de carnes abrangem a substituição de espécies de carnes (onde, carnes de menor valor são vendidas como sendo de espécies mais caras), a adição de ingredientes não declarados (como água, amido, gelatina, corantes e conservantes são adicionados para aumentar o peso, melhorar a textura e prolongar a vida útil dos produtos) e a rotulagem enganosa (informações sobre origem, qualidade e ingredientes falsos ou incompletos, induzindo o consumidor ao erro) (CAI & ZHANG, 2019; DOE, 2021; WILLIAMS & TAYLOR, 2020). Essas práticas não apenas violam normas de segurança dos alimentos, mas também podem provocar reações alérgicas severas, intoxicações e riscos à saúde pública a depender da suscetibilidade do consumidor (MILLER et al., 2017).

Um estudo realizado na África do Sul revelou que cerca de 60% dos produtos analisados apresentavam algum tipo de adulteração (CAWTHORN et al., 2013). No Brasil, práticas como a adição de água e amido são recorrentes em produtos como salsichas e hambúrgueres, esses ingredientes aumentam o peso dos produtos, enganando o consumidor e violando as normas de rotulagem (GARCIA & LEE, 2018).

Essas fraudes, além de prejudicar o consumidor, dificultam a fiscalização e prejudicam empresas que atuam de forma ética. A detecção dessas práticas exige o uso de tecnologias avançadas e a implementação de medidas rigorosas de controle de qualidade.

Dentre os métodos de detecção de fraudes, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) se destaca por sua eficácia em identificar fraudes envolvendo a substituição de espécies, mesmo em misturas complexas (CAI & ZHANG, 2019; THOMPSON et al., 2020). Em um estudo realizado por Marciano et al. (2018), a pesquisa microscópica e a pesquisa molecular por técnica de PCR foi aplicado na análise de um pastel de carne vendido em Itapira, São Paulo, Brasil. As análises revelaram a presença de papilas gustativas bovinas, sub produto

cárneo que não deveria estar presente, caracterizando uma adulteração grave. Esse exemplo demonstra a eficácia da PCR em identificar fraudes.

Outra técnica de destaque é a combinação da espectrometria de massa com técnicas de cromatografia, sendo amplamente utilizada para detectar ingredientes não declarados, como corantes e conservantes proibidos, essencial para garantir a segurança dos alimentos (THOMPSON et al., 2020; WILLIAMS & TAYLOR, 2020). No entanto, tanto a PCR quanto a espectrometria de massa apresentam limitações relacionadas ao custo elevado e à necessidade de infraestrutura e capacitação técnica (CAI & ZHANG, 2019). A Tabela 1 apresenta uma análise das fraudes mais frequentes na indústria de carnes, juntamente com os métodos de detecção.

Tabela 1 - Tipos de adulterantes mais comuns em carnes e produtos cárneos e os principais métodos de análises.

Adulterante	Alimento Adulterado	Método de Detecção	Referência
Proteínas vegetais	Hambúrguer	PCR, Espectrometria de massas	Ballin (2010); Fengou et al. (2024)
Carne de cavalo	Carne bovina	PCR	Everstine et al. (2018)
Água	Salsichas, embutidos	Análise físico-química	Garcia & Lee (2018)
Amido	Produtos cárneos processados	Espectrometria UV/Vis, Cromatografia	Fengou et al. (2024)
Conservantes ilegais (nitratos)	Produtos cárneos processados	Espectrometria UV/Vis	Miller et al. (2017)
Carne de animais silvestres	Produtos de origem animal	Análise de DNA	Lianou et al. (2021)
Corantes (ex.: Sudão IV)	Carnes processadas	Cromatografia acoplada à Espectrometria de massas	Clark et al. (2020)

Tecidos inferiores	Carne moída	Microscopia	Marciano et al. (2018)
--------------------	-------------	-------------	---------------------------

Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Apesar do avanço tecnológico na detecção de fraudes, a aplicação dessas tecnologias enfrenta desafios significativos. Em mercados emergentes, os custos elevados dos equipamentos e a falta de profissionais qualificados são as principais barreiras. Pequenas e médias empresas do setor alimentício muitas vezes não conseguem arcar com o investimento necessário para adquirir e manter as ferramentas de detecção mais avançadas. Além disso, a complexidade das cadeias de suprimento gera mais pontos de vulnerabilidade, dificultando a implementação de sistemas de controle eficazes em todas as etapas do processo (SMITH & JONES, 2021).

Para superar esses desafios, é fundamental a criação de políticas públicas que incentivem a adoção de novas tecnologias, por meio de subsídios, incentivos fiscais e treinamento de pessoal qualificado. A cooperação entre governos e a indústria alimentícia é essencial para garantir que todos os envolvidos tenham acesso a ferramentas adequadas para a detecção e mitigação de fraudes, promovendo a integridade da cadeia de suprimentos (CLARK et al., 2020).

Ferramentas para melhorar a rastreabilidade e a transparência na cadeia produtiva de carnes, como o *blockchain* surgem como uma alternativa promissora. Essa tecnologia permite o registro imutável de todas as etapas da produção, dificultando adulterações e fornecendo informações claras para o consumidor final (LIANOUE et al., 2021). No entanto, sua aplicação ainda enfrenta barreiras significativas, principalmente para pequenas empresas, que possuem recursos financeiros limitados e pouca infraestrutura para integrar sistemas digitais complexos (FENGOU et al., 2024). A efetivação dessas tecnologias exige colaboração entre governo e setor privado, além de incentivos financeiros que facilitem a adoção por empresas menores (JOHNSON et al., 2020).

CONCLUSÕES

As fraudes em carnes e produtos cárneos continuam sendo um problema relevante, impactando tanto a segurança dos alimentos quanto a economia. Este estudo demonstrou que métodos analíticos, como a PCR e a espectrometria de massas, são eficazes para detectar adulterações, mas sua aplicação em larga escala ainda enfrenta barreiras de custo e infraestrutura, especialmente em mercados emergentes.

Tecnologias emergentes, como o *blockchain*, apresentam potencial para aumentar a rastreabilidade e a transparência na cadeia produtiva, mas exigem investimentos e capacitação. A mitigação das fraudes exige uma abordagem integrada, combinando avanços tecnológicos, regulamentações e ações coordenadas de governos, empresas e consumidores para garantir a segurança dos alimentos e a proteção dos direitos do consumidor.

A regulamentação brasileira, por meio do Decreto nº 9.013/2017, é um exemplo de esforço nesse sentido, mas é necessário incentivar a adoção de tecnologias de rastreamento, como o *blockchain*, para garantir maior conformidade e proteção ao consumidor. Futuras pesquisas podem explorar maneiras de tornar a adoção do *blockchain* mais acessível para pequenas empresas e avaliar o impacto da inteligência artificial na detecção de fraudes. A

cooperação entre governos, indústria e sociedade é essencial para garantir a segurança dos alimentos e a integridade dos produtos cárneos no mercado global.

REFERÊNCIAS

BROWN, R. Global supply chains and food safety: challenges and solutions. **Food Research International**, v. 109, p. 1-10, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996918300347> Acesso em: 30 set. 2024.

BRASIL. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Dispõe sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 mar. 2017. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2017/decreto-9013-29-marco-2017-784536-publicacaooriginal-152253-pe.html>. Acesso em: 21 out. 2024.

BRASIL. **Portaria MAPA nº 672, de 8 de abril de 2024**. Estabelece os procedimentos de cadastro no Sistema de Gestão de Serviços de Inspeção. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 abr. 2024. Disponível em: <https://www.iagro.ms.gov.br/wp-content/uploads/2024/05/PORTARIA-MAPA-No-672-DE-8-DE-ABRIL-DE-2024-PORTARIA-MAPA-No-672-DE-8-DE-ABRIL-DE-2024-DOU-Imprensa-Nacional.pdf>. Acesso em: 21 out. 2024.

CAI, H.; ZHANG, W. Advances in the detection of food fraud. **Food Science and Technology International**, v. 25, n. 4, p. 365-377, 2019. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1082013218825334> Acesso em: 15 set. 2024.

CAWTHORN, D. M.; STEINMAN, H. A.; HOFFMAN, L. C. A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. **Food Control**, v. 32, p. 440-449, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.008> Acesso em: 21 out. 2024.

CLARK, R.; JONES, P.; SMITH, T. Effects of unauthorized colorants on food safety. **Food Safety Journal**, v. 45, n. 3, p. 123-130, 2020. Disponível em: <https://www.foodsafetyjournal.com/article/effects-unauthorized-colorants-food-safety>. Acesso em: 1 jun. 2024.

DOE, J. Adulteration in meat products: A growing concern. **Meat Industry Review**, v. 12, n. 2, p. 34-41, 2021. Disponível em: <https://meatindustryreview.com/adulteration-concern> Acesso em: 15 out. 2024.

EVERSTINE, K. et al. Development of a Hazard Classification Scheme for Substances Used in the Fraudulent Adulteration of Foods. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 1, p. 31-36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-173>. Acesso em: 1 jun. 2024

FENGOU, L.-C. et al. Features in visible and Fourier transform infrared spectra confronting aspects of meat quality and fraud. **Food Chemistry**, v. 440, n. 138184, 15 maio 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138184>. Acesso em: 21 out. 2024.

GARCIA, J.; LEE, P. Food fraud and adulteration: impacts on consumer safety. **Food Control**, v. 90, p. 266-273, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517302558>. Acesso em: 30 mai. 2024.

JOHNSON, L.; SMITH, T.; WILLIAMS, R. Historical perspectives on meat fraud: a comprehensive review. **Journal of Food Safety**, v. 42, n. 3, p. 1-10, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jfs.12778> Acesso em: 1 jun. 2024.

LIANOU, A.; PAPAKONSTANTINO, M.; NYCHAS, G.-J. E.; STOITSIS, J. Fraud in meat and poultry products. **Food Safety and Protection**. Elsevier, 2021. p. 85-134. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817242-1.00012-9>. Acesso em: 21 out. 2024.

MARCIANO, M. A. M., FIORAVANTI, M. I. A., MAZON, E. M. D. A., SILVA, S. O. D. S., BRANDÃO, P. E., & BALIAN, S. D. C. (2018). Microscopic and molecular identification of foreign matter in food: detection of fraudulent practices. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, 6(4), 86-90. Acesso em: 30 set. 2024.

MILLER, J.; THOMPSON, A.; DAVIS, K. Risks associated with food fraud. **International Journal of Food Science**, v. 56, n. 1, p. 23-31, 2017. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijfs/2017/1643241/> Acesso em: 1 jun. 2024.

O GLOBO. **Operação Carne Fraca: Entenda os riscos e as implicações das fraudes alimentares**. 2017. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/economia/operacao-carne-fraca-entenda-os-riscos-as-implicacoes-das-fraudes-alimentares-21076007> Acesso em: 1 jun. 2024.

SMITH, J. Emerging trends in food fraud: a technological perspective. **Food Quality and Preference**, v. 75, p. 202-210, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950329318300195> Acesso em: 15 mai. 2024.

THOMPSON, J.; KELLY, A.; PARKER, L. Technological advances in food fraud detection: PCR and mass spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 12, n. 8, p. 2122-2135, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11483-019-00240-5> Acesso em: 15 abr. 2024.

WILLIAMS, P.; TAYLOR, R. Meat quality and food safety: the impact of adulteration. **Journal of Meat Science**, v. 29, n. 4, p. 40-46, 2020. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174019300458> Acesso em: 15 abr. 2024.

Capítulo 20

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-20

DETECÇÃO MOLECULAR DE MICOBACTÉRIAS EM AMOSTRAS DE MAMÍFEROS SILVESTRES E SUAS IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA

Laís Ferreira Inácio¹; Vanessa Campos Paizan²; Luciana da Silva Ruiz Menezes³; Virgínia Bodelão Richini Pereira⁴

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública- NCBM– IAL- Bauru;
E-mail: lais.f.inacio@unesp.br

²Mestranda do Programa de Doenças Tropicais, FMB-UNESP-Botucatu; ³Pesquisador Científico VI e Diretor Técnico I, CLR II Bauru; ⁴Pesquisador Científico VI e Diretor Técnico de Saúde II, CLR II Bauru

Resumo: A saúde única engloba a saúde animal, humana e ambiental, tornando-se cada vez mais relevante diante do crescente contato entre humanos e animais e às mudanças ambientais. Nesse contexto, o estudo das zoonoses é crucial e emerge como um desafio global, com ferramentas moleculares e análise espacial contribuindo para a compreensão da epidemiologia das doenças de importância em saúde pública. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de micobactérias, agentes causadores de diversas doenças, em animais silvestres mortos por atropelamento em duas regiões brasileiras: Sul e Sudeste. Foram analisadas 43 amostras de pulmão, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional, utilizando *primers* da região da sequência repetitiva IS6110 do gênero *Mycobacterium*. Foi possível a amplificação de sete amostras, sendo três de Botucatu-SP e quatro de Santa Catarina. As amostras positivas foram sequenciadas, confirmando ser do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), em *Cerdocyon thous*; *Leopardus tigrinus*; *Didelphis albiventris*; *Cavia* sp.; *Akodon montensis*; roedor sem identificação e *Oligoryzomys* sp., demonstrando que a tuberculose pode circular em diversas espécies, aumentando o risco de transmissão. Portanto, a identificação de micobactérias em diferentes espécies e regiões ressalta a importância de estudos epidemiológicos para melhor compreensão da doença, além de reforçar a importância de implementar medidas de prevenção e controle da tuberculose zoonótica.

Palavras-chave: Reação em Cadeia da Polimerase, Saúde Única e Zoonoses

INTRODUÇÃO

A saúde humana, animal e ambiental estão interligadas e, as doenças emergentes e zoonóticas evidenciam essa relação. Essas doenças representam uma ameaça à saúde pública, economia e segurança global (NARROD *et al.*, 2012; RUPASINGHE; CHOMEL; MARTÍNEZ-LÓPEZ, 2022;). Segundo a organização mundial da Saúde (OMS), mais de 60% dos patógenos humanos têm origem zoonótica, incluindo bactérias, vírus, fungos, helmintos e protozoários sendo, seu surgimento e distribuição influenciadas por diversos fatores, como mudanças climáticas, urbanização, migração, comércio, turismo, biologia de vetores, além de fatores naturais e antropogênicos (KARESH, 2012).

O aumento do contato entre humanos e outras espécies, somados a mudanças no uso da terra e intensificação da agricultura, facilita a emergência de novas doenças em escala global. Isso ressalta a importância da abordagem de Saúde única para prevenção e controle de zoonoses (RUPASINGHE; CHOMEL; MARTÍNEZ-LÓPEZ, 2022). Dentre as zoonoses, aquelas causadas por micobactérias são especialmente relevantes.

As micobactérias são pertencentes à família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium* com mais de 180 espécies com características diversas (GUPTA; LO; SON, 2018). Há três grupos principais: o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis*, além das micobactérias não tuberculosas (MNT) (HAN *et al.*, 2008; JAGIELSKI *et al.*, 2016). MTBC inclui agentes causadores da tuberculose, como *M. tuberculosis*, responsável pela tuberculose humana, além de diversas espécies adaptadas a diferentes hospedeiros como *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium caprae*, causadores da tuberculose zoonótica que pode infectar humanos especialmente por meio do consumo de leite contaminado, destacando a interconexão entre saúde humana, animal e ambiental (GHIELMETTI *et al.*, 2021; MATOS *et al.*, 2016; CARNEIRO *et al.*, 2022).

A análise de animais atropelados é uma ferramenta valiosa para compreender a epidemiologia desses microrganismos, além de, contribuir para a conservação da fauna silvestre, uma vez que, é uma abordagem menos invasiva que permite utilizar técnicas moleculares para a detecção de patógenos (RICHINI-PEREIRA *et al.*, 2008; COBAMALES *et al.*, 2023), oferecendo informações relevantes para saúde pública visto que, fornece dados sobre a diversidade de patógenos presente na fauna silvestre brasileira.

Com base nisso, a vigilância epidemiológica é essencial para prevenir e controlar doenças somadas à epidemiologia espacial, que analisa a distribuição geográfica e os fatores que influenciam a disseminação das doenças (ELLIOTT; WARTENBERG, 2004).

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi analisar amostras de animais atropelados em Botucatu - SP e diversos municípios de Santa Catarina, utilizando biologia molecular na identificação de micobactérias do complexo tuberculose (MTCB), sendo extremamente relevante para o controle da tuberculose zoonótica. Além disso, investigar interações ecoepidemiológicas que podem auxiliar na compreensão da transmissão e distribuição das doenças, permitindo a implementação de medidas de controle mais eficazes e informando políticas públicas voltadas à saúde e manejo da fauna nas regiões estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 43 amostras de pulmão de diferentes espécies de animais silvestres coletadas no período de 2009 à 2012 em Botucatu - SP e de diversos municípios catarinenses (Blumenau, Dr. Pedrinho, Gaspar, Indaial, Navegantes, Águas de Chapecó, Chapecó, Itapoá) que estão de acordo com a Instrução normativa nº119, de 11 de outubro de 2006, Capítulo VI, Art. 26 do IBAMA. O projeto foi aprovado pelo Conselho Técnico Científico (CTC) do Instituto Adolfo Lutz (CTC-IAL 42-P/2023).

As amostras foram maceradas e, em seguida submetidas a extração do material genético utilizando o kit Illustra tissue & cells genomic Prep Mini Spin (Cytiva, USA), conforme instruções do fabricante. Após, foram quantificadas em espectrofotômetro (Epoch-Biotek, USA) a fim de verificar a qualidade das amostras. A análise do DNA foi realizada pela Reação em cadeia da polimerase (PCR) e, para avaliar a qualidade endógena, foi amplificada uma região conservada do gene β -globulina (DNA nuclear) de vertebrados que resulta em um produto de 140 pares de bases (pb) com o uso dos *primers*: β -1 (5'-ACCACCAACTTCATCCACGTTTAC-3') e β -2 (5'-

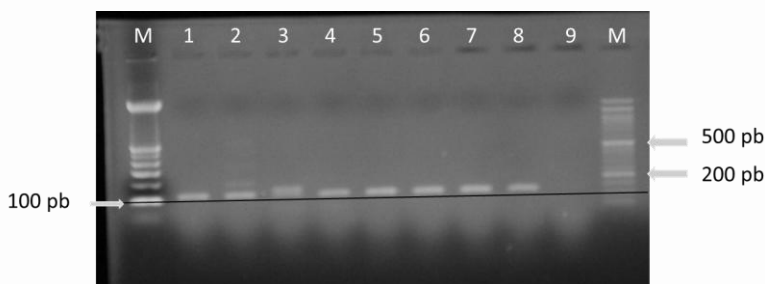
CTTCTGACACAACCTGTGTTCCTAGC-3'), ou com o uso do gene gliceraldeído 3-fosfato, com os *primers* GAPDH-4F (5'-AGGCTGAGAACGGGAACTT-3') e GAPDH-4R (5'-ATTAAGTTGGGGCAGGGACT-3'), que amplificam um produto de 911pb. Já para detecção de micobactérias foram utilizados *primers* da sequência repetitiva IS6110, IS6110-F (5'-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG-3') e IS6110-R (5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG-3'), resultando em um produto de 123 pb.

As amostras amplificadas foram purificadas com 4 µl da enzima ExoSap (GE) - USB ExoSap-IT® (USB Affymetrix, USA) e 10µl do produto da PCR, conforme instruções do fabricante. Após esse procedimento as amostras foram sequenciadas pelo método Sanger no Instituto de Biotecnologia (IBTEC-UNESP - Botucatu), como serviço de terceiros. As sequências obtidas foram visualizadas no *software* Chromas 2.6.6, alinhadas no programa MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (KUMAR *et al.*, 2018) e, comparadas com as sequências presentes no banco de dados NCBI via Blastn. Para os estudos ecoepidemiológicos, as informações de georreferenciamento foram coletadas via localização GPS (Sistema de Posicionamento Global).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo analisou 43 amostras de pulmão de animais silvestres mortos por atropelamentos no período de 2009 a 2012, sendo 20 da região de Botucatu - SP e 23 da região de Santa Catarina (Blumenau, Dr. Pedrinho, Gaspar, Indaial, Navegantes, Águas de Chapecó, Chapecó, Itapoá). Foi realizada a quantificação do material genético e a análise de genes constitutivos de mamíferos para validar a técnica e assegurar a confiabilidade dos resultados, passando pela análise molecular para detecção do gênero *Mycobacterium*, obtendo-se, sete animais foram positivos, como demonstrado na Figura 1.

Figura 1- Gel de agarose a 1,5% utilizando os *primers* *Mycobacterium* IS6110 F e R de 123 pb.



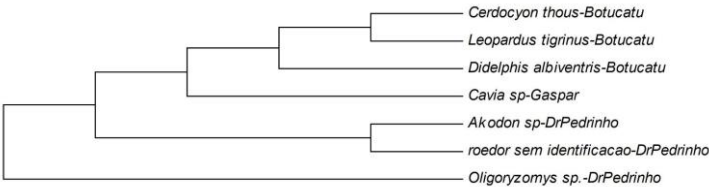
Legenda: M - DNA Ladder 100pb; 1 - *C. thous*; 2 - *L. tigrinus*; 3 - *D. albiventris*; 4 - *Cavia* sp.; 5 - *A. montensis*; 6 - roedor sem identificação;; 7 - *Oligoryzomys* sp.; 8 - DNA positivo utilizando cepa de MTBC; 9 - controle negativo; M- DNA Ladder 50pb. **Fonte:** Elaborada pela autora (2024)

A detecção de *Mycobacterium* em diferentes regiões do Brasil, como Sul e Sudeste destaca a influência de fatores ecoepidemiológicos na dispersão dessas bactérias (VERA *et al.*, 2020; CONCEIÇÃO *et al.*, 2021). Embora a tuberculose humana causada por *Mycobacterium tuberculosis* seja priorizada, a tuberculose zoonótica torna-se uma preocupação importante e reemergente em saúde pública (COUTO *et al.*, 2022). O presente trabalho confirmou, por meio do sequenciamento, a presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em diversas espécies (Figura 2), sendo a porcentagem de identificação observada na tabela 1, sugerindo que estratégias de controle e vigilância devem incluir a fauna silvestre na prevenção e manejo da doença.

Portanto, das 43 amostras analisadas 16,28% (7 amostras) foram positivas para micobactérias, destas, três eram da região de Botucatu-SP e, quatro do Médio Vale do Itajaí e

Oeste de Santa Catarina. O DNA de *Mycobacterium* spp. foi detectado em 20% (1/5) das amostras de *Cercyon thous* (cachorro-do-mato) de Botucatu - SP. Em um estudo anterior, não foi encontrado *M. leprae* em animais atropelados nesta espécie (PEDRINI *et al.*, 2010). Porém, outros estudos identificaram *M. bovis* em canídeos silvestres atropelados (MATOS *et al.*, 2016). O DNA também foi encontrado no único exemplar de *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato) e em 14,28% (1/7) das amostras de *Didelphis albiventris* (gambá-de-orelha-branca), corroborando com achados de Abdala e colaboradores (2015). Além desses animais, o DNA de *Mycobacterium* foi identificado em roedores como *Cavia* sp. (preá), *Akodon montensis* (rato-do-mato), *Oligoryzomys* sp. (rato) e roedor sem identificação, embora esses roedores sejam considerados reservatórios de patógenos zoonóticos, há poucos trabalhos da presença de micobactérias naturalmente nessas espécies (ABDALA *et al.*, 2015; VALOIS *et al.*, 2024)

Figura 2: Árvore genética com a análise evolutiva inferida usando o método Neighbor-Joining, de amostras sequenciadas para *Mycobacterium* sp. em animais silvestres mortos por atropelamento.



Fonte:Elaborado pela autora, utilizando o MEGA X (2024)

Tabela 1 - Porcentagem de identidade de *Mycobacterium* nas amostras sequenciadas

Espécie	Município	% identidade	Acesso GenBank
<i>Cercyon thous</i>	Botucatu-SP	98,37%	CP069065.1*/CP096840.1+
<i>Leopardus tigrinus</i>	Botucatu-SP	100,00%	CP069065.1*/CP096840.1+
<i>Didelphis albiventris</i>	Botucatu-SP	95,89%	CP041872.1*/CP096848.1+
<i>Cavia</i> sp.	Gaspar-SC	98,68%	CP018302.1*/CP008744.1+
<i>Akodon serrensis</i>	Dr.Pedrinho-SC	99,20%	CP018302.1*/CP008744.1+
Roedor sem identificação	Dr. Pedrinho-SC	94,51%	CP130809.1*
<i>Oligoryzomys</i> sp.	Águas do Chapecó-SC	97,60%	CP018302.1*/CP008744.1+

Legenda: **M. tuberculosis*; *M. bovis* + **Fonte:** Elaborada pela autora (2024)

Diversos trabalhos identificaram *Mycobacterium* em animais silvestres pelo mundo (AKHTAR *et al.*, 2023), sendo a presença de *M. tuberculosis* em animais silvestres em cativeiro comum, devido ao contato frequente com humanos, levando a preocupações sobre zoonose reversa (LOPES *et al.*, 2021; ZACHARIAH *et al.*, 2017). Logo, a detecção de MTBC ressalta a interconexão entre humanos, animais silvestres e o meio ambiente enfatizando a necessidade de uma abordagem de saúde única (COUTO *et al.*, 2022). Além disso, o presente estudo contribui para a vigilância epidemiológica da tuberculose e destaca o potencial de usar animais silvestres atropelados para monitorar a circulação de patógenos, fornecendo uma alternativa para investigar a distribuição de doenças infecciosas.

CONCLUSÕES

O presente estudo identificou a presença do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) em amostras de animais silvestres atropelados em Santa Catarina e São Paulo, indicando a presença de patógenos na fauna brasileira. Além disso, ressalta a importância da utilização de ferramentas moleculares e de georreferenciamento nos estudos epidemiológicos, contribuindo significativamente para a saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Keila Zaniboni Siqueira Batista e Sérgio Luiz Althoff, da FURB Blumenau, pelo fornecimento do material biológico de Santa Catarina para a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABDALA, A. A. et al. [Mycobacterium bovis in wildlife of the dairy regions of Santa Fe (Argentina)]. **Revista Argentina De Microbiologia**, v. 47, n. 3, p. 174–182, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.04.005> .Access in: 29 ago. 2024
- AKHTAR, K. et al. Molecular identification and infection pathology of Mycobacterium spp. in captive wild animals in Pakistan. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 17, n. 8, p. 1107–1113, 31 ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3855/jidc.17287> .Access in: 29 ago. 2024
- ALVES-PALMEIRA, A. R. DE O. Análise espacial e detecção molecular de Leishmania spp. e Trypanosoma spp. em animais silvestres mortos por atropelamento no estado de Santa Catarina, Brasil. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/153292> .Access in: 29 ago. 2024
- CARNEIRO, P. A. M. et al. Milk Contamination by Mycobacterium tuberculosis Complex, Implications for Public Health in Amazonas, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 85, n. 11, p. 1667–1673, 1 nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/JFP-21-303> Access in: 29 ago. 2024
- COBA-MALES, M. A. et al. From roads to biobanks: Roadkill animals as a valuable source of genetic data. **PLOS ONE**, v. 18, n. 12, p. e0290836, 7 dez. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0290836> . Access in: 10 set. 2024
- CONCEIÇÃO, E. C., et al., Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in Brazil before the whole genome sequencing era: a literature review. **Memórias do Instituto Oswaldi Cruz**, v. 116, e200517, Mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760200517> . Access in: 28 ago. 2024
- COUTO, R. M, et al., One Health and surveillance of zoonotic tuberculosis in selected low-income, middle-income and high-income countries: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 6, e0010428. 6 jun. 2022 Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010428> . Access in: 15 set. 2024
- ELLIOTT, P., WARTENBERG, D. Spatial epidemiology: current approaches and future challenges. **Environmental Health Perspectives**. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1289/ehp.6735> . Access in: 28 ago. 2024
- GHIEMMETTI, G. et al. Mycobacterium microti Infections in Free-Ranging Red Deer (Cervus elaphus). **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 8, p. 2025–2032, ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2708.210634> .Access in: 20 ago. 2024
- GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus Mycobacterium into an Emended Genus Mycobacterium and Four Novel Genera. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 13 fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067> . Access in: 20 ago. 2024
- HAN, X. Y. et al. A New Mycobacterium Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 6, p. 856–864, 1 dez. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1309/AJCPP72FJZZRRVMM> . Access in: 20 ago. 2024

- Elephants, Southern
2017. Disponível em:
- 143**

Zoonoses. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>>.
Acesso em: 8 ago. 2024.

Capítulo 21

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-21

PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* spp. E *E. coli* EM CARNE DE FRANGO CRUA REFRIGERADA COMERCIALIZADA EM SÃO PAULO

Lucas Rodrigues de Lima^{1*}; Christiane Asturiano Ristori²; Cecília Gerales Martins²; Ruth Estela Gravato Rowlands²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – IAL Central; E-mail: lucasl@alumni.usp.br

²Pesquisadora do Núcleo de Microbiologia do Instituto Adolfo Lutz

Resumo: O presente estudo teve como objetivo avaliar os padrões microbiológicos de amostras de peito de frango cru refrigerado, com osso e pele, segundo os parâmetros estabelecidos na Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022, da ANVISA e realizar a caracterização genotípica dos isolados de *Salmonella* spp. e *E. coli* pela pesquisa de genes de virulência. Foram analisadas 63 amostras, coletadas em estabelecimentos comerciais de 16 municípios do estado de São Paulo. Do total de amostras analisadas, oito (12,7%) foram consideradas em desacordo com a legislação por apresentarem bactérias aeróbias mesófilas acima do limite tolerado na legislação. A população de bactérias aeróbias mesófilas variou de $1,0 \times 10^3$ a $> 2,5 \times 10^7$ UFC/g, enquanto as contagens de *E. coli* variaram de < 10 a $7,0 \times 10$ UFC/g. Dentre as 51 cepas de *E. coli* isoladas, duas foram identificadas como EPEC atípica pela presença do gene *eae*. *Salmonella* spp. foi detectada em sete (11,1%) amostras, sendo identificados os seguintes sorotipos: *S. Schwarzengrund* (2), *S. Minnesota* (2), *S. Heidelberg* (2) e *S. Soerenga* (1). Todas as cepas de *Salmonella* spp. foram positivas para o gene *invA* e apenas duas cepas, pertencente ao sorotipo Soerenga, foram positivas para o gene *fliC*. Os resultados do presente estudo reforçam a importância da educação contínua do consumidor quanto à manipulação adequada de produtos cárneos crus, evitando, principalmente, a contaminação cruzada e, consequentemente, a ocorrência de casos e surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos.

Palavras-chave: *E. coli*, Produtos avícolas, *Salmonella* spp., virulência.

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

² Núcleo de Microbiologia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, CEP: 01246-000.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango do mundo e o maior exportador, atingindo cerca de 150 países. Com um consumo médio de 45,1 kg/hab, em 2023, a carne de frango é um dos alimentos mais consumidos da dieta brasileira (ABPA, 2024).

Diante desse cenário, é fundamental o emprego de medidas que garantam a qualidade higiênico-sanitária da carne e seus derivados em todas as etapas de produção, visando diminuir o risco de transmissão de doenças (HACHIYA *et al.*, 2020). O não cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF) pode favorecer a presença de microrganismos patogênicos provenientes do ambiente de processamento, dos manipuladores e de outras aves contaminadas, com potencial de causar gastroenterites, como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli* e *S. aureus* (GONÇALVES-TENÓRIO *et al.*, 2018; MASHAYEKH *et al.*, 2022).

Dentre esses microrganismos, *Salmonella* spp., destaca-se como um dos principais microrganismos associado com casos e surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em diversos países (BRASIL, 2024; CHANAMÉ *et al.*, 2022). A maioria dos sorotipos desse gênero é nociva ao homem, levando a manifestações clínicas que variam de acordo com os mecanismos de patogenicidade do microrganismo e das condições do hospedeiro como resposta imune e idade (SHINOHARA *et al.*, 2008).

E. coli está presente, predominantemente, no trato intestinal dos humanos e de animais de sangue quente. Em alimentos é considerada indicadora de contaminação de origem fecal e está associada a práticas de higiene inadequadas (BARCO *et al.*, 2015). A maioria das cepas são comensais, no entanto algumas podem ser patogênicas e causar doenças intestinais e extra-intestinais tanto em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos (XU *et al.*, 2022).

Considerando que os alimentos de origem animal representam uma das fontes mais importantes de bactérias patogênicas responsáveis por DTA, a análise microbiológica de produtos cárneos é fundamental para determinar a qualidade e a inocuidade dos mesmos, averiguando se os padrões e especificações microbiológicas nacionais e internacionais estão sendo atendidos. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os padrões microbiológicos de amostras de peito de frango cru refrigerado, com pele e osso, segundo os parâmetros estabelecidos na Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022, da ANVISA e realizar a caracterização genotípica dos isolados de *Salmonella* spp. e *E. coli* pela pesquisa de genes de virulência.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de abril a junho de 2024 foram analisadas 63 amostras de peito de frango cru refrigerado, com pele e osso, coletadas em estabelecimentos comerciais de 16 municípios do estado de São Paulo. As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com os parâmetros estabelecidos na Instrução Normativa nº 161, de 1º de Julho de 2022, da ANVISA (BRASIL, 2022) que determina para essa categoria de produto a pesquisa de *Salmonella* spp., enumeração de *E. coli* e bactérias aeróbias mesófilas.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada segundo metodologia descrita na ISO 6579-1:2017 (ISO, 2002) e a sorologia de acordo com o esquema de White-Kauffmann-Le Minor (GRIMONT & WEIL, 2007). A contagem de *E. coli* foi realizada pelo método de semeadura em profundidade conforme a ISO 16649-2:2001 (ISO, 2001) e de bactérias aeróbias mesófilas pela técnica de semeadura em profundidade de acordo com o

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (RYSER *et al.*, 2015).

As cepas de *E. coli* e *Salmonella* spp., isoladas das amostras de peito de frango, foram submetidas a caracterização genotípica pela pesquisa de genes de virulência. A pesquisa de genes de virulência nas cepas de *Salmonella* spp e *E. coli* foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). As cepas de *Salmonella* spp. foram submetidas a PCR multiplex para detecção dos *invA*, *spvC* e *sefA* e a três PCR simplex para pesquisa dos genes *pefA*, *fliC* e *sdflI*. Como controles positivos foram utilizadas as cepas de referência *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Com relação às cepas de *E. coli*, a pesquisa dos genes *stx1*, *stx2*, *eae* e *hly* foi realizada por PCR multiplex; dos genes *st* e *aggR* por PCR duplex e dos genes *lt*, *ipaH* e *bfp* por PCR simplex. Como controles positivos foram utilizadas as seguintes cepas: *E. coli* O157:H7, *E. coli* IAL ST/LT, *E. coli* IAL 2391, *E. coli* IAL 1893, *E. coli* IAL 307 (O124:K72) e *E. coli* O127:k6. Em todas as reações utilizou-se a água ultrapura livre de DNase/RNases como controle negativo.

Para extração do DNA genômico foi utilizando o kit de extração QIAamp® DNA Mini Kit, seguindo as instruções do fabricante. Todas as reações de PCR foram realizadas a partir de uma solução contendo 2 µL de DNA; 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 200 µM de cada dNTP e 1,5 mM MgCl₂ (pH 8,5); 1 µL do *primer* (10 pmoles) e água livre de DNAase e RNAase para um volume final de reação de 25 µL, exceto para a pesquisa dos genes *invA*, *spvC* e *sefA* em que a quantidade do *primer* foi alterada para 0,5 µL (10 pmoles). Os produtos gerados na PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1x (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de-EDTA), contendo brometo de etídio a 0,5 µg/mL. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100 bp. A corrida foi realizada a 120 Volts por 1 h e o gel visualizado sob transiluminação UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 63 amostras de peito de frango cru analisadas, verificou-se população de bactérias aeróbias mesófilas variando de $1,0 \times 10^3$ a $> 2,5 \times 10^7$ UFC/g, sendo que oito (12,7%) apresentaram contagens acima do limite tolerado pela IN nº 161, de 01/07/2022, da ANVISA, e 12 (19,0%) foram consideradas com qualidade intermediária para esse parâmetro. A presença de mesófilos em grande quantidade sugere falhas na limpeza e desinfecção das superfícies, práticas inadequadas de higiene durante a produção, além de condições inadequadas de tempo e temperatura no processo de produção, transporte e conservação dos alimentos (PENTEADO & ESMERINO, 2011).

Quanto à contagem de *E. coli*, a população variou de < 10 a $7,0 \times 10$ UFC/g e dentre as amostras analisadas, 28,6% (18/63) foram positivas para *E. coli*, no entanto as contagens estavam abaixo do limite inferior especificado na legislação. Dentre as amostras positivas, 51 cepas foram isoladas e submetidas a pesquisa genes de virulência que caracterizam os patótipos de *E. coli* diarreio gênicas. Todas as cepas foram negativas para os genes *st*, *stx1*, *stx2*, *bfp*, *lt*, *hly*, *ipaH* e *aggR*. Apenas duas cepas, isoladas da mesma amostra de peito de frango, foram positivas para o gene *eae* que caracteriza o patótipo EPEC. Por sua vez, o gene *bfp* não foi detectado nas cepas de *E. coli* avaliadas, portanto as duas cepas positivas para o gene *eae* foram caracterizadas como EPEC atípica (aEPEC). A baixa frequência de *E. coli* diarreio gênicas em carne de frango (1,6%), observada no presente estudo, tem sido descrita no Brasil. Cerutti *et al.* (2020) realizaram a pesquisa dos genes *stx1*, *stx2*, *eae* e *bfp* em 246 carcaças de frango congelada comercializadas no estado de Santa Catarina e detectaram

aEPEC em 4,9% das amostras. Em outro estudo, descrito por Tanabe *et al.* (2019), foram analisadas 103 amostras de peito de frango, coletadas em Botucatu, e 2,9% foram positivas para aEPEC.

Salmonella spp. foi detectada em sete (11,1%) amostras, sendo identificados os seguintes sorotipos: *S. Schwarzengrund* (2), *S. Minnesota* (2), *S. Heidelberg* (2) e *S. Soerenga* (1). Embora tenha sido detectada *Salmonella* nestas amostras, todas foram consideradas de acordo com a Instrução Normativa nº161, da ANVISA, que estabelece, para carnes de aves, ausência de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. No Brasil, estudos mostram prevalência de *Salmonella* spp. em carne de aves variando de 8,3% a 46% (GOMES *et al.*, 2022; PAVELQUESI *et al.*, 2023).

Dentre as amostras positivas para *Salmonella* spp. foram avaliadas 11 cepas quanto ao perfil de virulência. O gene de virulência *invA* foi detectado em todas as cepas de *Salmonella* spp. Esses resultados corroboram com diversos estudos que detectaram o gene em 100% das cepas provenientes de fontes diversas (MASHAYEKH *et al.*, 2022; MORASI *et al.*, 2022;). A alta frequência observada entre os isolados sugere que o gene é conservado no gênero *Salmonella* spp., sendo comumente utilizado como marcador para detecção do patógeno (WHANG *et al.*, 2009).

O gene *fliC*, que codifica a flagelina, parte estrutural do flagelo da bactéria, (HAIKO *et al.*, 2013) foi identificada em duas cepas de *S. Soerenga*, provenientes da mesma amostra. Alegria-Moran *et al.* (2017) detectou o gene *fliC* em todas as 25 cepas de *Salmonella* spp., pertencentes aos sorotipos Typhimurium, Infantis, Enteritidis, Hadar,

Tennessee e Kentucky, isoladas de amostras aves e suínos no Chile. Em contrapartida, Vilela *et al.* (2020) analisou 113 cepas de *S. Dublin* isoladas de humanos e animais e todas foram negativas para o gene.

Para os demais genes pesquisados (*spvC*, *sefA*, *pefA* e *sdfl*), todas as cepas foram negativas. Fardsanei *et al.* (2017) avaliou 34 *S. Enteritidis* isoladas de ovos e produtos cárneos, identificando o gene *spvC* em 100% dessas cepas. O gene *sefA* é exclusivo dos sorotipos pertencentes ao grupo D, como *S. Enteritidis* e *S. Dublin* (MALORNY *et al.*, 2007), portanto a ausência nas cepas avaliadas era esperada. Quanto ao gene *pefA*, Thung *et al.* (2018) identificaram o gene em três cepas isoladas em carne bovina, sendo uma *S. Enteritidis* e duas *S. Typhimurium*, enquanto Sever *et al.* (2019) detectaram o gene em *S. Infantis*, isoladas de frangos e perus. O gene *sdfl* é utilizado para confirmar a identificação do sorotipo Enteritidis, que não foi isolado entre as amostras de peito de frango analisadas (AGRON *et al.*, 2001).

CONCLUSÕES

Os resultados do estudo demonstraram que, apesar do baixo número de amostras em desacordo com a legislação, foram identificados microrganismos potencialmente patogênicos, sugerindo a necessidade de maior fiscalização e controle de qualidade para garantir a conformidade com os padrões estabelecidos. A presença de patógenos nas amostras reforça, ainda, a importância da educação contínua do consumidor quanto à manipulação adequada de produtos cárneos crus, evitando, principalmente, a contaminação cruzada e, consequentemente, a ocorrência de casos e surtos de DTA.

AGRADECIMENTO

Ao Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Instituto Adolfo Lutz pela realização da sorologia de *Salmonella* spp.

REFERÊNCIAS

- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2024**. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2024/04/ABPA-Relatorio-Anual-2024_capa_frango.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2024.
- AGRON, P. *et al.* Identification by Subtractive Hybridization of Sequences Specific for *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4984–4991, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.4984-4991.2001>>. Acesso em: 15 mai. 2024.
- ALEGRIA-MORAN, R. *et al.* First detection and characterization of *Salmonella* spp. In poultry and swine raised in backyard production systems in central Chile. **Epidemiology and infection**, v. 145, p. 3180–3190, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0950268817002175>>. Acesso em: 15 mai. 2024.
- BARCO, L. *et al.* A systematic review of studies on *Escherichia coli* and Enterobacteriaceae on beef carcasses at the slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**, v. 207, p. 3039, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.027>>. Acesso em: 23 out. 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar: Informe – 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe2024/view>. Acesso em: 23 out. 2024.
- BRASIL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 161, DE 1º DE JULHO DE 2022**. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CERUTTI, M. *et al.* *Escherichia coli* in Chicken Carcasses in Southern Brazil: Absence of Shigatoxigenic (STEC) and Isolation of Atypical Enteropathogenic (aEPEC). **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 22, n. 1, p. eRBCA-2019-1093, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1093>>. Acesso em: 21 mai. 2024.
- CHANAMÉ P. L. *et al.* Sources and trends of human salmonellosis in Europe, 2015–2019: an analysis of outbreak data. **International Journal of Food Microbiology**, v. 379, p. 109850, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109850>>. Acesso em: 22 out. 2024.
- FARDSANEI, F. *et al.* Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies enterica serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 451456, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.026>>. Acesso em: 21 mai. 2024
- GOMES, V. T. M. *et al.* Characterization of *Salmonella enterica* Contamination in Pork and Poultry Meat from São Paulo/Brazil: Serotypes, Genotypes and Antimicrobial Resistance Profiles. **Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 358, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/pathogens11030358>>. Acesso em: 23 out. 2024.
- GONÇALVES-TENÓRIO, A. *et al.* Prevalence of Pathogens in Poultry Meat: A Meta-Analysis of European Published Surveys. **Foods**, v. 7(5), n. 69, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/foods7050069>>. Acesso em: 17 mai. 2024.
- GRIMONT, P. A.; WEIL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. **Institute Pasteur**, p. 1166, 2007. Disponível em: <https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf>. Acesso em: 22 out. 2024.

HACHIYA, J. *et al.* Contaminação por *Salmonella* spp. durante o processamento de aves em abatedouros. *Ars Veterinaria*, v. 36, p. 218-229, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.15361/2175-0106.2020v36n4p218-229>>. Acesso em: 16 mai 2024.

HAIKO, J.; WESTERLUND-WIKSTRÖM, B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, v. 2, p. 1242–1267, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/biology2041242>>. Acesso em: 16 mai. 2024.

ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of positive *Escherichia coli*. **International Organization for Standardization**, ed. 1, 2001.

ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. **International Organization for Standardization**, ed. 4, 2002.

MALORNY, B. *et al.* A real-time PCR for the detection of *Salmonella Enteritidis* in poultry meat and consumption eggs. *Journal of Microbiological Methods*, v. 70, n. 2, p. 245-251, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.013>>. Acesso em: 16 mai. 2024.

MASHAYEKH, Z. *et al.* Detection of invA, sivH, and agfA virulence genes in *Salmonella* spp. isolated from broiler breeder farms in Alborz Province, Iran. *Archives of Razi Institute*, v. 77, n. 2, p. 607-614, 2022. DOI: 10.22092/ARI.2021.353674.1607. Disponível em: <<https://doi.org/10.22092/ARI.2021.353674.1607>>. Acesso em: 16 mai. 2024.

MORASI, R. M. *et al.* Overview of antimicrobial resistance and virulence factors in *Salmonella* spp. isolated in the last two decades from chicken in Brazil. *Food Research International*, v. 162, p. 111955, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111955>>. Acesso em: 16 mai 2024.

PENTEADO, F.R.; ESMERINO, L.A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de Ponta Grossa –Paraná. *Revista Publicatio UEPG - Ciências Biológicas*, v.17, n.1, p. 37-45, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.5212/publicatio%20uepg.v17i1.3446>>. Acesso em: 17 mai. 2024.

PAVELQUESI, L. S. *et al.* Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* spp. Isolated From Chilled Chicken Meat Commercialized at Retail in Federal District, Brazil. *Journal of Food Protection*, v. 86, n. 9, p. 100130, set. 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100130>>. Acesso em: 23 out. 2024.

RYSER, E. T.; SCHUMAN, J. D. Mesophilic aerobic plate count. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 5. ed. Washington, DC: APHA, 2015. cap. 2, p. 13-25.

SEVER, N.; AKAN, M. Molecular analysis of virulence genes of *Salmonella* Infantis isolated from chickens and turkeys. *Microbial Pathogenesis*, v. 126, p. 199-204, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.006>>. Acesso em: 18 mai. 2024.

SHINOHARA, N. K. S. *et al.* *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, n. 5, p. 1675–1683, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1413-81232008000500031>>. Acesso em: 18 mai. 2024.

TANABE, R. H. S. *et al.* Identification and characterization of atypical enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ground beef and poultry breast purchased in Botucatu, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 50, n. 4, p. 1099-1103, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42770-019-00101-6>>. Acesso em: 23 out. 2024

THUNG, T. Y. et al. Prevalence, Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella* Serovars from Retail Beef in Selangor, Malaysia. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2697, 2018, Disponível em: Acesso em: 15 mai. 2024.

VILELA, F. et al. Virulence traits and expression of *bstA*, *fliC* and *sopE2* in *Salmonella* Dublin strains isolated from humans and animals in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 80, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104193>>. Acesso em: 22 out. 2024.

WHANG, Y. P. et al. Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA*, growth and intracellular invasion and survival. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 328-334, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.07.012>>. Acesso em: 22 out. 2024.

XU, X. et al. Using *E. coli* population to predict foodborne pathogens in pastured poultry farms. **Food Microbiology**, v. 108, p. 104092, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104092>>. Acesso em: 23 out. 2024.

Capítulo 22

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-22

AVALIAÇÃO DO TEOR DE GORDURA TOTAL EM BISCOITOS: IMPLICAÇÕES PARA A SAÚDE DO CONSUMIDOR

Maria Angélica Loures de Souza^{1*}; Mahyara Markievicz Mancio Kus-Yamashita²

¹Estudante do Curso de Especialização, Instituto Adolfo; E-mail: angelitasza@gmail.com

²Pesquisadora Núcleo de Química, Física e Sensorial, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz.

Resumo: Muito consumido pela população, em especial por crianças, o biscoito utiliza vários tipos e quantidades de óleo como matéria prima no processamento, que determinam a qualidade do produto final. Os tipos de gordura usados nos biscoitos são prioritariamente ácidos graxos saturados e trans, que na maior parte estão relacionados com o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. O objetivo do trabalho foi verificar os teores de gorduras totais (GT) em biscoitos entre 2009 a 2016, e analisar a evolução no período. Foram avaliados 203 laudos técnicos de amostras de biscoitos, nas seguintes categorias: salgado, água e sal, *cream cracker*, polvilho e biscoito doce. Pode-se verificar que há uma tendência de diminuição da quantidade de gordura total nos alimentos industrializados ao longo dos anos, entretanto o impacto na população brasileira, aliado ao alto consumo destes produtos, e a ausência de dados de gordura total para estes alimentos em anos mais recentes, ainda, não pode ser observado. O alto consumo de gordura em produtos industrializados agrava o risco de desenvolvimento de DCNT. Assim, as informações corretas da rotulagem nutricional pode ser uma estratégia de prevenção de doenças, e a principal ferramenta de direito na escolha de produtos conscientes atrelada a análise laboratorial frequente como uma defesa a saúde do consumidor.

Palavras-chave: Lipídeos, Vigilância em Saúde Pública, Rotulagem de Alimentos

INTRODUÇÃO

Os óleos e gorduras são nutrientes essenciais e fonte de energia para o metabolismo do organismo humano devido às suas propriedades nutricionais, funcionais e organolépticas. Eles fornecem ácidos graxos essenciais, servem como precursores hormonais, são veículos para vitaminas lipossolúveis e contribui para promover a saciedade. A composição de lipídeos nos alimentos é muito ampla e tem influência nos atributos de textura, sabor e nutrição, sendo um foco importante na pesquisa. (RAMALHO; SUAREZ, 2013).

Os óleos e gorduras são a matéria prima mais importante em processamento de biscoitos, segundo Moretto e Fett (1999), no processamento o tipo de óleo e quantidade a serem utilizados, determinam o grau de qualidade no produto final. Considerando a variedade de biscoitos que há no mercado, existem fatores a serem considerados como: resistência à rancificação; sabor; aroma e textura. A adição de lipídios em biscoitos funciona

como amaciador, fornecendo melhoria na expansão, lubrificação da massa (óleo) e até mesmo como agente de crescimento pela retenção de ar. A quantidade de sólidos tem importância devido a temperaturas ambiente; no manuseio.

As doenças crônicas não transmissíveis estão entre os maiores desafios para a saúde pública no mundo. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que em torno de 74% das mortes ocorridas globalmente, em 2019, foram ocasionadas pelas DCNT representadas principalmente por doenças cardiovasculares, respiratórias crônicas, diabetes e cânceres. No Brasil são igualmente relevantes, sendo essas quatro principais categorias responsáveis, em 2022, por 52% do total de óbitos registrados, mais de 790 mil. (VIGITEL, 2024).

O Relatório sobre Alimentação, Nutrição e Prevenção de Doenças Crônicas revisou as evidências da relação entre os padrões alimentares e o risco de DCNT, e concluiu que o consumo excessivo de certos nutrientes, como os açúcares livres, gorduras saturadas, gorduras *trans* e sódio, estavam relacionadas com diversas enfermidades (Brasil, 2019). O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das DCNT no Brasil (2011-2022), destaca a importância da regulamentação de alimentos como estratégia de saúde pública na promoção de uma alimentação saudável. As ações propostas nesse eixo incluem a revisão e o aprimoramento das normas de rotulagem de alimentos, de forma a atender critérios de legibilidade e visibilidade que facilitem a compreensão pelo consumidor. Sua importância como instrumento de orientação é mencionada no Guia Alimentar para a População Brasileira, bem como na Política Nacional de Alimentação e Nutrição (Brasil, 2019).

Neste sentido, o Brasil foi um dos primeiros países a implementar e adotar a rotulagem nutricional obrigatória, elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) fundamentada em diretrizes da Organização Mundial de Saúde e do *Codex Alimentarius*. (Brasil, 2019). Os teores de gorduras totais (GT) devem ser declarados no rótulo, assim como gorduras saturadas e *trans*. (ANVISA 2020).

Considerando que a rotulagem nutricional é um instrumento de direito à informação do consumidor, o monitoramento da qualidade dos alimentos, incluindo a avaliação dos teores de GT, é importante para verificar a veracidade das informações no rótulo.

O objetivo do trabalho foi verificar os teores de gorduras totais nos biscoitos entre 2009 e 2016, e analisar a evolução no período.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram selecionados 203 laudos técnicos de análises de biscoitos que forneciam os valores de gordura total/lipídios no período de 2009 a 2016 obtidos pelo Núcleo de Química, Física e Sensorial do Centro de Alimentos, do Instituto Adolfo Lutz Central. Inseridos manualmente em um banco de dados criado com o software Microsoft Excel. A organização foi feita de forma a permitir a comparação entre os diferentes alimentos, ano de análise e teor de gordura total.

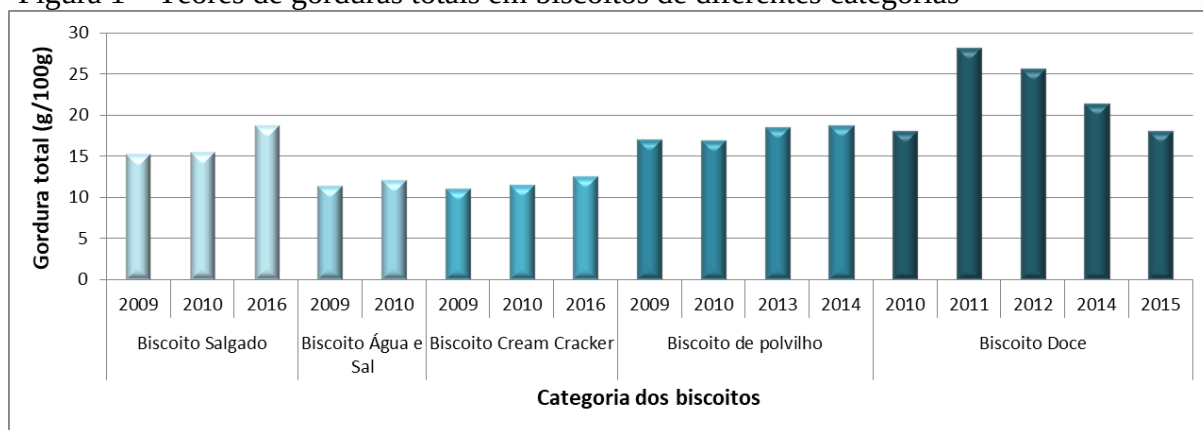
Os laudos foram separados nas seguintes categorias: biscoito salgado (34); biscoito água e sal (32); biscoito cream cracker (37); biscoito de polvilho (44) e biscoito doce (56).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, são apresentados os teores médios de gorduras totais para os biscoitos. Os resultados para os biscoitos água e sal e *cream cracker* foram similares nos anos avaliados

(2009, 2010 e 2016), com médias entre 11,04 e 12,58 g/100g. Já os biscoitos salgados apresentaram as maiores médias, variando entre 15,29 e 18,80 g/100g. As análises de biscoito doce, que incluem os recheados, revelaram a maior média de 28,25 g/100g em 2011, e os resultados foram reduzindo ano a ano, com menor valor médio obtido em 2015 (18,13 g/100g), sugerindo uma alteração de formulação, com redução na quantidade de gordura adicionada. (18,13 g/100g), sugerindo uma alteração de formulação, com redução na quantidade de gordura adicionada.

Figura 1 – Teores de gorduras totais em biscoitos de diferentes categorias



De acordo com a Figura 1, para o biscoito salgado foi observado o teor de gordura de 23,14 g/100g (valor máximo) atingindo um aumento significativo de cerca 21%, entre os anos de 2010 e 2016. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados (ABIMAPI), os biscoitos salgados, tiveram crescimento de venda em valor expressivo, portanto é um indicativo de atenção quanto a monitorização da qualidade de GT.

Para biscoito de polvilho, entre 2009 e 2014, os resultados médios de GT variaram de 16,98 a 18,78 g/100g, e foram próximos aos encontrados por Aued-Pimentel e Separovic (2016) nos anos de 2009 e 2010 (17,10 e 16,98 g/100g, respectivamente) e inferiores aos obtidos em 2013 e 2014, próximos a 30 g/100g, o que pode indicar uma mudança de composição, indicando não haver uma padronização na formulação deste tipo de produto, o que pode ser confirmado pela composição de ácidos graxos.

As análises de biscoito doce, que incluem os recheados, tiveram média de 18,12 g/100g de GT em 2010; 28,25 g/100g em 2011, e os resultados foram reduzindo ano a ano, com menor valor médio obtido em 2015 (18,13 g/100g), revelando uma alteração de formulação e redução na quantidade de gordura adicionada.

No estudo de Aued-Pimentel et al. (2003), que avaliou diversos biscoitos comerciais (incluindo biscoitos salgados, doces e recheados), os teores de ácidos graxos saturados e *trans* foram similares, considerando as diversas marcas e fabricantes, sendo os AGT prioritários no conteúdo total de lipídios, com exceção das amostras do tipo wafer, em que o teor de AGS foi superior em relação ao AGT.

A Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados (ABIMAPI) informou no anuário (2023) que o volume produzido entre 2022 e 2023 foi de 1,5 toneladas de biscoitos. Os números da Nielsen contratada pela (Abimapi) mostram resultado de pesquisa, de vendas em destaque a categoria que mais cresceu foi a de biscoitos cobertos com chocolate com 34%; recheados doces (+21%); cookies (+17%) devido a multiplicação de marcas de variedades do item e a busca por indulgência. Na análise geral dos biscoitos é possível afirmar que, apesar da alta nos preços, especialmente no início de 2022, a categoria manteve penetração e consumo, conseguindo atingir movimentação de vendas em 22% e 21,8% de 2021 para 2022 segundo a análise da ABIMAPI feita a partir dos dados da Nielsen e Kantar.

Sabe-se que o padrão alimentar relacionado ao ganho excessivo de peso, à obesidade e às DCNT é caracterizado, especialmente, pelo baixo consumo de alimentos in natura e minimamente processados em paralelo ao consumo excessivo de alimentos processados. Aproximadamente 10,5% de todas as mortes prematuras entre brasileiros de 30 a 69 anos e 22% das mortes prematuras por doenças cardiovasculares foram atribuídas ao consumo de processados. Estima-se que 25% das mortes ocorridas prematuramente no mundo poderiam ser evitadas com mudanças na alimentação. (VIGITEL, 2024).

CONCLUSÕES

Pode-se verificar que há uma tendência de diminuição da quantidade de gordura total nos alimentos industrializados ao longo dos anos, entretanto o impacto na população brasileira, aliado ao alto consumo destes produtos, e a ausência de dados de gordura total para estes alimentos em anos mais recentes, ainda, não pode ser observado. A alimentação é um dos fatores que contribuem com a incidência das doenças crônicas não transmissíveis, e o alto consumo de gordura nos alimentos industrializados impactam nestas doenças. A informação nutricional onde esclarece a composição dos alimentos desde que correta atrelada a análise laboratorial frequente como uma defesa a saúde do consumidor e proteção contra fraudes, demonstrou ser uma ferramenta mais efetiva e adequada nas escolhas do padrão alimentar de cada indivíduo.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC 429, de 08 de outubro de 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br> “Acesso em: 10 dez.24.”

BRASIL. **Relatório de Análise de Impacto Regulatório sobre Rotulagem Nutricional.** Brasília: Gerência-Geral de Alimentos, setembro de 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/regulamentacao/air/analises-de-impactoregulatorio/2019/relatorio-de-analise-de-impacto-regulatorio-sobre-rotulagemnutricional.pdf/view>. “Acesso em: 26 out.24.”

AUED-PIMENTEL, S. et al. Ácidos graxos saturados versus ácidos graxos trans em biscoitos. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 62, n. 2, p. 131-137, 2003.

AUED-PIMENTEL, Sabria; SEPAROVIC, Luciana. Biscoitos de polvilho do comércio do estado de São Paulo, Brasil: composição da gordura com destaque para os ácidos graxos trans. *Vigilância Sanitária em Debate*, v. 4, 2016. DOI: 10.3395/2317-269x.00600.

ABIMAPI. (2024). Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados. Disponível em:
<https://abimapi.com.br/estatisticasmercado/> “Acesso em: 26 out. 2024.”

IBGE. (2004). *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003: Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:
<https://www.ibge.gov.br>. “Acesso em: 25 out. 2024.”

ITAL. Publicações. Disponível em: <https://ital.agricultura.sp.gov.br/publicacoes>. “Acesso em: 22 out. 2024.”

MORETTO, E.; FETT, R. *Processamento e Análise de Biscoitos*. São Paulo: Livraria Varela, 1999. ISBN : 8585519525

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A química dos óleos e gorduras e seus processos de extração e refino. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 1, p. 2-15, 2013. Disponível em:
<http://www.uff.br/rvq>. “Acesso em: 25 out. 2024.”

VIGITEL. (2024). *Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefone*. Ministério da Saúde. Disponível em:
<https://www.gov.br/saude/ptbr/centrais-de-conteudo/publicacoes/vigitel>. “Acesso em: 22 out. 2024.”

Capítulo 23

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-23

DETERMINAÇÃO DE PROLINA NOS MÉIS DO ESTADO DE SÃO PAULO

Klaus Dombek^{3*}, Cristiane Bonaldi Cano²

^{1*}Estudante do Curso de Especialização de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – NQSA – IAL;
E-mail: klausdomb@gmail.com

²Docente/pesquisador do NQSA – CALI – IAL; E-mail: cristiane.bonaldi@ial.sp.gov.br

Resumo: A prolina no mel é um aminoácido amplamente estudado para sua caracterização e fiscalização em países europeus e do oriente, entretanto no Brasil o uso da análise de prolina no mel é negligenciado e seus estudos ainda são raros. O objetivo deste trabalho visa avaliar amostras de méis quanto à concentração de prolina e comparar com as recomendações internacionais. Foram analisadas 25 amostras de méis do Programa Paulista de Análise de Alimentos 2024. A concentração de prolina foi determinada pelo método espectrofotométrico 979-20 da AOAC. Os resultados do teor de prolina das amostras de méis tiveram um intervalo de 64-761 mg.Kg⁻¹, e esta quando comparada com outros estudos brasileiros e europeus, observou-se que houve uma diferença entre as médias apresentadas entre elas, sugerindo um influência na concentração de prolina quanto a sua origem. Em relação à adoção dos limites internacionais de prolina no mel. Nota-se que a grande maioria do conjunto amostral se enquadra dentro do limite mínimo exigido de 180 mg.Kg⁻¹, indicando que os méis analisados são autênticos e de boa qualidade. Conclui-se que a análise de prolina no mel pode representar um parâmetro importante, entre outros, para indicar a qualidade e identidade do produto. Assim podendo ser sugerido sua implementação na regulamentação brasileira.

Palavras-chave: Prolina; Mel; Fraude; Legislação

INTRODUÇÃO

A prolina é um aminoácido comumente usado como precursor de proteínas, tem uma função importante nas plantas de protegê-las de efeitos de estresse hídrico ao aumentar sua concentração nas células, que acaba se refletindo no néctar e principalmente no pólen, o qual é a maior fonte de aminoácidos que as abelhas carregam para o mel (Bryś & Strachecka, 2024).

Para as abelhas a prolina é uma importante fonte energética, também usada na elaboração do mel e da geleia real. Apesar de sua função vital, tanto as abelhas como as

^{1*} Aluno do curso de especialização, NQSA, IAL/SUS/CEFOR/SES, São Paulo, e-mail: klausdomb@gmail.com

² Pesquisadora científica, NQSA, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, e-mail: cristiane.bonaldi@ial.sp.gov.br

plantas conseguem sintetizá-la, sendo um aminoácido não essencial (Barker & Lehner, 1972).

No mel, a prolina representa cerca de 50-85% do teor de aminoácidos presentes, e a sua origem é dada principalmente pelo pólen, variando dependendo da florada predominante, além disso, é introduzida pela própria abelha, a qual possui altos valores de prolina na sua saliva, usadas para a criação do mel e a geleia real, e esses valores também são influenciados pela espécie da abelha (Brys & Strachecka, 2024).

O mel por ser um produto de alto valor agregado possui vários tipos de fraudes, muitos países europeus e da Ásia ocidental utiliza o parâmetro de prolina, pois esta sempre deve estar presente no mel e seus valores podem refletir na autenticidade e qualidade (Damto *et al*, 2024; Nisbet *et al*, 2018; Hajian-Tilaki *et al*, 2024).

Este estudo teve o objetivo de avaliar as amostras de méis quanto à concentração de prolina e sua comparação com recomendação internacional.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O plano amostral foi constituído por 25 amostras de méis em suas embalagens originais coletadas pelo programa paulista 2024. As amostras foram subdivididas em tubos Falcon de 50mL e mantidas em temperatura ambiente para a realização da análise (São Paulo, 2024a,b).

Método

Este procedimento foi baseado no método 979.20 do AOAC (HORWITZ, 2005).

Preparo da Curva de prolina

Para a realização da curva, foram preparados 8 pontos a partir da solução mãe de prolina nas respectivas diluições 1mL, 2mL, 3mL, 4mL, 5mL, 6mL, 7mL e 8mL em balões de 50mL com água ultrapura.

Preparo da amostra

Foram pesados 2,5 gramas da amostra de mel e diluída com água ultrapura em balão volumétrico de 50mL.

Análise Estatística

Para gerar a curva de calibração, foi realizada análise de regressão linear simples com os dados da Absorção em 520 nm e a concentração da solução de padrão de prolina (mg.Kg⁻¹) no nível de 95% de confiança. E também foi gerada uma análise descritiva básica para avaliação dos dados. Toda a análise estatística empregou-se o pacote estatístico STATISTICA 10, (STATSOFT, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O plano amostral pode ser categorizado por dois fatores principais, a origem do envase do mel e sua tipificação quanto à florada predominante indicado pelo apicultor (Figuras 1 e 2).

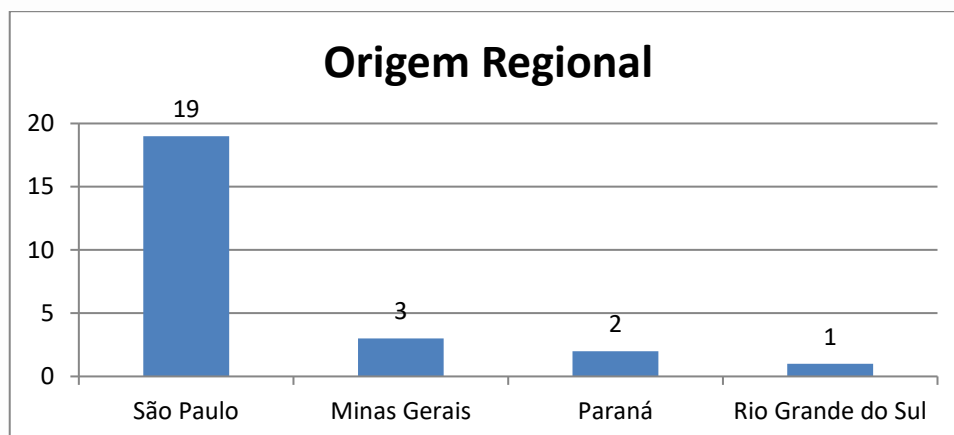


Figura 1 - Origem regional das amostras coletadas
Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

A origem do envase provém da região Sul e Sudeste com predomínio no estado de São Paulo (figura 1). Dentro do estado de São Paulo sua distribuição é desuniforme, apesar de possuir amostras coletadas no norte, leste e sudeste do estado, a maioria se encontra na parte sudeste, o que reflete o comportamento das amostras dentro do estado em relação a sua comercialização.

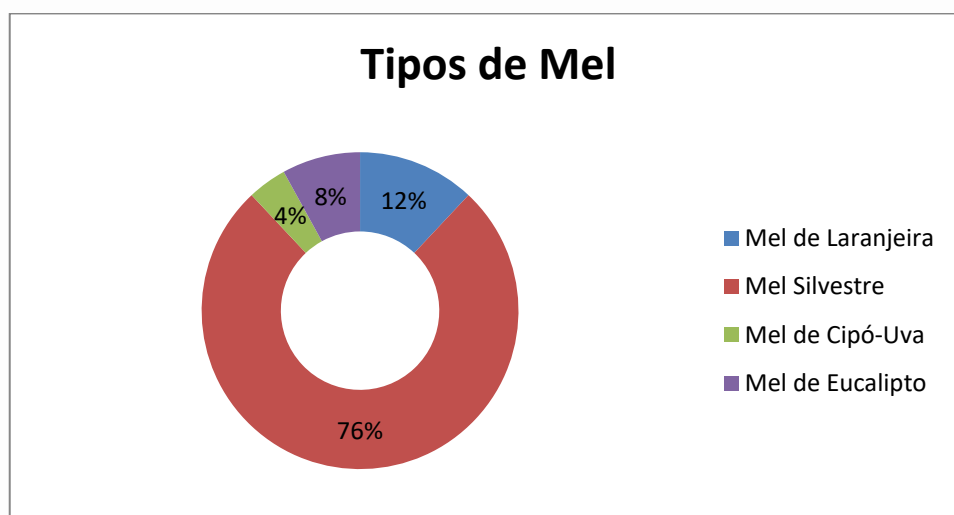


Figura 2 - Classificação da origem botânica dos méis coletados
Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Na figura 2, pode se observar que 76% das amostras provém da classificação pelos apicultores como silvestre, devido a não predominância de uma fonte floral, estes méis possuem uma maior variabilidade na sua composição química e reológica devido sua

natureza de tipos de néctares e suas proporções que contribuem na composição química do mel (Brasil, 2000).

Na figura 3 estão representados os resultados da análise descritiva estatística das concentrações de prolina das amostras, onde se observou que seu intervalo foi de 64-761 mg.Kg⁻¹, esta ampla variação também pode ser encontrada em outros estudos da literatura, que sugerem que alguns fatores podem estar relacionados a esta amplitude dos resultados, como a origem botânica e geográfica (Costa et al, 1999).

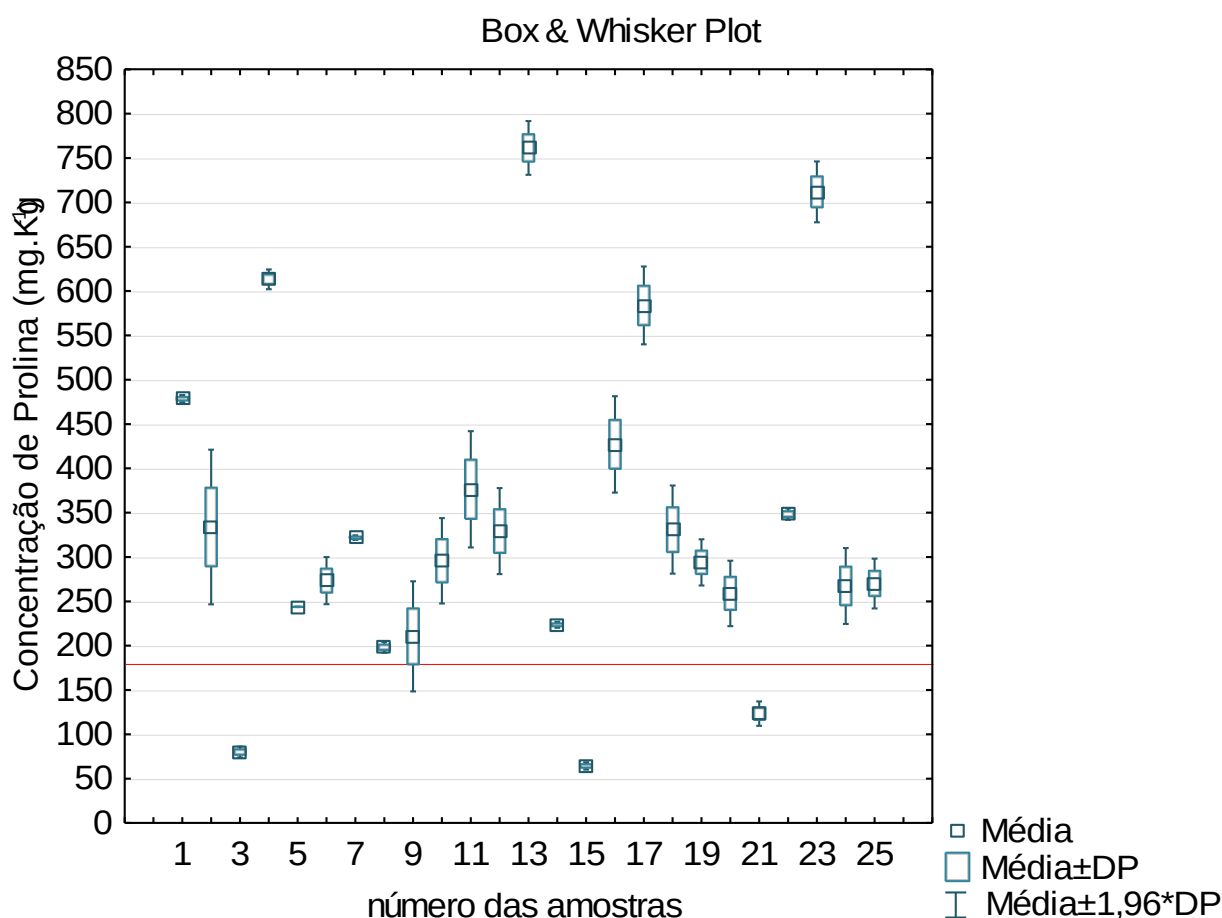


Figura 3 – Gráfico de Box-plot da concentração de prolina nos méis
Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

No Brasil não há uma legislação nacional que regule tal parâmetro, sendo assim foi utilizado o limite mínimo de 180 mg.Kg⁻¹ proposto pela Comissão Europeia de 2009 (IHC, 2009), onde se observa na figura 3 pela linha vermelha, que a maioria das amostras encontram-se acima do valor proposto, e somente as amostras 3, 15 e 21 obtiveram resultados inferiores, sugerindo que estes valores abaixo do limite podem indicar uma suspeita de fraude, adulteração e/ou baixa qualidade do mel (Damto et al, 2024; e Nisbet, 2018).

CONCLUSÕES

Neste estudo a concentração de prolina encontrada nas amostras de méis do programa paulista mostraram que seu valores estavam de acordo com as recomendações internacionais, e entre elas havia uma grande variabilidade entre as amostras no estado de São Paulo, sugerindo que este parâmetro poderia ser empregado nas análises de qualidade e autenticidade de mel em futuras legislações nacionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha colega de curso de especialização por me auxiliar no trabalho e oferecer seu apoio sempre que possível, meus agradecimentos a Maria Angélica Loures de Souza.

REFERÊNCIAS

BARKER, R. J.; LEHNER, Y. Free amino acids in thoraces of flown honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 163-IN7, 1972.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 23 de outubro de 2000

BRYŚ, M. S.; STRACHECKA, A. The key role of amino acids in pollen quality and honey bee physiology-A review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 29, n. 11, p. 2605, 2024.

COSTA, L.S.M.; ALBUQUERQUE, M.L.S.; TRUGO, L.C.; QUINTEIRO, L.M.C.; BARTH, O.M; RIBEIRO, M.; DE MARIA, C.A.B. Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. **Food chemistry**, v. 65, n. 3, p. 347–352, 1999.

DAMTO, T.; ZEWDU, A.; BIRHANU, T. Impact of different adulterants on honey quality properties and evaluating different analytical approaches for adulteration detection. **Journal of food protection**, v. 87, n. 4, p. 100241, 2024.

HAJIAN-TILAKI, A.; KENARI, R. E.; FARAHMANDFAR, R.; RAZAVI, R. Comparative study of physiochemical properties in Iranian multi-floral honeys: Local vs. commercial varieties. **Heliyon**, v. 10, n. 17, p. e37550, 2024.

HORWITZ, W. Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis, Appendix D, AOAC **Official Methods of Analysis**. 2005. 27-28 p

INTERNATIONAL HONEY COMMISSION METHODS (IHC). **Harmonised methods of the international honey commission methods:** swiss bee research centre. Switzeland, 2009

NISBET, C.; KAZAK, F.; ARDALI, Y. Determination of quality criteria that allow differentiation between honey adulterated with sugar and pure honey. **Biological trace element research**, v. 186, n. 1, p. 288–293, 2018..

SÃO PAULO (Estado) Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Saúde do Interior. **Programa paulista de inspeção de alimentos 2013:** projeto de segurança alimentar. São Paulo: SES/CSI, 2013. Disponível em: <https://cvs.saude.sp.gov.br/up/progr_insp_seg_alim%20-%20gvs%20xvi.pdf>. Acesso em: 23 out. 2024a.

SÃO PAULO (Município) Secretaria da Saúde. **Projetos e programas:** vigilância sanitária de alimentos. São Paulo, 2022. Disponível em: <https://capital.sp.gov.br/web/saude/w/vigilancia_em_saude/vigilancia_sanitaria/alimentos/7046>. Acesso em: 23 out. 2024b.

STATSOFT, INC. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. www.statsoft.com.

Capítulo 24

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-24

CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS DE *PARACOCCIDIODES* ssp DO ACERVO DO NÚCLEO DE COLEÇÃO DE MICRO- ORGANISMOS POR METODOLOGIA DE REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE

Nayra Gama Lacerda¹; Tania Sueli de Andrade²

¹Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública- Núcleo de Coleção de Micro-organismos (NCMO) – IAL; E-mail: nayragl93@gmail.com

²Docente/pesquisador do Núcleo de Coleção de Micro-organismos (NCMO) – CPI – IAL

Resumo: As linhagens do acervo da coleção de cultura de micro-organismos são utilizadas para controle de qualidade, ensaios para o desenvolvimento de produtos, pesquisas científicas e são disponibilizadas ao público em geral como: indústrias, universidades e laboratórios de saúde pública, sendo desta forma classificada como coleção de serviços por atuar como centro de conservação e distribuição de material autenticado. O acervo é composto por bactérias, fungos e protozoários que são autenticados periodicamente. Entre os fungos podemos destacar a coleção de *Paracoccidioides* ssp, com aproximadamente 36 isolados. A caracterização deste grupo é realizada com base na identificação polifásica, envolvendo a morfologia microscópica, macroscópica, e métodos moleculares para a identificação de espécie. O objetivo de realizar a caracterização completa das linhagens de *Paracoccidioides* que não haviam sido identificadas por métodos moleculares. Foram analisadas 34 linhagens quanto à morfologia e reação da cadeia polimerase por ensaio duplex para a identificação molecular. Das 36 linhagens pertencentes ao acervo, 9 foram classificadas como *P. lutzii* e 24 como *P. brasiliensis*, uma não foi classificada por essa metodologia e duas não foram recuperadas. Importante ressaltar que para algumas linhagens a caracterização não correspondeu ao informado quando depositadas no núcleo, por isso a relevância de sempre autenticar por métodos fenotípicos e genotípicos, pois, o material depositado na coleção é importante patrimônio genético e servirá como controle para o diagnóstico laboratorial das redes de vigilância, uma vez que, desde abril de 2024 a paracoccidioidomicose é doença de notificação compulsória no estado de São Paulo.

Palavras-chave: Vigilância epidemiológica; *Paracoccidioides brasiliensis*; *Paracoccidioides lutzii*; Paracoccidioidomicose; PCR

INTRODUÇÃO

O *Paracoccidioides* é um fungo termodimórfico que, quando em temperatura entre 22 e 27°C apresenta a forma de micélio e em temperatura 35° a 37°C apresenta a forma de levedura (CÓRDIVA 2022; HAHN 2022). Esse fungo causa micose sistêmica, a paracoccidioidomicose (PCM), uma doença endêmica que ocorre na América Latina mais

prevalente na América do Sul e está associada ao contato com solo contaminado (SHIKANAI 2017; MARTÍNEZ 2017; PEREIRA 2020).

As formas clínicas da doença podem ser divididas em 3 estágios: infecção aguda/subaguda que é a forma juvenil, considerada a mais grave que acomete crianças e adultos com menos de 30 anos; a forma crônica denominada de adulto, é mais frequente e se manifesta na maioria das vezes em homens adultos com idade superior a 30 anos, sendo o principal sintoma o comprometimento pulmonar; e a forma residual (sequelas), após anos de infecção, pode ser observadas em vários órgãos além, do pulmão, pele e mucosas, vasos linfáticos entre outros. (TEIXEIRA 2009; HAHN 2022). Devido à gravidade da doença, sua alta mortalidade e incidência no estado de São Paulo, desde abril de 2024 foi incluída na lista de notificação compulsória do estado. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado com o encontro de elementos fúngicos sugestivos de *Paracoccidioides*. (MESSIAS 2020 ; CÓRDOVA 2022). Os testes micológicos juntamente com metodologias de exames sorológicos são importantes para o diagnóstico da PCM, e como o principal, o teste padrão realizado com antígeno Gp43 (exoantígenos usados para detecção de anticorpos anti *P. brasiliensis*). (TEIXEIRA 2014; BATISTA 2010).

Anteriormente apenas um agente etiológico era associado à PCM, o *Paracoccidioides brasiliensis*. Porém, em algumas regiões do Brasil, soros de pacientes não reagiram com o antígeno tradicional obtido da cepa B-339, usada para métodos de diagnóstico na América Latina (BATISTA 2010; TEIXEIRA 2014; HAHN 2022). Apesar dos pacientes apresentarem diagnóstico de PCM, este fato chamou a atenção da comunidade científica e vários pesquisadores começaram a investigar a variabilidade genética e antigênica dos isolados de *Paracoccidioides*. Com auxílio de marcadores moleculares por amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) foi demonstrado que o isolado 7455 era pertencente ao mesmo clado que Pb01, mas diferente de outros grupos de *P. brasiliensis* analisados. (SOARES 1995; TEIXEIRA 2009; MELO 2013).

Posteriormente, verificou-se que se tratava de uma nova espécie o *Paracoccidioides lutzii*. (TEIXEIRA, 2009; LEITÃO 2014), além disso, outras variedades genéticas de *Paracoccidioides brasiliensis* foram descritas (PINHEIRO 2021) e as linhagens filogenéticas foram identificadas como: S1 mais frequente na América do Sul, PS2 Brasil e Venezuela, PS3 encontrada na Colômbia e PS4 encontrada na Venezuela. (TEIXEIRA 2014; MARTÍNEZ 2017; COCIO 2020; CÓRDOVA 2022;).

Como descrito, a identificação das diferentes espécies e suas variantes são recentes, por isso a maioria das coleções de fungos ainda mantém a nomenclatura antiga, sendo necessária sua atualização. O Núcleo de Coleção de Micro-organismos (NCMO) recebe linhagens para serem depositadas de outros centros e, no caso de *Paracoccidioides*, 3 diferentes laboratórios enviaram suas linhagens para NCMO com a identificação de: *P. brasiliensis*, *P. lutzii*, *P. restripiensis*, *P. venezuelensis* e *P. americana*, porém sem informação de metodologia de caracterização prévia. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar a análise da morfologia, viabilidade e identificação molecular baseada em ensaio rápido de PCR- duplex para a confirmação em nível de espécie, e caracterização completa.

MATERIAS E MÉTODOS

Foram avaliadas 36 linhagens depositadas no NCMO, mantidas por diferentes métodos de conservação e recuperadas por repiques em ágar batata incubados em estufa 27°C e em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) a 36°C. A análise morfológica foi realizada

através da técnica de esgarçamento e coloração azul de lactofenol, observada em microscópio óptico. Para extração foram utilizadas as linhagens na fase de levedura dos tubos de ágar BHI, uma alçada de cada um dos crescimentos foi transferida para um microtubo e a extração foi realizada usando o *minikit Purelink™ Genomic DNA*, seguindo protocolo do fabricante. A concentração ng/μl e pureza do DNA para verificar a relação DNA/proteína (260/280) foram analisadas em espectrofotômetro (uniscience DeNovix® DS-11). A integridade do DNA extraído foi verificada em eletroforese em gel de agarose com concentração 0,8%. O preparo da reação de PCR teve como volume final para cada linhagem extraída 25μl, nas seguintes concentrações: os primers PbraCx – F (5' T CG TGA TAT AGA CAG CAC CGT TTG 3') / PbraCx – R (5' ACG AAC CAT CAA ATC GCG AAC CTA 3') e Plu – F (5' CTT CAT GGC GCC CAA GGA CCT 3') / Plu – R (5' GAC TCC GCT AAG TCT GTC TGT CCT AGG C 3') a 0,1μM, tampão GoTaq® Green (MgCl₂ e dNTPs) 1x e 1μL do produto extraído. A reação foi realizada em termociclador *applied Biosystems™ SimpliAmp™ Thermal cycler* nas condições 20 ciclos sendo, 95°C por 5 minutos, 95°C por 1 minuto, 70°C (touch) por 1 minuto e 15 ciclos sendo, 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72°C por 5 minutos. Os produtos gerados na amplificação foram verificados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, nas condições: 100 v, 400 w por 30 minutos. As linhagens do complexo *P. brasiliensis* apresentaram 308 pb e as linhagens de *P. lutzii* apresentaram 142 pb. (PINHEIRO 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento em ágar batata crescimento filamentosos apresenta aspecto parecido com (pipoca estourada) (figura 1) foi observado com aproximadamente 15 dias, e em 25 dias no ágar BHI crescimento leveduriforme apresentam aspecto morfológico (cerebriformes). Na observação microscópica foi possível verificar a presença de células arredondadas ou alongadas de dupla parede, agrupadas em três ou mais elementos com ou sem gemulação, esta quando múltiplas apresentará rodas de leme representado na figura 1 (d) e (e):

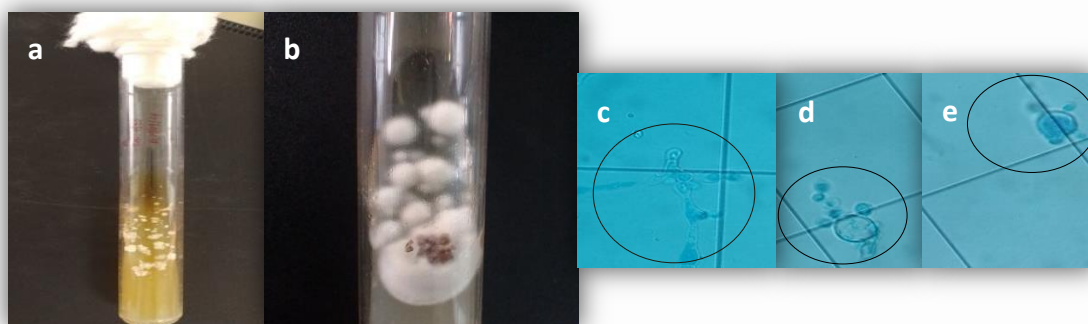


Figura 1 – (Morfologia macroscópica) a: leveduriforme; b: filamentosos; (Morfologia microscópica) c: gemulação (brotamentos) IAL 3792 (*P. brasiliensis*); d: gemulação em forma de roda de leme IAL 3786 (*P. brasiliensis*); e: gemulação em forma de roda de leme IAL 6450 (*P. lutzii*).

A concentração e a relação DNA/proteína (1,8 a 2,0) em comprimento de onda 260/280 e a integridade do DNA corresponderam aos critérios esperados. De todas as linhagens depositadas no NCMO, 26 foram depositadas como *P. brasiliensis*, 6 como *P. lutzii*, 1 como *P. restrepiensis*, 1 *P. venezuelensis* e 2 *P. americana*. Nossos resultados

indicam que para a maioria das linhagens a identificação foi igual à de origem do depósito, demonstrando a eficácia do método escolhido para diferenciação das espécies *P. brasiliensis* da *P. lutzii*, e para oito dessas linhagens a identificação foi diferente. A figura 2 mostra resultado de algumas dessas linhagens na eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR- duplex, sendo demonstrados os resultados que confirmaram e que os que foram divergentes do que foi depositado no NCMO.



Figura 2 – Análise dos produtos de PCR-duplex para identificação de *P. brasiliensis*. e *P. lutzii* por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Poços: 1,14,15;27 -padrão de tamanho molecular de DNA de 50 pb; Poços: 4 e 17 - Padrão *P. lutzii* (IAL 9804 – ATCC MYA-826); Poços: 2 e 16 -Padrão *P. brasiliensis* (IAL: 9536 – ATCC 32069); Poço 2: linhagem *P. venezuelensis*; Poços: 5 ao 9 e 19, 23, 24 e 26 - produtos de PCR das linhagens *P. brasiliensis*; Poços: 10 ao 13 e 18, 20, 21, 22 e 25 produtos de PCR das linhagens *P. lutzii*.

Na figura 2 as linhagens que conformaram a identificação inicial de quando foram depositadas são: (poços: 5 ao 9, 24 e 26 – *P. brasiliensis* e poços: 10 ao 13 – *P. lutzii*). As linhagens que apresentaram divergência de espécie do que foi depositado são: (poços: 18,20,21,22 e 25) depositadas como *P. brasiliensis*, mas identificadas como *P. lutzii* e (poços: 19 e 23) depositadas como *P. americana*, e identificadas como *P. brasiliensis* e a linhagem que não foi possível identificar, pois não foi usado primers para essa espécie, foi *P. venezuelensis* (poço 2). Entretanto, os resultados diferentes do depositado para as espécies de *P. restrepiensis* e *P. americana* não são considerados divergentes e sim positivos, uma vez que, fazem parte do complexo *P. brasiliensis* e a metodologia empregada pode ser utilizada para a identificação de complexo, porém, para a caracterização completa das variantes é necessário o sequenciamento de várias regiões do DNA.

Para as divergentes entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, possivelmente não foram realizados métodos moleculares de identificação na origem, antes do depósito no NCMO.

A eficiência do ensaio de PCR duplex se deu pela sensibilidade e especificidade em identificar *Paracoccidioides brasiliensis* (complexo) e *P. lutzii*, tanto que conforme descrito por Gonçalves (2021), é possível em uma única rodada identificar as duas espécies, além de ser possível identificar se o mesmo paciente está acometido em concomitante com as duas espécies ou ainda realizar o ensaio de suspeitas de mais de uma amostra diferente e ainda identificar cepas de regiões geográficas diferentes. A PCR duplex para identificação desse fungo, ainda se sobressai se comparada ao RAPD que em um estudo feito por Hahn *et al.* (2003), mostrou que devido a diversidade genética de cepas isoladas no Brasil não puderam

ser agrupadas, ou seja, não foi possível a detecção do agrupamento de algumas cepas. E como descrito por Teles (2011), as técnicas sorológicas são muito úteis para o diagnóstico, mas pode ocorrer ativação cruzada de anticorpos anti- *P. brasiliensis* e outros fungos, além de ser inadequada para distinguir entre diferentes cepas de regiões geográficas diferentes. Teles (2021), ainda relata que as técnicas moleculares como PCR é essencial para distinguir e identificar genótipos circulantes e descreve ainda que, na detecção de *P. brasiliensis* é essencial quando não é possível a identificação microscópica ou quando há falhas na sorologia devidas antígenos e anticorpos baixos.

CONCLUSÃO

As análises macro e micromorfológicas das linhagens analisadas foram compatíveis para a descrição do gênero. No entanto, não possibilitam a identificação de espécie. A reação de PCR – duplex pode ser utilizada para diferenciar o complexo *P. brasiliensis* da espécie *P. lutzii*. A aplicação desta metodologia na caracterização das linhagens de *Paracoccidioides* depositadas no Núcleo de Coleção de Micro-organismos possibilitou a autenticação do acervo, que é utilizado por toda a comunidade científica, auxiliando no diagnóstico, epidemiologia e pesquisas.

REFERÊNCIAS

- Batista J. Jr.; de Camargo Z.P.; Fernandes G.F.; Vicentini A.P.; Fontes C.J.; Hahn R.C. **Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis?** Mycoses. 2010 Mar 1;53(2):17680. DOI 10.1111/j.1439-0507.2008.01687.x. Epub 2009 Apr 23. PMID: 19422525. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19422525/>. Acesso: 01 out.2024.
- Cocio, T.A.; Nascimento, E.; von Zeska Kress, M.R.; Bagagli, E.; Martinez, R. Phylogenetic Species of *Paracoccidioides* spp. **Isolated from Clinical and Environmental Samples in a Hyperendemic Area of Paracoccidioidomycosis in Southeastern Brazil.** J. Fungi 2020, 6, 132. DOI 10.3390/jof6030132. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/3/132>. Acesso: 09 ago.2024.
- Cordova L.A.; Torres J. **Paracoccidioidomycosis.** [Updated 2022 Sep 19]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563188/>. Acesso: 01 ago.2024.
- Hahn, R.C.; Hagen, B.; Mendes, R.P.; Hambúrguer, E.; Nery, A.F.; Siqueira, N.P. **Paracoccidioidomycosis: Current Status and Future Trends.** Clin Microbiol Rev. 2022 Dec 21;35(4):e0023321, DOI 10.1128/cmr.00233-21. Epub 2022 8 de setembro. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36074014/>. Acesso: 23 jul.2024.
- Leitão N.P Jr.; Vallejo M.C.; Conceição P.M.; Camargo Z.P.; Hahn R.C.; Puccia R. **Paracoccidioides lutzii Plp43 is an active glucanase with partial antigenic identity with *P. brasiliensis* gp43.** PLoS Negl Trop Dis. 2014 Aug 28;8(8):e3111. DOI 10.1371/journal.pntd.0003111. PMID: 25166744; PMCID: PMC4148228. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003111>. Acesso: 17 ago.2024.

Martinez, R. **New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology.** J Fungi (Basel). 2017 Jan 3;3(1):1. DOI 10.3390/jof3010001. PMID: 29371520; PMCID: PMC5715958. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29371520/>. Acesso: 05 ago.2024.

Pereira, E. F.; Gegembauer, G.; R. Chang, M.; de Camargo, Z.P.; F. Nunes, T.; Ribeiro, S.M. **Comparação de características clínico-epidemiológicas e radiológicas em pacientes com paracoccidioidomicose em relação à classificação sorológica usando antígenos do complexo Paracoccidioides brasiliensis e Paracoccidioides lutzii.** PLoS neglected tropical diseases 14.8 (2020): e0008485, DOI 10.1371/journal.pntd.0008485. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0008485>. Acesso: 05 ago.2024.

Pinheiro, B.G.; Pôssa, A P.; Della Terra, P.P.; de Carvalho, J.A; Ricci, G.; Nishikaku, A.S. **A New Duplex PCR-Assay for the Detection and Identification of Paracoccidioides Species.** J. Fungi 2021, 7, 169. DOI 10.3390/jof7030169. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309608X/7/3/169>. Acesso: 06 ago.2024.

Shikanai-Yasuda M.A.; Mendes, RP.; Colombo, A.L.; de Queiroz-Telles F.; Kono, A.S.G.; Pagiano, A. MM. **Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis.** Rev Soc Bras Med Trop. 2017 Sep-Oct;50(5):715-740. DOI 10.1590/0037-8682-0230-2017. Epub 2017 Jul 12. Erratum in: Rev Soc Bras Med Trop. 2017 Sep-Oct;50(5):744. DOI 10.1590/00378682-0383-2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28746570/>. Acesso: 17 set.2024.

Soares, C.M.; Madlun, E.E.; da Silva, S.P.; Pereira, M.; Felipe, M.S. **Characterization of Paracoccidioides brasiliensis isolates by random amplified polymorphic DNA analysis.** J Clin Microbiol. 1995 Feb;33(2):505-7. DOI 10.1128/jcm.33.2.505-507.1995. PMID: 7714219; PMCID: PMC227979. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7714219/> Acesso: 07 ago.2024.

Teixeira, M.M.; Theodoro, R.C.; de Oliveira, F.F.M.; Machado, G.C.; Hahn, R.C.; Bagagli, E. **Paracoccidioides lutzii** sp. nov.: biological and clinical implications. Medical Mycology, Volume 52, Issue 1, January 2014, Pages 19–28, DOI 10.3109/13693786.2013.794311. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/52/1/19/1003728>. Acesso: 05 ago.2024.

Teixeira, M.M.; Theodoro, R.C.; de carvalho, M. JA.; Fernandes, L.; Paes, H.C.; Hahn, R.C. **Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus.** Molecular Phylogenetics And Evolution, [S.L.], v. 52, n. 2, p. 273-283, ago. 2009. Elsevier BV, DOI 10.1016/j.ympev.2009.04.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790309001353>. Acesso: 27 jul.2024.

Teixeira, M.M.; Theodoro, R.C.; Niño-Vega, G.; Bagagli, E.; Felipe, M.S. **Paracoccidioides species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence.** PLoS Pathog. 2014 Oct 30;10(10):e1004397. DOI 10.1371/journal.ppat.1004397. PMID: 25357210; PMCID: PMC4214758. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004397>. Acesso: 06 ago.2024.

ISBN 978-658506222-0

