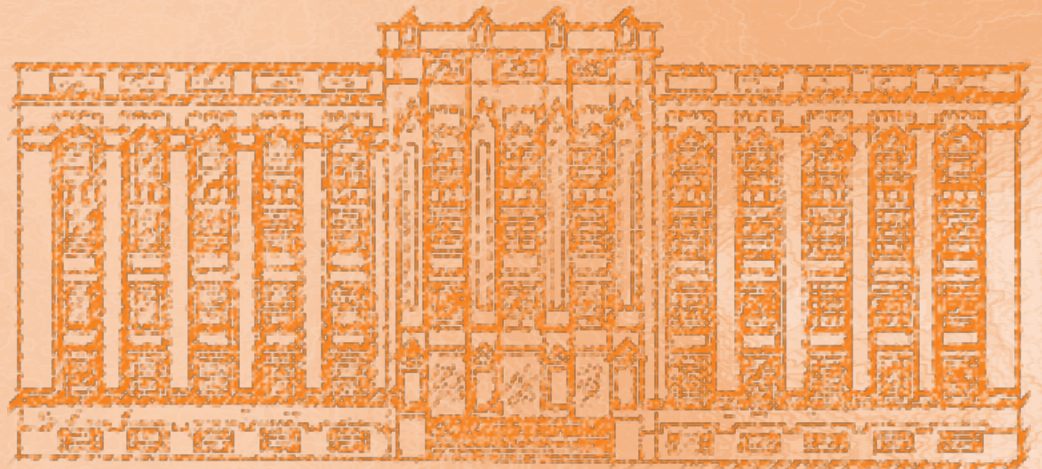


ISSN: 1983-3814 (*on-line*)
RIALA6

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 77 número único, 2018



Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 77, 2018

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz Hélio Hehl Caiaffa Filho

Editor Chefe

Pedro Luiz Silva Pinto

Editor Adjunto

Adriana Bugno

Editores Assistentes

Adriana Aparecida Buzzo Almodovar
Aurea Silveira da Cruz Garçon
Elaine Marra de Azevedo Mazon
Iracema de Albuquerque Kimura
Lílian Nunes Schiavon
Márcia Liane Buzzo
Maria de Fátima Costa Pires
Marilena Oshiro
Mirthes Ueda
Paula Ordonhez Rigato
Rosemeire Cobo Zanella Ramos
Ruth Estela Gravato Rowlands
Simone Alves da Silva

Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

Editoração

Claudia Cristiane de Araujo
Irony Therezinha Pires

Conselho Editorial / Editorial Board

Adele Caterino-de-Araújo, São Paulo, Brasil.
Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA
Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.
Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.
Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.
Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.
Elizabeth Castañeda, Bogotá, Colômbia.
Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.
Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.
Gordon S. Shephard, Cape Town, África do Sul.
Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.
Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.
Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.
John Gilbert, York, UK.
Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.
Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.

Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.
Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.
Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.
Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.
Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.
Paul W. Flinn, Kansas, EUA.
Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.
Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.
Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.
Thales de Brito, São Paulo, Brasil.
Vanessa Yardley, London, UK.
Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.
Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.
Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ
(Secretaria de Estado da Saúde)
São Paulo, SP – Brasil

1941
2018, 77

CDD₁₈ 614.07205

RIALA 6
ISSN 1983-3814 versão *on line*
ISSN 2176-3844 CD-ROM
ISSN 0073-9855 versão impressa

(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1072.

Os artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz são indexados por: Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases; Analytical Abstracts; Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica; Biological Abstracts; Chemical Abstracts; Food Science and Technology Abstracts; Index Medicus Latino-americano; LILACS, SP: Saúde Pública; Microbiology Abstracts; Sumários Correntes Brasileiros; Toxicology Abstracts; Tropical Diseases Bulletin; e Virology Abstracts.

Acesso on line / on line access. Texto integral / full text.

<http://www.ial.sp.gov.br/>

Portal de Revistas em Veterinária e Zootecnia
<http://revistas.bvs-vet.org.br/>

Portal de Revistas Saúde SP
<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/>

Cartas ao editor:
Endereço / Address
Núcleo de Acervo
Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-000 São Paulo/ SP – Brasil
Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869
E-mail: rial@saude.sp.gov.br

■ **ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLE**

1749 **Teste de Galactomanana para o Diagnóstico de Aspergilose Invasiva – Uma Revisão**

Galactomannan Test for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis – An Update

Sabrina MESQUITA-ROCHA

■ **ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE**

1737 **The Anatto Carotenoids and the Norbixin Absorption Coefficient**

Carotenoides de Urucum e o Coeficiente de Absorção da Norbixina

Marta Gomes da SILVA, Adão Luiz GARCIA, Enieluce Santos BRITO, Paulo Roberto Nogueira CARVALHO

1738 **Complying with the HIV test algorithm for diagnosing children aged from 1 to 18 months born to HIV-positive mothers**

Cumprimento do algoritmo para o diagnóstico do HIV em crianças de 1 a 18 meses nascidas de mães HIV positivas

Marcella Kelyva PIERRE, Denise Maria Bussoni BERTOLLO, Juliana Kindler FIGUEIREDO, Márcia Maria Costa Nunes SOARES

1739 **Monitoring the trihalomethanes concentrations in drinking water**

Monitoramento das concentrações de trihalometanos na água potável

Tuany Natana SCHÄFER, Beatriz BOGER, Ingridy Isabelle Maia de SOUZA, Marilene da Cruz Magalhães BUFFON, Rafael Gomes DITTERICH, Milene Zanoni da SILVA, Yanna Dantas RATTMANN

1740 **Qualidade da água em escolas públicas municipais: análise microbiológica e teor de nitrato em Araçatuba, estado de São Paulo – Brasil**

Quality of water in municipal public schools: microbiological analysis and nitrate content in Araçatuba, state of São Paulo – Brazil

Débora Regina Romualdo da SILVA, Marilene Oliveira dos Santos MACIEL, Barbara Braga Ferreira MARTA, Teresa Marilene . BRONHARO, Aparecida de Fátima MICHELIN

1741 **Identificação laboratorial da coqueluche na região do oeste do Estado de São Paulo**

Laboratory identification of pertussis in the western region of São Paulo State, Brazil

Carolina Yumi GUSHIKEN, Erika Kushikawa SAEKI, Luciano Moura MARTINS, Juliana Cristina PEREIRA, Daniela LEITE

1743 **A evolução da regulamentação técnica na qualidade das bolsas plásticas utilizadas na coleta de sangue no Brasil**

The evolution of technical regulation for the quality of plastic bags used in the blood collection in Brazil

Renata de Freitas Dalavia VALE, Lilian de Figueiredo VENANCIO, Anna Maria Barreto Silva FUST, Michele FEITOZA-SILVA

-
- 1744 Qualificação do transporte de amostras para o monitoramento da qualidade de água tratada para uso em diálise**
Qualification of the sample transport for monitoring the quality of water for dialysis purpose
Adriana BUGNO, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR, Fernando Pontes de Lima e SILVA, Ellen Gameiro HILINSKI, Márcia Liane BUZZO
- 1748 Avaliação dos níveis de cromo total em águas para consumo humano**
Evaluation of the total chromium levels in the drinking water
Lidiane Raquel Verola MATAVELLI, Márcia Liane BUZZO, Maria de Fátima Henriques CARVALHO, Luciana Juncioni de ARAUZ, Guilherme Augusto Verola MATAVELI
- 1750 Atividade in vitro do extrato etanólico de própolis e do digluconato de clorexidina sobre as espécies de Candida isoladas da mucosa bucal de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI)**
In vitro activity of ethanolic extract of propolis and chlorhexidine digluconate on Candida species isolated from the oral mucosa of patients hospitalized in the Intensive Care Unit (ICU)
Maria Luisa MAKABE, Patricia de Souza SANTOS, Maria de Fátima Costa PIRES
- 1752 Análise comparativa entre os diferentes protocolos utilizados para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**
Comparative analysis among the different protocols used for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis
Denise Maria Bussoni BERTOLLO, Jose Eduardo TOLEZANO

■ COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION

- 1735 Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de méis comercializados em Natal – RN**
Evaluation of the physical-chemical and microbiological qualities of honeys sold in Natal - RN
Joyce Karoline Lopes MARINHO, Camila Vanessa da Silva MOREIRA, Letícia Costa FERREIRA, Karla Suzanne Florentino da Silva Chaves DAMASCENO, Jéssica Anarellis Barbosa dos SANTOS, Nely HOLLAND
- 1736 Avaliação da qualidade de pepinos em conserva**
Evaluation of the quality of canned cucumbers
Greiz Roberta Oliveira SANTANA, Taiana Ferreira MACHADO, Paula Ferreira de Araújo RIBEIRO, Aline TIECHER
- 1746 Condições higiênicossanitárias do comércio ambulante de alimentos**
Hygienic and Sanitary conditions of the street food trade
Jéssica Queiroz PEREIRA, Tatiana Salgado TONIATO, Jackline Freitas Brilhante de SÃO JOSÉ

■ NOTA CIENTÍFICA/SCIENTIFIC NOTE

- 1734 Validação de metodologia analítica para determinação de endotoxina bacteriana em água para diálise por meio de método cromogênico cinético**
Analytical methodology validation for determining the bacterial endotoxin in the dialysis water by means of kinetic chromogenic technique
Ellen Gameiro HILINSKI, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR, Fernando Pontes de Lima e SILVA, Terezinha de Jesus Andreoli PINTO, Adriana BUGNO

■ COMENTÁRIOS TÉCNICO-CIENTÍFICOS/TECHNICAL-SCIENTIFIC COMMENTS

- 1747 O papel das nucleases no laboratório de biologia molecular: vilãs ou aliadas?**
The role of nucleases in the molecular biology laboratory: villains or allies?
Silvana Beres CASTRIGNANO

1751 Dia Mundial do HTLV - 10 de Novembro

World HTLV Day – November 10th

Adele CATERINO-DE-ARAUJO

■ **RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES**

1733 Microorganismos e parasitos em água destinada ao consumo humano proveniente da zona rural de Santo Antônio de Jesus - BA

Microorganisms and parasites in water reserved for human consumption from the rural area of Santo Antônio de Jesus – BA

Miranda FS

1742 Tratamentos para descontaminação de tomates contendo resíduos de imidacloprido

Treatment for decontamination of tomatoes containing imidacloprid residues

Bissacotti AP

1745 Caracterização genética e perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* presentes em um hospital de ensino

Genetic characterization and antimicrobial susceptibility of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains present in a teaching hospital

Tavares LCB

■ **SIMPÓSIO INTERNACIONAL – “LEISHMANIOSE VISCERAL: DESAFIOS PARA O CONTROLE NO CONTEXTO DA DIVERSIDADE DOS CENÁRIOS”**

RESUMO EXPANDIDO/ EXPANDED ABSTRACT

1753 Leishmaniose visceral: cenários epidemiológicos e desafios

Visceral leishmaniasis: epidemiological scenarios and challenges

Mauro Celio de Almeida MARZOCHI

1754 Reflexões sobre cenários, vigilância epidemiológica e controle da transmissão de leishmaniose visceral no estado de São Paulo

Analysis of epidemiological scenarios and the relationship with surveillance and control of visceral leishmaniasis transmission in the state of São Paulo

Osias RANGEL

1755 Diversidade Clínica e Tratamento da Leishmaniose Visceral

Clinical Diversity and Treatment of Visceral Leishmaniasis

José Angelo Lauletta LINDOSO

1756 Addressing the recent dispersion of urban visceral leishmaniasis in the border of Argentina, Brazil, Paraguay + Uruguay + Bolivia – Project IDRC

Abordando a recente dispersão da leishmaniose visceral urbana nas fronteiras da Argentina, Brasil e Paraguai + Uruguai + Bolívia - Projeto IDRC

Oscar Daniel SALOMON

1757 Vetor ou vetores? Capacidade vetorial e estratégias de controle

Vector or vectors? Vectorial capacity and control strategies

Claudio CASANOVA

1758 Effectiveness of control strategies against visceral leishmaniasis in Brazil: there is no silver bullet

Efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral no Brasil: não existe uma bala de prata

Guilherme Loureiro WERNECK

-
- 1759 Geospatial and Modeling Tools for Leishmaniasis Studies: A Review of publication between 2008-2018**
Ferramentas geoespaciais e de modelagem para estudos de leishmaniose: uma revisão de publicação entre 2008-2018
Elivelton da Silva FONSECA, Moara de Santana MARTINS, John B Malone, Raul Borges GUIMARÃES
- 1760 Geohealth: biology based mapping of vector borne disease in the Americas using NASA satellite data**
Geosaúde: mapeamento da biologia das doenças vetoriais nas Américas utilizando dados de satélites da NASA
John B MALONE, PRIXIA del Mar NIETO, Jeffrey C LUVALL, Jennifer C McCARROLL, Rebecca C CHRISTOFERRSON, Seung-Jong PARK, Moara S MARTINS, Elivelton S FONSECA, Maria E BAVIA, Ryan H AVERY, Cassan N PULASKI, Raul B GUIMARAES
- 1761 A Thermodynamic Paradigm for Using Satellite Based Geophysical Measurements in Public Health Applications**
Um Paradigma Termodinâmico para o Uso de Medidas Geofísicas Baseadas em Satélites e suas Aplicações em Saúde Pública
Jeffrey C. LUVALL
- 1762 Patologia morfológica e molecular aplicadas à inovação diagnóstica e vigilância da leishmaniose visceral**
Morphological and molecular pathology applied to diagnostic innovation and surveillance of visceral leishmaniasis
Juliana Mariotti GUERRA¹, Leonardo José Tadeu de ARAÚJO, Rodrigo Albergaria RESSIO, Natália Coelho Couto de Azevedo FERNANDES
- 1763 Leishmaniose canina: diagnóstico e manejo do reservatório urbano**
Canine leishmaniasis: diagnosis and management of the urban reservoir
Filipe DANTAS-TORRES
- **ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE**
- 1764 Avaliação da efetividade do uso de coleiras impregnadas com deltametrina no controle da leishmaniose visceral no município de Votuporanga, Estado de São Paulo, Brasil, 2014 – 2016**
Evaluation of the effectiveness of using deltamethrin-impregnated collars to control visceral leishmaniasis in the municipality of Votuporanga, State of São Paulo, Brazil, 2014 – 2016
José Eduardo Tolezano, Patricia Sayuri Silvestre Matsumoto, Helena Hilomi Taniguchi, Denise Maria Bussoni Bertollo, Marcella Kelvya Pierre, José Eduardo de Raefray Barbosa, Juliana Mariotti Guerra, Natália Coelho Couto de Azevedo Fernandes, Ernesto Machado de Figueiredo, Élcio Sanchez Esteves Junior, Samara Del Pino Fernandes, Roberto Carlos Grassi Malta, Raul Borges Guimarães, Roberto Mitsuyoshi Hiramoto

■ **COLABORADORES**

■ **INSTRUÇÕES AOS AUTORES**



Teste de galactomanana para o diagnóstico de aspergilose invasiva: uma revisão

Galactomannan test for the diagnosis of invasive aspergillosis: a review

RIALA6/1749

Sabrina MESQUITA-ROCHA*

*Endereço para correspondência: Coordenadoria de Vigilância em Saúde, Secretaria Municipal de Saúde de São Paulo, Prefeitura da Cidade de São Paulo, Rua Santa Isabel, 181, 5º andar, Vila Buarque, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01221-010. Tel: 11 3397 8353. E-mail: bia17mesquita@gmail.com

Recebido: 02.07.2018 - Aceito para publicação: 26.09.2018

RESUMO

As doenças fúngicas invasivas têm sido um problema crescente em ambientes hospitalares, sobretudo nas últimas duas décadas. A aspergilose invasiva (AI), ocasionada pelo gênero *Aspergillus*, está entre as principais causas de morte em pacientes gravemente imunocomprometidos, com mortalidade que varia de 70 a 90%. O padrão de referência para o diagnóstico de AI é o cultivo do micro-organismo e a análise histopatológica dos órgãos afetados. Estes procedimentos são dificilmente realizados na maioria dos casos, e apresentam baixa sensibilidade (<50%), além de as amostras serem habitualmente obtidas em estados avançados da infecção. O teste de detecção de galactomanana tem sido objeto de estudo para o diagnóstico de AI, por representar uma promissora ferramenta e por ser uma técnica sorológica rápida e não invasiva. A presente revisão tem por objetivo fazer levantamento de estudos que utilizaram o teste de galactomanana em amostras de pacientes com quadros clínicos distintos, porém com suspeita e/ou com comprovada AI, bem como as atuais tendências de conhecimento, aplicação e utilidade do ensaio laboratorial

Palavras-chave. *Aspergillus*, aspergilose invasiva, teste galactomanana.

ABSTRACT

Invasive fungal diseases represent an increasing problem in the hospital environments, predominantly in the last two decades. The invasive aspergillosis (IA), induced by *Aspergillus* species, has been the main cause of death in severely immunocompromised patients, with mortality varying from 70 to 90%. Difficulties are found for diagnosing the IA. *In vitro* culture of biological material shows low sensitivity (<50%), besides the positivity usually occurs at the advanced stages of the infection. The test for detecting galactomannan has been the object of the present study, seeing that it represents a promising diagnostic tool, as a fast and non-invasive serological procedure. The objective of the present review is to survey the studies which have been performed by using methods for detecting galactomannan in samples from patients with distinct clinical pictures. Patients presenting suspicion and/or confirmed IA were also included, as well as the up-to-date trends in knowledge, application and utility of the test.

Keywords. *Aspergillus*, invasive aspergillosis, galactomannan test.

INTRODUÇÃO

As Doenças Fúngicas Invasivas (DFIs) representam um problema crescente em ambientes hospitalares, sobretudo nas últimas duas décadas. O principal fator para este aumento é o crescente número de pacientes susceptíveis, como receptores de órgãos sólidos e de medula óssea, pacientes submetidos ao uso de quimioterápicos e corticosteróides e pacientes portadores do vírus HIV^{1,2}. Apesar de não serem consideradas doenças de notificação compulsória, estima-se que mais de 3,8 milhões de pessoas possam padecer de infecções fúngicas no Brasil³.

Entre os agentes mais importantes nas DFIs de ambientes nosocomiais, destaca-se o fungo *Aspergillus*, um gênero amplamente distribuído na natureza, como no ar, água, solo, alimentos, material em decomposição, sendo considerado um agente oportunista. O gênero compreende cerca de 200 espécies, sendo *Aspergillus fumigatus* o agente infeccioso mais comum, embora *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus (Erimicella) nidulans* e *Aspergillus calidoustus* (antes *Aspergillus ustus*) apresentem também um papel importante na etiologia de DFIs. Dentre as manifestações ocasionadas por *Aspergillus* estão a aspergilose pulmonar invasiva (API) ou aspergilose invasiva (AI), aspergilose cavitária crônica, bola fúngica, sinusite, ceratite e manifestações alérgicas^{4,5}.

A despeito da ausência de dados oficiais dos casos de aspergilose, um estudo conduzido no Brasil estimou a frequência baseada em revisão de artigos que descreveram o número de casos de doenças fúngicas por tipo de doença e incluindo casos de aspergilose, por grupo específico de pacientes (asmáticos, com fibrose cística e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - DPOC). Os autores calcularam que 1.010.465 casos de doenças fúngicas ocasionadas por *Aspergillus* ocorrem no Brasil por ano, incluindo aspergilose invasiva, aspergilose broncopulmonar crônica e asma ocasionada por sensibilização fúngica³. A Aspergilose Invasiva (AI) está entre as principais causas de morte em pacientes severamente

imunocomprometidos, com mortalidade que varia de 85 a 90%. A principal porta de entrada do agente é a inalação de conídios, estruturas facilmente dispersas no ar, que se depositam no pulmão e devido à baixa imunidade celular do hospedeiro, iniciam a colonização e posterior processo patogênico. Nas últimas décadas novos fatores de risco foram incluídos para AI, como problemas estruturais pulmonares, DPOC, abuso de antibióticos de amplo espectro, longo tempo de permanência em unidades de terapia intensiva, e resistência a antifúngicos⁶⁻⁸.

Há várias dificuldades no diagnóstico da AI. O padrão ouro para o diagnóstico é o crescimento do agente em cultura utilizando materiais biológicos de sítios estéreis e análise histopatológica dos órgãos afetados. Contudo, a sensibilidade do método é baixa (< 50%), o que torna o diagnóstico final tardio. Atualmente, o diagnóstico da AI é baseado na análise de sinais e sintomas, histopatologia, exames radiológicos (não são específicos) crescimento em cultura e a detecção de DNA fúngico ou componentes da parede celular como galactomanana e/ou β -D- glucana em amostras clínicas provenientes de sítios estéreis^{9,10}.

O teste de detecção de galactomanana (GM) está descrito como um critério micológico para o diagnóstico de AI, de acordo com o consenso de definição de diagnóstico de doença fúngica invasiva (EORTC/MS), e pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas. O teste representa uma promissora ferramenta diagnóstica, por ser um método sorológico rápido e não invasivo. Desde 2002 foi liberado pela United States Food and Drug Association (US FDA) para uso no diagnóstico de AI. O diagnóstico tardio representa um pior prognóstico, uma vez que a terapia antifúngica é tardia e compromete a sobrevivência do paciente^{1,6,11}.

A presente revisão tem por objetivo fazer um levantamento de estudos que utilizaram o teste de galactomanana em amostras de pacientes com quadros clínicos distintos, porém com possível e/ou com comprovada AI, bem como as tendências de conhecimento, aplicação e utilidade do teste.

MÉTODOS

Para a presente revisão foram realizadas buscas na base de dados MEDLINE/PUBMED, utilizando os descritores *Galactomannan test* e *Aspergillus*. Foram selecionados artigos que descreveram a aplicação do teste e suas limitações, e artigos que descreveram o *cut-off* utilizado bem como os valores de sensibilidade e especificidade do teste, publicados entre 2007 e 2017.

Galactomanana

A galactomanana (GM) um heteropolisacarídeo termoestável constituinte da parede celular de várias espécies de fungos, principalmente nos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo liberada durante o crescimento da hifa no tecido infectado. A molécula tem uma não imunogênica manana com sítios imunoreativos contendo unidades de galactofuranose¹¹⁻¹³.

Há diferenças químicas entre galactomananas de espécies distintas. Todavia, a estrutura química da galactomanana de *Aspergillus* e *Penicillium* é muito similar. Peculiaridades entre espécies de *Aspergillus* também são relatadas: *A. fumigatus* libera baixos níveis de galactomanana, enquanto *A. terreus*, *A. niger* e *A. nidulans* libera altas concentrações¹¹.

A cinética da liberação da galactomanana não é bem definida. Vários fatores como o estado imunológico do hospedeiro, o sítio da infecção, a fase de crescimento do agente, podem influenciar na concentração liberada. Em casos de doenças não invasivas ocasionadas por *Aspergillus* e terapia antifúngica sistêmica podem ocorrer resultados falso-negativos. A concentração de galactomanana detectada é proporcional ao crescimento fúngico no tecido infectado mesmo na ausência de sinais e sintomas clínicos^{6,12}.

Os materiais biológicos mais utilizados no teste de detecção de galactomanana são o soro (sangue) e o lavado broncoalveolar (LBA), no entanto pode ser raramente detectado no líquido cefalo-espinhal, fluido peritoneal, urina e fluido do pericárdio. *Aspergillus* dificilmente é isolado

em culturas de sangue, e o teste utilizando soro tem menor sensibilidade em pacientes neutropênico, além de baixa reprodutibilidade observada em alguns estudos¹⁴⁻¹⁶.

Os testes comerciais mais utilizados para a detecção de galactomanana são a aglutinação por partículas de látex (Pastorex *Aspergillus*, Sanofi Diagnostics Pasteur), o radioimunoensaio, e o teste que utiliza a técnica de ELISA (Platelia™ *Aspergillus*, Bio Rad France). O teste de Platelia™ utiliza anticorpos monoclonais EB-A2 e apresenta alta sensibilidade capaz de detectar 0,5 -1 ng/mL de galactomanana. Este teste é utilizado há mais de uma década na Europa e nos Estados Unidos, como ferramenta no diagnóstico de AI¹¹.

O teste de galactomanana tem boa sensibilidade em amostras de LBA, em pacientes neutropênicos e não-neutropênicos, quando comparado com teste em soro. Além disso, a detecção do antígeno em amostras de LBA é, em alguns casos, mais rapidamente evidenciada do que outros métodos como cultura e a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). O teste de PCR pode apresentar baixa sensibilidade em amostras oriundas de pacientes que recebem terapia antifúngica, contudo estudos apontam que ele pode ser combinado com outros testes laboratoriais para aumentar a especificidade e consequentemente, a acurácia do diagnóstico¹⁷⁻²⁰.

Utilizando uma combinação de métodos (PCR espécie específica para detecção de DNA fúngico, teste de GM no soro e LBA, detecção de 1,3 β - D- Glucana), em modelo murino, infectado com *A. terreus*, Ahmad et al²¹ concluíram que a combinação de métodos confere um diagnóstico mais rápido e específico para a detecção de *A. terreus*²¹.

Urabe et al²², avaliaram as técnicas de PCR espécie-específica, 1,3 β - D- Glucana e GM em amostras de LBA de 120 pacientes com aspergilose pulmonar crônica. Os testes de 1,3 β - D- Glucana e GM obtiveram ótimos resultados de especificidade e sensibilidade, quando combinados (utilizando o *cut-off* de 0.5 ng/mL), contudo como único critério micológico de diagnóstico, a PCR espécie-espe-

cífica teve maiores valores de sensibilidade.

A falta de reprodutibilidade, tempo de estocagem da amostra e padronização do *cut-off* representam uma limitação do teste. Todavia, o teste de GM em amostras de soro e LBA é recomendado, mas como um marcador de AI em pacientes com doenças hematológicas malignas e transplantados de células tronco hematopoiéticas^{1,23}.

Outros fatores influenciam na sensibilidade do teste tais como a população na qual o teste é aplicado, a concomitante terapia antifúngica, o tipo de amostra utilizada, a definição do *cut-off* do teste (definir valores que indicam colonização e infecção) e o uso prolongado de antibióticos β - lactâmicos são alguns dos fatores que comprometem a eficácia e o número de resultados falsos positivos em amostras de LBA^{24,25}.

A padronização de procedimentos pré-analíticos é necessária para diminuição de resultados falso-negativos e/ou falso-positivos. Em amostras de soro o tempo e temperatura de estocagem da amostra, os valores de bilirrubinas, e presença de hemólise e a antibioticoterapia podem comprometer os resultados. Ademais, recentes investigações apontaram que o uso do antifúngico micafungina limita a sensibilidade e especificidade do teste de GM em amostras de soro^{13,26,27}.

Outra questão relevante é que o teste de GM pode ser aplicado no monitoramento de AI comprovada, uma vez que há decaimento da titulação de GM em pacientes em tratamento antifúngico, o que representa um indicador de efetividade do tratamento²⁸.

Teste de Galacomanana aplicado em paciente com doenças hematológicas

Em unidades hematológicas a incidência de AI é descrita como mais alta devido à severa imunossupressão dos pacientes com doenças malignas (principalmente a neutropenia), além do fato de que frequentemente os sintomas de AI mimetizam com outros sintomas oriundos da patologia de base. A maioria dos estudos que aplicaram o teste de GM nesta população foi

conduzida em hospitais europeus e americanos.

Woods et al²⁹ conduziram um estudo em Arkansas, USA, numa unidade hematológica, onde amostras de soro de 56 pacientes foram testadas com Platelia™ *Aspergillus*. A sobrevida dos pacientes com AI diagnosticada esteve fortemente correlacionada com a rápida detecção de GM nos testes realizados.

Outros estudos utilizaram LBA para avaliar a sensibilidade do teste de GM neste tipo de amostra. Em uma investigação, realizada em um hospital universitário na França, 64 amostras de LBA provenientes de 57 pacientes de uma unidade hematológica foram testadas por Platelia™ *Aspergillus* e por PCR em tempo real. A sensibilidade do teste de GM foi de 88% em culturas positivas e 38% em culturas negativas. A análise por PCR em tempo real mostrou sensibilidade inferior ao teste de GM³⁰.

Ainda na Europa, dois estudos avaliaram amostras de LBA no teste de GM como ferramenta no diagnóstico de AI. O primeiro, um estudo prospectivo em 110 pacientes com doenças malignas e suspeita clínica de AI. Utilizando *cut-off* ≥ 0.5 ng/mL, a detecção de GM em LBA obteve sensibilidade de 88%, enquanto que em amostra de soro foi de apenas 42%. O nível de GM em LBA de 11 pacientes com AI comprovada foi positivo, enquanto que no soro e na cultura foram negativas. Nesta população de risco, o teste de detecção de GM em LBA obteve melhores resultados³¹. Na Alemanha, um estudo comparou a utilidade do teste de GM em amostras de LBA e soro de 26 pacientes imunocomprometidos e com alto risco para Aspergilose Pulmonar Invasiva (API). A sensibilidade e especificidade do teste foram de 85%, 88% em amostras de LBA e de 23% e 88% em amostras de soro respectivamente. Os autores concluíram que o teste de GM tem resultados superiores para o diagnóstico de API, utilizando as amostras de LBA³².

O teste de GM representa uma alternativa para pacientes hematológicos que tem alto risco de desenvolver API. Reinwald et al³³, avaliaram 79 pacientes de risco, dos quais 29 foram diagnosticados com API provável

ou provada. O teste de GM em amostras de LBA, utilizando o *cut-off* de 0.5 ng/mL teve 79% e 96% de sensibilidade e especificidade respectivamente. Neste estudo a positividade do teste de GM e da PCR foi altamente similar.

Na Holanda, de Mol et al³⁴, utilizou o teste de GM em 72 amostras de LBA em pacientes pediátricos diagnosticados com API. A especificidade do teste foi de 82,4% e a especificidade de 87,5% utilizando o *cut-off* de 0.5 ng/mL. Apesar de bons resultados, os autores avaliaram que as evidências obtidas em exames de imagem (TC) são mais seguras para iniciar ou continuar a terapia antifúngica, combinadas com resultados do teste de GM.

Outro estudo prospectivo avaliou a utilidade do teste de GM em 145 crianças com episódios de neutropenia febril, no período de 2007 a 2011, combinado com exames de imagem para classificar os pacientes com AI provada, provável e possível. O *cut-off* de 0.7 ng/mL para o teste de GM em amostras de soro apresentou 82.2% e 82.5% de sensibilidade e especificidade respectivamente, o que representou uma ótima opção para o diagnóstico de AI em pacientes pediátricos³⁵.

Em países da Ásia o teste de GM também tem sido aplicado em unidades de população de risco (com doenças hematológicas malignas). Um estudo prospectivo de caso-controle conduzido na Índia avaliou o teste de GM em amostras de LBA e soro em 51 pacientes hematológicos; o grupo controle incluiu 20 pacientes sem doenças hematológicas e evidências de AI. A sensibilidade do teste em amostras de LBA foi de 87,5% e a especificidade foi de 100%, utilizando o *cut-off* de 1.0 ng/mL³⁶.

Um estudo multicêntrico conduzido na Turquia avaliou o teste de GM em pacientes pediátricos com episódios de neutropenia. Foram incluídos 47 pacientes, sendo 25 com diagnóstico de AI (provada, provável ou possível) e 22 pacientes sem evidências clínicas. Um total de 158 amostras de sangue foram testadas utilizando *cut-off* de 0.5 ng/mL. A sensibilidade e especificidade do teste foram de 68% e 77% respectivamente.

Os autores ressaltaram que para o diagnóstico de AI os resultados de GM devem ser avaliados em conjunto com as evidências clínicas³⁷.

No Irã, um estudo avaliou técnicas não invasivas para o diagnóstico de AI em pacientes onco-hematológicos. Dos 62 pacientes incluídos no estudo, 26 foram diagnosticados com AI. Utilizando amostras de soro e o *cut-off* de 0.5 ng/mL, a sensibilidade e especificidade do teste foi de 94,4% e 100% respectivamente. Apesar dos resultados, os autores descreveram a importância da combinação de achados clínicos, radiológicos e microbiológicos no diagnóstico de AI em pacientes de risco³⁸.

A maioria dos estudos tem por objetivo avaliar o valor do teste de GM aplicado numa determinada população de risco. A combinação de técnicas comumente é realizada com intuito de definir um método de diagnóstico mais rápido e preciso. Como exemplo, as técnicas baseadas em métodos moleculares e tomografia computadorizada. Contudo, a falta de padronização interlaboratorial diminui sua eficácia no diagnóstico de AI. Como alternativa, a combinação de métodos como a detecção de GM e tomografia computadorizada (TC) aumentam a rapidez do diagnóstico e, conseqüentemente, melhor prognóstico para o paciente.

Segundo Hachem et al³⁹, avaliando o teste de detecção de GM e de 1,3 β -D Glucana conjuntamente, a sensibilidade do teste de GM em amostras de soro é baixa quando a infecção envolve espécies de *Aspergillus* não *fumigatus*.

O teste de GM em amostras de LBA também pode ter grande utilidade no monitoramento e controle de surtos de aspergilose. A associação de mais de um teste com exames radiológicos proporciona diagnóstico rápido quando comparados ao uso de apenas um método.

Teste de Galactomanana aplicado em pacientes sem doença hematológica

O diagnóstico de AI ainda é um desafio em pacientes não neutropênicos. Apesar da menor especificidade do teste de GM em relação a técnicas moleculares, a sensibilidade

do teste pode chegar a 90%, principalmente quando amostras de LBA são utilizadas⁴⁰.

Para pacientes com doenças hematológicas, principalmente neutropênicos, a quantificação da galactomanana em amostras de LBA e soro tem sido extensivamente testada. Atualmente *Aspergillus* spp. tem sido agente de doenças invasivas em outro grupo de risco: pacientes com DPOC, submetidos a altas doses de corticosteróides, portadores de hepatite C, cirrose, com doenças autoimunes, doenças respiratórias como as ocasionadas por vírus H1N1, e aqueles com longa permanência em unidades de terapia intensiva⁴¹.

O padrão para o diagnóstico de AI (critério micológico, clínico e radiológico) foi desenvolvido e padronizado em pacientes com neutropenia e outras doenças hematológicas, contudo nas últimas duas décadas diversos estudos utilizaram testes de GM e PCR para o diagnóstico de outros pacientes de risco.

Na Espanha, um estudo que compreendeu três hospitais universitários no período de 2010 a 2014, avaliou a aplicabilidade do teste de GM em amostras de LBA de 188 pacientes divididos em dois grupos: o primeiro compreendeu pacientes com DPOC e o segundo pacientes imunossuprimidos sem doenças hematológicas. Dos pacientes analisados, 31 foram diagnosticados com aspergilose provada ou provável. A sensibilidade do teste foi mais alta nas amostras de pacientes imunossuprimidos do que com DPOC (81,8% e 66,7% respectivamente). Os *cut-off* utilizados para os grupos foram de >1.0 ng/mL para pacientes com outros tipos de imunossupressão e > 0.5 ng/mL para os pacientes com DPOC. O estudo concluiu que para a coorte estudada, o teste de GM teve bom desempenho no diagnóstico de AI⁴².

Um estudo com pacientes com doença DPOC utilizando amostras de LBA e soro avaliou que utilizando o *cut-off* de 1.19 ng/mL nas amostras de LBA há um aumento da sensibilidade e especificidade do teste, utilizando o Plateia Galactomana. Em amostras de soro o *cut-off* ideal foi de 0.5 ng/mL⁴³.

Num estudo caso-controle conduzido em unidade pediátrica do Iran, selecionou amostras de LBA de pacientes com API provável ou provada. Foram utilizadas 16 amostras de pacientes com aspergilose provável ou provada e 54 controles (pacientes classificados com possível *aspergilose e API*). Utilizando o *cut-off* de 0.5 ng/mL a sensibilidade do teste de GM em amostras de LBA foi de 87,5%. Dentre os controles, sete amostras foram positivas para GM⁴⁴.

Zhou et al⁴⁵, avaliaram o teste de GM em amostras de LBA e soro de 120 pacientes não neutropênicos, no período de 2014 e 2016. A análise dos dados, utilizando três *cut-off* de (0.5 ng/mL, 0.7 ng/mL e 1.0 ng/mL), mostrou que em amostras de LBA a sensibilidade do teste de GM é superior do que em amostras de soro, contudo a especificidade não. No estudo o *cut-off* de 0.7 ng/mL foi o que apresentou maiores valores de sensibilidade e especificidade, em amostras de LBA (72,97% e 89,16% respectivamente).

Na Índia, um estudo avaliou o teste de GM em 50 pacientes não hematológicos, com outras co-morbidades, como *Diabetes mellitus*. O *cut-off* de 0.5 ng/mL em amostras de soro teve 79% de sensibilidade e 71% de especificidade⁴⁶.

Ağca et al⁴⁷, avaliaram o teste de GM em 1427 amostras de LBA e lavado bronquial (700 e 727 respectivamente), provenientes de pacientes neutropênicos e não neutropênicos. Neste estudo o *cut-off* de 1.0 ng/mL foi ideal para o diagnóstico de AI e recuperação do agente em cultura, e a acurácia do teste foi superior em amostras de LBA.

No Japão, um estudo com 114 pacientes com aspergilose pulmonar crônica, a sensibilidade e especificidade do teste de GM utilizado em amostras de LBA foi de 77,2% e 77%, respectivamente, utilizando um *cut-off* de 0.4 ng/mL, valores superiores aos observados em amostras de soro, onde utilizando um *cut-off* de 0.7 ng/mL a sensibilidade e especificidade foram de 66,7% e 63,5% respectivamente⁴⁸.

Na Turquia, um estudo avaliou a utilidade do teste de GM em amostras de LBA de 44 pacientes não neutropênicos, com uso de corticosteróides, da unidade de terapia

intensiva, com diagnóstico de “provável API” e “possível API”. Utilizando o *cut-off* de 0.7 ng/mL a sensibilidade foi de 100% e a especificidade de 87,9% em amostras de LBA. Os autores avaliaram que o uso do teste de GM pode ser efetivamente utilizado para o diagnóstico de API em comparação com outros métodos utilizados⁴⁹.

He et al⁵⁰, avaliaram o teste de GM em amostras de soro e LBA de 34 pacientes com DPOC. O teste de GM em amostras de LBA, utilizando o *cut-off* de 0.8 ng/mL, teve sensibilidade e especificidade de 88,9% e 100% respectivamente. Os autores concluíram que em pacientes com DPOC a detecção de GM pode ser utilizada para o diagnóstico de API.

Com o objetivo de investigar fatores preditores de mortalidade em pacientes não-neutropênicos, Russo et al⁵¹, num estudo retrospectivo analisam fatores de risco, e testaram GM em amostras do trato respiratório de 27 pacientes com API (provada e provável). Utilizando o *cut-off* de 2.0 ng/mL o teste de GM foi hábil para classificar pacientes com pior prognóstico, com sensibilidade e especificidade de 100% e 77% respectivamente. Neste estudo o fator preditivo para mortalidade de pacientes com API foi a cirrose hepática.

Na Flórida, um estudo retrospectivo conduzido num hospital terciário, avaliou a utilização do teste de galactomanana por ELISA, em amostras de LBA e soro de pacientes transplantados de órgãos sólidos. Por meio deste teste foi possível detectar AI em cinco pacientes, no qual evoluíram bem após a terapia antifúngica. A sensibilidade do método foi de 100%. Entre os pacientes transplantados de pulmão, o teste de LBA apresentou um valor de 41,7% de resultados falso-positivos, o que evidencia a frequente colonização das vias aéreas respiratórias destes pacientes. Foi utilizado o *cut-off* ≥ 1.0 ng/mL em todos os casos. Assim, o estudo ratificou que o teste de GM aplicado a transplantados de pulmão não apresenta boa especificidade⁵².

Outro estudo, avaliando a eficácia do teste em receptores de pulmão, demonstrou que há dificuldade em estabelecer um *cut-off* para GM para definir uma provável infecção. Foi possível

verificar que a determinação do *cut-off* ≥ 1.0 ng/mL não foi suficiente para a população estudada, e neste caso, as evidências clínicas e radiológicas foram os principais fatores sugestivos de AI⁵³.

No Irã, um estudo avaliou a sensibilidade do teste de GM em amostras de soro e LBA, em pacientes transplantados de coração e pulmão. Dos 17 pacientes incluídos, API foi diagnosticada em nove. Utilizando o *cut-off* de 0.5 ng/mL para amostras de soro e LBA, a sensibilidade do teste em amostras de soro e LBA foi de 77,1% e 100% respectivamente. Em ambas amostras a especificidade foi de 100%. Os autores concluíram que a utilização do teste de GM pode ser uma boa opção para o diagnóstico oportuno de API⁵⁴.

Swoboda-Kopec et al⁵⁵, testaram GM em amostras de soro de 20 pacientes transplantados de órgãos sólidos, com suspeita de AI, e em paralelo utilizou um teste comercial de PCR (MycAssayTM). O *cut-off* utilizado foi ≥ 0.5 ng/mL. Sete pacientes apresentaram níveis de GM acima do *cut-off*, contudo não foi estabelecida concordância com o teste de PCR utilizado.

Os testes sorológicos são utilizados extensivamente no diagnóstico de diversas doenças, contudo para o diagnóstico de AI a falta de padronização, como o *cut-off* ideal para o tipo de amostra, limita a utilização de teste como a GM como único critério de diagnóstico. Nos estudos citados os *cut-off* utilizados variaram de 0.4 a 2.0 ng/mL (Tabela), o que demonstra que a definição do valor deve ser de acordo com a população na qual o teste é aplicado.

CONCLUSÃO

A detecção de galactomanana por ELISA representa uma alternativa no diagnóstico em amostras de LBA, pois apresenta alta sensibilidade e especificidade, rapidez, além de não ser um método invasivo, e poderia ser utilizado em unidades de risco no Brasil. Contudo, o método deve ser realizado concomitantemente a outros, como microscopia e cultura e exames de imagem, uma vez que o teste não é suficientemente sensível e específico para o correto diagnóstico.

Tabela. Valores de *cut-off*, sensibilidade e especificidade do teste de detecção de galactomanana (GM) em amostras de pacientes com e sem doença hematológica

Autores/ano de publicação	Número de amostras	Tipo de amostra	Pacientes com doença hematológica	Cut-off (ng/mL)**	Sensibilidade %	Especificidade %
Urabe et al ²² /2017	120	LBA*	Não	≥0.5	77,8%	90%
Fréalte et al ³⁰ /2009	64	LBA	Sim	≥0.5	88%	58%
Meersseman et al ³¹ /2008	110	LBA	Sim	≥0.5	88%	----
Boch et al ³² /2016	26	LBA	Sim	≥0.5	85%	88%
Reinwald et al ³³ /2012	79	LBA	Sim	≥0.5	79%	96%
de Mol et al ³⁴ /2013	72	LBA	Sim	≥0.5	82,4%	87,5%
Dinand et al ³⁵ /2016	145	Soro	Sim	≥0.7	82,2%	82,5%
Gupta et al ³⁶ /2017	71	LBA e soro	Sim	≥1.0	87,5%	100%
Sav et al ³⁷ /2017	158	Soro	Sim	≥0.5	68%	77%
Badiee et al ³⁸ /2016	62	Soro	Sim	≥0.5	94,4%	100%
Zhang et al ⁴⁰ /2016	94	LBA e soro	Não	≥1.19	90,5%	65,5%
Fortún et al ⁴² /2016	188	LBA	Não	≥0.5	81,8%	66,7%
Mohammadi et al ⁴⁴ /2015	70	LBA	Sim/Não***	≥0.5	87,5%	93,33%
Zhou et al ⁴⁵ /2017	120	LBA e soro	Não	≥0.7	72,97%	89,16%
Savio et al ⁴⁶ /2016	50	Soro	Não	≥0.5	79%	71%
Ağca et al ⁴⁷ /2014	1427	LBA e lavado bronquial	Sim/Não***	≥ 1.0	----	----
Izumikawa et al ⁴⁸ /2012	114	LBA	Não	≥0.4	77,2%	77%
Özger et al ⁴⁹ /2015	44	LBA	Não	≥0.7	100%	87,9%
He et al ⁵⁰ /2012	34	LBA e soro	Não	≥0.8	88,9%	100%
Russo et al ⁵¹ /2014	27	Amostras trato respiratório	Não	≥2.0	100%	77%
Clancy et al ⁵² /2007	81	LBA e soro	Não	≥1.0	100%	90,8%
Husain et al ⁵³ /2007	333	LBA	Não	≥1.0	60%	98%
Tabarsi et al ⁵⁴ /2012	17	LBA e soro	Não	≥0.5	77,1%	100%
Swoboda-Kopec et al ⁵⁵ /2015	46	Soro	Não	≥0.5	----	----

*LBA: Lavado Broncoalveolar; **ng/mL: nanograma por mililitro; *** Dois grupos foram analisados no estudo

Outro ponto importante é a determinação do *cut-off* do teste que deve ser determinado de acordo com a população na qual é aplicado.

REFERÊNCIAS

1. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R et al. Practice guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016; 63(4):433–42. <https://dx.doi.org/10.1093/cid/ciw444>
2. Bassetti M, Bouza E. Invasive mould infections in the ICU setting: complexities and solutions. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72 (sypl_1): i39-i47. <https://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx032>
3. Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*. 2016; 59(3):145-50. <https://doi.org/10.1111/myc.12427>
4. Chamilos G, Kontoyiannis DP. Defining the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol*. 2006; 44: 5163-72. <https://dx.doi.org/10.1080/13693780600823258>
5. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*. 2005;5(10):609-22. [https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70238-3](https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70238-3)
6. Sun KS, Tsai CF, Chen SCC, Chen YY, Huang WC. Galactomannan testing and the incidence of invasive pulmonary aspergillosis: a 10-year nationwide population-based study in Taiwan. *Plos One*. 2016; 11 (2): e0149964. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0156566>
7. Rijnders BJ, Cornelissen JJ, Slobbe L, Becker MJ, Doorduijn JK, Hop WCP et al. Aerosolized liposomal amphotericin B for the prevention of invasive pulmonary aspergillosis during prolonged neutropenia: a randomized placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(9):1401-8. <https://dx.doi.org/10.1086/586739>
8. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in intensive care unit. *Clin Infect Dis*. 2007;45(2):205-16. <https://dx.doi.org/10.1086/518852>
9. Barnes PD, Marr KA. Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Br J Haematol*. 2007; 139(4):519-31. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06812.x>
10. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Invasive Fungal Infections Cooperative Group and National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) consensus group. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(12):1813-21. <https://dx.doi.org/10.1086/588660>
11. Aquino VR, Goldani LZ, Pasqualotto AC. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia*. 2007;163(4):191-202. <https://dx.doi.org/10.1007/s11046-007-9010-2>
12. Warris A, Lehrnbecher T. Progress in the diagnosis of invasive fungal disease in children. *Curr Fungal Infect Rep*. 2017;11(2):35-44. <https://dx.doi.org/10.1007/s12281-017-0274-9>
13. Monteiro AA, Rubenich DS, Zandoná MR, Pasqualotto AC. Impact of pré-analytical variables in the determination of serum galactomannan. *Med Mycol*. 2017;55(6):635-41. <https://dx.doi.org/10.1093/mmy/myw123>
14. Alanio A, Menotti J, Gits-Museli M, Hamane S, Denis B, Rafoux E et al. Circulating *Aspergillus fumigatus* DNA is quantitatively correlated to galactomannan in serum. *Front Microbiol*. 2017;8:2040. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02040>
15. Pedroza KC, de Matos SB, de Moura DL, Oliveira MB, Araújo MA, Nascimento RJ et al. Reproducibility of positive results for the detection of serum galactomannan by Platelia™ *Aspergillus* EIA. *Mycopathologia*. 2013;176(3-4):295-7. <https://dx.doi.org/10.1007/s11046-013-9670-z>

16. Perloth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol*. 2007;45(4):312-46. <https://dx.doi.org/10.1080/13693780701218689>
17. Arvanitis M, Anagnostou T, Mylonakis E. Galactomannan and polymerase chain reaction-based screening for invasive aspergillosis among high-risk hematology patients: a diagnostic meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2015;61(8):1263-72. <https://dx.doi.org/10.1093/cid/civ555>
18. D'Haese J, Theunissen K, Vermeulen E, Schoemans H, De Vlieger G, Lammertijn L et al. Detection of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid samples of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis: analytical and clinical validity. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(4):1258-63. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.06423-11>
19. Acosta J, Catalan M, del Palacio-Peréz-Medel A, Lora D, Montejo JC, Cuetara MS et al. A prospective comparison of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary invasive aspergillosis in medical patients under intensive care: comparison with the diagnostic performance of galactomannan and of (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan chromogenic assay in serum samples. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(7):1053-60. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03357.x>
20. Reinwald M, Hummel M, Kovalevskaya E, Spiess B, Heinz WJ, Vehreschild JJ et al. Therapy with antifungals decreases the diagnostic performance of PCR for diagnosing invasive aspergillosis in bronchoalveolar lavage samples of patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(9):2260-7. <https://dx.doi.org/10.1093/jac/dks208>
21. Ahmad S, Khan ZU, Theyyathel M. Diagnostic value of DNA, (1-3) β -d-glucan, and galactomannan detection in serum and bronchoalveolar lavage of mice experimentally infected with *Aspergillus terreus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;59(2):165-71. <https://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.04.009>
22. Urabe N, Sakamoto S, Sano G, Suzuki J, Hebisawa A, Nakamura Y et al. Usefulness of two *Aspergillus* PCR assays and *Aspergillus* galactomannan and β -d-glucan testinf of bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2017;55(6):1738-46. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.02497-16>
23. Johnson GL, Sarker SJ, Hill K, Tsitsikas DA, Morin A, Bustin SA et al. Significant decline in Galactomannan signal during storage of clinical serum samples. *Int J Mol Sci*. 2013;14(7):12970-7. <https://doi.org/10.3390/ijms140712970>
24. Eigl S, Prattes J, Reinwald M, Thornton CR, Reischies F, Spiess B et al. Influence of mould-active antifungal treatment on the performance of the *Aspergillus*-specific bronchoalveolar lavage fluid lateral-flow device test. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;46(4):401-5. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.05.017>
25. Brownback KR, Pitts LR, Simpson SQ. Utility of galactomannan antigen detection in bronchoalveolar lavage fluid in immunocompromised patients. *Mycoses*. 2013;56(5):552-8. <https://dx.doi.org/10.1111/myc.12074>
26. Zheng F, Zha H, Yang D, Deng J, Zhang Z. Diagnostic values and limitations of (1,3)- β -d-glucans and galactomannan assays for invasive fungal infection in patients admitted to pediatric intensive care unit. *Mycopathologia*. 2017;182(3-4):331-8. <https://dx.doi.org/10.1007/s11046-016-0063-y>
27. Kim R, Koh Y, Shin DY, Choe PG, Kim NJ, Yoon et al. The limited role of serum galactomannan assay in screening for invasive pulmonary aspergillosis in allogeneic stem cell transplantation recipients on micafungin prophylaxis: a retrospective study. *Blood Res*. 2017;52(4):300-6. <https://dx.doi.org/10.5045/br.2017.52.4.300>
28. Hadrich I, Makni F, Cheikhrouhou F, Neji S, Amouri I, Sellami H et al. Clinical utility and prognostic value of galactomannan in neutropenic patients with invasive aspergillosis. *Pathol Biol (Paris)*. 2012;60(6):357-61. <https://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2011.10.011>
29. Woods G, Miceli MH, Graziutti ML, Zhao W, Barlogie B, Anaissie E. Serum *Aspergillus* galactomannan antigen values strongly correlate with outcome of invasive aspergillosis. *Cancer*. 2007;110(4):830-4. <https://dx.doi.org/10.1002/cncr.22863>

30. Fréalle E, Decrucq K, Botterel F, Bouchindhomme B, Camus D, Dei-Cas E et al. Diagnosis of invasive aspergillosis using bronchoalveolar lavage human DNA content on real-time PCR performance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(3):223-32. <https://dx.doi.org/10.1007/s10096-008-0616-1>
31. Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(1):27-34. <https://dx.doi.org/10.1164/rccm.200704-606OC>
32. Boch T, Buchheidt D, Spiess B, Miethke T, Hofmann WK, Reinwald M. Direct comparison of galatomannan performance in concurrent serum and bronchoalveolar lavage samples in immunocompromised patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses*. 2016;59(2):80-5. <https://dx.doi.org/10.1111/myc.12434>
33. Reinwald M, Spiess B, Heinz WJ, Vehreschild JJ, Lass-Flörl C, Kiehl M et al. Diagnosing pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies: a multicenter prospective evaluation of an *Aspergillus* PCR assay and a galactomannan ELISA in bronchoalveolar lavage samples. *Eur J Haematol*. 2012;89(2):120-7. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0609.2012.01806.x>
34. de Mol M, de Jongste JC, van Westreenen M, Merkus PJ, de Vries AH, Hop WC et al. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in children with bronchoalveolar lavage galactomannan. *Pediatr Pulmonol*. 2013;48(8):789-96. <https://dx.doi.org/10.1002/ppul.22670>
35. Dinand V, Anjan M, Oberoi JK, Khanna S, Yadav SP, Wattal C et al. Threshold of galactomannan antigenemia positivity for early diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic children. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016;49(1):66-73. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2013.12.003>
36. Gupta A, Capoor MR, Shende T, Sharma B, Mohindra R, Suri JC et al. Comparative evaluation of galactomannan test with bronchoalveolar lavage and serum for the diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *J Lab Physicians*. 2017;9(4):234-8. https://dx.doi.org/10.4103/JLP.JLP_127_16
37. Sav H, Atalay MA, Koc AN, Unal E, Demir G, Zararsiz G. Utility of the *Aspergillus* galactomannan antigen testing for neutropenic paediatric patients. *Infez Med*. 2017;25(1):38-44. Disponível em: https://www.infezmed.it/media/journal/Vol_25_1_2017_7.pdf
38. Badiie P, Hashemizadeh Z, Ramzi M, Karimi M, Mohammadi R. Non-invasive methods to diagnose fungal infection in pediatric patients with hematologic disorders. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;9(11):e41573. <https://dx.doi.org/10.5812/jjm.41573>
39. Hachem RY, Kontoyiannis DP, Chemaly RF, Jiang Y, Reitzel R, Raad I. The utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1-3) β -d-Glucan in the diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. *J Clin Microbiol*. 2009;47(1):129-33. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.00506-08>
40. Zhang S, Wang S, Wan Z, Que C, Li R, Yu J. Quantitative real-time PCR and Platelia Galactomannan Assay for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: bronchoalveolar lavage fluid performs better than serum in non-neutropenic patients. *Mycopathologia*. 2016;181(9-10):625-9. <https://dx.doi.org/10.1007/s11046-016-0024-5>
41. Bassetti M, Peghin M, Vena A. Challenges and solution of invasive aspergillosis in non-neutropenic patients: a review. *Infect Dis Ther*. 2018;7(1):17-27. <https://dx.doi.org/10.1007/s40121-017-0183-9>
42. Fortún J, Martín-Dávila P, Gomez Garcia de la Pedrosa E, Silva JT, Garcia-Rodríguez J, Benito D et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis in non-hematological patients. *J Infect*. 2016;72(6):738-44. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.02.019>

43. Zhang S, Wang S, Wan Z, Li R, Yu J. The diagnosis of invasive and noninvasive pulmonary aspergillosis by serum and bronchoalveolar lavage fluid galactomannan assay. *Biomed Res Int*. 2015;2015:943691. <https://dx.doi.org/10.1155/2015/943691>
44. Mohammadi S, Khalilzadeh S, Goudarzipour K, Hassanzad M, Mahdaviani A, Aarabi N et al. Bronchoalveolar galactomannan in invasive pulmonary aspergillosis: a prospective study in pediatric patients. *Med Mycol*. 2015;53(7):709-16. <https://dx.doi.org/10.1093/mmy/myv053>
45. Zhou W, Li H, Zhang Y, Huang M, He Q, Li P et al. Diagnostic value of galactomannan antigen test in serum and bronchoalveolar lavage fluid samples from patients with nonneutropenic invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2017;55(7):2153-61. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.00345-17>
46. Savio J, Menon NR, Sudharma AR, Jairaj V, Mathew J. Galactomannan assay and invasive pulmonary aspergillosis – comparison of the test performance at an in-house and the kit cut-off. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(8): DC01-4. <https://dx.doi.org/10.7860/JCDR/2016/19175.8310>
47. Ağca H, Ener B, Yılmaz E, Ursavaş A, Kazak E, Özkocaman V et al. Comparative evaluation of galactomannan optical density indices and culture results in bronchoscopic specimens obtained from neutropenic and non-neutropenic patients. *Mycoses*. 2014;57(3):169-75. <https://dx.doi.org/10.1111/myc.12126>
48. Izumikawa K, Yamamoto Y, Mihara T, Takazono T, Morinaga Y, Kurihara S et al. Bronchoalveolar lavage galactomannan for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*. 2012;50(8):811-7. <https://dx.doi.org/10.3109/13693786.2012.682228>
49. Özger S, Hızel K, Kalkancı A, Aydoğdu M, Civil F, Dizbay M et al. Evaluation of risk factors for invasive pulmonary aspergillosis and detection of diagnostic values of galactomannan and PCR methods in bronchoalveolar lavage samples from non-neutropenic intensive care unit patients. *Mikrobiyol Bul*. 2015;49(4):565-75.
50. He H, Ding L, Sun B, Li F, Zhan Q. Role of galactomannan determinations in bronchoalveolar lavage fluid samples from critically ill patients with chronic obstructive pulmonary disease for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: a prospective study. *Crit Care*. 2012;16(4):R138. <https://dx.doi.org/10.1186/cc11443>
51. Russo A, Giuliano S, Vena A, Lucidi C, Falcone M, Raponi G et al. Predictors of mortality in non-neutropenic patients with invasive pulmonary aspergillosis: does galactomannan have a role? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;80(1):83-6. <https://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.015>
52. Clancy CJ, Jaber RA, Leather HL, Wingard JR, Staley B, Wheat LJ et al. Bronchoalveolar lavage galactomannan in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis among solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol*. 2007;45(6):1759-65. <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.00077-07>
53. Husain S, Paterson DL, Studer SM, Crespo M, Pilewski J, Durkin M et al. *Aspergillus* galactomannan antigen in the bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Transplantation*. 2007;83(10):1330-6. <https://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000263992.41003.33>
54. Tabarsi P, Soraghi A, Marjani M, Zandian P, Baghaei P, Najafzadeh K et al. Comparison of serum and bronchoalveolar lavage galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis in solid-organ transplant recipients. *Exp Clin Transplant*. 2012;10(3):278-81. <https://dx.doi.org/10.6002/ect.2011.0176>
55. Swoboda-Kopec E, Golás M, Piskorska K, Dabkowska M, Niecwietajewa I, Paczek L et al. *Aspergillus* galactomannan detection in comparison to a real-time PCR assay in serum samples from a high-risk group of patients. *Cent Eur J Immunol*. 2015;40(4):454-60. <https://dx.doi.org/10.5114/ceji.2015.56968>



The Annatto Carotenoids and the Norbixin Absorption Coefficient

Carotenoides de Urucum e o Coeficiente de Absorção da Norbixina

RIALA6/1737

Marta Gomes da SILVA^{1*}, Adão Luiz GARCIA², Enieluce Santos BRITO¹, Paulo Roberto Nogueira CARVALHO^{1*}

*Correspondence to: ¹Center of Chemistry of Food and Applied Nutrition, Institute of Food Technology, Av. Brasil, 2880, Campinas, SP, Brazil, CEP: 13070-178. E-mail: martags@ital.sp.gov.br

²Institute of Chemistry, State University of Campinas, Campinas, SP, Brasil

Recebido: 10.10.2017 - Aceito para publicação: 23.04.2018

ABSTRACT

Annatto seeds present cis-bixin as the major carotenoids, but the norbixin salt is the main pigment present in dyes obtained from the alkaline extraction process. For analyzing the norbixin, the absorptions are obtained in the two spectral peaks with higher intensity, but discrepancies in the published extinction values have led to serious doubts. Taking into account the use of absorption coefficient for evaluating the norbixin concentration in annatto seeds and extracts, the present study evaluated the absorption coefficient in various solvents and the total uncertainty associated with this value was determined. The norbixin standard was prepared from annatto seeds, purified by column chromatography and the purity of norbixin was evaluated by HPLC-DAD. The absorption coefficients were determined for norbixin in different solvents and the uncertainty was evaluated. The 0.5% potassium hydroxide, the main solvent used for marketing the annatto seeds and extracts, showed the absorption coefficients of 2887 at 454nm and of 2546 at 483nm, and the estimation of expanded uncertainty ($K=2$) was ± 86 and $85 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$, respectively.

Keywords. *Bixa orellana*, pigments, solvents, quantification, uncertainty estimation.

RESUMO

O principal carotenoide em sementes de urucum é a cis-bixina, mas o sal de norbixina torna-se o principal pigmento presente em corantes obtidos pelo processo de extração alcalino. Para a análise de norbixina as absorvâncias são obtidas nos dois picos espectrais de maior intensidade, mas discrepâncias no valor de absorvabilidade levam a sérias dúvidas. Levando-se em conta o uso do coeficiente de absorção na avaliação da concentração de norbixina em sementes de urucum e extratos, este trabalho teve como objetivo avaliar o coeficiente de absorção em vários solventes e determinar a incerteza expandida associada a esse valor. Para a execução do estudo, um padrão de norbixina foi preparado a partir de sementes de urucum, purificado em coluna aberta e a pureza da norbixina foi avaliada por HPLC-DAD. O coeficiente de absorção da norbixina foi determinado pela construção de curvas analíticas em diferentes solventes e a incerteza expandida foi avaliada. O hidróxido de potássio a 0,5%, principal solvente utilizado na comercialização de sementes de urucum e extratos, apresentou o coeficiente de absorção determinado em 2887 a 454nm e 2546 a 483nm e a estimação da incerteza expandida ($K=2$) foi 86 e $85 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave. *Bixa orellana*, pigmentos, solventes, quantificação, estimação da incerteza.

INTRODUCTION

Carotenoids are yellow, orange, or red pigments with wide distribution in nature. They are formed of isoprenoid units that constitutes the light-absorbing chromophore and are responsible for their color, properties and functions. The π electrons of the conjugated double bond system show the relevant transition $\pi \rightarrow \pi^*$ with excited state of comparatively low energy, which corresponds to light in the visible wavelength region. The solvent effect on the $\pi \rightarrow \pi^*$ transition energy of pigment in different solvents which allows to obtain the absorption coefficient with the Beer-Lambert law^{1,2,3}.

The carotenoids exist in nature generally more thermodynamically stable form, all-*trans*-configuration. However, the bixin is an exception because it occurs naturally in the *cis*-configuration¹.

Annatto seeds (*Bixa orellana* L.) present *cis*-bixin as the major carotenoid, representing more than 80% of the carotenoids present⁴. *Cis*-bixin is designated as the monomethyl ester of *cis*-norbixin dicarboxylic acid (9'-*cis*-norbixin: 6,6'-diaprocarotenedioic acid) (). Norbixin is found in low concentrations in annatto seeds, but the norbixin salt becomes the main pigment present in dyes obtained by the alkaline extraction process⁵.

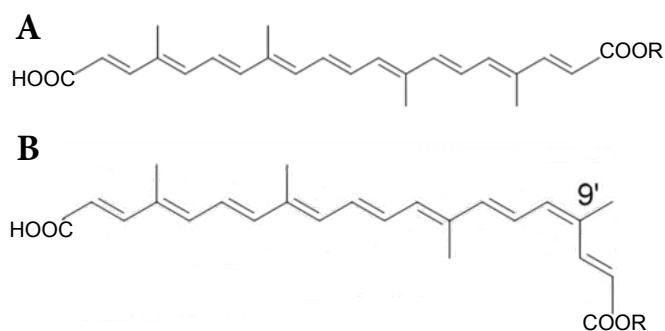


Figure 1. Chemical structure of (A) *trans*- and (B) *cis*-bixin (for R=CH₃) or norbixin (for R=H) (Dias et al)⁶

Seeds with the highest pigment contents are looked for in order to produce the dye, and hence the value of the seeds is directly related to the carotenoid concentration, making the exactness of the quantification method an extremely important factor.

A spectrophotometer with the wavelength in the visible region can be used for a quick evaluation of the pigments in annatto seeds or of the water soluble or liposoluble dyes obtained using the alkaline extraction process. However, due to the difficulty of obtaining and maintaining an analytical standard of norbixin, the use of the absorption coefficient () for the quantification of these pigments has been widely divulged^{3,6,7,8}. The absorption coefficient is the measure of the decrease in radiation intensity that passes through a layer containing a constant fraction of a determined substance in a one centimeter optical path⁹.

The values divulged in the literature for the norbixin absorption coefficient have undergone changes with time, without changing the wavelength or solvent. Reith and Gielen¹⁰ and FAO/WHO¹¹ mentioned values for () of 2850±40 for spectrophotometric readings of annatto pigments in 0.1N sodium hydroxide at 453 nm, but in 1982 FAO/WHO¹² changed the value to 3473. In 2006, FAO/WHO¹³ suggested the use of an absorption coefficient of 2870 absorption units for readings obtained at 482 nm for annatto dyes, using 0.5% potassium hydroxide as the solvent.

Due to doubts concerning the values currently used, a study was carried out to determine the of norbixin and the total uncertainty associated with this value.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

In the present study the solvents methanol, ethyl acetate and acetonitrile (JT Baker, Center Valley, USA) were of chromatographic grade, and the following reagents (Synth, São Paulo, Brazil) were of analytical grade: petroleum ether, ethanol, dichloromethane, chloroform, acetone, acetic acid, potassium hydroxide and sodium hydroxide.

Preparation of norbixin

The norbixin standard was separated as described by Tocchini and Mercadante¹⁴ and Rios and Mercadante¹⁵. A mass of approximately 200 g of annatto seeds was washed with two successive portions of 400 mL of petroleum ether

to remove the lipids, and the pigments then extracted from the defatted seeds with two portions of 400 mL of ethanol: dichloromethane (1:1, v/v). The dichloromethane was eliminated in a rotary evaporator at 40 °C and 200 mL of a 10% (m/v) ethanolic solution of potassium hydroxide added to the residue. The pigments were saponified overnight at room temperature and the saponified pigments neutralized and precipitated with glacial acetic acid and collected by filtration.

The norbixin was purified by open column chromatography using a glass column with a 10 mm internal diameter and length of 250 mm, filled with the absorbent silica gel 60 with particle diameters from 0.063 mm to 0.200 mm (Merck, Darmstadt, Germany, article 1.07734). The pigment collected by filtration was dissolved in ethyl acetate. Some drops of ethanol and petroleum ether were added to the extract to facilitate dissolution of the pigment, which was then transferred to a chromatographic column previously conditioned with ethyl acetate. A yellow band was eluted with portions of ethyl acetate: ethanol (1:1, v/v) and ethyl acetate: methanol (1:1, v/v). After eluting the yellow band, the norbixin (orange band) was eluted with 100% methanol. The solvents were eliminated in a rotary evaporator at a maximum temperature of 40 °C, and the norbixin dried in a nitrogen flow and collected.

The purity of the norbixin was evaluated by high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD) according to the method described by Scotter¹⁶. A Shimadzu model CLASS 10 chromatograph (Shimadzu, Tokyo, Japan) was used for this evaluation equipped with a 250 mm long x 4 mm internal diameter C18 reverse phase column (Merck, Darmstadt, Germany). The mobile phase was composed of acetonitrile in a 2% aqueous acetic acid solution (65:35, v/v) with a flow rate of 1 mL min⁻¹ in an isocratic system.

Determination of the norbixin absorption coefficient

In order to determine the norbixin absorption coefficient, analytical curves with ten points were constructed with norbixin concentrations between 0.035 and 0.355 mg mL⁻¹ in the solvents methanol;

acetone; chloroform: acetic acid (99:01, v/v); and aqueous 0.5% (m/v) solutions of potassium hydroxide and sodium hydroxide. The solvents were chosen based on the reagents most commonly used in commercialization of the seeds and in the quality control of annatto dyes^{1,3,7,17,18,19,20}.

The absorbance readings were obtained using two Varian (Varian, Victoria, Australia) model Cary 50 spectrophotometers, one bought in 2003 (equipment 1) and the other in 2007 (equipment 2). The wavelengths showing maximum absorption, peaks II and III, were obtained by a spectral scan between 300 nm and 600 nm for each solvent used. Peak II is usually considered as the maximum absorption wavelength (λ max)^{5,10,15,21}.

Uncertainty estimation

By definition, "Uncertainty is an interval associated with a measurement result which expresses the range of values that can reasonably be attributed to the quantity being measured. An uncertainty estimate should take account of *all recognized effects* operating on the result. The uncertainties associated with each effect are combined according to well-established procedures²². According to this definition, the uncertainty estimation associated with the absorption coefficient () in g 100g⁻¹ obtained by spectrophotometry, was calculated from the graph equation (), and the uncertainty sources listed on the cause - effect graph (). Thus the combined uncertainty () was determined from the sum of the squares of the norbixin concentration uncertainties, the linearity of the analytical curves, the uncertainties associated with the spectrophotometer and the precision of the analytical system.

(Equation 1)

(Equation 2)

where: () = the absorption coefficient; C_{norb} = the norbixin concentration; linear = the analytical curve linearity; spect = the uncertainty associated with the spectrophotometer; and prec.syst = the precision of the analytical system; $E_{\text{spect}1,2}$ = absorption coefficient spectrophotometer 1,2.

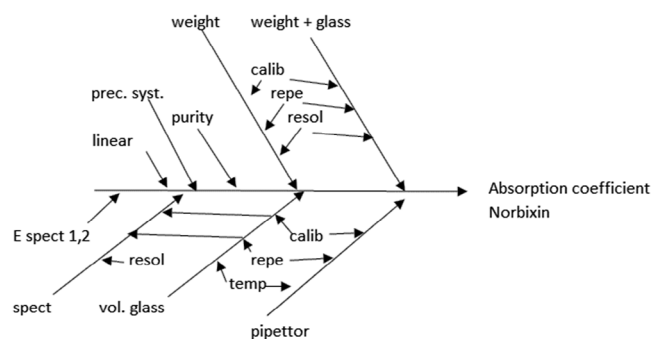


Figure 2. Cause – effect graph showing the uncertainty causes used in the absorption coefficient calculation. Where calib = calibration; spect = spectrophotometer; linear = analytical curve linearity; repe = repeatability; resol = resolution; prec. syst = analytical system precision; and temp = temperature; E spect 1,2 = absorption coefficient of spectrophotometer 1,2

RESULTS AND DISCUSSION

Analytical curve preparation

The purity of the norbixin isolated and determined by high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD) () was calculated as 89% with a spectral purity of 99%.

The *trans* and *cis* isomers can be distinguished based on the UV-VIS absorption spectra between 250 and 600 nm. According to Scotter et al²³, the *cis* isomer shows an increase in absorption intensity close to 355 nm. The absorption spectrum obtained () showed an increase in intensity at 355 nm, indicating that the pigment isolated corresponded to *cis*-norbixin.

Under the HPLC-DAD analytical conditions used, the maximum absorption for 9'-*cis*-norbixin occurred at 463 nm and presented a spectral purity of 99% (). Scotter et al²³ and Rios and Mercadante¹⁵ reported maximum absorption for *cis*-norbixin at 461 nm and a chromatographic purity of 92% and 93%, respectively, under the same analytical conditions used in the present study.

As from the norbixin solution in methanol, with the concentration corrected for chromatographic purity (44.44 mg 100 mL⁻¹), 2 mL aliquots were taken and dried in a nitrogen flow before diluting to 100 mL in the solvents mentioned above. An analytical curve with 10 points (not including the origin) was prepared and a spectral scan carried out between 300 nm and 600 nm to verify the absorption maxima of peaks II and III. After the spectral scan and determining the absorption maxima of peaks II and III, absorption reading was taken at each peak and the curve equation determined for each wavelength evaluated in each solvent. shows the data obtained.

According to Pretsch et al²⁴, the Woodward-Fieser rule can be used to calculate the absorption chromophore value at the maximum absorption wavelength (λ max in nm). The rule estimates that carboxylic acids with α , β -unsaturation present maximum absorption at a wavelength of 195 nm, substitutions at the γ and δ positions contribute 18 nm, each additional conjugated double bond contributes 30 nm, and each alkyl substituent 5 nm. Norbixin presents 7 additional conjugated double

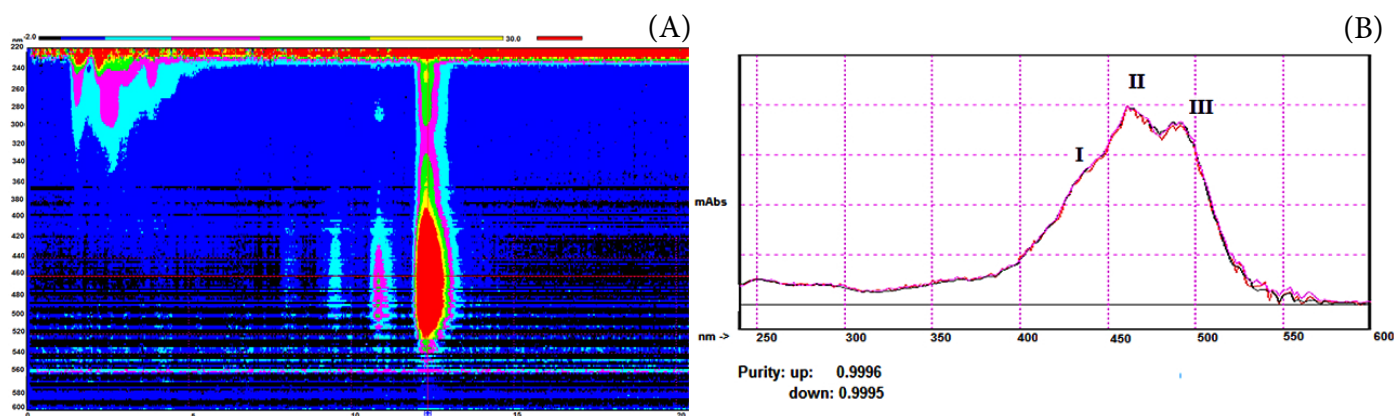


Figure 3. Thin layer chromatogram (A) absorption spectra with the identification of the absorption peaks I, II and III and the spectral purity of the isolated 9-*cis*-norbixin. (B). Analytical conditions described in the text

bonds, one substitution at position γ and another at position δ , and 4 alkyl substituents, and hence, according to the rule, should present maximum absorption at a wavelength of 461 nm, not considering the solvent. The same rule mentions correction for some solvents, such as water, of -8 nm. Considering correction for the solvent, the maximum absorption wavelength calculated for norbixin would change from 461 nm to 453 nm. Maximum absorption of 454 nm was observed for the solutions of 0.5% sodium hydroxide and 0.5% potassium hydroxide.

The spectrophotometers used in the study were located in buildings far from each other, and the absorbance readings were made in an interval of approximately 30 minutes, which allowed for some observations of the solvents of acetone and of the alkalis.

Acetone, which has one carbonyl group, shows

a tendency to suffer nucleophilic addition reactions, which occur quicker in acid and basic solutions than in neutral solutions, the hydration equilibrium constant (K_{hydr}) and the relative hydration velocity being influenced by the effects of the steric and electronic structure²⁵. A contact period was found to be necessary for the solvents of potassium hydroxide and sodium hydroxide in order to establish chemical equilibrium and the formation of the norbixin salts. The readings taken using equipment 2 were made soon after preparation, and could have been taken before the acetone and potassium hydroxide solutions had reached equilibrium. However this was not observed for the 0.5% sodium hydroxide solution, probably because the curves made with the two alkaline solutions were prepared in sequence, and the absorbance readings made first were those prepared in the potassium hydroxide solution ().

Table. Dilution solvents, wavelengths, spectrophotometers, regression equations of the analytical curves, determination coefficients and absorption coefficients found for *cis*-norbixin, expanded uncertainty

Solvent	λ (nm)	Spect	Analytical curve	r^2	Mean \pm s		U (K = 2)	% U
Methanol	452	1	Abs=2.9122c - 0.0037	1.0000	2912	2896 \pm 23	58	2
		2	Abs=2.88c + 0.0009	1.0000	2880			
	480	1	Abs=2.5912c - 0.0011	1.000	2591	2583 \pm 11	51	2
		2	Abs=2.5755c + 0.0018	1.0000	2575			
Acetone	457	1	Abs=2.5931c - 0.0514	0.9923	2593	2553 \pm 57	98	4
		2	Abs=2.5122c - 0.0453	0.9914	2512			
	486	1	Abs=2.2689c - 0.0488	0.9915	2269	2237 \pm 45	83	4
		2	Abs=2.2059c - 0.0399	0.9917	2206			
Chloroform: acetic acid (99:01, v/v)	475	1	Abs=2.7659c - 0.0025	0.9998	2766	2757 \pm 12	52	2
		2	Abs=2.7484c - 0.022	0.9999	2748			
	507	1	Abs=2.4245c - 0.0027	0.9998	2424	2417 \pm 10	51	2
		2	Abs=2.4098c - 0.0024	0.9999	2410			
0.5% Potassium hydroxide	454	1	Abs=2.9235c + 0.0063	0.9994	2923	2887 \pm 51	86	3
		2	Abs=2.8514c + 0.0056	0.9997	2851			
	483	1	Abs=2.614c + 0.0000	0.9995	2581	2546 \pm 50	85	3
		2	Abs=2.5109c + 0.0049	0.9997	2511			
0.5% Sodium hydroxide	454	1	Abs=2.8461c - 0.0060	0.9991	2846	2854 \pm 11	51	2
		2	Abs=2.8617c - 0.0018	0.9994	2862			
	483	1	Abs=2.5213c - 0.0053	0.9992	2521	2523 \pm 2	49	2
		2	Abs=2.5243c - 0.0015	0.9995	2524			

λ = wavelength; Spect = spectrophotometer; r^2 = correlation coefficient; = calculated absorption coefficient; s = standard deviation estimate; U = expanded uncertainty; %U = percentage contribution of uncertainty for absorption coefficient

Of the solvents used to determine the absorption coefficient of the 9'-*cis*-norbixin isolated with a purity of 89%, 0.5% sodium hydroxide was the one that presented an absorption coefficient closest to the values reported in the publications consulted. The mean values determined for were 2854 at 454 nm and 2523 at 483 nm, and Scotter²³ and Reith and Gielen¹⁰ found values of 2818 and 2850 at 453 nm, and 2503 and 2550 at 482 nm, respectively, although the sodium hydroxide concentration used was 0.1N.

The values calculated for the solvent 0.5% potassium hydroxide were 2887 at 454 nm and 2546 at 483 nm, which differed from the values found in publications by FAO/WHO, where values of 3473 at 453 nm (1982)¹² and 2870 at 482 nm (2003²⁶ and 2006¹³) were presented.

Although the concentration of acetic acid used in the chloroform (99:01, v/v) was not the same as the concentration used in other publications (99.5:0.5, v/v), the values encountered presented less variation. Values for equal to 2757 at 475 nm and 2417 at 507 nm were found in the present study, and Scotter et al⁷ and Reith and Gielen¹⁰ established values of 2620 at 473 nm and 2290 at 503 nm.

Estimate of the measurement uncertainty

In order to estimate the measurement uncertainty, the uncertainties associated with each analytical step were considered according to the cause and effect graph (), and shows the results obtained. The expanded uncertainty was calculated at a confidence level of 95.45% using the fact that the coverage factor K is equal to 2²⁷.

The greatest source of uncertainty observed was the spectrophotometer () contributing about 80% of the associated uncertainties.

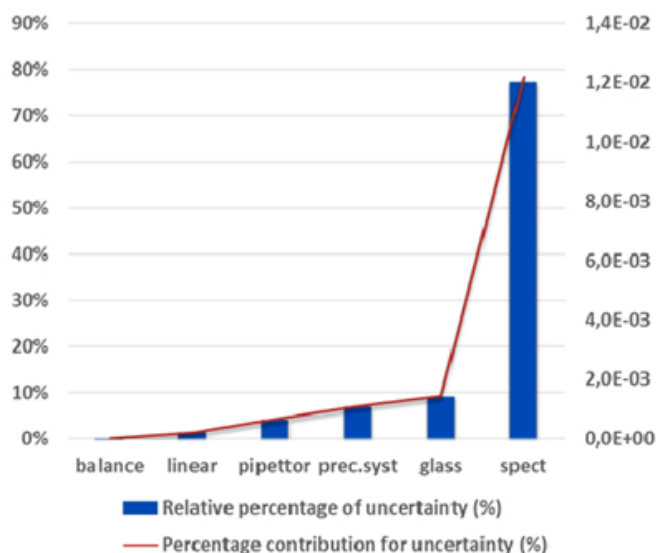


Figure 4. Relative percentage of uncertainty and percentage contribution for uncertainty considered in the estimates

CONCLUSION

The results obtained in this study indicate the need for a better discussion concerning the values for the absorption coefficient for norbixin found in the literature. These values, used in various scientific studies, quality control analyses and in the commerce of annatto dyes and seeds, should always be accompanied by the indication of their uncertainty.

Although this study did not use analytical techniques such as nuclear magnetic resonance or mass detector in the identification of norbixin, demonstrated that the absorption coefficient must be adequate for the intended use, be supported by evidence and have adequate uncertainty.

REFERENCES

1. Bareth A, Strohmar W, Kitzelmann E. HPLC and spectrophotometric determination of annatto in cheese. *Eur Food Res. Technol.* 2002;215:359-64. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-002-0541-y>
2. Rodriguez-Amaya DB. *Food carotenoids: chemistry, biology and technology*, Chichester (UK):John Wiley & Sons, Ltd; 2016.
3. Tupuna DS, Paese K, Guterres SS, Jablonski A, Flôres SH, Rios AO. Encapsulation efficiency and thermal stability of norbixin microencapsulated by spray-drying using different combinations of wall materials. *Ind Crops Prod.* 2018;111:846-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.12.001>
4. Preston HD, Rickard MD. Extration and chemistry on annatto. *Food Chem.* 1980;5:47-56. [http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(80\)90063-1](http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(80)90063-1)
5. Costa CLS, Chaves MH. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. *Quím Nova.* 2005;28 (1):149-52. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v28n1/23053.pdf>
6. Dias VM, Pilla V, Alves LP, Oliveira HPM, Munin E. Optical characterization in annatto and comercial colorific. *J Fluoresc.* 2011;21:415-21. <http://dx.doi.org/10.1007/s10895-010-0730-1>
7. Scotter MJ, Wilson LA, Appleton GP, Castle L. Analysis of annatto (*Bixa orellana* L.) food coloring formulations. 1. Determination of coloring components and colored thermal degradation products by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J Agric Food Chem* 1998;46(3):1031-8. <http://dx.doi.org/10.1021/jf970063+>
8. Scotter, MJ. Methods for the determination of European Union-permitted added natural colours in foods: a review. *Food Addit Contam. A* 2011;28(5):527-96. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2011.555844>
9. Dean JA. *Lange's handbook of chemistry*. 5.ed. St. Louis (NY):McGraw-Hill Inc;1999.
10. Reith JE, Gielen JW. Properties of bixin and norbixin and the composition of annatto extracts. *J Food Sci.* 1971;36(6):861-4. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1971.tb15545.x>
11. FAO/WHO. Specifications for the Identify and Purity of Some Food Colors, Flavours Enhancer, Thickening Agents and Certain other Food Additives. FAO Nutricion Meeting Report Series, 54B: Rome; 1975. WHO Food Additives Series, nº. 7, 1975.
12. FAO/WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series, nº 683 / Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, Italy; 1982. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41546/WHO_TRS_683.pdf?sequence=1
13. FAO/WHO. Compendium of Food Additive Specifications. Monographs 3 / Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 67th meeting, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome; 2006. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0675e.pdf>
14. Tocchini L, Mercadante AZ. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2001;21(3):310-3. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612001000300010>
15. Rios AO, Mercadante AZ. Otimização para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em snacks extrusados por CLAE. *Alim Nutr.* 2004;15(3):203-13.
16. Scotter M. The chemistry and analysis of annatto colouring: a review. *Food Addit Contam. A* 2009;26(8):1123-45. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030902942873>
17. Carvalho PRN, da Silva MG, Fabri EG, Tavares PER, Martins ALM, Spatti LR. Concentração de bixina e lipídios em sementes de urucum da coleção do Instituto Agrônômico (IAC). *Bragantia.* 2010;69(3):519-24. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052010000300002>

18. Cardeñosa V, Lunar ML, Rubio S. Generalized and rapid supramolecular solvent-based sample treatment for the determination of annatto in food. *J Chromatogr A*. 2011; 1218(50):8996-9002. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.041>
19. Gallardo-Cabrera C, Rojas-Barahona A. Stability study of an aqueous formulation of the annatto dyes. *Int Food Res J*. 2015;22(5):2149-54. Disponível em: [http://www.ifrj.upm.edu.my/22%20\(05\)%202015/\(56\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/22%20(05)%202015/(56).pdf)
20. Raddatz-Mota D, Pérez-Flores LJ, Carrari F, Insani M, Asis A, Mendoza-Espinoza JA, León-Sánchez FD, Rivera-Cabrera F. Chemical characterization and quantification of the pigment extraction yield of seven mexican accessions of *Bixa orellana*. *Rev Mex Ing Quím*. 2016;15(3):727-40.
21. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. HarvestPlus Handbook for carotenoid analysis. HarvestPlus Technical Monograph 2. Washington, DC and Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT);2004.
22. Magnusson B, Örnemark U. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 2. ed.;2014. [acesso 2015 Jun 03]. Disponível em: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
23. Scotter MJ, Thorpe SA, Reynolds SL, Wilson LA, Strutt PR. Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Food Addit Contam*. 1994;11(3):301-315. <http://dx.doi.org/10.1080/02652039409374229>
24. Pretsch E, Bühlmann P, Badertscher M. Structure Determination of Organic Compounds – Table of Spectral Data. 4.ed. Verlag Berlin Heidelberg: Springer; 2009.
25. Carey FA. Química Orgânica. 7.ed., vol. 2. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda; 2011.
26. FAO/WHO. Compendium of Food Additive Specifications. Addendum 11 / Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), 61th meeting, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome; 2003.
27. Ellison SLR., Williams A. Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3.ed; 2012. [acesso 2015 Jun 03]. Disponível em: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf



Complying with the HIV test algorithm for diagnosing children aged from 1 to 18 months born to HIV-positive mothers

Cumprimento do algoritmo para o diagnóstico do HIV em crianças de 1 a 18 meses nascidas de mães HIV positivas

RIALA6/1738

Marcella Kelyva PIERRE, Denise Maria Bussoni BERTOLLO, Juliana Kindler FIGUEIREDO, Márcia Maria Costa Nunes SOARES*

*Correspondence to: Laboratório de Biologia Molecular, Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz São José do Rio Preto – X, Rua Alberto Sufredini Bertoni, 2325, Maceno, São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP: 15060-020. Tel: 17 3224 2602, ramal 707. E-mail: marcia.soares@ial.sp.gov.br

Recebido: 10.04.2017 - Aceito para publicação: 08.05.2018

ABSTRACT

The evolution of the epidemic of HIV in Brazil has especially affected women, and the control of mother-to-child transmission of HIV (MTCT) has been a new challenge to be faced. This study assessed the compliance with the algorithm recommended by the Ministry of Health (MH) for diagnosing the children born to HIV-positive mothers, followed-up in the Regional Central Laboratory of the Instituto Adolfo Lutz of São José do Rio Preto-X, and to evaluate the occurrence of mother-to-child transmission. This cross-sectional descriptive study collected data on the CD4⁺ T-cell count and viral load System for Controlling Laboratory Examinations (SISCEL) and System for Hospital Management (SIGH) from January 2009 to December 2014. In this period, 265 children were registered, being 141 (53.2%) male and 124 (46.8%) female; and only 217 (81.9%) complied with the algorithm recommended by the MH. The mean prevalence of MTCT was 5.9%. Despite the efforts exerted by the MH, the HIV algorithm noncompliance still occurs, and the vertical transmission rate is higher than 2%. These data reinforce the need to intensify the surveillance, to improve the information and the follow-up of pregnant women, and to rescue those responsible who do not strictly comply with the algorithm proposed by the MH.

Keywords. infectious disease transmission, vertical, HIV, diagnostic techniques and procedures.

RESUMO

A epidemia do HIV no Brasil tem afetado de maneira especial as mulheres e trouxe, como um novo desafio a ser enfrentado, o controle da transmissão vertical (TV) do HIV. O objetivo deste estudo foi de avaliar o cumprimento ao algoritmo preconizado pelo Ministério da Saúde (MS) no diagnóstico de crianças nascidas de mães HIV positivas, acompanhadas no Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto-X, e avaliar a ocorrência de TV. Foram coletados dados do Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (SIGH) e do Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da Rede Nacional de Contagem de Linfócitos T CD4⁺ e Carga Viral (SISCEL) no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2014. Foram cadastradas 265 crianças, 141 (53,2%) eram do sexo masculino e 124 (46,8%) feminino. Destas, 217 (81,9%) completaram o algoritmo preconizado pelo MS. A média da prevalência de TV foi de 5,9%. Apesar dos esforços do MS, há descumprimento no algoritmo e a taxa de TV é maior que a meta de 2%. Os dados reforçam a necessidade de intensificar a vigilância, melhorar a informação e acompanhamento de gestantes e resgate dos responsáveis que não cumprem o algoritmo do MS.

Palavras chave. transmissão vertical de doença infecciosa, HIV, técnicas e procedimentos diagnósticos.

INTRODUCTION

The acquired immunodeficiency syndrome (aids) epidemic has stabilized in Brazil over the last ten years with an average of 20.7 cases per 100,000 inhabitants. In the same period, the Human Immunodeficiency Virus (HIV) detection rate in the pregnant women increased by around 28.6%. Thus, concern over the mother-to-child transmission of HIV (MTCT) issue has been growing¹.

MTCT may occur during the pregnancy (35%) or at delivery (65%), with an increased risk from 7% to 22% of transmission during breastfeeding. The preventive measures may reduce this latter transmission to the levels from 0% to 2.0%².

From the beginning of the epidemic in 1980 to June 2016, 842,710 aids cases were notified in Brazil, and by December 2015, 303,353 deaths were occurred in patients of all of age groups¹. As of June 2012, there were 17,539 cases in under 5-year-old children and 4,435 cases in children between 5 and 9 years old. Since October 1996, the National Program, nowadays the STD/Aids and Viral Hepatitis Department of the Ministry of Health, has recommended the prophylaxis against MTCT for all of HIV-positive pregnant women and for newborns exposed to HIV. This strategy has reduced the number of MTCT cases in Brazil, even though the rate remains above the goal of elimination. Data from a Brazilian multicenter collaborative study reported the MTCT rate of 7.5% in 2003 and 2004³.

A study performed by Succi et al⁴ and the Epidemiological Bulletin of the Ministry of Health¹ reveal that despite the occurrence of a fall in the MTCT rate, differences were found out among the geographic regions of Brazil reflecting the cultural, economic and social diversity, as well as the access to health services.

Since 2002, a significant decrease was observed in the number of aids cases due to MTCT; but in the recent years, this rate has stabilized at an unsatisfactory level of around 500 cases/year in under 5-year-old children³.

In 2012, MTCT was the form of exposure to HIV in 99.6% of under 13-year old patients.

In under 5-year-old children, MTCT has been considered responsible for approximately 100% of aids cases. Thus, in Brazil the incidence rate of aids in under 5-year-old children (per 100,000 inhabitants) has been regarded as proxy indicator of the MTCT rate in the country. The incidence rate of aids in under 5-year old children has been stable in Brazil at an average level of 3.5 per 100,000 inhabitants; but a large variation among the federation districts and among the regions has been found³.

Data from the meta-analysis by Drake et al⁵ corroborate this information, showing that the MTCT rate was high (22.7%) for the group of pregnant and puerperal women with incident infections. This group also presented a 2.8-fold higher risk of transmission when compared to women with chronic infections, confirming that the prophylaxis with antiretroviral drugs is effective for preventing MTCT.

According to the new clinical protocol published by the Brazilian Ministry of Health (BMH)³, the early identification of vertically infected children is crucial for starting the antiretroviral therapy, the prophylaxis against opportunistic infections and the management of infectious complications and nutritional disorders. The transplacental passage of maternal anti-HIV IgG antibodies, mainly in the third trimester of gestation, interferes in the diagnosis of vertical infection. Maternal antibodies may persist until the infant is 18 months of age. Therefore, the detection of HIV antibodies is not sufficient for diagnosing children younger than 18 months of age. Hence, it is necessary to perform virological tests, such as viral RNA quantification, a test provided by the BMH. The laboratory diagnosis of HIV MTCT follows the algorithm updated by the BMH³.

All of these data demonstrate that MTCT continues to occur in several regions of Brazil and of the world, in spite of the efforts to eradicate the transmission with the launch of the Global Plan to Eliminate New HIV Infections in Children by the year 2015, proposed by the Joint United Nations Program on HIV/aids⁶. The regional investigations and the follow-ups are necessary, for better understanding the reality of each region.

The objective of the present study was to assess the compliance with the algorithm, recommended by the BMH for diagnosing the children born to HIV-positive mothers followed-up in the Institute Adolfo Lutz - Regional Laboratory of São José do Rio Preto X-SP, and to evaluate the occurrence of mother-to-child transmission.

MATERIAL AND METHODS

This cross-sectional descriptive study collected data on the CD4⁺T-cell count and the viral load by the System for Controlling Laboratory Examinations (SISCEL) and the System for Hospital Management (SIGH). The data from children aged from 1 to 18 months born to HIV-positive others, who performed the HIV viral load test at the Institute Adolfo Lutz - Regional Laboratory of São José do Rio Preto-X during the period from January 2009 to December 2014 were analyzed. This laboratory

is the reference center for Regional Health Departments XV, which is comprised of 102 municipalities located in the northwest region of São Paulo State.

Evaluation of adherence to the algorithm

All of the records of children aged 1 to 18 months were evaluated regarding the compliance with the algorithm formally approved by of the BMH³ ().

Evaluation of the occurrence of mother-to-child transmission

The viral load (VL) results detected in samples from children were analyzed for investigating the occurrence of MTCT. According to the new clinical protocol of the BMH, the detectable viral load below 5,000 copies/mL should be carefully analyzed, and the sample has to retested be repeated for possible false results.

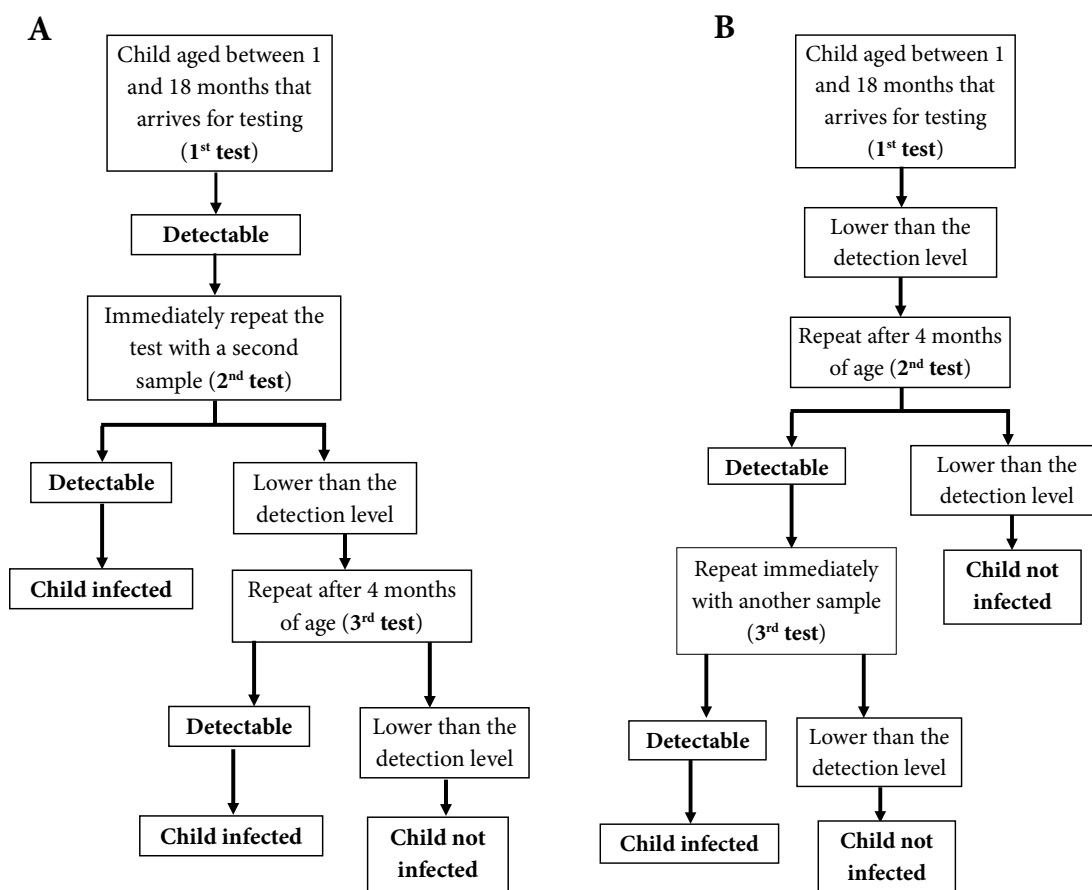


Figure 1. Algorithm of tests used for the diagnosis of HIV in children aged between 1 and 18 months, born of HIV positive mothers. A) Viral load detectable in the 1st test. B) Viral load below the limit of detection in the 1st test

An under 18-month-old child with two undetectable viral load results, the second one being performed after four months of age, this case is considered non-HIV infected and no longer “probably uninfected”.

Therefore, the results found in this study were presented according to the following recommendations: children with undetectable viral load, being possibly false-positive children (viral load results <5,000 copies/mL) and children with detectable viral load (viral load > 5,000 copies/mL).

The HIV transmission was calculated by the proportion of the number of newborns with detectable viral load (viral load > 5,000 copies/mL), divided by the total number of newborns per studied year. The average was calculated by the sum of the rates observed per year, divided by the number of evaluated years.

Statistical analysis

The results found in this study are presented according to the absolute frequency and their occurrence over the years. The statistical program EPI Info version 7.1 was used for analyzing the data.

Ethical considerations

This project was submitted (n° 841.188) and it was approved by the Ethics Committee of the Central Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, SP, in accordance with the National Health Council - MH (NHC) Resolution 466 of December 12, 2012.

Considering that only the registered data were evaluated and that there was no possibility of harm to the patients, a waiver was granted in respect to the necessity of informed written consent.

RESULTS

In the evaluated period, 265 children aged from 1 to 18 months were registered, being 141 male and 124 female (53% and 47%, respectively; p -value > 0.05). The number of evaluated children grew progressively over the years. The distribution of children by sex is shown in

On average 49.8% (132/265) of the guardians took two months to start the evaluation (1st collection). The first sample collection was done in the 1st, 3rd and 4th months of age in 18% (49/265), 10% (28/265) and 7% (20/265) of children, respectively. The remaining children were tested from six (0.5%) to 11 months (2%). Only one child had its first collection after 18 months of age.

Regarding the collection of the second sample, only 2.3% (5/217) of the guardians followed the algorithm and returned within two months; 11% (25/217) returned in three months, 41% (89/217) returned after four months and about 18% (39/217) and 9% (19/217) in five and six months, respectively. The other guardians returned for the second test from 7 (3.7%) to 20 months (0.5%).

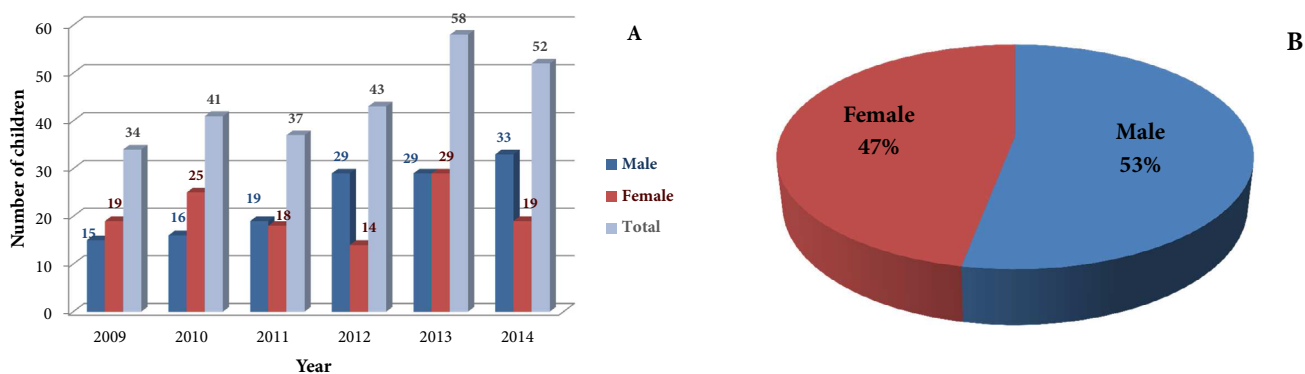


Figure 2. A) Number of children born to HIV-positive mothers who performed the viral load in CLR IAL São José do Rio Preto – X, from January 2009 to December 2014. B) Distribution of children according to sex

As for the adhesion to the BMH algorithm, the majority (82% - 217/265) completed all of the stages of the testing algorithm ().

Considering the children who presented positive results in the first sample, 33% did not return within the period of time recommended by the algorithm, that is, a second sample collection should be performed immediately upon receiving the result.

In the present study, no child with detectable viral load <5,000 copies (false positive) was observed in any of the analyzed samples (1st and 2nd collections). The detectable and undetectable viral load results are shown in .

When assessing the MTCT, the prevalence rates observed at each year ranged from 2.3% to 10.8% with the overall mean of 5.9%. shows the annual prevalence distribution of MTCT.

DISCUSSION

Brazil was the first country to develop and to implement the measures to prevent MTCT^{7,8}.

The algorithm was instituted in 2002, according to the Guide for Clinical Treatment of HIV Infection in Children - BMH/Health Surveillance Secretariat⁹. Since then, attempts to reduce the rate of MTCT in the country has been made. In 2006, the BMH included in their Pact for Life a pledge to reduce the maternal and infant mortality, and being one of the priorities the reduction of the mother-to-child transmission rate of HIV and syphilis⁶.

In the present study, 265 children were analyzed with no significant difference between genders. According to Vermelho et al¹⁰, no sex differences

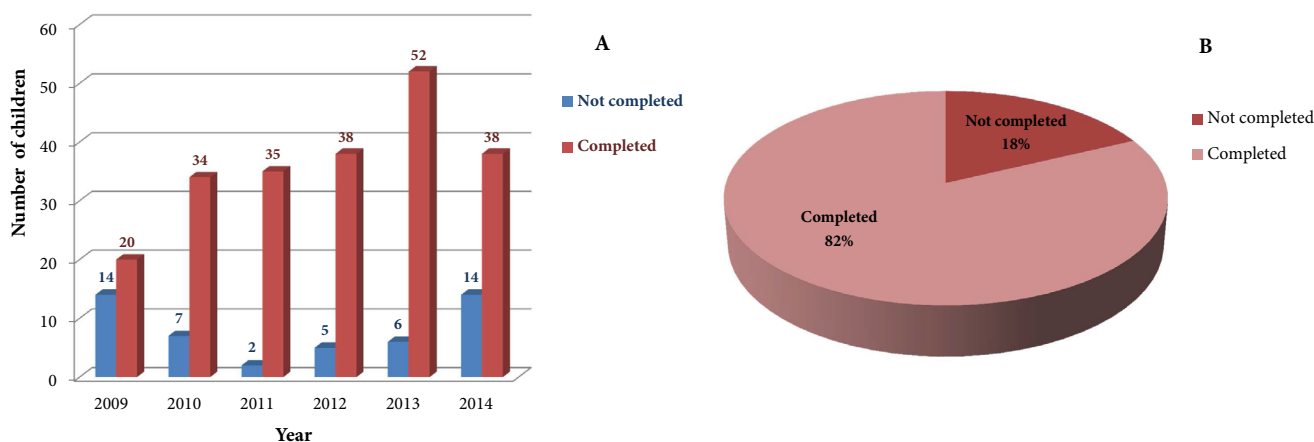


Figure 3. Compliance with the algorithm designed by the Ministry of Health. A) Number of the children by year evaluated. B) Overview of the study

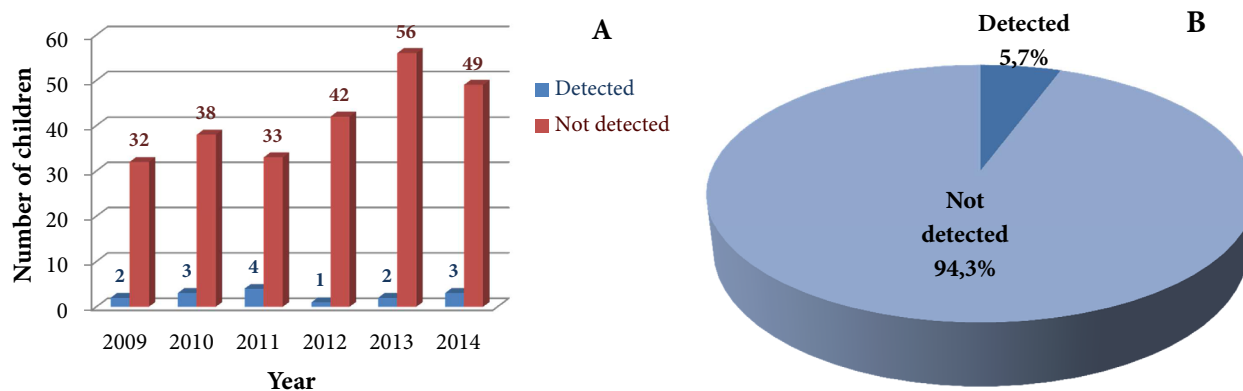


Figure 4. HIV viral load results in children from 1 to 18 months born of HIV-positive mothers, performed in CLR IAL São José do Rio Preto - X, from January 2009 to December 2014. A) Distribution by year. B) Overview of the study

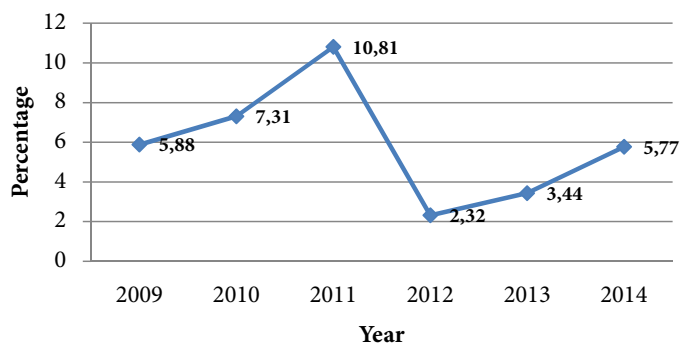


Figure 5. Distribution of the annual prevalence of MCTC in children born from HIV-positive mothers who performed viral load in the CLR IAL São José do Rio Preto - X, from January 2009 to December 2014

were observed throughout the study period (1990-1999), although in the early years of the epidemic, the predominance of male patients occurred due to hemophilia.

A survey carried out from 2001 to 2006 in the western region of São Paulo State¹¹ showed that 20% of HIV-positive mothers had not performed the HIV tests in their children even at eight months after birth. The current study shows that this time has been reduced to two months.

Regarding the compliance with the algorithm of BMH, 18% of the analyzed children did not complete all of the testing steps. These data corroborate the studies performed by Gouveia et al¹², Succi⁴ and Matida et al¹³. However, the percentage was lower when compared to the studies by Patrício et al¹⁴ and Vasconcelos et al¹⁵, who observed 28% and 31%, respectively, without following-up after delivery. According to Moura et al¹⁶ some seropositive mothers still believe that their children will be born healthy, free of IV contamination and that the post-natal treatment is fully effective, thereby justifying the non-compliance with the algorithm.

Regarding MTCT, the rates observed in this study (mean 5.9%) corroborate those found in other studies^{11,17-20}. Although the occurrence of the decrease in relation to both evaluations, previous to the BMH program²¹ and the more recent studies^{14,22}, the goal of the Brazilian government established at 2% of children infected through MTCT until 2015 has not yet been achieved⁶.

According to the BMH, the variation in the MTCT rates is mainly related to the regions of the country, followed by the mother age and schooling. In the last ten years, 42.7% reduction in the MTCT rate occurred in Brazil, but the states of Roraima and of Rio Grande do Sul have shown rates considered very high¹.

According to Burger¹⁸, the rate in the city of Curitiba which was 5.1% in 1999 fell to 2.5% in 2009, because of the preventative measures that were instituted. In another study carried out in Sorocaba, São Paulo State which established the “Mother-to-child Transmission Zero” Program, more than ten years ago, the rate dropped to 0.17%, that is, almost to zero²³.

The low adherence to the algorithm observed in this study and the high MTCT rate, might be due to the lack of information of the professional or of the children guardian. On the other hand, possibly the child registration changed due to the adoption or even the child death; thus, the second sample collections might not have been done or even identified.

The stable reduction of MTCT cases indicates that still much work has to be done, and that it is still not feasible to achieve the BMH goal in the short term. This situation occurs because many factors influence on the results, such as: the diagnosis and the delayed treatment of pregnant women; the lack of adherence to treatment; the special attention given to pregnant women who use illicit drugs, and they currently represent a major problem in the MTCT elimination²⁴. The study performed by Lima et al²⁵ highlights the vulnerability of young pregnant women with low socioeconomic and social resources, who start late the prenatal care and have high viral loads. These conditions have been the great challenge to the country public health services for eliminating MTCT.

This information reinforces the importance of developing the focused surveillance, the active searches and the rescue of patients who do not adhere to all of the steps of the algorithm recommended by the BMH, in order to eliminate the MTCT in the region analyzed in the present study and throughout the country.

CONCLUSION

Despite all the efforts of the BMH, a lack of adherence still occurs by those responsible for complying with the HIV-1 testing algorithm for the diagnosis of children born to mothers carrying the virus. In the present study, 18% of non-compliance with the algorithm were detected.

Although 82% of the cases complied with the algorithm (two sequential samples), the majority (97.7%) did not meet the recommended deadlines, and among the children who showed positive results detected in the first sample, 33% did not return immediately to collect the second sample.

The services where the patients have been attended and the work performed with pregnant women still have not achieved the goal of the BMH, concerning the MTCT rate 2%, as in the present study the observed mean was 5.9%.

Although this study did not investigate those responsible for this situation, it is considered essential to develop the special measures for mothers who use illicit drugs, because they represent the major problem for potentially maintaining the rate of MTCT.

These data reinforce the need to intensify the surveillance, to improve information and the follow-up of HIV-positive pregnant women, in order to promote an active search and to rescue the children whose guardians do not complete all of the steps of the diagnostic algorithm proposed by the BMH.

ACKNOWLEDGEMENT

Dra. Susilene Maria Tonelli Nardi for her collaboration in the statistical analysis.

REFERENCES

1. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico HIV Aids. Brasília, DF, Ano V, nº 01, 2016. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2016/boletim-epidemiologico-de-aids-2016>
2. Fonseca FF, Jesus BR, Rocha KT, Silva SSS, Andrade DCS, Costa FM. A transmissão Materno-Infantil do HIV: Uma revisão de literatura na perspectiva da enfermagem. *Rev Eletrônica Gest Saúde*. 2015;6(01):533-48. Disponível em: <http://periodicos.unb.br/ojs311/index.php/rgs/article/view/2580/2303>
3. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Crianças e Adolescentes. Brasília, DF; 2014. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2014/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-criancas-e>
4. Succi RCM. Mother-to-child transmission of HIV in Brazil during the years 2000 and 2001: results of a multi-centric study. *Cad Saúde Pública*. 2007; 23(supl.3):379-89. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2007001500006>
5. Drake AL, Wagner A, Richardson B, John-Stewart G. Incident HIV during Pregnancy and Postpartum and risk of Mother-to-child HIV Transmission: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Med*. 2014;11(2):e1001608. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001608>
6. Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids / VIH/Sida (UNAIDS/UNUSIDA). Plano Global para Eliminar Novas Infecções por HIV/VIH em Crianças até 2015 e Manter suas Mães Vivas; 2011. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_global_eliminar_novas_infeccoes.pdf
7. Amaral E, Assis-Gomes F, Milanez H, Cecatti JG, Vilela MM, Pinto e Silva JL. Timely implementation of interventions to reduce vertical HIV transmission: a successful experience in Brazil. *Rev Panam Salud Publica*. 2007;21(6):357-64. <http://dx.doi.org/10.1590/S1020-49892007000500003>
8. Kakehasi FM, Pinto JA, Romanelli RM, Carneiro M, Cardoso CS, Tavares MC, et al. Determinants and trends in perinatal human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission in the metropolitan area of Belo Horizonte, Brazil: 1998 - 2005. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103(4):351-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000400007>
9. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional de DST e Aids. Guia de Tratamento Clínico da Infecção pelo HIV em Crianças; 2002. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/crianca.pdf>
10. Vermelho LL, Silva LP, Costa AJL. Epidemiologia da transmissão vertical do HIV no Brasil. *Bol Epidemiol - Aids*. 1999;12(3):5-15.

11. Gonçalves VLMA, Troiani C, Ribeiro AA, Spir PRN, Gushiken EKK, Vieira RB et al. Transmissão vertical do HIV-1 na região oeste do Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(1):4-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011000100002>
12. Gouveia PAC, Silva GAP, Albuquerque MFPM. Predictors of loss to follow-up among children registered in an HIV prevention mother-to-child transmission cohort study in Pernambuco, Brazil. *BMC Public Health*. 2014;14:e1232. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2458-14-1232>
13. Matida LH, Santos NJS, Ramos AN Jr, Gianna MC, da Silva MH, Domingues CSB, et al. Eliminating vertical transmission of HIV in São Paulo, Brazil: progress and challenges. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011;57(suppl 3):S164-170. <https://dx.doi.org/10.1097/QAI.0b013e31821e9d13>
14. Patricio FRL, Rutherford GW, Barreto JHS, Rodamilans C, Badaró R. Effectiveness of the prevention of mother-to-child HIV transmission in Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2015;19(5):538-42. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.06.006>
15. Vasconcelos ALR, Hamann EM. Why does Brazil still report high rates of vertical HIV transmission? An evaluation of health care quality to HIV-infected pregnant women and their children. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2005;5(4):483-92. <http://doi.org/10.1590/S1519-38292005000400012>
16. Moura EL, Praça NS. Transmissão Vertical do HIV: expectativas e ações da gestante soropositiva. *Rev Lat-Am Enferm*. 2006;14(3):405-13. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-11692006000300015>
17. Fernandes RCSC, Ribas GF, Silva DP, Gomes AM, Medina-Acosta E. Desafios operacionais persistentes determinam a não redução da transmissão materno-infantil do HIV. *J Pediatr*. 2010;86(6). <http://dx.doi.org/10.1590/S0021-75572010000600010>
18. Burger M, Pchebilski LT, Sumikawa ES, Sakurada EMY, Telles TMBB, Parabocz M, et al. O Impacto do Programa Mãe Curitibana sobre a Transmissão Vertical do HIV no Município de Curitiba entre 2000 e 2009. *DST J Bras Doenças Sex Transm*. 2011;23(2):76-83. <http://doi.org/10.5533/2177-8264-201123205>
19. Araujo ESP, Friedman RK, Camacho LAB, Derrico M, Moreira RI, Calvet GA et al. Cascade of access to intervention to prevent HIV mother-to-child transmission in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2014;18(3):252-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.11.002>
20. Barbieri MM, Von Linsingen R, Sbalqueiro RL, Tristão EG. Vertical mother-to-child HIV transmission in babies born in a tertiary hospital in southern Brazil. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018;31(15):2000-6. <http://doi.org/10.1080/14767058.2017.1333102>
21. Turchi MD, Duarte LS, Martelli CMT. Mother-to-child transmission of HIV: risk factors and missed opportunities for prevention among pregnant women attending health services in Goiânia, Goiás State, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2007;23(suppl.3):S390-401. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2007001500007>
22. Lemos LMD, Anglemeyer A, Santos VS, Gurgel RQ, Rutherford GW. Prevalence of and risk factors for late diagnosis of HIV infection in Brazilian infants and child. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(3):326-30. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0257-2014>
23. Pereira DA, Horiy DM, Proença EO, Santos ASA. Expectativas de mães soropositivas em processo de pesquisa de transmissão vertical do HIV, em Sorocaba/SP. *Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba*. 2014;16(1):11-4. Disponível em: <https://revistas.pucsp.br/index.php/RFCMS/article/view/13566/pdf>
24. Redmond AM, McNamara JF. The road to eliminate mother-to-child HIV transmission. *J Pediatr (Rio J)*. 2015;91(6):509-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2015.08.004>
25. Lima YAR, Reis MNG, Cardoso LPV, Stefani MMA. HIV-1 infection and pregnancy in young women in Brazil: socioeconomic and drug resistance profiles in a cross-sectional study. *BMJ Open*. 2016;6(7):e010837. <http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010837>



Monitoring the trihalomethanes concentrations in drinking water

Monitoramento das concentrações de trihalometanos na água potável

RIALA6/1739

Tuany Natana SCHÄFER¹, Beatriz BOGER¹, Ingridy Isabelle Maia de SOUZA¹, Marilene da Cruz Magalhães BUFFON², Rafael Gomes DITTERICH², Milene Zanoni da SILVA¹, Yanna Dantas RATTMANN^{1*}

*Correspondence to: ¹Laboratory of Public and Environmental Health, Department of Collective Health, Federal University of Paraná, Av. Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, Curitiba, PR, Brazil, zipcode: 80210-170. Tel: +55 41 3360 4166 / +55 41 3360 4073. E-mail: yannadr@gmail.com

²Department of Collective Health, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

Recebido: 25.10.2017 - Aceito para publicação: 25.05.2018.

ABSTRACT

The reduction of the incidence of water-borne diseases is achieved with the diffusion of the use of chlorination techniques. However, in spite of the benefits of this disinfection method, the reactions of chlorine with the natural organic matter occurring in the water induce the production of disinfection by products such as trihalomethanes. These products have already been associated with the incidence of some cancers types. Considering that in the Brazilian legislation, it is not mandatory measuring and controlling the occurrence of trihalomethanes at the exit and during the water distribution to the consumer. This study aimed at analyzing the relationship between chlorination and its by products. Thus, this project evaluated the concentrations of trihalomethanes in water collected at different points of supply in the municipality of Colombo, Paraná, Brazil, during the period from November 2015 to February 2016. Chromatographic methods were employed, besides the spreadsheets provided by the Health Surveillance of Colombo for comparison. The found values were tabulated and they were compared with the limits established by the Brazilian Ministry of Health- Ordinance N° 05/2017. The results confirmed that the values of those provided by the concessionaire responsible for the city water treatment and supply, and being within the standards determined by the legislation.

Keywords. trihalomethanes, chlorine, disinfection by products, drinking water, Brazil, gas chromatography.

RESUMO

A redução da incidência de doenças transmitidas pela água foi alcançada com a difusão do uso de técnicas de cloração. Apesar dos benefícios desse método de desinfecção, as reações de cloro com a matéria orgânica natural presente na água levam à formação de subprodutos de desinfecção como trihalometanos. Esses produtos já foram associados à incidência de alguns tipos de câncer em animais, e muitas vezes podem ser detectados em água tratada e fornecida para o consumo. Pela legislação brasileira não é obrigatório efetuar o monitoramento de trihalometanos após o tratamento e distribuição de água. Frente a este problema, este estudo teve como objetivo avaliar as concentrações de trihalometanos em água coletada em diferentes pontos de abastecimento no município de Colombo, PR, Brasil, durante o período de novembro de 2015 a fevereiro de 2016. Utilizou-se método cromatográfico para as análises, além de planilhas fornecidas pela Vigilância Sanitária de Colombo. Todos os valores foram comparados com os limites estabelecidos na Portaria de Consolidação N° 05/2017 do Ministério da Saúde. Os resultados confirmaram que os valores de trihalometanos fornecidos pela concessionária, responsável pelo tratamento e fornecimento de água na cidade, atendem aos parâmetros legais.

Palavras-chave. trihalometanos, cloreto, produtos da desinfecção, água potável, Brasil, cromatografia a gás.

INTRODUCTION

No other resource that nature comes to offer to earth, none is so abundant as the water. It is estimated that 70% of the earth's surface is covered by water, however, only a small fraction of this volume is valued as available for human consumption¹.

Increasing industrialization and demographic explosion occurred over the past XVII century in the European continent, and these events brought up the need to invest in the water and sewage collection and supply systems; with the main aim to sterilize water and make it available for consumption. The significant increase of life expectancies in the developed countries during the XX century is due to this, whereupon today it's known as the conventional treatment of water^{2,3}.

Among the chemical agents that can be used for disinfecting the water for human consumption, chlorine is still the most utilized, due to its efficiency and its low cost⁴. The expressive presence of natural organic matter (NOM) in the raw water promotes the formation of trihalomethanes (TTHM) compounds since the NOM tends to react with free chlorine within its midst^{5,6}.

The use of chlorine as a disinfection agent in water treatment is associated with the traditional sanitary measures and has brought undeniable benefits to society, as the decline of morbid-mortality resulting from pathogens of hydric propagation^{3,7}.

Nonetheless, a control for regulating the concentrations of chlorine in the water outlet is needed, and in the distribution networks by the companies, liable for the water supply. These strategies aim at maintaining the water chlorination at a safe and effective level, as well as to minimize the formation of TTHM and their harmful consequences to the health when exposed to the large concentrations or over a long period of time³.

The risk of forming TTHM is, they act as potential carcinogenic and mutagenic substances in some animals^{8,9}. These occurrences have already been associated with some epidemiological studies with cancer, and they are cited in journals using search engines ScienceDirect and PubMed, the search results having an average of 119 articles.

In Brazil, the current legislation on the drinking water establishes the value of 100 µg.L⁻¹ as the maximum contents of TTHM, and 5 mg.L⁻¹ for free residual chlorine in the water from the distribution networks¹⁰. The Ordinance n° 05/2017 states to monitor the TTHM concentrations in the treated water, but unlike those required by other countries, this category of monitoring established by the Brazilian governmental agencies¹⁰ is not compulsory.

Due to the scarcity of studies concerning the quality of the water that reaches the taps for Brazilian consumers, the present investigation aimed at evaluating the TTHM concentrations in samples collected at different points in the city of Colombo, state of Paraná - Brazil, for evidencing the possible risks to the health of the local population.

METHOD

The study consisted of monitoring for four months, from November/2015 to February/2016, the water samples collected for measuring the chlorine concentrations, and to evaluate the formation of water disinfection by products (trihalomethanes) in the water supply distribution system of the city of Colombo, Paraná-Brazil.

According to the Census of the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), in 2015, the population of Colombo was estimated to have 227.220 inhabitants¹¹. The higher percentage of inhabitants resides in the urban area at the southern region of the municipality.

Collection points

Water samples were collected in triplicate at five specific points, all of them located in the Basic Health Units (BHU) in the city of Colombo. The criterion adopted for choosing the sites was justified by the regular territorial distribution, and because they are regions that cover the greater part of the population of the municipality.

Samples were collected in 45 mL glass bottles, equipped with teflon caps and silicone septums, containing 3 mg of sodium sulfite. The flasks were completely filled with the water samples, and they were kept under refrigeration at 4 °C.

Reagents

Water free of organic matter (HexiS) was diluted in a volume of 500 mL, as the TTHM non-forming control under the laboratory conditions.

Samples evaluation

Colorimetric assay

Samples were firstly evaluated at the Laboratory of Public and Environmental Health of the Pharmacy course of the Federal University of Paraná. A colorimetric assay was performed using the reagent kit for detecting trihalomethanes (TTHM Plus®-HACH). The detected absorbance values were compared to the positive and negative patterns for the specific chemical substance. The results from this colorimetric method were not quantitative, and they were discarded.

Gas Chromatography

The samples were submitted for extraction using purification and trapping (purge and trap method) and analyzed by gas chromatography with mass spectrometry detection (CG-MS).

Shimadzu gas chromatograph, model 2014, with electron capture detector was used; separations were performed on Rtx-5MS, Restek capillary column (30 m x 0.25 mm d.i and 0.25 mm film thickness). The chromatographic conditions are summarized in below.

A detector, containing an electron ionization source (EI-70 eV) and a quadrupole mass analyzer, operated at 40-500 m/z linear scanning mode, were used for the detection by mass spectrometry and for compounds identification. The interface was maintained at 310 °C and the source of ions at 200 °C.

Table 1. Experimental conditions

Inlet temperature	250° C
Injection volume	1 µL
Split ratio	1:5
Furnace temperature	40° C (2 min), with a heating ramp of 20° C/min to 200° C, followed by ramp from 4° C/min to 290° C
Detector temperature	300° C
Carrier gas	Helium gas
Flow rate	1.2 mL min ⁻¹

The linearity of the method was studied in ten different concentrations of analyte, in triplicate. The proposed method showed good linear range between 0,1 - 100 µL⁻¹, with excellent coefficients of determination (R>0.9933) for analyte. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 0,03 µL⁻¹ and 0,1 µL⁻¹, respectively.

Data provided by the Colombo Health Surveillance

The monthly average of chlorine concentrations in the municipal water supply networks was monitored since the excess of free residual chlorine was predisposes to a higher formation of TTHM.

The Health Surveillance agency for the city of Colombo, that controls the heterocontrol for the parameters of chlorine concentrations, provided the value of concentrations for comparing with the data informed by the concessionaire, which is responsible for treating and for distributing water, the Sanitation Company of Paraná (SANEPAR).

Data on the TTHM concentrations in the water supply system, reported by SANEPAR were provided by the Health Surveillance of the municipality of Colombo, which were used as a pattern for comparing the results from the present study.

The data were tabulated by using the GraphPad Prism® program. The results were evaluated according to the limits allowed by the Brazilian Ministry of Health - Ordinance n° 05/2017, which stipulates a maximum of 5.0 mg.L⁻¹ chlorine in the water, and the permitted maximum value of 0.1mg.L⁻¹ (=100 µg.L⁻¹) of TTHM in the treated water and distributed for consumption.

RESULTS

SANEPAR is responsible for the water treatment and distribution in Colombo, and for analyzing the total TTHM concentrations at two points in the trial system time.

Concentration of trihalomethanes

Figures and represent the values of TTHM found in the water after the treatment () and at the distribution points (), at different points of the supply system, during the years of 2015 and 2016. These data were provided by both the SANEPAR and the Health Surveillance.

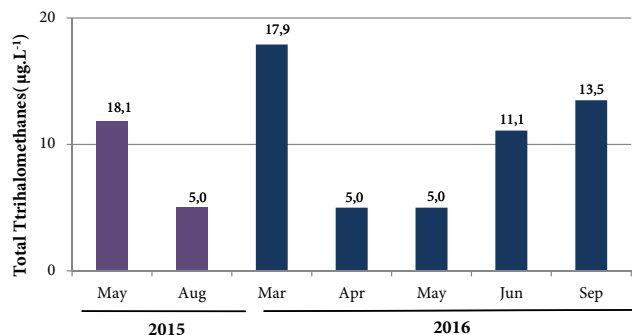


Figure 1. Values of total trihalomethanes (TTHM) in µg.L⁻¹ at the end of treatment

Source: SANEPAR and Health Surveillance of the city of Colombo

A higher variation in the TTHM concentration was observed in . In the values remained constant only during the months of August 2015, April and May 2016; at the same time, a significant variation between the months of March and April of 2016 was observed (12.9 µg.L⁻¹).

illustrates the increasing occurrence of TTHM along the water supply system, besides indicating certain invariability on the values over the investigated periods. Although, there was no possibility of establishing a direct relationship between the values since some of them indicated one of the variables only, the output value or the value in the distribution network.

Mean value of TTHM at the exit of treatment was established as $9.9 \pm 5.0 \mu\text{g.L}^{-1}$, with the lowest value of $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ and the highest value of $17.9 \mu\text{g.L}^{-1}$. The concentration of TTHM in the distribution

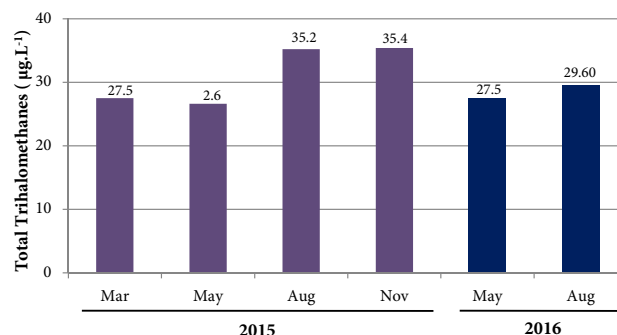


Figure 2. Values of total trihalomethanes (TTHM) in the water supply system at distinct periods.

Source: SANEPAR and Health Surveillance of the city of Colombo

network was established as $30.3 \pm 3.9 \mu\text{g.L}^{-1}$. This indicates an approximate increase of 206% in the concentration of TTHM in the water, which leaves the treatment site until reaching the tap of the consumer.

shows the mean concentrations of TTHM detected by means of gas chromatographic analysis in water samples collected at five specific points in Colombo city, from November 2015 to February 2016.

On average the present study found the following TTHM concentration values: $33.1 \pm 3.7 \mu\text{g.L}^{-1}$; $31.3 \pm 5.5 \mu\text{g.L}^{-1}$; $30.7 \pm 5.1 \mu\text{g.L}^{-1}$; $27.3 \pm 5.7 \mu\text{g.L}^{-1}$; $32.3 \pm 0.7 \mu\text{g.L}^{-1}$ for the collection points located in Jardim Monza, Atuba, Maracanã, Guaraituba and São José, respectively. November was the month, in which the highest TTHM contents were detected, on average $32.74 \pm 4.4 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Table 2. Mean values (\pm standard deviation) to total concentrations (µg.L⁻¹) of trihalomethanes (TTHM) in the supply drinking water at the Basic Health Units (UBS) that serve some of the most populous neighborhoods of Colombo, Paraná during November of 2015 to February of 2016

Mean and standard deviation to Total Concentrations of TTHM (µg.L ⁻¹)								
Collection point in Colombo (UBS)	Nov		Dec		Jan		Feb	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Jardim Monza	36.6	2.0	28.2	3.1	32.3	2.3	35.3	1.3
Atuba	36.1	1.9	26.5	2.2	36.1	1.5	26.7	0.6
Maracanã	25.6	1.3	36.3	0.9	27.3	2.0	33.8	1.4
Guaraituba	32.1	1.8	22.1	1.7	22.7	0.7	32.3	0.8
São José	33.3	2.0	32.3	2.0	32.3	2.1	31.6	1.3

The data corresponding to mean concentration and standard deviation (SD). Water samples were collected in triplicate at five specific points, located in basic health units in Colombo-PR

Otherwise, a mean of $29,0 \pm 5,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ was found in December, the lowest mean concentration. The means of $30,1 \pm 5,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ and $31,9 \pm 3,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ were recorded in January and February, respectively. The overall mean for all of the monitored months was $30,9 \pm 4,5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Chlorine concentration

shows the monthly average concentrations of chlorine obtained from heterocontrol worksheets provided by the Health Surveillance of Colombo, which delivered the values comprising the period from January to December 2015.

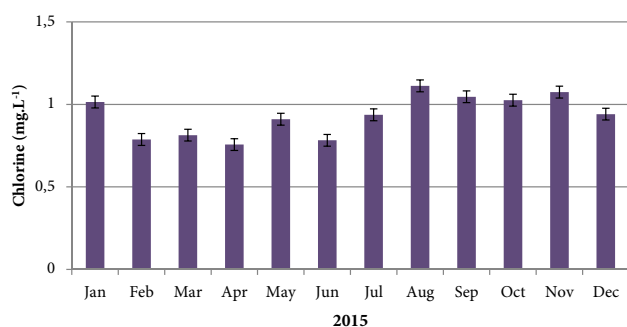


Figure 3. Concentration (mg.L⁻¹) of chlorine in the supply drinking water at the Basic Health Units (UBS) of Colombo, between January and December of 2015

Source: Health Surveillance of Colombo

Values of this parameter are concentrated in the range from $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ to $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$, and the highest variation being between 1 mg.L^{-1} and $1,8 \text{ mg.L}^{-1}$ in January. A lower concentration of chlorine was detected during September, being circa $0,7 \text{ mg.L}^{-1}$ of residual chlorine in the drinking water.

DISCUSSION

Due to the technical limitations, the Health Surveillance of the city of Colombo does not perform the heterocontrol of TTHM concentrations in the water of the municipality. Therefore, this was the proposal of the present study, and seeing that, it strategically selected the sample collection sites in the basic health units, which serve some of the most populous districts (Guaraituba, Atuba, Monza) in Colombo¹¹.

Since they were detected for the first time in the early 1970s in treated water⁴, some epidemiological studies have suggested the possible relationship between the long-term exposure to these disinfection by products from the chlorination method and the increased risk of cancer and other health-related ills¹²⁻¹⁴.

By means of the ScienceDirect search system (strictly using the keyword “trihalomethanes”), it may find about 1,108 papers referring to study on TTHM since the 1970s when these by products began to be investigated.

Several of these studies are still focused on the new testing (or already known) techniques for detecting and removing the TTHM and NOM from drinking water¹⁵. Though, in the last decade, a significant increase in papers regarding the study of these compounds and their association with the induction of some neoplasms can also be found.

Studies on related cases have been reported in several countries: Canada, Spain and Italy^{12,16,17}. These surveys analyzed the quality of the incoming water to the population, concerning the presence of TTHM in drinking water for ingestion or inhalation. In Brazil, this kind of monitoring has still been scarce^{18,19}. In Brazil, the majority of the researchers working on TTHM and disinfection by products investigate the methods for detecting or removing these compounds from the drinking water^{15,20}, are made under laboratory conditions.

As shown in **Figures** and , the obtained data were not directly correlated. Therefore, it cannot accurately assert the type of parameters that should be evaluated to detect what caused the TTHM increase throughout the treatment from the exit (particularly in August 2015) to the collection points. Although it is implied that the reactions of TTHM occurred during the distribution, as reported^{4,9}.

Higher production of TTHM might be associated with: (a) the higher availability of organic precursors^{4,6,9,18,21,22} which may originate from the humus derivatives (common in the water medium) or even from the sewage contamination on the way, or (b) high concentration of residual chlorine in water^{4,3,21,23}.

It is important to consider that when talking about the supply of treated water at each stage, the

abstraction of water from springs, rivers and other sources, before their distribution, they have to go through a rigorous supervision process.

Heterocontrol is the process of monitoring the quality of goods or services, whether it involves risk or it represents a protection factor for public health. In general terms, in addition to the control that must be exercised by the producer on their production, distribution and consumption procedure, and the state institutions also having to exercise these controls²⁴.

The control of the chlorine concentrations in water, treated by the SANEPAR, is performed by the concessionaire.

In contrast, the Health Surveillance of the Municipality is responsible for the heterocontrol, which compares the detected values and passes them on to the Information System for Surveillance of Water Quality for Human Consumption (SISÁGUA), of the Ministry of Health. Nevertheless, the same Brazilian standard that establishes the maximum values of TTHM for the consumption, the periodic measurement of the TTHM concentration at the exit of the treatment and along the supply networks are not obligatory.

The Brazilian legislation establishes that the analyzes for TTHM determination have to be done in accordance with the methods described in the "Standard Methods for Water and Sewage Examination"²⁵ published in 1905, and periodically updated by the American Public Health Association (APHA). Among the methods proposed by APHA, the "purge and trap" extraction technique with GC/MS (gas chromatography/mass spectrometry) detection was adopted to quantify the TTHM in this project.

The present study did not aim at individually quantifying the TTHM produced such as: chloroform (CHCl_3), bromodichloromethane (CHClBr_2), dibromodichloromethane (CHBr_2Cl), bromoform (CHBr_3) and other components such as haloacetic acids (HAA). Although, it is important to note that other similar studies indicated the higher presence of chloroform and haloacetic acids¹⁵ as being the principal compounds contained in drinking water.

Knowledge of the maximum permissible value of the TTHM concentrations in drinking water varies greatly according to the drinking water

standards of each country. The World Health Organization (WHO) establishes the maximum permissible values of up to $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ for TTHM²³ (WHO 2008). However, some countries such as Germany, Switzerland and other regulatory agencies such as the United States Environmental Protection Agency (USEPA) have lower values than WHO ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$, $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ and $80 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectively) for the occurrence of these compounds in the water for consumption^{4,26}.

The values of the TTHM concentrations at the exit stage of the treatment procedure, as well as those found in the distribution network (Figures and), were below the limit established by Brazilian and Paraná legislation, that is $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ^{4,6,18,27} and $80 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectively⁶. The results found in this study corroborated the information provided by the SANEPAR and the Health Surveillance.

Monitoring the NOM concentrations was not performed in the present study, but it is essential to analyze it at the collection and distribution points, especially during the periods of high temperature and rainfall²⁸. The amount of NOM present in the collection and supply reservoirs may be changed, and this will directly interfere in TTHM contents, pH value and water turbidity constants²⁵.

Analyzing , a considerable variation can be observed in the TTHM concentration during the period from March and April of 2015. This difference could be attributed to the high rainfall recorded in these months in this region²⁹. In fact, the peaks of the highest concentration of TTHM recorded at the end of treatment (March and September 2016), coincided with the times when the rainfall measurements for the Curitiba region were above the normal range. For this reason, in addition to the presence of TTHM at this time during the treatment withdrawal, the amount of NOM and turbidity of the water should be reasonably altered because of the rainy season.

Although TTHM concentrations are below the limits established by Ordinance N° 05/2017, the free residual chlorine concentrations in municipal water were also monitored. For this parameter, the concentrations are within the safe limits established by Brazilian legislation, that is, from 0.2 mg.L^{-1} to 5 mg.L^{-1} ¹⁰. The concessionaire responsible for

water distribution discloses the number of samples of residual chlorine, which it annually performed. In 2014, 185 analytical assays for determining the concentrations of this disinfectant agent were carried out monthly²⁹. Currently, the free residual chlorine content for the last monthly analysis was 1.2 mg.L⁻¹ ³⁰.

The concentration of free residual chlorine is vital for inhibiting the proliferation of pathogens, which possibly still can be found in the water distribution network. However, it is also essential that the chlorinated water receives the addition of ammonia compounds¹⁰. Since chloramines (structures more stable than free residual chlorine) act as a secondary source of chlorine to other possible oxidants that arise in the network, they might cause the recontamination^{4,9}, the corrosions to the distribution system^{5,6}.

CONCLUSION

The concentrations of TTHM and the free residual chlorine found in drinking water of the city of Colombo, Paraná, during the evaluated period were within the standards determined by the Brazilian legislation.

Although some aspects that might interfere, the increase of the chlorination by products formation have not been analyzed or considered in this study. The obtained results are important to ensure the monitoring of water supply in the community so that they comply with required safety limits.

Little is discussed the importance and relevance of TTHM to the public health provided by the Brazilian government agencies, which stress the seriousness of the data and information to be brought to the public knowledge. Therefore, numerous water disinfection techniques could be developed, ensuring the product quality, and increasing the human and environmental health safety.

Given the high public health relevance of the topic, further research is needed to draw strong evidence about the risk of TTHM in drinking water. In comparing to other countries, the maximum level proposed for TTHM in Brazil is high and should be revised and better regulated.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Edital Universal-CNPq 2013 (nº 485207/2013-3) for financial support. The English text of this paper was revised by Michael Joseph Hannon, Irish, Athlone Institute of Technology.

REFERENCES

1. Bracho N, Castillo J, Vargas L, Morales R. Formación de trihalometanos durante el proceso de desinfección en la potabilización de agua. *Rev Téc Ing Univ Zulia*.2009;32(3):231-7.
2. Alvarado DAM, Garcia HC, Solano AM. Cáncer gástrico en Costa Rica: ¿existe o no relación con la cloración del agua para consumo humano?. *Rev costarric salud pública*.2007;16(30):62-73. [acesso 2016 Nov 22]. Disponível em: <http://www.scielo.sa.cr/pdf/rcsp/v16n30/3524.pdf>
3. Vallejo-Vargas OI, Beltrán L, Franco P, Montoya-Navarrete CH, Alzate-Rodríguez EJ, Reyes H. Determinación de trihalometanos en aguas de consumo humano por microextracción en fase sólida- cromatografía de gases en Pereira, Colombia. *Rev colomb quim*. 2015;44(1):23-9. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n1.54041>
4. Meyer ST. O uso de cloro na desinfeção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. *Cad Saúde Públ*. 1994;10(1):99-110. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1994000100011>
5. Manahan SE. *Environmental Chemistry*. 9. ed. London: CRC Press; 2009.
6. Bach L. Avaliação da formação de tri-halometanos em processos de cloração de água e estudo do efeito do pré-tratamento fundamentado no uso de radiação ultravioleta [dissertação de mestrado]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2014.
7. Dos Santos SM, Gouveia N. Presença de trihalometanos na água e efeitos adversos na gravidez. *Rev bras epidemiol*. 2011;14(1):106-19. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-790X2011000100010>

8. Grelier J, Bennett J, Patelaro E, Smith RB, Toledano MB, Rushton L et al. Exposure to disinfection by-products, fetal growth, and prematurity: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology*. 2010;21(3):300-13. <http://dx.doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181d61ffd>
9. Baird C, Cann M. *Química Ambiental*. 4. ed. Porto Alegre (RS): Bookman; 2011.
10. Ministério da Saúde (BR). Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, Anexo XX. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 03 out. 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html
11. Prefeitura Municipal de Colombo, Brasil. Dados Gerais de Colombo. [acesso 2016 Nov 22]. Disponível em: <http://portal.colombo.pr.gov.br/perfil-do-municipio-de-colombo/>
12. Font-Ribera L, Kogevinas M, Schmalz C, Zwiener C, Marco E, Grimalt JO et al. Environmental and personal determinants of the uptake of disinfection by-products during swimming. *Environ Res*. 2016;149:206-15. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.013>
13. Font-Ribera L, Kogevinas M, Nieuwenhuijsen MJ, Grimalt JO, Villanueva CM. Patterns of water use and exposure to trihalomethanes among children in Spain. *Environ Res*. 2010;110(6):571-9. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.05.008>
14. Tardif R, Catto C, Haddad S, Simard S, Rodriguez M. Assessment of air and water contamination by disinfection by-products at 41 indoor swimming pools. *Environ Res*. 2016;148:411-20. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.04.011>
15. Cunha GC, Romão LPC, Costa AS, Alexandre MR. A green strategy for desorption of trihalomethanes adsorbed by humin and reuse of the fixed bed column. *J Hazard Mater*. 2012;209-210:9-17. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.12.028>
16. Tokmak B, Capar G, Dilek FB, Yetis U. Trihalomethanes and associated potential cancer risks in the water supply in Ankara, Turkey. *Environ Res*. 2004; 96(3):345-52. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.11.005>
17. Righi E, Bechtold P, Tortorici D, Lauriola P, Calzolari E, Astolfi G et al. Trihalomethanes, chlorite, chlorate in drinking water and risk of congenital anomalies: A population-based case-control study in Northern Italy. *Environ Res*. 2012;116:66-73. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.04.014>
18. Tominaga MY, Midio AF. Exposição humana a trihalometanos presentes em água tratada. *Rev Saúde Pública*. 1999;33(4):413-21. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101999000400013>
19. Budziak D, Carasek E. Determination of trihalomethanes in drinking water from three different water sources in Florianopolis-Brazil using purge and trap and gas chromatography. *J Braz Chem Soc*. 2007;18(4):741-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532007000400012>
20. Brum MC, Oliveira JF. Removal of humic acid from water by precipitate flotation using cationic surfactants. *Minerals Engineering*. 2007;20(9):945-9. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2007.03.004>
21. Golfnopoulos SK, Arhonditsi GB. Quantitative assessment of trihalomethane formation using simulations of reaction kinetics. *Water Res*. 2002;36(11):2856-68. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00509-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00509-7)
22. Chowdhury S. Trihalomethanes in drinking water: Effect of natural organic matter distribution. *Water SA*. 2013;39(1):1-8. <https://doi.org/10.4314/wsa.v39i1.1>
23. World Health Organization – WHO (2008). Guidelines for drinking-water quality incorporating 1st and 2nd addenda, Vol. 1, Recommendations. [acesso 2016 Abr 20]. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/secondaddendum20081119.pdf
24. Motter J, Moyses ST, França BHS, De Carvalho ML, Moyses SJ. Análise da concentração de flúor na água em Curitiba, Brasil: comparação entre técnicas. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;29(2):120-5.
25. Rosalém SF. Estudo de identificação e quantificação de trihalometanos em água de abastecimento [dissertação de mestrado]. Vitória (ES): Universidade Federal do Espírito Santo; 2007.

26. Dos Santos MS, Martendal E, Carasek E. Determination of THMs in soft drink by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Food Chem*. 2011;127(1):290-5. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.115>
27. Paim APS, Souza JB, Adorno MAT, Moraes EM. Monitoring the trihalomethanes present in water after treatment with chlorine under laboratory condition. *Environ Monit Assess*. 2007;125(1-3):265-70. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9518-9>
28. Oliver SL, Ribeiro H. Variabilidade climática e qualidade da água do Reservatório Guarapiranga. *Estud Av*. 2014;28(82):95-128. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142014000300007>
29. Sanepar. Relatório qualidade da água. 2014. [acesso 2016 Nov 22] Disponível em: <http://www.sanepar.com.br/sanepar/RelatorioQualidadeAgua/2014/079.pdf>
30. Sanepar. Análise de água, 2016. [acesso 2016 Nov 22] Disponível em: <http://www.sanepar.com.br/sanepar/usav/resultados.nsf/Analises?OpenAgent&Cod=079>



Qualidade da água em escolas públicas municipais: análise microbiológica e teor de nitrato em Araçatuba, estado de São Paulo – Brasil

Quality of water in municipal public schools: microbiological analysis and nitrate content in Araçatuba, state of São Paulo – Brazil

[RIALA6/1740](#)

Débora Regina Romualdo da SILVA¹, Marilene Oliveira dos Santos MACIEL², Barbara Braga Ferreira MARTA², Teresa Marilene BRONHARO², Aparecida de Fátima MICHELIN^{2*}

*Endereço para correspondência: ²Centro Laboratorial Regional de Araçatuba, Instituto Adolfo Lutz, Rua Minas Gerais, 135, Vila Mendonça, Araçatuba, SP, Brasil, CEP: 16010-330. Tel: 18 3623 4784. E-mail: cidinhamichelin@gmail.com

¹Universidade Paulista – UNIP, Campus de Araçatuba.

Recebido: 02.06.2017 - Aceito para publicação: 13.05.2018

RESUMO

A potabilidade da água de consumo em escolas públicas de Ensino Infantil do município de Araçatuba/SP foi avaliada procedendo-se à pesquisa de coliformes totais, de *Escherichia coli* e ao teor de nitrato em amostras coletadas, nos seguintes pontos: cavalete de distribuição da rede pública ou de poço; torneira da cozinha e bebedouro. Das 25 escolas analisadas, 12% não atenderam aos padrões de potabilidade da água perante parâmetro microbiológico; entretanto, quanto ao nível de nitrato, todas as amostras apresentaram resultados dentro do Valor Máximo Permitido pela legislação vigente. Os dados obtidos sugerem correlação positiva entre a concentração de nitrato e o NMP de coliformes totais. A presença de coliformes totais e de *E. coli*, especialmente em escolas da zona rural, cuja a água é proveniente de poço, aponta a necessidade da implantação de medidas de saneamento da água em escolas públicas de Educação Infantil do município de Araçatuba, SP.

Palavras-chave. abastecimento de água, qualidade da água, creches, saúde.

ABSTRACT

The potability of water for consumption in public childhood education schools of the city of Araçatuba/SP was evaluated by carrying out a survey of total coliforms, *Escherichia coli* and nitrate content, in collected samples at the following points: cross connection control manual of public main or wells; kitchen faucet and watercooler. Of the 25 schools analyzed, 12% did not meet the standards of water potability to the microbiological parameter; but referring to nitrate content, all remained within the maximum value allowed by vigent legislation. Obtained data suggest a positive correlation between the nitrate concentration and the NMP of total coliforms. The presence of total coliforms and *E. coli*, especially in rural schools, whose water comes from well, points out the need to implement water sanitation measures in public schools of Early Childhood Education in the city of Araçatuba, SP.

Keywords. water supply, water quality, child day care centers, health.

INTRODUÇÃO

Água, elemento essencial à vida, também constitui um fator de risco à saúde devido à disseminação de contaminantes físico-químicos e/ou biológicos¹, com surtos epidemiológicos confirmados seja em países desenvolvidos como em desenvolvimento².

As doenças de origem hídrica resultam da ingestão, direta ou indireta, de água contaminada, sendo, frequentes sob condições precárias de saneamento básico e/ou higiene. Crianças, indivíduos imunossuprimidos e idosos destacam-se entre os grupos expostos ao risco de doença de veiculação hídrica³. Estudo realizado no Nordeste do Brasil em 2010 aponta a ocorrência de surtos de gastroenterite associados ao consumo de água contaminada em menores de cinco anos⁴. Estima-se óbito de uma a cada 100 crianças por doenças de veiculação hídrica no estado de São Paulo⁵, ratificando a suma importância do padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano⁶.

A Portaria nº. 2914/2011 do Ministério da Saúde estabelece procedimentos e responsabilidades para o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade⁷. A avaliação microbiológica baseia-se na pesquisa de coliformes totais e coliformes termotolerantes ou fecais, especialmente a *Escherichia coli*^{7,8}; entre os parâmetros químicos, o nitrato destaca-se devido à indução à metahemoglobinemia especialmente em crianças, assim como ao risco de ocorrência de cancerígenos nitrosamina e nitrosamida^{9,10,11}.

Embora comum em águas naturais, com níveis menores em águas superficiais e maiores em profundidade¹², o nitrato apresenta importância em saúde pública por indicar contaminação remota da água, resultante naturalmente do ciclo final da decomposição da matéria orgânica¹⁰. De acordo com o Manual de Procedimentos de Vigilância Ambiental, do Ministério da Saúde, além do nitrato de origem natural, deve-se considerar a ocorrência de nitrogênio de origem antropogênica, principalmente em decorrência do lançamento de despejos domésticos, industriais e criadouros de animais próximos a corpos d'água,

bem como, por meio da lixiviação de terrenos fertilizados durante atividades agrícolas¹³.

O estudo avaliou a potabilidade da água em escolas públicas de Educação Infantil do município de Araçatuba/SP quanto ao parâmetro microbiológico e ao teor de nitrato para analisar a possibilidade de associações entre os parâmetros estudados; baseado no resultado obtido pretende-se orientar a higienização de reservatório de água.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

O município de Araçatuba, situado na região Noroeste do estado de São Paulo, apresenta topografia moderada, textura média, relevo plano a suavemente ondulado, com altitude entre 390 a 400 m, a 21° 12' 32" latitude sul e 50° 25' 58" de longitude Oeste. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2017 o município apresentou uma estimativa de 194.874 habitantes, que residem em área urbana e na área rural, com densidade demográfica de 155,54 habitantes por km²¹⁴. A malha hídrica, densa e perene, compõe cursos d'água da bacia do Baixo Tietê. Cerca de 70% do abastecimento municipal é proveniente do reservatório Ribeirão Baguaçu com captação terceirizada, seguida de bombeamento para duas Estações de Tratamento de Água (ETA 1 e ETA 2) para potabilidade e enviada para os reservatórios; segue-se e a distribuição pública para atendimento ao perímetro urbano. Os 30% restantes são provenientes do rio Tietê e de dois poços profundos pertencentes ao Aquífero Guarani (Jardim Ipanema, em funcionamento desde 1994 e Jardim Jussara, desde 2000)¹⁵. O município apresenta 68 escolas públicas municipais, sendo quatro localizadas no perímetro rural, que atendem 14.943 alunos. Das escolas públicas municipais, 40 são Unidades de Educação Infantil, que equivalem aos ciclos Maternal I e II (creches), Infantil I e II (pré-escola) e atendem crianças entre 4 meses a 5 anos; enquanto as demais 28 são Unidades de Ensino Fundamental I, que atendem alunos do 1 ao 5º ano com idades entre 6 e 10 anos¹⁶.

Amostragem

Do total de 40 Unidades de Ensino Infantil do município de Araçatuba\SP, 25 foram selecionadas por amostragem estratificada, sendo avaliadas 2 Unidades localizadas no perímetro rural, que correspondem a 50% das escolas rurais e 23 Unidades em perímetro urbano, situadas em áreas centrais e periféricas. As escolas foram identificadas com letras de A até Y. Exceto escola X, cuja água foi proveniente de poço de perímetro rural, a água nas 24 escolas de Educação Infantil foi proveniente da rede pública de abastecimento da cidade, conforme descrito anteriormente e distribuída para os bebedouros de forma hidráulica. A água foi filtrada antes de seguir para a cozinha e bebedouro.

Coleta

As amostras de água foram coletadas conforme descrito no Manual de Coleta, Conservação e Transporte de Amostras de Água, do Centro de Vigilância Sanitária do estado de São Paulo¹⁷. Em cada uma das 25 Unidades amostradas, foram realizadas coletas nos seguintes pontos: cavalete de distribuição da rede pública ou diretamente do poço (P1), torneira da cozinha (P2) e bebedouros de água destinados aos alunos (P3), totalizando 25 amostras em cada ponto. Para análise microbiológica, a coleta de amostras foi feita em duplicata, em frasco de polipropileno estéril contendo pastilha de tiosulfato e sódio preenchido até a marca de 100 mL. Para a análise do teor de nitrato, foi utilizado frasco de polietileno de 500 mL não esterilizado e preenchido até 2/3 do volume. As mostras devidamente identificadas foram transportadas em caixa isotérmica até o Centro de Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz de Araçatuba/SP e mantidas sob refrigeração até a análise.

Análises microbiológicas

A análise microbiológica foi realizada por método cromogênico, conforme preconizado por *American Public Health Association*¹⁸. A Presença/Ausência de coliformes totais e de *E. coli* foi realizada empregando substrato cromogênico (Colilert – Idexx Laboratories). O *blister* do substrato

cromogênico (Colilert) foi adicionado a 100 mL de amostra de água coletada, sem necessidade de diluição prévia, em frasco estéril, incubado a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 horas para a primeira leitura que, se negativa, a amostra é re-encubada por até 28h para a segunda leitura. A presença de coliformes totais é indicada pela coloração amarela do meio, enquanto que a presença de *E. coli* por fluorescência sob luz ultravioleta; ambas constatadas por inspeção visual.

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de *E. coli* foi utilizado o método de substrato cromogênico (Quanti-tray/Colilert – Idexx Laboratories) que consiste na adição do *blister* Colilert em 100 mL da amostra de água, coletada e sem diluição prévia, seguida de homogeneização e transferência para cartela Quanti-Tray com 91 poços. Após selada, a cartela foi incubada nas mesmas condições descritas para a presença/ausência. O NMP de coliformes totais foi determinado procedendo à contagem de poços com coloração amarela, enquanto que o NMP de *E. coli* foi determinado pelo número de poços que apresentarem fluorescência sob luz ultravioleta, ambas constatadas por inspeção visual.

Teor de nitrato

A determinação do teor de nitrato em água foi realizada por espectrofotometria conforme descrito em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2008)¹⁹. Alíquota 100 mL da amostra de água foi transferida para balão volumétrico de igual volume e, em seguida, foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico 1 M. Após a homogeneização, uma alíquota foi transferida para cubeta de quartzo e a leitura da absorbância (a 205nm) foi realizada em espectrofotômetro (Specord S 600, Analytik Jena, Germany), cujo limite de quantificação é de 0,05 mg/L e limite de detecção é de 0,01 mg/L com desvio padrão de 0,005. A verificação da curva de calibração foi válida, uma vez que os resultados dos padrões variaram $\pm 10\%$ do seu valor verdadeiro¹⁹.

RESULTADOS

Do total de Unidades de Educação Infantil

amostradas, somente 12% evidenciaram a ocorrência de coliformes totais em água, com cargas variando entre 4,2 NMP/100 mL e 165,2 NMP/100 mL (). Com relação à ocorrência de *E. coli*, somente 01 Unidade (escola X) evidenciou a presença do microrganismo em água, tendo sido detectado nos três pontos de coleta, em cargas entre 1 NMP/100 mL e 4,2 NMP/100 mL (), indicando contaminação fecal e, subsequente risco da ocorrência de doenças.

Referente à concentração de nitrato nas águas consumidas em escolas públicas de Educação

Infantil do município, todas as amostras coletadas em cada um dos três pontos amostrados apresentaram resultados em conformidade com Valor Máximo Permitido, na legislação vigente, < 10,0 mg NO₃⁻/L. As concentrações de nitrato variaram entre 0,02 a 4,02 mg NO₃⁻/L com os valores médios de 0,82 ± 0,75 mg NO₃⁻/L no ponto 1; 0,81 ± 0,71 mg NO₃⁻/L no ponto 2 e 0,83 ± 0,72 mg NO₃⁻/L no ponto 3 (). A Organização Mundial da Saúde estabelece nível de até 50 mg NO₃⁻/L (ou 11 mgN-NO₃⁻/L, se expresso como teor de nitrogênio-nitrato) para o teor de nitrato em águas destinadas ao consumo humano²⁰.

Tabela. Parâmetros microbiológicos e teor de nitrato verificados em amostras de água consumida em Unidades de Educação Infantil do município de Araçatuba, SP

Escola	Parâmetro Avaliado								
	P1 – Cavalete ou Poço			P2 – Cozinha			P3 – Bebedouro		
	Coliformes totais ^(I)	<i>E. coli</i> ^(II)	Nitrato ^(III)	Coliformes totais ^(I)	<i>E. coli</i> ^(II)	Nitrato ^(III)	Coliformes	<i>E. coli</i> ^(II)	Nitrato ^(III)
A	ausente	ausente	0,03	ausente	ausente	0,02	ausente	ausente	0,02
B	ausente	ausente	0,18	ausente	ausente	0,94	ausente	ausente	0,94
C	ausente	ausente	0,15	ausente	ausente	0,16	ausente	ausente	0,11
D	ausente	ausente	0,11	ausente	ausente	0,19	ausente	ausente	0,05
E	ausente	ausente	0,2	ausente	ausente	0,08	ausente	ausente	0,48
F	ausente	ausente	0,34	ausente	ausente	0,05	ausente	ausente	0,25
G	ausente	ausente	0,81	ausente	ausente	0,88	ausente	ausente	0,89
H	ausente	ausente	0,82	ausente	ausente	0,82	ausente	ausente	0,85
I	ausente	ausente	0,79	ausente	ausente	0,79	ausente	ausente	0,80
J	ausente	ausente	0,75	ausente	ausente	0,68	ausente	ausente	0,68
K	ausente	ausente	0,57	ausente	ausente	0,57	ausente	ausente	0,57
L	ausente	ausente	0,79	ausente	ausente	0,82	ausente	ausente	0,80
M	ausente	ausente	0,83	ausente	ausente	0,82	ausente	ausente	0,78
N	ausente	ausente	0,93	ausente	ausente	0,65	ausente	ausente	0,60
O	ausente	ausente	0,68	ausente	ausente	0,63	ausente	ausente	0,62
P	ausente	ausente	4,02	ausente	ausente	3,82	ausente	ausente	3,87
Q	ausente	ausente	0,71	ausente	ausente	0,69	ausente	ausente	0,69
R	ausente	ausente	0,87	ausente	ausente	0,79	ausente	ausente	0,78
S	ausente	ausente	0,93	12,4	ausente	1,05	ausente	ausente	0,94
T	ausente	ausente	0,96	ausente	ausente	0,95	ausente	ausente	0,95
U	Ausente	ausente	0,92	ausente	ausente	0,77	ausente	ausente	0,75
V	Ausente	ausente	0,93	ausente	ausente	0,92	ausente	ausente	0,93
X	88,5	1	1,49	165,2	4,2	1,44	13,7	4,2	1,54
W	4,2	ausente	0,86	ausente	ausente	0,87	ausente	ausente	0,98
Y	Ausente	ausente	0,83	ausente	ausente	0,83	ausente	ausente	0,78
	Média+DP		0,82+0,75			0,81+0,71			0,83+0,72

(I) NMP/100mL

(II) NMPE. coli/100 mL

(III) N-NO-3, em mg/mL

DISCUSSÃO

Os dados obtidos indicaram que 12% das escolas públicas de Educação Infantil avaliadas apresentaram-se em desacordo com as normas de potabilidade regulamentadas pela Portaria nº 2914/11 do Ministério da Saúde⁷, devido a ocorrência de coliformes totais e de *E. coli*. Salienta-se que a detecção de coliformes totais em água não necessariamente indica contaminação fecal ou ocorrência de enteropatógenos, devido à ampla variedade de gêneros no grupo²¹, sendo, portanto, imprescindível diferenciar a origem fecal da não-fecal²².

Resultados semelhantes foram observados em estudo que avaliou as condições higiênicas e sanitárias de 36 instituições de ensino do município de Teixeira de Freitas-BA, em 2010, em que a água de 25% das escolas avaliadas estavam em desacordo com as normas de potabilidade, por apresentarem coliformes totais e/ou termotolerantes²³. Outro estudo realizado em 31 escolas e creches municipais da cidade de São Carlos, SP, também constatou a presença de coliformes totais em sete amostras e a presença de *E. coli* em uma amostra de água²⁴. Em outros estudos^{25,26}, também foram observadas amostras coletadas em instituições de ensino que não atenderam ao padrão microbiológico exigido pela legislação brasileira, demonstrando a necessidade de providências por parte do poder público, com vistas a proteger a saúde das crianças.

Estudos demonstraram que a contaminação pode ocorrer no decorrer da captação de água no sistema público e não obstante, a ocorrência de contaminação está associada à má condição higiênica na tubulação e no reservatório e à ineficiência troca periódica de filtros na instituição de ensino^{3,23,27}. A falta de manutenção pode desencadear condições favoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência de patógenos microbianos, fato que requer capacitação de gestores para adoção de medidas de higiene no bebedouro, filtro e reservatório²⁸.

Ações que visam o saneamento da água, principalmente em sistemas alternativos na zona rural, proporcionam ganhos na saúde pública preventiva. Neste contexto, pode-se citar um

programa de saneamento da água de poços rasos realizado em todas as 50 escolas da zona rural do Município de Ibiúna (SP), em 2007, no qual foram colhidas amostras de água antes e após as intervenções, para análises microbiológicas e físico-químicas. Antes das intervenções, foi verificada a presença de coliformes totais em 90% das amostras analisadas, enquanto que a presença de *E. coli* em 82% delas; considerando os resultados obtidos, foram adotados os seguintes procedimentos: instalação de filtros dosadores de cloro e flúor no cavalete dos poços e nos reservatórios; limpeza/desinfecção de todos os reservatórios das unidades escolares e ainda, treinamento e capacitação de todas as diretoras das escolas em relação ao programa ora desenvolvido, sendo que após a referida intervenção, os resultados foram considerados satisfatórios, com a ausência de coliformes em todas as amostras de água²⁹.

Neste estudo, verificou-se que os três pontos de coleta da escola X apresentaram condições sanitárias precárias (), com evidências de contaminação por coliformes totais e *E. coli*., enquanto que outras duas escolas (S e W), com evidências de contaminação por coliformes totais. Os resultados preocupantes exigiram a intervenção e a Vigilância Sanitária municipal foi informada para tomada de providências adequadas à correção e de medidas de orientação quanto à importância da limpeza e higienização de reservatórios e filtros de água.

Embora todos os resultados referentes ao nitrato estejam de acordo com a legislação vigente⁷, os poços das duas escolas do perímetro rural, identificadas com P e X, apresentaram valores acima da média ($3,90 \pm 0,10$; $1,50 \pm 0,05$ mg N-NO₃⁻/L, respectivamente), obtidas nas demais unidades escolares, que sugere, necessidade e monitoramento da água desses poços, no que se refere ao teor deste íon, mesmo que a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB proponha valor de 5 mg N-NO₃⁻/L para iniciar ações preventivas²⁸.

Os resultados deste estudo, quanto à concentração de nitrato, foram semelhantes a outros desenvolvidos para analisar a qualidade da água em escolas públicas de Ribeirão Preto, SP³⁰ e na cidade de Macapá/AP²⁶. A ocorrência de nitrato é frequente em mananciais de zonas rurais e



Figura. Registro do poço particular da escola X situada em perímetro rural do município de Araçatuba, SP. Fonte: Arquivo pessoal, 2017

suburbanas, oriundo de quatro fontes: 1) aplicação de fertilizantes com nitrogênio inorgânico ou orgânico; 2) cultivo do solo; 3) esgoto humano depositado em sistemas sépticos e 4) deposição atmosférica. Particularmente em poços rurais, a principal fonte de nitrato decorre da lixiviação de solo cultivado para rio e fluxos de água³¹, constituindo em risco à saúde pública e animal³².

O excesso de nitrato em água potável é preocupante devido ao risco de cianometahemoglobinemia em recém-nato, conhecida como síndrome de bebê azul, enquanto que em adultos pode estar associada a câncer de estômago e de mama.

Considerando que crianças com idade inferior a três meses são mais sensíveis à presença de nitrato, seja pelo maior consumo de água em relação ao peso corporal, seja pelo fato do pH estomacal favorecer o crescimento de bactérias redutores de nitrato a nitrito³¹, estudos relacionados aos de níveis de nitrato presentes em água devem ser ampliados e periodicamente monitorados, principalmente em escolas de educação infantil abastecidas com água de poço e em perímetro rural, que ao ser constatado nível elevado de nitrato devem receber atenção especial por parte dos órgãos de vigilância em saúde³².

Os dados obtidos neste estudo sugerem haver uma correlação positiva entre o NMP de coliformes totais e o nível de nitrato (Spearman $R=0,36$, $p<0,0017$). Embora a literatura seja escassa quanto a correlação entre esses

parâmetros, sabe-se a intensa participação de bactérias em processos de nitrificação - oxidação de amônio, nitrito a nitrato - e desnitrificação de nitrato a gás nitrogênio; portanto, o aumento na carga de coliformes totais em água pode sugerir a participação de outros grupos bacterianos em processos de nitrificação/desnitrificação³¹.

CONCLUSÃO

Dentre todas as escolas participantes do estudo, 12% não atenderam ao padrão microbiológico de potabilidade da água, conforme estabelecido pela legislação vigente. A presença de coliformes totais e de *E. coli*, especialmente em escolas da zona rural, aponta a necessidade de medidas de saneamento da água em escolas públicas de Educação Infantil do município de Araçatuba, SP.

REFERÊNCIAS

1. Valentim LSO. O plano de segurança da água no contexto sanitário paulista. BEPA, Bol epidemiol paul (Online). 2015;12(141):35-40. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicao-2015/edicao_141_-_setembro.pdf
2. World Health Organization - WHO. Guidelines for drinking-water quality: second addendum. Vol. 1, Recommendations. 3. ed. Genebra: WHO; 2008. [acesso 2016 Fev.03]. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/secondaddendum20081119.pdf

3. Cardoso RCV, Almeida RCC, Guimarães AG, Goes JAW, Silva AS, Santana AAC et al. Qualidade da água utilizada em escolas atendidas pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), em Salvador-BA. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66(3): 287-91. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v66n3/v66n3a12.pdf>
4. Araújo TME, Dantas JM, Carvalho CEF, Costa MAO. Surto de diarreia por rotavírus no município de Bom Jesus (PI). *Ciênc Saúde Colet*. 2010;15(Supl. 1):1039-46. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232010000700010>
5. Mendes JDV. A redução da mortalidade infantil no Estado de São Paulo. BEPA, Bol epidemiol paul (Online). 2009;6(69):1-11. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/2009/bepa_69_-_setembro_2009.pdf
6. Boreli K, Brito NJN, Santos ECG, Silva GA. Avaliação de coliformes totais e termotolerantes em bebedouros de escolas públicas e ginásios de esportes em um município do norte de Mato Grosso. *Rev Bras Educ Saúde*. 2014;5(1):96-9. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBES/article/view/3180>
7. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 14 dez 2011. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html
8. Chagas SD, Iaria ST, Carvalho JPP. Bactérias indicadores de poluição fecal em águas de irrigação de hortas que abastecem o município de Natal – Estado do Rio Grande do Norte. *Rev Saude Publica*. 1981;15(6):629-42. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v15n6/06.pdf>
9. Freitas MB, Brilhante OM, Almeida LM. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. *Cad Saúde Publica* 2001;17(3):651-60. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2001000300019>
10. Zeman CL, Kross B, Vlad M. A nested case-control study of methemoglobinemia risk factors in children of Transylvania, Romania. *Environ Health Perspect*. 2002;110(8):817-22. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1240955/pdf/ehp0110-000817.pdf>
11. Sadek M, Moe CL, Attarassi B, Cherkaoui I, Elaouad R, Idrissi L. Drinking water nitrate and prevalence of methemoglobinemia among infants and children aged 1-7 years in Moroccan areas. *Int. J. Hyg. Environ Health*. 2008;211(5-6):546-54. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.09.009>
12. Alaburda J, Nishihara L. Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. *Rev Saúde Publica*. 1998;32(2):160-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101998000200009>
13. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de procedimentos de vigilância em saúde ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. 284p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_procedimentos_agua_consumo_humano.pdf
14. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. População estimada 2017 – Araçatuba, São Paulo, Brasil. [acesso 2017 Dez. 30]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/aracatuba/panorama>
15. Soluções Ambientais de Araçatuba - SAMAR. Água. Mananciais. [acesso 2016 Fev. 10]. Disponível em: <http://samar.eco.br/agua/mananciais>
16. Prefeitura Municipal de Araçatuba. Secretaria Municipal de Educação. Lista de Escolas. 2016. [acesso 2016 Fev. 10]. Disponível em: http://www.educacao.sp.gov.br/central-de-atendimento/Relat_Escola.asp?ID_DIR=018&ID_MUN=177&ID_DIST=&NM_MUN=ARACATUBA&NM_DIST=&CD_ADM=1&Nova=1
17. Centro de Vigilância Sanitária (São Paulo – Brasil). Manual de Coleta, Conservação e Transporte de Amostras de Água. 1 ed. São Paulo (SP): Centro de Vigilância Sanitária; 2004.
18. American Public Health Association – APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Washington (DC): Health Lab. Sci; 1998.

19. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos químicos e físicos para análise de alimentos; normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. São Paulo (SP); Instituto Adolfo Lutz; 2008. [acesso 2016 Nov. 22]. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/ediorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf
20. World Health Organization - WHO. Guidelines for Drinking Water Quality. 4 ed. Genebra: WHO; 2011. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/
21. Souza RMGL, Perrone MA. Padrões de Potabilidade da Água. Programa Estadual de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano – PRÓ-ÁGUA, vol. 2, São Paulo, 2000. 13p.
22. Zulpo DL, Peretti J, Ono LM, Garcia JL. Avaliação microbiológica da água consumida nos bebedouros da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, Brasil. *Semin Cienc Agrar*. 2006;27(1):107-10. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2006v27n1p107>
23. Rocha ES, Rosico FS, Silva FL, Luz TCSD, Fortuna JL. Análise microbiológica da água de cozinhas e/ou cantinas das instituições de ensino do município de Teixeira de Freitas (BA). *Rev Baiana Saúde Pública*. 2010;34(3):694-705. Disponível em: <https://doi.org/10.22278/2318-2660.2010.v34.N3>
24. Scuracchio PA, Farache-Filho A. Qualidade da água utilizada para consumo em escolas e creches no município de São Carlos/SP. *Alim Nutr*. 2011;22(4):641-7.
25. Antunes CA, Castro MCFM, Guarda VLM. Influência da qualidade da água destinada ao consumo humano no estado nutricional de crianças com idades entre 3 e 6 anos, no município de Ouro Preto/MG. *Alim Nutr*. 2004; 15(3):221-6.
26. Trindade GA, Sá-Oliveira JC, Silva ES. Avaliação da qualidade da água em três Escolas Públicas da Cidade de Macapá, Amapá. *Biota Amazônia*. 2015; 5(1): 116-22. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v5n1p116-122>
27. Souza CAB, Oliveira EL, Avelino MB, Rodrigues RCD, Rodrigues MP, Ferreira MAF et al. Qualidade da água consumida em unidades de educação infantil no município de Mossoró-RN. *Rev Ciênc Plur*. 2015;1(2):57-67. Disponível em: <https://periodicos.ufrn.br/rcp/article/view/7615>
28. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB. Qualidade das águas subterrâneas do Estado de São Paulo 2013-2015. Série Relatórios/CETESB. São Paulo (SP): CETESB; 2016. Disponível em: https://cetesb.sp.gov.br/aguas-subterraneas/wp-content/uploads/sites/13/2013/11/Cetesb_QualidadeAguasSubterraneas2015_Web_20-07.pdf
29. Soto FRM, FonsecaYS, Risseto MR, Maria LBA, Marchette DSC, Camargo C. Programa de saneamento da água de poços rasos de escolas públicas rurais do município de Ibiúna-SP. *Rev Ciênc Ext*. 2009; 3(2): 10-20. Disponível em: http://ojs.unesp.br/index.php/revista_proex/article/view/104/26
30. Castania J. Qualidade da água utilizada para consumo em escolas públicas municipais de o ensino infantil de Ribeirão Preto (SP) [tese de doutorado]. Ribeirão Preto (SP): Universidade de São Paulo; 2009.
31. Baird C, Cann M. Química Ambiental. 4 ed. Porto Alegre (RS): Bookman; 2011. 844p.
32. Campos TS, Rohlf DB. Avaliação dos valores de nitrato em águas subterrâneas e sua correlação com atividades antrópicas no município de Águas Lindas de Goiás [dissertação de mestrado]. Goiânia (GO): Pontifícia Universidade Católica de Goiás; 2011.



Identificação laboratorial da coqueluche na região do oeste do Estado de São Paulo

Laboratory identification of pertussis in the western region of São Paulo State, Brazil

RIALA6/1741

Carolina Yumi GUSHIKEN¹, Erika Kushikawa SAEKI^{1*}, Luciano Moura MARTINS², Juliana Cristina PEREIRA², Daniela LEITE²

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente, Av. Cel José S. Marcondes, 2357, Jd. Paulistano, Presidente Prudente, SP, Brasil, CEP: 19013-050. Tel: 18 3221 1449. E-mail: erikaksaeki@gmail.com

²Centro de Referência Nacional para Pertussis - Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 02.01.2018 - Aceito para publicação: 08.06.2018

RESUMO

O objetivo deste estudo foi de confirmar laboratorialmente os casos suspeitos de coqueluche na região oeste do Estado de São Paulo, ocorridos entre 2010 a 2015. A cultura foi realizada no Centro de Laboratório Regional - Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente e a PCR em tempo real (qPCR) foi realizada no Centro de Referência Nacional para Pertussis - Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, SP. Foram recebidas 189 amostras, sendo 29 (15,3%) confirmadas segundo os critérios laboratoriais (cultura e/ou qPCR). A faixa etária mais acometida foi em crianças menores de seis meses de idade (82,8%), não vacinados ou com o esquema de vacinação incompleto. Provavelmente, estes resultados representam apenas uma fração do número real de casos de coqueluche que ocorrem no Brasil. O contínuo monitoramento da doença e informações da prevalência por faixa etária são importantes ferramentas para melhorar as estratégias de imunização como forma de controlar esta doença reemergente.

Palavras-chave. *Bordetella pertussis*, diagnóstico laboratorial, PCR em tempo real, coqueluche.

ABSTRACT

The aim of this study was to confirm the suspected cases of pertussis in the Western region of the Sao Paulo State from 2010 to 2015. The samples were cultured in the Instituto Adolfo Lutz - Regional Laboratory of Presidente Prudente-SP, and the qPCR was performed at the National Reference Laboratory for Pertussis - Central Instituto Adolfo Lutz, São Paulo-SP. In this period, 189 samples were received, being 29 (15.3%) confirmed by the laboratory criteria (culture and/or qPCR). The most affected group was the children less than six months old (82.8%), not vaccinated or with the incomplete vaccination. Most likely, these results only represent a fraction of the actual number of pertussis cases occurring in Brazil. The continuous disease monitoring and the prevalence data by age group are fundamental to improve the immunization strategies as a way to control this important re-emerging disease.

Keywords. *Bordetella pertussis*, laboratory diagnosis, Real-time PCR, pertussis.

INTRODUÇÃO

A coqueluche é uma doença infecciosa causada pela *Bordetella pertussis*. A transmissão ocorre pelo contato direto com indivíduos sintomáticos, por meio de gotículas de secreção eliminadas por tosse, espirro ou durante a fala¹.

Esta doença acomete principalmente crianças menores de um ano, porém, nas últimas décadas, a faixa etária dos indivíduos afetados parece ter sido ampliada, aumentando a incidência em adolescentes e adultos^{2,3}, que são grupos potenciais de transmissão da doença em recém-nascidos e crianças. Desta forma, a identificação imediata dos pacientes com coqueluche torna-se essencial, pois a demora no diagnóstico pode resultar em início tardio do tratamento, aumentando a possibilidade de transmissão secundária da doença⁴.

O método de cultura para o isolamento de *B. pertussis* continua sendo o padrão ouro para o diagnóstico da coqueluche. Entretanto, embora o método seja altamente específico, a sua sensibilidade pode ser variável. A partir de 2010, a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi introduzida como metodologia complementar ao diagnóstico laboratorial da coqueluche para o Estado de São Paulo. Esta técnica é uma ferramenta importante para o diagnóstico rápido, e sua alta sensibilidade (70-90%) e especificidade (86-100%), fazem da técnica um método alternativo para o diagnóstico de *B. pertussis*^{5,6}.

Com a finalidade de facilitar a imunização, em 2002, foi criado um imunobiológico combinado para o esquema básico de imunização contra a coqueluche (três doses), a vacina tetravalente contendo Tríplice Bacteriana e *Haemophilus influenzae* b (DTP + Hib)⁷. Após 10 anos, este esquema básico foi substituído para três doses de pentavalente: difteria, tétano, pertussis, hepatite B e *Haemophilus influenzae* b (DTP + Hib + Hepatite B) aos 2, 4 e 6 meses de idade, com primeiro reforço aos 15 meses e o segundo com 4 anos de idade, conforme preconizado pela Portaria nº 1.498, de 19 de julho de 2013⁸.

O objetivo deste trabalho foi confirmar laboratorialmente pelas técnicas de cultura e qPCR os casos suspeitos de coqueluche na região oeste do Estado de São Paulo no período de 2010 e 2015.

MÉTODOS

Este estudo retrospectivo foi realizado através da análise dos resultados de pacientes com suspeita de coqueluche e notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), atendidos em 45 municípios pertencentes ao Departamento Regional de Saúde - DRS XI, localizados na região oeste do Estado de São Paulo, no período de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2015. Neste período foram coletadas amostras de nasofaringe de acordo com a definição de caso suspeito recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil^{9,10}.

Isolamento e identificação de *B. pertussis*

A coleta das amostras foi realizada com *swabs* ultrafinos, flexíveis, estéreis e alginatados e transportadas ao Centro de Laboratório Regional de Presidente Pudente (CLR IAL-PP-V) em ágar Regan Lowe (RL) semi-sólido (Oxoid), suplementado com 10% de sangue desfibrinado, estéril, de carneiro ou cavalo e cefalexina.

As amostras de secreção de nasofaringe foram semeadas no mesmo dia da coleta em placas de Petri contendo o meio RL sólido, suplementado com cefalexina e sangue desfibrinado, estéril, de carneiro ou cavalo. As placas foram incubadas em atmosfera úmida a 35-37 °C por até 10 dias.

As amostras que apresentaram crescimento a partir do terceiro ou quarto dia de incubação, com colônias sugestivas de pertencerem ao gênero *Bordetella* foram submetidas à coloração de Gram e a caracterização bioquímica e antigênica previamente descritas¹¹.

PCR em tempo real – qPCR

Após a semeadura os *swabs* foram transferidos para um tubo de ensaio estéril seco, e mantidos em freezer a -20 °C para posterior encaminhamento ao Instituto Adolfo Lutz – São Paulo (IAL) para realização da qPCR.

A extração do DNA foi realizada empregando-se o kit-I para isolamento e purificação de DNA genômico (Roche AppliedScience, Indianapolis, IN) no extrator automático da Roche MagNa Pure LC, seguindo as instruções sugeridas pelo fabricante.

O método de qPCR utilizado foi o proposto por Leite et al⁶. As reações de amplificação do material

genômico foram realizadas utilizando o Termociclador LightCycler®480 Software Release 1.5.0 sp3 - Roche® incluindo primers e probes específicos para a detecção do gene da toxina pertussis, *ptxS1* (GenBank n° AJ920066), e a sequência de inserção IS481 (GenBank acesso n° M22031).

Análise dos dados

Os dados dos resultados laboratoriais foram obtidos do Sistema Informatizado de Gestão (SIGH) do CLR IAL-PP-V na forma de relatórios anuais em planilhas do programa Microsoft Excel® 2007.

Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Conselho Técnico Científico do IAL (CTC-IAL 20-I/2016) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CAAE: 58193216.1.0000.0059).

RESULTADOS

No período do estudo foram analisadas 189 amostras de pacientes suspeitos de coqueluche de 45 municípios. Destes, 29 (15,3%) foram confirmados como *B. pertussis* segundo os critérios laboratoriais estabelecidos: a qPCR detectou 28 (14,8%) amostras, a cultura 13 (6,9%) e qPCR e cultura detectaram 29 (15,3%) amostras simultaneamente.

Conforme a

A faixa etária mais acometida por coqueluche foram crianças menores de seis meses de idade (82,8%; 24/29). Em crianças entre seis meses a um ano, um caso (3,4%; 1/29) e entre 2 a 15 anos foram confirmados quatro casos (13,8%; 4/29); não havendo nenhuma positividade em pacientes acima de 15 anos (

Quanto ao gênero dos indivíduos, o diagnóstico positivo de coqueluche foi maior para o sexo masculino (55,2%; 16/29) em relação ao sexo feminino (44,8%; 13/29) do total de casos positivos.

Tabela 1. Número de casos suspeitos por ano e total de amostras positivas para *B. pertussis* pela técnica de cultura e/ou qPCR no período de 2010 à 2015, região oeste do Estado de São Paulo

Ano	Suspeitos	Positividade	
		Cultura e/ou qPCR	%
2010	2	0	0
2011	6	3	50,0
2012	2	0	0
2013	55	6	11,0
2014	67	11	16,4
2015	57	9	15,8
TOTAL	189	29	15,3

qPCR: teste de reação em cadeia da polimerase em tempo real

Tabela 2. Distribuição etária e resultados da cultura e/ou qPCR em pacientes com suspeita de infecção por *B. pertussis*

Idade	Cultura e/ou qPCR		Total
	Negativo	Positivo	
≤ 6 meses	78	24	102
6 meses - 1 ano	15	1	16
2 à 15 anos	32	4	36
>15 anos	35	0	35
Total	160	29	189

qPCR: teste de reação em cadeia da polimerase em tempo real

DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado um aumento na investigação de casos suspeitos e notificação da coqueluche a partir do ano de 2013; sendo o ano de 2014 com mais casos suspeitos e positivos. Esta doença é considerada reemergente e apresenta surtos epidêmicos a cada três a cinco anos.

Segundo dados do Grupo de Vigilância Epidemiológica, no ano de 2011, houve um grande aumento no número de casos de coqueluche no Brasil. As hipóteses para a reemergência são: perda da imunidade adquirida após a vacina ou infecção natural, diminuição da eficácia da vacina; mudança genética bacteriana, melhoria no diagnóstico, como por exemplo, a implementação da qPCR; ou melhoria no sistema de Vigilância

Epidemiológica em capacitar os profissionais da saúde em identificar novos casos de coqueluche^{12,13}.

O aumento da sua prevalência tem sido relatado nos últimos anos em outros países^{15,16} e inclusive no Brasil^{12,16}.

Durante o período avaliado, houve 15,3% de positividade nas 189 amostras suspeitas para coqueluche. Estudos realizados entre 2001 a 2005 por Oliveira e Silva et al¹⁸ constataram que a região de Presidente Prudente não apresentou amostras positivas para *B. pertussis*.

Almeida et al¹⁷ e Oliveira e Silva et al¹⁸, reportaram uma positividade de 7,1% e 9,4%, respectivamente no estado de São Paulo, provavelmente devido a não realização da técnica de qPCR no período avaliado.

Estudo realizado por Torres et al¹⁹ no estado do Paraná entre 2007-2013, reportou 35,0% de positividade para *B. pertussis*. Guimarães et al¹² relataram que no Brasil, no período de 2007-2014, houve 32% de casos positivos de coqueluche.

O diagnóstico da coqueluche pela cultura em ágar carvão denominado Regan e Lowe (RL) é considerado um método altamente específico, porém com uma sensibilidade variável. A implementação da técnica de qPCR tem auxiliado na detecção da doença, podendo identificar o DNA da bactéria com maior rapidez, uma alta sensibilidade e especificidade (>95%)²⁰. Neste estudo, evidenciou-se uma maior positividade pela técnica de qPCR quando comparado com a cultura bacteriológica, uma vez que a técnica molecular identifica o DNA da cepa bacteriana, não precisando esta estar viável para sua detecção²¹.

Os resultados do presente estudo reforçam a importância do trabalho da Vigilância Epidemiológica Estadual e Municipal na capacitação e conscientização dos profissionais de saúde para realização do diagnóstico da coqueluche, pois esta doença tem como dificuldade a sua identificação clínica, tendo em vista que seu quadro clínico se assemelha a outras doenças respiratórias agudas virais ou bacterianas.

Observou-se que a faixa etária mais acometida foi entre os lactentes de até seis meses de idade (82,8%; 24/29). Estes dados corroboram com Almeida et al¹⁷ que obtiveram 81,5% na mesma faixa etária. Guimarães et al¹² e Bellettini et al²

encontraram dados inferiores, sendo respectivamente 71,7% e 51,5% de casos entre lactentes de até seis meses de idade. Nesta idade os bebês não estão com o calendário vacinal completo, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde, ficando mais suscetíveis à doença. Além disso, uma das principais fontes de infecção da coqueluche em lactentes (principalmente em bebês) é através da exposição de pessoas infectadas, sem serem diagnosticadas, na comunidade. Outro fator é o contato de pessoas próximas com a doença, principalmente a mãe, ou pessoas que residem na mesma casa ou mesmo profissionais da área da saúde^{16,22,23}.

Embora a coqueluche não tenha preferência por gênero, em nosso estudo obteve-se maior incidência no sexo masculino (55,2%; 16/29) dos casos. Santos et al²² também relatou maior positividade (54,8%;) para o sexo masculino.

Segundo o Ministério da Saúde, a cobertura vacinal considerada adequada é $\geq 95\%$ ²⁴. Constatou-se que no Sistema de Informação de Avaliação do Programa Nacional de Imunizações (SIAPI) a cobertura vacinal da tetravalente e pentavalente na região estudada, apresentaram-se acima de 95% entre 2010 e 2015. Inclusive, houve cobertura vacinal acima de 100%.

As hipóteses para esta cobertura acima de 100% podem estar relacionadas com o cálculo inexato da população de nascidos vivos (gestantes que tenham seus partos em municípios maiores e registrem um endereço de residência diferente do habitual), maior facilidade de acesso à sala de vacinação por habitantes de municípios vizinhos e mudança de população de um município para outro, visitantes ou turistas que se encontram nos respectivos municípios²⁵.

Portanto, nota-se que apesar da cobertura vacinal de tetravalente e pentavalente se apresentar acima da média estipulada entre 2010 e 2015, ainda houveram casos positivos de coqueluche na região do estudo.

As equipes de saúde têm papel fundamental no reconhecimento da coqueluche e sua notificação. Por isso, melhoria nos programas de vigilância e controle de doenças, aumento das práticas de conscientização e divulgação do agravo podem ser úteis para diminuir a incidência da doença em nosso país. A introdução da

qPCR para o diagnóstico a coqueluche foi um excelente método adicional na rotina laboratorial para a identificação de *B. pertussis*.

CONCLUSÃO

A maior positividade da doença pelo critério laboratorial foi detectada em crianças menores seis meses de idade, não vacinados ou com o esquema de vacinação incompleto. Provavelmente, esses resultados representam apenas uma fração do número real de casos de coqueluche que ocorrem no estado de São Paulo e no Brasil. O contínuo monitoramento da doença e informações da prevalência por faixa etária são importantes ferramentas para melhorar as estratégias de imunização como forma de controlar esta doença reemergente.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Aprimoramento Profissional na área da Saúde, Secretaria Estadual da Saúde (SES) – Instituto Adolfo Lutz.

Fonte de financiamento: Secretaria Estadual da Saúde (SES)

REFERÊNCIAS

1. Nobre JOC, Nunes EM, Yu ALF, Sousa MNA, Freitas TD, Medeiros RC et al. Pertussis: Incidence and Surveillance in Municipalities of 6 Regional Health Management of Paraíba, Brazil. *Int Arch Med*. 2016;9(384):1-8. <http://dx.doi.org/10.3823/2255>
2. Bellettini CV, Oliveira AW, Tusset C, Baethgen FL, Amantéa SL, Motta F et al. Preditores clínicos, laboratoriais e radiográficos para infecção por *Bordetella pertussis*. *Rev Paul Pediatr*. 2014;32(4):292-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpped.2014.06.001>
3. Fathima S, Ferrato C, Lee BE, Simmonds K, Yan L, Mukhi SN et al. *Bordetella pertussis* in sporadic and outbreak settings in Alberta, Canada, July 2004 – December 2012. *BMC Infect Dis*. 2014;14:48. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-14-48>
4. Tozzi AE, Ravà L, Ciofi Degli Atti ML, Salmaso S, Progetto Pertosse Working Group. Clinical presentation of pertussis in unvaccinated and vaccinated children in the first six years of life. *Pediatrics*. 2003;112(5):1069-75. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.112.5.1069>
5. Dalby T, Andersen PH, Hoffmann S. Epidemiology of pertussis in Denmark, 1995 to 2013. *Euro Surveill*. 2016;21(36):1-8. <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.36.30334>
6. Leite D, Blanco MR, Melo LCV, Fiorio CE, Martins LM, Vaz TMI et al. Implementation and assessment of the use of Real-Time PCR in routine diagnosis for *Bordetella pertussis* detection in Brazil. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2013;2(2):196-202. <http://dx.doi.org/10.5812/pedinfect.12505>
7. Centro de Vigilância Epidemiológica. Divisão de Imunização. Secretaria do Estado da Saúde. Informe Técnico. Vacina combinada contra DTP e Hib; 2002. [acesso 2018 Jan 02]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/imuni/tetra_valente.pdf
8. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 1.498, de 19 de julho de 2013. Redefine o Calendário Nacional de Vacinação, o Calendário Nacional de Vacinação dos Povos Indígenas e as Campanhas Nacionais de Vacinação, no âmbito do Programa Nacional de Imunizações (PNI), em todo o território nacional. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 22 jul 2013. Seção1(139):31. [acesso 2018 Jan 02]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt1498_19_07_2013.html
9. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. Informe Técnico para Implantação da Vacina Adsorvida Difteria, Tétano e Coqueluche (Pertussis Acelular) Tipo adulto – dTpa; 2014. [acesso 2018 Jan 02]. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/junho/26/Informe-Tecnico-dTpa-2014.pdf>
10. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Manual de vigilância epidemiológica coqueluche: normas e instruções. São Paulo; 2000. [acesso 2018 Jan 02]. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/resp/manu_coque.pdf

11. Gonçalves CR, Vaz TMI, Medeiros MIC, Castro MTE, Rocha MMM, Melles CEA, Irino, K. Phenotypical and genotypical characterization of *Bordetella pertussis* strains isolated in São Paulo, Brazil, 1988-2002. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2007;49(2):123-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652007000200012>
12. Guimarães LM, Carneiro ELNC, Carvalho-Costa FA. Increasing incidence of pertussis in Brazil: a retrospective study using surveillance data. *BMC Infect Dis*. 2015;15(442):1-12. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1222-3>
13. Porto MA, Santos CP, Gonçalves GG, Martinato LHM, Miranda PP, Celeste RK. Análise das desigualdades socioeconômicas na cobertura da vacina contra difteria, tétano e coqueluche (DTP)/tetravalente para menores de 1 ano de idade no Rio Grande do Sul, 2000-2009. *Epidemiol Serv Saúde*. 2013;22(4):579-86. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742013000400004>
14. Riolo MA, King AA, Rohani P. Can vaccine legacy explain the British pertussis resurgence? *Vaccine*. 2013;31(49):5903-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.09.020>
15. Matthias J, Pritchard PS, Martin SW, Dusek C, Cathey E, D'Alessio R et al. Sustained transmission of pertussis in vaccinated 1-5-year-old children in a preschool, Florida, USA. *Emerging Infectious Disease*. 2016;22(2):242-6. <http://doi.org/10.3201/eid2202.150325>
16. Berezin EN, de Moraes JC, Leite D, Carvalhanas TR, Yu AL, Blanco RM et al. Sources of Pertussis Infection in Young Babies From São Paulo State, Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(12):1289-91. <http://doi.org/10.1097/INF.0000000000000424>
17. Almeida IAZC, Marques DF, Alves EC, Silva PM, Leite D. Coqueluche: avaliação de 10 anos de diagnóstico laboratorial na região Noroeste do Estado de São Paulo 2001-2011. *BEPA, Bol epidemiol paul*. 2011; 90:16-23. Disponível em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-42722011000600003&lng=pt&nrm=iss&tlng=pt
18. Oliveira e Silva RB, Lemes-Marques EG, Medeiros MIC, Almeida IAZC, Esper MRNR, Garbelotti M et al. Diagnóstico laboratorial da coqueluche: frequência do isolamento de *Bordetella pertussis* de amostras clínicas, por meio da técnica de cultura realizada nos laboratórios regionais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66(2):194-200. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial66_2_completa/1128.pdf
19. Torres RSLA, Santos TZ, Torres RAA, Pereira VVG, Fávero LAF, M Filho OR et al. Resurgence of pertussis at the age of vaccination: clinical, epidemiological and molecular aspects. *J Pediatr*. 2015;91(4):333-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.09.004>
20. Qin X, Zerr DM, Kronman MP, Adler AL, Berry JE, Rich S et al. Comparison of molecular detection methods for pertussis in children during a state-wide outbreak. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15(28):1-7. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0142-4>
21. van der Zee A, Schelleken JE, Mooi FR. Laboratory Diagnosis of Pertussis. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(4):1005-26. <http://doi.org/10.1128/CMR.00031-15>
22. Santos BA, Bischoff AR, Chikota C, Silva CC, Lima NB, Agne M et al. Coqueluche em crianças menores de 3 anos de idade hospitalizadas em 2011 e 2012. *Clin Biomed Res*. 2015;35(4):227-32. <http://dx.doi.org/10.4322/2357-9730.60323>
23. Leite D, Martins LM, Fiório CE, Blanco RM, Moraes JC, Berezin EN et al. Laboratory Detection of *Bordetella pertussis*: Are the Household Contacts a Major Sources of Infection for Infants? *SM Vaccine Vaccin*. 2015;1(3):1012.
24. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações: aspectos históricos dos calendários de vacinação e avanços dos indicadores de coberturas vacinais de 1980 a 2013. *Boletim Epidemiológico*. 2015; 46(30):1-13. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/outubro/14/besvs-pni-v46-n30.pdf>
25. Nora TTD, Paz AA, Linch GFC, Pelegrini AHW, Wachter MZD. Situação da cobertura vacinal de imunobiológicos no período de 2009-2014. *Rev Enferm UFSM*. 2016;6(4):482-93. <http://dx.doi.org/10.5902/2179769221605>



A evolução da regulamentação técnica na qualidade das bolsas plásticas utilizadas na coleta de sangue no Brasil

The evolution of technical regulation for the quality of plastic bags used in the blood collection in Brazil

RIALA6/1743

Renata de Freitas Dalavia VALE^{1*}, Lilian de Figueiredo VENANCIO¹, Anna Maria Barreto Silva FUST¹, Michele FEITOZA-SILVA¹

*Endereço para correspondência: ¹Setor de Hemoderivados e Artigos de Saúde, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21040-900. Tel: 21 3685 5219. E-mail: renata.dalavia@incqs.fiocruz.br

Recebido: 01.11.2017 - Aceito para publicação: 28.12.2018

RESUMO

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde é uma unidade de referência no controle da qualidade em bolsas de sangue. A legislação vigente que descreve este controle é a RDC n° 35/2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde, que substituiu a Portaria SVS/MS n° 950/1998 (Secretaria de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde). Os objetivos deste estudo foram avaliar os avanços técnico-científicos no controle da qualidade e propor novas metodologias. Primeiramente, foram comparadas as metodologias e as técnicas recomendadas, para, em seguida, apresentar novos estudos. Na comparação, foram observados os avanços referentes à preocupação da manutenção das colunas cromatográficas e reprodutibilidade de resultados. As metodologias foram desenvolvidas, otimizadas e validadas buscando-se eficiência e robustez. Das onze metodologias, cinco foram alteradas e discutidas neste estudo. Para nova atualização da legislação, estão em tramitação o desenvolvimento de uma metodologia para determinação de teor de citrato e fosfato, avanços em estudos do pH, além de duas metodologias propostas para determinação do principal contaminante. Este estudo apresentou a evolução nos parâmetros da qualidade e evidenciou a importância do Instituto como ente do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e na atualização das questões regulatórias.

Palavras-chave. legislação, controle de qualidade, bolsas de plástico para coleta de sangue.

ABSTRACT

The National Institute of Health Quality Control is a reference unit for the quality control of blood-collecting bags. The current legislation that describes this control is RDC No 35/2014 of National Health Surveillance Agency/Ministry of Health, which replaced the Order SVS/MS N° 950/1998 (Secretariat of Health Surveillance/Ministry of Health). The objectives of this study were to evaluate the technical-scientific advances in the quality control and to propose the new methodologies. Firstly, the recommended methodologies and techniques were compared; then the new studies were presented. In the comparison study, the progresses were observed regarding the maintenance of the chromatographic columns and the reproducibility of results. The methodologies were developed, optimized and validated looking for the efficiency and robustness. Of eleven methodologies, five were changed and they were discussed in this study. For the further legislation updating, the development of a methodology for determining citrate and phosphate contents, the advances in pH studies, and besides the two proposed methodologies for detecting the main contaminant are underway. This study presented the evolution in the quality parameters and evidenced the importance of Institute as part of the National Sanitary Surveillance System and in the regulatory issues updating.

Keywords. legislation, quality control, plastic bags for blood collection.

INTRODUÇÃO

As bolsas plásticas para coleta de sangue são classificadas como produtos médicos, inseridas no grupo de produtos identificados como produtos para saúde que correspondem aos produtos que não se enquadram nas definições de insumo farmacêutico, medicamento ou droga. Devido sua complexidade são consideradas como produtos de risco III, segundo a Resolução RDC nº 185/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde (ANVISA/MS) e são em grande parte importadas, havendo pequena participação, ainda em fase crescente, da indústria nacional¹.

Este produto consiste em bolsas plásticas completas com tubo de coleta, tubos de saída e agulha para coleta, armazenamento, processamento, transporte, separação e administração de sangue e seus componentes^{2,3}. Apresentam estabilidade biológica, química e física em relação ao seu conteúdo durante o período de validade, não permitindo a entrada de micro-organismos nem a liberação de qualquer substância acima dos limites especificados para a solução anticoagulante e/ou preservadora, sangue ou componentes².

As soluções anticoagulantes (conservadoras) e preservadoras do sangue são destinadas a assegurar a integridade funcional e proteica dos constituintes celulares e plasmáticos do sangue⁴, sendo que existem seis tipos de soluções: a solução ACD é constituída de glicose, ácido cítrico anidro e citrato de sódio diidratado, em duas concentrações distintas (tipo A e tipo B); quando acrescida de fosfato e sódio, é identificada como solução CPD; esta, quando acrescida de adenina é identificada como sendo do tipo CDPA e a solução preservadora SAG-M, que é composta por glicose, adenina, manitol e sódio, em duas variações de concentrações (tipo 1 e tipo 2)².

A composição da solução interfere diretamente no tempo de armazenamento do sangue, que pode variar de 21 a 42 dias, seja por estabilizar a membrana celular e manter o pH controlado como fazem o citrato, o fosfato e o manitol, ou ainda por atuar no controle da coagulação ou, como a glicose, por fornecer energia e contribuir para a manutenção dos

níveis de ATP⁵. Mas a viabilidade do sangue estocado apresenta-se também dependente da técnica da coleta, do tipo de anticoagulante, da temperatura de conservação, dos parâmetros bioquímicos e da frequência de homogeneização durante o armazenamento⁵.

Este assunto torna-se ainda mais importante por envolver, também, aspectos éticos da doação de sangue, um ato voluntário conforme disposto pela Constituição da República, e por estar relacionado com a sensibilização do público sobre esta necessidade⁶.

Neste cenário, o Sistema de Vigilância Sanitária, através de sua instituição reguladora, a ANVISA⁷, surge para assegurar aos cidadãos a disponibilidade de insumos e produtos de saúde que cumpram requisitos de garantia de qualidade⁶. O monitoramento da qualidade desses produtos é de responsabilidade dos Laboratórios Oficiais, como o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e os Laboratórios Centrais de Saúde Pública dos Estados (LACEN) que integram, portanto, a estrutura da Vigilância Sanitária⁸, sendo responsáveis por análises de âmbito fiscal e análises prévias segundo legislação específica⁹ ou, como no caso exclusivo do INCQS, por realizar análises com a finalidade de registro ou revalidação de registro².

A grande demanda por bolsas de sangue coletadas por ano¹⁰ demonstra a importância do estudo acerca dos parâmetros de qualidade para o controle deste tipo de produto, com a finalidade de garantir segurança, eficácia e credibilidade¹¹; os parâmetros de qualidade definidos para bolsas de sangue estão descritos na Resolução RDC nº 35/2014 da ANVISA/MS, relacionada com os principais compêndios oficiais e normas técnicas internacionais².

Esta legislação preconiza avaliação inicial de aspectos gerais, considerando parâmetros de transparência, flexibilidade, resistência, compatibilidade com o conteúdo sob condições normais de estocagem, dimensão, embalagem e rotulagem, além da verificação de tubos de coleta, agulha para coleta e tubos de saída².

A avaliação dos aspectos específicos é recomendada por meio de ensaios

físicos, biológicos e físico-químicos, sendo que estes incluem doseamento dos componentes da solução anticoagulante e/ou preservadora e controle de pH².

Considerando que a metodologia utilizada deve permitir obter resultados analíticos confiáveis, de modo a evitar possíveis decisões desastrosas e desperdícios indesejáveis¹², a validação analítica surge como uma ferramenta importante ao Laboratório de Referência, que baseando-se em estudos desenvolvidos, pode apontar a necessidade de atualização da legislação específica, como ocorrido na substituição da Portaria SVS/MS nº 950/1998 pela Resolução RDC nº 35/2014 da ANVISA/MS^{2,13}, para a qual foram otimizadas, desenvolvidas e validadas novas metodologias, mais eficientes, robustas e de menor custo.

Este estudo demonstra os avanços técnico-científicos no controle da qualidade de bolsas de sangue, comparando-se as metodologias analíticas descritas nos dois regulamentos para avaliar soluções anticoagulantes e/ou de preservação, além de avaliar a utilização de novos métodos em uma possível revisão da Resolução RDC nº 35/2014, da ANVISA.

MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas fases. Na etapa inicial, foram comparadas metodologias e técnicas preconizadas no regulamento técnico vigente e na Portaria SVS/MS nº 950/1998, para o controle físico-químico das soluções anticoagulantes e/ou preservadoras^{2,13}. Foram destacadas técnicas, equipamentos e condições analíticas envolvidas e, correlacionadas também com referências oficiais. Em segunda fase do estudo, foram avaliadas outras metodologias para a avaliação, que pudessem ser aplicadas de modo a oferecer vantagens ao setor regulado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira fase do estudo demonstrou a ocorrência de divergências entre as metodologias recomendadas, incluindo técnica, equipamento e condições analíticas entre os regulamentos

técnicos, para a avaliação físico-química da solução anticoagulante e/ou preservadora utilizada. Entre as diferentes metodologias e técnicas recomendadas (**Tabela**), foi possível observar que a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a principal indicação, justificada pelo destaque crescente das técnicas de separação para análises quantitativas².

Para a determinação de fosfato diácido de sódio, a Portaria SVS/MS nº 950/98 preconiza a metodologia descrita na Farmacopeia Americana, que utilizava a espectrofotometria até sua 29ª edição e, nas edições seguintes passou a recomendar a CLAE para esta determinação, utilizando como padrão fosfato diácido de sódio, fase móvel solução de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio sob o fluxo de 2,0 mL por minuto, temperatura do forno em 30 °C, coluna de troca iônica e detector eletroquímico. Este método também é indicado para determinação do teor de citrato total¹³⁻¹⁵.

A técnica de espectrofotometria é recomendada tanto pela Farmacopéia Americana como pela Farmacopeia Europeia 9ª edição, sendo que ambos os compêndios recomendam a utilização do padrão de fosfato de potássio monobásico. Entretanto, a Farmacopeia Europeia recomenda reação com molibdato de vanádio para formação de complexo e leitura em 450 nm, enquanto que a Farmacopeia Americana 41ª edição recomenda reação com ácido sulfúrico, ácido 1,2,4-aminonaftolsulfônico, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e molibdato de amônio para formação de complexo com leitura em 660nm¹⁴⁻¹⁶.

O regulamento técnico vigente concilia as possibilidades destacadas acima e permite que seja utilizada a metodologia por espectrofotometria como primeira opção e o método cromatográfico como segunda, ambos da Farmacopeia Americana². Apesar do interesse crescente por métodos cromatográficos como o CLAE para quantificação, a técnica de espectrofotometria de UV-Vis mantém-se muito utilizada, sendo indicada como primeira opção nesta determinação, por conferir praticidade, confiabilidade e baixo custo para a rotina laboratorial¹⁷, além de apresentar eficiência

comprovada em diversos estudos, como no caso da validação e estimativa da incerteza do método de determinação de fosfato por espectrofotometria¹⁸.

O regulamento de 1998 indicava a determinação de dextrose (glicose e frutose monoidratadas) tanto por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como por gravimetria. O processo por CLAE, que permite a quantificação concomitante de glicose, frutose e manitol, utilizava como fase móvel água ultrapurificada sob o fluxo de 0,5 mL por minuto, temperatura do forno entre 80 e 90 °C, coluna de troca catiônica e detector de índice de refração; na gravimetria, a reação com tartarato cúprico alcalino seguida de secagem para determinação apenas de resíduo equivalente à glicose monoidratada¹³⁻¹⁵. A atualização do regulamento não alterou significativamente a metodologia pela técnica de CLAE; a otimização da metodologia definiu que a melhor condição analítica é obtida com a fixação da temperatura do forno em 80 °C¹⁹. Por outro lado, a gravimetria foi excluída como opção, sendo substituída pela técnica de volumetria, descrita pela Farmacopeia Europeia, que utiliza tiosulfato de sódio e amido como indicador para a titulação de uma solução ácida resultante de extração^{2,16}.

De acordo com o novo regulamento, a determinação pode ser realizada por métodos instrumentais (cromatografia) ou métodos clássicos (volumetria)². Observa-se uma maior inclinação para o uso da técnica de CLAE, com detecção por índice de refração para quantificação de carboidratos, por apresentar vantagens como maior sensibilidade e menor tempo de análise²⁰. Entretanto, o método clássico, também recomendado, é considerado preciso e muito eficiente no doseamento ressaltando a importância da volumetria de neutralização em meio aquoso²¹.

A determinação de manitol, concomitante com a glicose e frutose pela técnica de CLAE, está presente em ambos os regulamentos^{2,13}. Uma característica especial em relação a esta substância é a ausência de referências oficiais quando relacionado com soluções preservadoras, sendo encontrada citação apenas

em monografia específica da Farmacopeia Americana sob condições de determinação bastante semelhantes²².

Para a substância adenina, a Portaria SVS/MS nº 950/98 propunha a utilização de dois métodos por CLAE: a) o método descrito na Farmacopeia Americana, que utilizava como fase móvel solução de ácido acético e dihidrogenofosfato de amônio sob o fluxo de 2,0 mL por minuto, coluna de aço inoxidável com empacotamento L9 e detector ultravioleta no comprimento de 254 nm¹⁵ e b) um método alternativo, também recomendado para a determinação do teor de citrato total e que utilizava como fase móvel solução de ácido fosfórico, dodecilbenzenossulfonato e metanol sob o fluxo de 0,8 mL por minuto, coluna de fase reversa e detector ultravioleta no comprimento de onda de 235 nm¹³.

O regulamento de 2014, continuou recomendando as duas metodologias por CLAE, alterando fase móvel (heptano sulfonato de sódio, acetato de amônio, ácido acético e acetonitrila) e seu fluxo (0,6 mL/minuto), o tamanho da coluna (250* 4,6 mm), o comprimento de onda (262 nm) e a utilização de forno (40 °C)². Um dos grandes destaques do novo regulamento refere-se à modificação nas determinações independentes de citrato de sódio e ácido cítrico, pelo regulamento de 1998 alterada no regulamento de 2014. Este trouxe uma nova proposta da exclusão do ensaio de ácido cítrico e determinação do teor de citrato total expresso em termos de ácido cítrico^{2,13}.

A Portaria SVS/MS nº 950/98 recomendava a determinação de citrato de sódio por espectrofotometria conforme recomendado pela Farmacopeia Americana ou por CLAE. A metodologia por CLAE permitia determinar simultaneamente citrato e adenina, entretanto, para determinar o teor de citrato de sódio era necessário utilizar a volumetria, conforme descrita na Farmacopeia Americana, para obter a quantidade de ácido cítrico livre presente¹³. A espectrofotometria recomendada pela Farmacopeia Americana consistia em reação com piridina, anidrido acético para formação de complexo que absorve em 425 nm; este ensaio

permite obter o teor de citrato total, de ácido cítrico e de citrato de sódio^{14,23}.

O novo regulamento permite o uso de três opções: a técnica de espectrofotometria recomendada pela Farmacopeia Europeia, a técnica de CLAE com a determinação simultânea de fosfato de sódio, descrita pela Farmacopeia Americana e por nova metodologia para determinação de citrato total, que apresenta fase móvel ácida preparada com ácido sulfúrico, detecção por ultravioleta a 230 nm, com temperatura de forno em 40 °C em coluna de troca catiônica, cujo resultado é representado como citrato total expresso em termos de ácido cítrico².

Em relação ao 5-hidroximetilfurfural, contaminante derivado da decomposição térmica da glicose, duas metodologias estavam recomendadas: a espectrofotometria, conforme a Farmacopeia Europeia, que baseia-se em reação com p-toluidina, ácido acético e ácido barbitúrico para produzir um complexo que absorve em 550 nm (porém, a formação de interferentes é apontada por alguns autores como desvantagem) e a metodologia por CLAE²⁴, que utiliza como fase móvel solução de metanol sob o fluxo de 0,8 mL por minuto, coluna de fase reversa e detector ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm¹³. No regulamento de 2014, as técnicas continuaram a ser recomendadas, entretanto, para metodologia por CLAE, foi fixada a temperatura do forno em 40°C pelo processo de otimização e comprovada a eficiência na etapa de validação analítica²⁴. Uma revisão bibliográfica sobre esta metodologia indicou bons resultados analíticos por metodologias semelhantes em uma larga faixa de variação de concentração^{20,25,26}.

As faixas de concentração das substâncias permaneceram inalteradas nos regulamentos. Fato não observado para o controle de pH, em que no antigo regulamento apresentava uma faixa única para todas as soluções e no regulamento vigente, segundo estudos e sugestão dos principais fabricantes e detentores

de registro do Brasil, foram definidas duas faixas de controle de pH conforme o tipo de solução^{2,13}.

Novas pesquisas e novos estudos sugeridos pelos fabricantes e detentores desencadearam linhas de pesquisa para atualização do regulamento técnico. Em relação ao controle físico-químico das substâncias fosfato, citrato e ácido cítrico (determinação de teor de fosfato diácido de sódio e determinação de teor de citrato total), vem sendo estudada metodologia que permitirá a determinação concomitante de citrato e fosfato por CLAE com detecção iônica; além disso, novos estudos buscam avaliar as faixas de pH estabelecidas, principalmente no caso das soluções preservadoras (SAG-M), ausentes nos compêndios oficiais que contemplam apenas soluções anticoagulantes (ACD, CPD e CPDA)^{14,16,23}. E, para o contaminante hidroximetilfurfural, como sugestão dos detentores de registros, foram desenvolvidos projetos para duas metodologias analíticas²⁴. Todos os projetos em andamento e linhas de pesquisa traçadas obedecem à necessidade de comprovar a qualidade das análises químicas obedecendo, também, às normas internacionais, nacionais e sistema da qualidade²⁷.

A proposta de submissão de novas metodologias e parâmetros de especificação é atribuição do laboratório de referência conforme o regulamento vigente que o responsabiliza pela avaliação da qualidade do produto necessário à obtenção do registro².

CONCLUSÃO

Os avanços técnico-científicos para o controle da qualidade das substâncias presentes na solução anticoagulante e/ou preservadora destacaram a complexidade e a importância do controle físico-químico. Para as seis substâncias dosadas, o regulamento antigo indicava 11 metodologias, das quais seis eram provenientes de compêndios oficiais, enquanto que o novo regulamento recomenda 12 metodologias analíticas, das quais sete são provenientes de compêndios oficiais.

Tabela. Técnicas analíticas recomendadas pelos regulamentos técnicos específicos

Substância	Regulamento antigo Portaria SVS/ MS nº 950 de 26/11/1998	Regulamento vigente RDC nº 35 de 12/06/2014 ANVISA/MS
Fosfato diácido de sódio	Farmacopeia Americana (Cromatografia líquida/ Espectrofotometria)	Farmacopeia Americana (Cromatografia líquida)
		Farmacopeia Americana (Espectrofotometria)
Dextrose (glicose)	Cromatografia líquida	Cromatografia líquida (Método validado)
	Farmacopeia Americana (Gravimetria)	Farmacopeia Europeia (Volumetria)
Manitol	Cromatografia líquida	Cromatografia líquida (Método validado)
Adenina	Farmacopeia Americana (Cromatografia líquida)	Farmacopeia Americana (Cromatografia líquida)
	Cromatografia líquida	Cromatografia líquida (Método validado)
Citrato de sódio		Farmacopeia Americana (cromatografia líquida)
	Farmacopeia Americana (Espectrofotometria)	Cromatografia líquida (Método validado)
	Cromatografia líquida	Farmacopeia Europeia (Espectrofotometria)
Ácido cítrico	Farmacopeia Americana	----
Hidroximetilfurfural	Farmacopeia Europeia (Espectrofotometria)	Farmacopeia Europeia (Espectrofotometria)
	Cromatografia líquida	Cromatografia líquida (Método validado)

Adaptado de: Farmacopeias; BRASIL,1988; BRASIL, 2014

As referências oficiais consistiram na Farmacopeia Americana e Farmacopeia Europeia, enquanto que os métodos apresentados no novo regulamento correspondem a métodos otimizados, desenvolvidos e validados no laboratório de referência.

Entre as substâncias dosadas e controladas, o fosfato foi a única substância que não apresentou um estudo dirigido de desenvolvimento, otimização e validação analítica no regulamento de 2014. E por esta razão, para uma nova proposta de atualização estão sendo finalizados estudos referentes a uma nova técnica que permite a determinação concomitante de citrato e fosfato. Além disso, estão sendo desenvolvidos estudos sobre faixas de especificação de pH e projetos referente a duas metodologias para determinação de hidroximetilfurfural, como sugestão do setor regulado.

Em nosso sistema de saúde, as doações de sangue são altruístas segundo a legislação brasileira. Neste contexto, uma mesma doação, a bolsa de sangue, na maioria das vezes, pode servir para muitas pessoas que necessitam, pois, no próprio banco de sangue, ocorre a separação dos hemocomponentes do próprio sangue. Em função disso, este produto precisa estar dentro dos critérios de qualidade estabelecidos para reduzir o desperdício destes componentes tão importantes, principalmente diante do risco intrínseco de seu uso.

Analisar, demonstrar, discutir e propor um novo regulamento com bases em evidências científicas possibilita a aproximação das ações regulatórias à construção do conhecimento específico de um insumo crítico na saúde da população.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz ao suporte financeiro para realização deste estudo. À equipe do Setor de Hemoderivados e Artigos de Saúde pela parceria na execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 185, de 22 de outubro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 24 out 2001. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_185_2001_COMP.pdf/137bc575-8352-4f9a-9afb-e9a5dd1b8eb3
2. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 35, de 12 de junho de 2014. Dispõe sobre bolsas plásticas para coleta, armazenamento e transferência de sangue humano e seus componentes. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 16 jun 2014. Disponível em: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0035_12_06_2014.pdf
3. Fernandes FS, Vale RFD, Fust AMBS, Freitas MNM, Guimarães RSE, Teixeira MT et al. Validação da metodologia para a determinação de citrato total em soluções anticoagulantes de bolsas de sangue por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Virtual Quím*. 2016;8(5):1476-84. <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20160104>
4. Brasil. Farmacopeia Brasileira. 4. ed. Brasília (DF): Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010.
5. Costa Júnior JD. Avaliação do sangue total de cães armazenado em bolsas plásticas contendo CPDA-1 e CDP/SAG-M [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2006. Disponível em: <http://locus.ufv.br/handle/123456789/5078>
6. Assembleia Nacional Constituinte (BR). Constituição da República Federativa do Brasil. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 05 out 1988. Seção 1(191):1-32.
7. Congresso Nacional (BR). Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 27 jan 1999.

8. Costa EA. *Vigilância Sanitária: proteção e defesa da saúde*. 2.ed. São Paulo (SP): Sobravime; 2004.
9. Congresso Nacional (BR). Lei n.º 6.437, de 20 de agosto de 1977. Configura as infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 24 ago 1977. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/Lei_6437_1977.pdf/bf885456-36fc-4295-b809-934a4f7be492
10. Salle NA, Sabino EC, Barreto CC, Barreto AME, Otani MM, Chamone DF. Descarte de bolsas de sangue e prevalência de doenças infecciosas em doadores de sangue da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. *Rev Panam Salud Publica*. 2003;13(2/3):111-6.
11. Rocha TG, Galende SB. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. *Uningá Rev*. 2014;20 (2):97-103. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1593>
12. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím Nova*, São Paulo. 2004;27(5):771-80. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
13. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 950, de 26 de novembro de 1998. Aprova Regulamento Técnico sobre Bolsas Plásticas para a coleta e acondicionamento de sangue humano e seus componentes. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 30 nov 1998.
14. United States Pharmacopeia (Rockville - United States). *Anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose Solution*. 41. ed. Rockville (US): United States Pharmacopeial Convention; 2018.
15. United States Pharmacopeia (Rockville - United States). *Anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose Adenine Solution*. 41. ed. Rockville (US): United States Pharmacopeial Convention; 2018.
16. European Pharmacopoeia (Strasbourg - Council of Europe). *Anticoagulant and preservative solutions for human blood*. 9. ed. Strasbourg (FR): Council of Europe (EDQM); 2018.
17. Soares MFLR, Sobrinho JLS, Grangeiro Júnior S, Silva KER, Rolim Neto PJ. Métodos de determinação do ornidazol em comprimidos revestidos: desenvolvimento, validação e comparação estatística. *Lat Am J Pharm*. 2008;27(5): 688-94.
18. Leal AAX, Henriques CA, Luna AS. Validação e estimativa da incerteza do método de determinação de fósforo por espectrometria UV-VIS. *Rev Analytica*. 2007;(32):28-34.
19. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR ISO/IEC 17025(2005): Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro; 2005.
20. Aquino FWB, Amorim AGN, Prata LF, Nascimento RF. Determinação de aditivos, aldeídos furânicos, açúcares e cafeína em bebidas por cromatografia líquida de alta eficiência: validação de metodologias. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004;24(1):32-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612004000100007>
21. Vieira CA, Alves RS, Barbieri RS. Doseamento de fármacos pela técnica de volumetria de neutralização em meio não aquoso. 48º Congresso Brasileiro de Química; outubro de 2008; Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2008/trabalhos/4/4-289-113.htm>
22. United States Pharmacopeia (Rockville - United States). *Manitol*. 41. ed. Rockville (US): United States Pharmacopeial Convention; 2018.
23. United States Pharmacopeia (Rockville - United States). *Anticoagulant Citrate Dextrose Solution*. 41. ed. Rockville (US): United States Pharmacopeial Convention; 2018.
24. Freitas MNM, Vale RFD, Fust AMBF, Fernandes FS, Feitoza-Silva M, Leandro KC. Otimização e validação da metodologia para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em soluções anticoagulantes e preservadoras de bolsas de sangue por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Virtual Quím*. 2016;8(3):665-77. <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20160050>

25. De Andrade MVAS, Araújo ACB, Costa JO, Souza VSL. Análise de hidroximetilfurfural em soros anticoagulantes. 46º Congresso Brasileiro de Química; setembro de 2006; Salvador. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2006/trabalhos2006/4/815-993-4-T1.htm>
26. Santos AF, Ribeiro CA, Polese L, Ernandes JR, Kesserlingh SM, Nonato RV. Determinação de parâmetros de validação de métodos cromatográficos para análise de 5-hidroximetilfurfural e açúcares em amostras de processo de produção de polímero biodegradável. *Eclét Quím*. 2006;31(1):13-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702006000100002>
27. La Roca MF, Sobrinho JLS, Nunes LCC, Rolim Neto PJ. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. *Rev Bras Farm*. 2007; 88 (4):177-80.



Qualificação do transporte de amostras para o monitoramento da qualidade de água tratada para uso em diálise

Qualification of the sample transport for monitoring the quality of water for dialysis purpose

RIALA6/1744

Adriana BUGNO¹, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR², Fernando Pontes de Lima e SILVA², Ellen Gameiro HILINSKI², Márcia Liane BUZZO^{3*}

*Endereço para correspondência: ³Núcleo de Contaminantes Inorgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-902. Tel: 11 3068 2923. E-mail: marcia.buzzo@ial.sp.gov.br

²Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz

¹Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 15.05.2018 - Aceito para publicação: 08.08.2018.

RESUMO

As condições de coleta e o transporte das amostras de água tratada para uso em diálise são etapas críticas para garantir a qualidade dos resultados analíticos. A temperatura no transporte de amostras deve assegurar a manutenção das características físicas e biológicas desde a coleta até o recebimento pelo laboratório analítico. O objetivo deste estudo foi de qualificar o transporte de amostras de água tratada para diálise desde os Serviços de Diálise do estado de São Paulo até o Instituto Adolfo Lutz, realizado durante a execução do Programa Estadual de Monitoramento. Os resultados obtidos indicaram que o sistema adotado, utilizando-se caixas isotérmicas e gelo reutilizável, é capaz de garantir as condições adequadas de temperatura durante o transporte do ponto de coleta das amostras até o laboratório analítico.

Palavras-chave. água, programa de monitoramento, qualificação, transporte de amostras, diálise, temperatura.

ABSTRACT

The conditions for collecting and transporting the dialysis water samples are the critical steps to assure the quality of the analytical results. The temperature during the water samples transport should ensure the maintenance of the physical and biological characteristics of samples from their collections to the analytical laboratory. The objective of this study was to qualify the transport of the dialysis water samples from the Dialysis Services of the state of São Paulo to the Adolfo Lutz Institute, during the performance of the State Monitoring Program. By using the isothermal boxes and the reusable ices, the obtained results indicated that the adopted system were able to guarantee the adequate temperature conditions during the transport from the sample collection point to the analytical laboratory.

Keywords. water, monitoring program, qualification, samples transportation, dialysis, temperature.

INTRODUÇÃO

Programas de monitoramento da qualidade da água são ferramentas importantes nas tomadas de decisões e ações governamentais para prevenção e promoção da saúde¹⁻⁴, ao evidenciar potenciais riscos em função da presença de contaminantes químicos e biológicos, bem como de seu uso ineficiente⁵.

Dentre os programas de monitoramento de águas efetuados no país⁶⁻⁸, o Programa de Monitoramento da Água Tratada para Diálise executado no estado de São Paulo, destaca-se devido à sua relevância na avaliação sistemática dos padrões de qualidade da água tratada em todos os Serviços de Diálise em atendimento à legislação vigente⁹, visando à orientação nas tomadas de ações pela Vigilância Sanitária, principalmente na preservação da segurança dos pacientes submetidos a tratamentos dialíticos⁶. Este programa de monitoramento, executado desde 2007, tem sido constantemente delineado de forma a garantir a sua eficiência, incluindo a padronização de procedimentos por meio de capacitações de equipes técnicas responsáveis pela coleta de amostras¹⁰ e de Manual¹¹ específico, que fornece suporte e orientação de coleta de amostras de água tratada para diálise.

Dentre as ações para aprimoramento deste programa de monitoramento da qualidade da água tratada para diálise, inclui-se a qualificação do armazenamento e transporte das amostras do ponto de coleta até o laboratório, que se constitui em etapa crítica para garantir a integridade das características químicas e biológicas das amostras e a qualidade dos resultados das análises laboratoriais desenvolvidas.

Considerando que as temperaturas de armazenamento e de transporte são relevantes para a manutenção da integridade da amostra e para a validade do resultado analítico, as amostras podem estar sujeitas a diferentes perfis de temperatura dependendo do local da coleta, do destino e as rotas de transporte rodoviário utilizados para as amostras coletadas no âmbito do Programa de Monitoramento da Qualidade, o presente estudo visou qualificar o transporte de amostras de água tratada para diálise, acondicionadas em caixas

térmicas contendo gelo reutilizável e estabelecer as condições que devem ser empregadas para minimizar as variações de temperaturas a que as amostras podem estar sujeitas entre sua coleta e o processamento no laboratório de análise.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição do sistema de acondicionamento e transporte

Para o desenvolvimento do Programa de Monitoramento da Qualidade da Água Tratada para Diálise no estado de São Paulo, as amostras coletadas são acondicionadas em caixas térmicas, com capacidade máxima de 26 L, contendo gelo reutilizável como elemento refrigerante e termômetro acoplado para monitorar a temperatura interna na caixa, cujo sensor está fixado na parede lateral da caixa até 1 cm do fundo, local considerado como ideal para o estudo, por estar próximo aos frascos que contêm as amostras distribuídas de forma homogênea no interior de cada caixa.

A carga a ser acondicionada e transportada nas caixas térmicas é composta por frascos plásticos específicos a cada tipo de ensaio laboratorial: 02 frascos apirogênicos com capacidade de 50 mL cada, para determinação de endotoxinas bacterianas; 02 frascos estéreis com capacidade de 500 mL cada, para análise microbiológica; 01 frasco com capacidade de 500 mL, para análises físico-químicas; 02 frascos com capacidade de 125 mL cada, para análise de metais; e outros 02 frascos com capacidade de 125 mL cada, para análise de mercúrio.

Amostra

Quarenta caixas térmicas, EasyCooler™ (EasyPath), de Polietileno de Alta Densidade, com corpo e tampa contendo isolamento térmico em Poliuretano e termômetro digital com visor acoplado na parede externa da caixa e sensor localizado na lateral interna da caixa, próximo da base, constituídas do mesmo número de lote, adquiridas especificamente para o Programa de Monitoramento da Água Tratada para Diálise no estado de São Paulo, foram numeradas de 01 a 40 e divididas em quatro subconjuntos compostos por 10 caixas cada: de 01 a 10, de 11 a 20, de 21

a 30 e de 31 a 40. Para o estudo, foram sorteadas aleatoriamente 06 caixas térmicas (15% do total de caixas), garantindo que ao menos uma caixa de cada subconjunto fosse avaliada. Ao final do sorteio, foram selecionadas as caixas térmicas de números 08, 14, 17, 23, 24 e 38.

Delineamento experimental

O presente estudo foi realizado entre os meses de novembro e dezembro de 2017, considerados os mais críticos do ano, que por apresentarem as temperaturas mais elevadas, oferecem as condições mais drásticas para o transporte das amostras de água tratada desde o ponto de coleta até a chegada ao laboratório para a execução das análises.

A coleta das amostras de água tratada nos Serviços de Diálise e o transporte são realizados por técnicos dos Grupos de Vigilância Sanitária Estadual (GVS) e de Vigilância Sanitária Municipal (VISAM), distribuídos pelo estado de São Paulo (), de acordo com cronograma pré-estabelecido pela coordenação do Programa de Monitoramento, segundo recomendações dispostas no Manual de Orientação de Colheita de Água¹¹ e também preconizadas pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*¹². As equipes de Vigilância Sanitária são orientadas a retirar as caixas térmicas contendo os frascos e as unidades de gelo reutilizável no Laboratório Central do Instituto Adolfo Lutz (IAL), no município de São Paulo, na semana anterior à data agendada para a coleta de amostras, a acondicionar todas as unidades de gelo reutilizável em freezer, pelo menos 24 horas antes ao procedimento de coleta e a proceder ao transporte das amostras logo após a coleta ao laboratório que irá efetuar cada tipo de análise (Laboratório Central e Regionais do IAL).

Considerando que todas as amostras coletadas para fins de determinação de endotoxinas bacterianas e de análise de metais são encaminhadas ao Laboratório Central do IAL, este estudo simulou as condições de transporte rodoviárias a que as amostras de água são submetidas após a coleta nos Serviços de Diálise, em termos de tempo e da distância percorrida pelo GVS e VISAM até o Laboratório Central do

IAL. Sendo que o Serviço de Diálise no município de Ilha Solteira é o mais distante do estado de São Paulo, localizado a aproximadamente 660 km da capital e a cerca de 8 horas do Laboratório Central do IAL, foi estabelecido que a situação mais crítica, em termos de tempo de traslado, a que a amostra pode estar submetida seria 10 horas e, desta forma, o monitoramento da temperatura nas caixas térmicas foi realizado com medições depois de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 horas, a fim de abranger o tempo despendido pelas equipes de Vigilância Sanitária para percorrerem as diferentes distâncias entre os Serviços de Diálise e o Laboratório Central do IAL, após a coleta de amostras.

Procedimento

Para simular as condições de temperatura a que as amostras estarão sujeitas durante o traslado rodoviário, as caixas térmicas foram mantidas em temperatura ambiente, em sala com ventilação natural.

A verificação da temperatura da sala foi realizada nos mesmos intervalos do estudo das caixas térmicas, por meio de termômetro de máxima e mínima para controle ambiental (Incoterm), enquanto a verificação da temperatura do interior das caixas térmicas, frascos e líquidos foi realizada por meio de termômetro de infravermelho Scantemp ST 60000 (Incoterm). Ambos os instrumentos foram calibrados por empresa credenciada pela Rede Brasileira de Calibração (RBC).

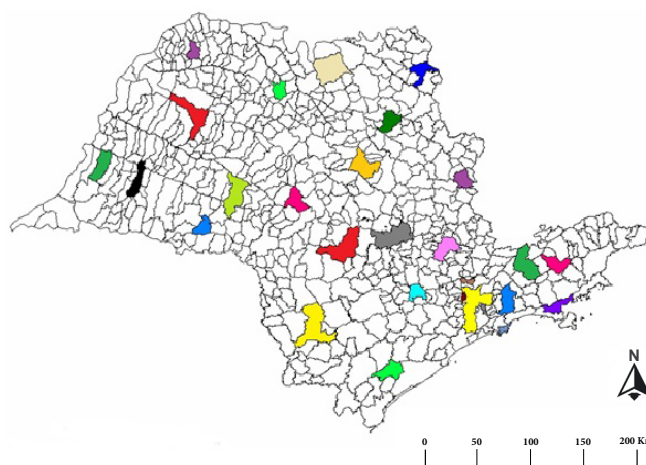


Figura 1. Mapa de localização dos Grupos de Vigilância Sanitária (GVS) no estado de São Paulo

Vinte e quatro horas antes do início das verificações de temperatura, as seis caixas térmicas e os seis conjuntos de frascos foram mantidos na sala com ventilação natural, enquanto os gelos reutilizáveis, com capacidade de 400 mL e medidas aproximadas de 17,4 x 9,5 x 3,0 cm, foram mantidos em freezer.

Considerando o conjunto de frascos destinados a coleta de amostras nos Serviços de Diálise, foi escolhido como indicador das condições da amostra, um dos frascos com maior capacidade em volume (500 mL) por ser aquele que demanda maior tempo para o decaimento da temperatura quando disposto no interior da caixa térmica.

No início do estudo, cada um dos frascos foi preenchido com água destilada para simular as amostras coletadas nos Serviços de Diálise. Em seguida, foram verificadas as temperaturas: (a) da sala, (b) na base interna de cada caixa, próximo da parede oposta àquela onde o sensor

de temperatura estava acoplado, (c) da parede externa dos frascos de 500 mL: fundo, porção mediana e porção superior do frasco e, (d) da água contida nos frascos (). Após a tomada de temperatura, as unidades de gelos reutilizáveis foram distribuídas no fundo e paredes laterais de cada caixa e, somente após os termômetros acoplados às caixas indicarem aproximadamente -4,0 °C, os frascos foram acondicionados no interior de cada caixa, intercalados com algumas das unidades de gelo reutilizável entre eles e, na sequência, as caixas foram fechadas. Depois de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 horas, foram tomadas as temperaturas nos mesmos pontos previamente descritos: da sala, do interior de cada caixa (tomando o cuidado de não atingir o gelo reutilizável), dos frascos de 500 mL e da água.

Todo procedimento foi realizado em quadruplicata, em dias distintos de avaliação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo iniciou com a avaliação da quantidade de material refrigerante (gelo reutilizável) capaz de manter, durante 10 horas de estudo, a temperatura de até 10,0 °C, conforme preconizado por *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*¹² para acondicionamento de amostras de água. Os procedimentos foram realizados utilizando-se 10, 12 e 16 unidades de gelo reutilizável. Estas avaliações prévias indicaram que somente com 16 unidades do material refrigerante dispostas nas caixas térmicas, foi possível manter a temperatura durante todo período de 10 horas de avaliação. Portanto, para a condução da qualificação do transporte de amostras no âmbito do Programa Estadual de Monitoramento da Qualidade de Água Tratada para Diálise, foram utilizados 16 gelos reutilizáveis assim dispostos nas caixas térmicas: 08 unidades dispostas em duas camadas no fundo das caixas, 06 unidades dispostas nas paredes laterais das caixas e 02 unidades intercaladas entre os frascos de coleta de água.

O material de acondicionamento foi mantido durante todo o período de avaliação em sala com ventilação natural, como forma de

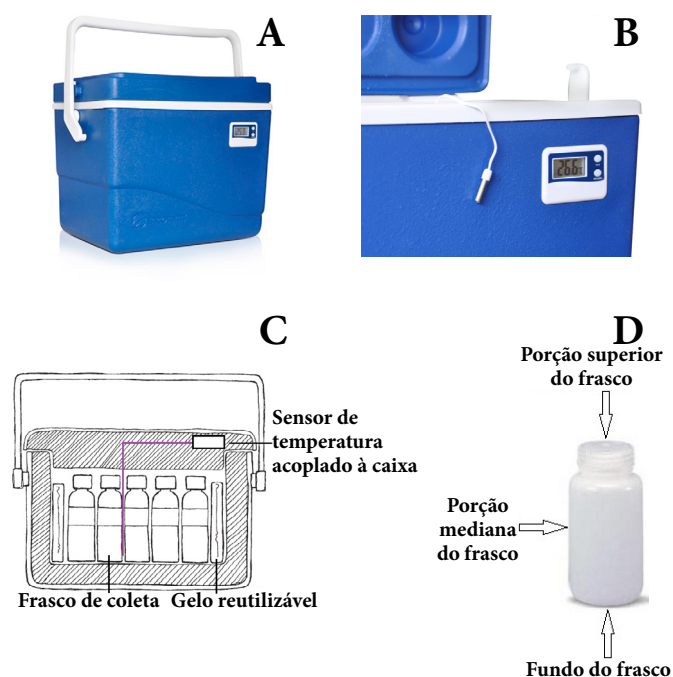


Figura 2. Esquema das caixas térmicas utilizadas no programa de monitoramento: (A) Caixa térmica; (B) Detalhe da localização do termômetro digital; (C) Esquema do interior da caixa térmica¹³; (D) Pontos de medição das temperaturas nos frascos

WHO¹³, com modificações

simular as condições a que as amostras de água coletadas estarão submetidas durante o transporte entre o Serviço de Diálise e o laboratório, que processará as análises. O monitoramento desta sala, realizado durante 10 horas de estudo, indicou variação média de temperatura entre 26,0 e 30,1 °C.

Antes de dispor as 16 unidades de gelo reutilizável, a temperatura média verificada no interior das caixas térmicas foi $26,2 \pm 1,0$ °C para medições com termômetro de infravermelho e $26,0 \pm 4,8$ °C para medições com o sensor acoplado e, aproximadamente 30 minutos após a disposição do material refrigerante, a temperatura média reduziu 29,7 °C (termômetro de infravermelho) e 31,4 °C (sensor acoplado), em relação à observada antes da introdução do gelo reutilizável, alcançando média de (-)4,35 °C (T0).

No momento em que o interior da caixa atingiu T0, as temperaturas do frasco de 500 mL e da água contida nele foram verificadas, apresentando variação média de temperatura de $26,7 \pm 1,2$ °C para os frascos e de $26,5 \pm 1,2$ °C na água, e então o conjunto de frascos foi disposto nas caixas térmicas.

A apresenta as temperaturas médias obtidas em cada conjunto amostrado em função dos pontos de monitoramento avaliados: interior de cada caixa térmica (A, sensor acoplado à caixa e B, termômetro de infravermelho), parede externa do fundo dos frascos de 500 mL (C), parede externa da porção mediana dos frascos (D), parede externa da porção superior dos frascos, sem retirá-los da caixa (E) e da água, cuja temperatura foi obtida apontando o termômetro de infravermelho diretamente nos frascos com água (F).

As Figuras e apresentam as temperaturas médias alcançadas no interior de cada uma das caixas térmicas e os resultados obtidos indicaram maior variabilidade entre as caixas ($p < 0,05$), em todos os períodos do estudo, quando a medição foi realizada por meio do sensor acoplado (Figura); enquanto que não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as caixas quando as medições de temperatura foram realizadas por termômetro de infravermelho (Figura), devido apresentar maior precisão, aliada ao fato de estar calibrado, em comparação ao termômetro acoplado à caixa térmica.

Apesar da variabilidade encontrada entre as caixas térmicas, os dados indicaram não haver diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as temperaturas médias registradas por termômetro de infravermelho e por sensor acoplado (Figura). A temperatura no interior das caixas aumentou gradativamente ao longo do período do estudo, sendo que as leituras indicaram que a temperatura média estabilizou a partir de 4 horas de estudo ($p > 0,05$), a $2,5 \pm 0,8$ °C. Considerando que as caixas térmicas foram mantidas em sala com temperatura média de $27,4 \pm 1,4$ °C durante todo o estudo e que o material de coleta foi disposto nas caixas quando apresentava temperatura média da ordem de $26,6 \pm 1,1$ °C, as caixas térmicas com 16 unidades de materiais refrigerantes dispostas em seu interior apresentaram o melhor desempenho térmico para manter a temperatura do material acondicionado em níveis inferiores ao limite máximo permitido de 10,0 °C¹².

Com relação aos frascos de coleta de amostras, o estudo de temperatura apontou que a parede externa do fundo dos frascos (Figura) apresentou comportamento térmico análogo com o interior da caixa térmica, em função de estarem dispostos diretamente sobre a camada do material refrigerante. A temperatura média reduziu 20,9 °C na primeira hora do estudo e depois gradativamente até estabilização ($p > 0,05$) a partir de 4 horas, a $3,7 \pm 0,7$ °C.

As paredes da porção mediana (Figura) e da porção superior (Figura) dos frascos apresentaram comportamento térmico semelhante: na primeira hora, a temperatura média reduziu cerca de 13,0 °C e depois gradativamente até a estabilização a partir de 8 horas, a $6,8 \pm 1,0$ °C e $4,9 \pm 1,0$ °C, respectivamente. Devido ao fato destes pontos de medição de temperatura não estarem em contato direto com as unidades de gelo reutilizável, foi necessário maior tempo para atingir o equilíbrio térmico com o ambiente interno da caixa. Entretanto, a temperatura média manteve-se inferior a 10,0 °C.

A qualificação do transporte de amostras teve o objetivo de garantir a manutenção de suas características durante o traslado entre o ponto de coleta e o laboratório. Para tanto, a temperatura do líquido contido em cada frasco também foi avaliada com intuito de verificar o provável

comportamento das amostras coletadas no âmbito do Programa de Monitoramento. Assim como ocorreu entre o fundo dos frascos e o interior das caixas térmicas, o comportamento térmico nas medições das temperaturas efetuadas diretamente na água, quando da abertura dos frascos, não foi significativamente diverso ($p > 0,05$) ao verificado com os frascos (Figura). Houve redução de temperatura na primeira hora de 12,7 °C em relação à temperatura mensurada antes do frasco ser acondicionado na caixa térmica e a necessidade de tempo maior para atingir o equilíbrio térmico com o interior da caixa, sendo que a estabilização da temperatura ocorreu 8 horas após o acondicionamento em caixa térmica, a $4,2 \pm 0,9$ °C, em média (Figura).

Embora durante o estudo para qualificação do transporte tenham sido efetuadas medidas da temperatura da água contida nos frascos, na condução do Programa de Monitoramento, medidas de temperaturas diretamente na amostra devem ser efetuadas somente em ambiente laboratorial para evitar eventual contaminação da amostra e, portanto, as unidades de recepção de

amostras, em geral, não são autorizadas a efetuar este tipo de medição. Entretanto, considerando que estas unidades devem efetuar a avaliação da temperatura na recepção das amostras, rejeitando aquelas que apresentem temperaturas acima de 10,0 °C, torna-se necessário determinar qual é o ponto mais adequado do frasco de coleta – parede externa do fundo, da porção mediana ou da porção superior – que pode oferecer a melhor estimativa da temperatura do líquido em seu interior.

Na avaliação estatística destes resultados, foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a temperatura média obtida para a água e aquela obtida para a parede do fundo do frasco e também para a porção mediana da parede do frasco. Entretanto, não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre a temperatura média obtida diretamente na água e aquela obtida na parede externa da porção superior do frasco, sem retirá-lo da caixa térmica, indicando que este é o melhor ponto de controle para prever a temperatura da amostra no âmbito do Programa de Monitoramento (Figura).

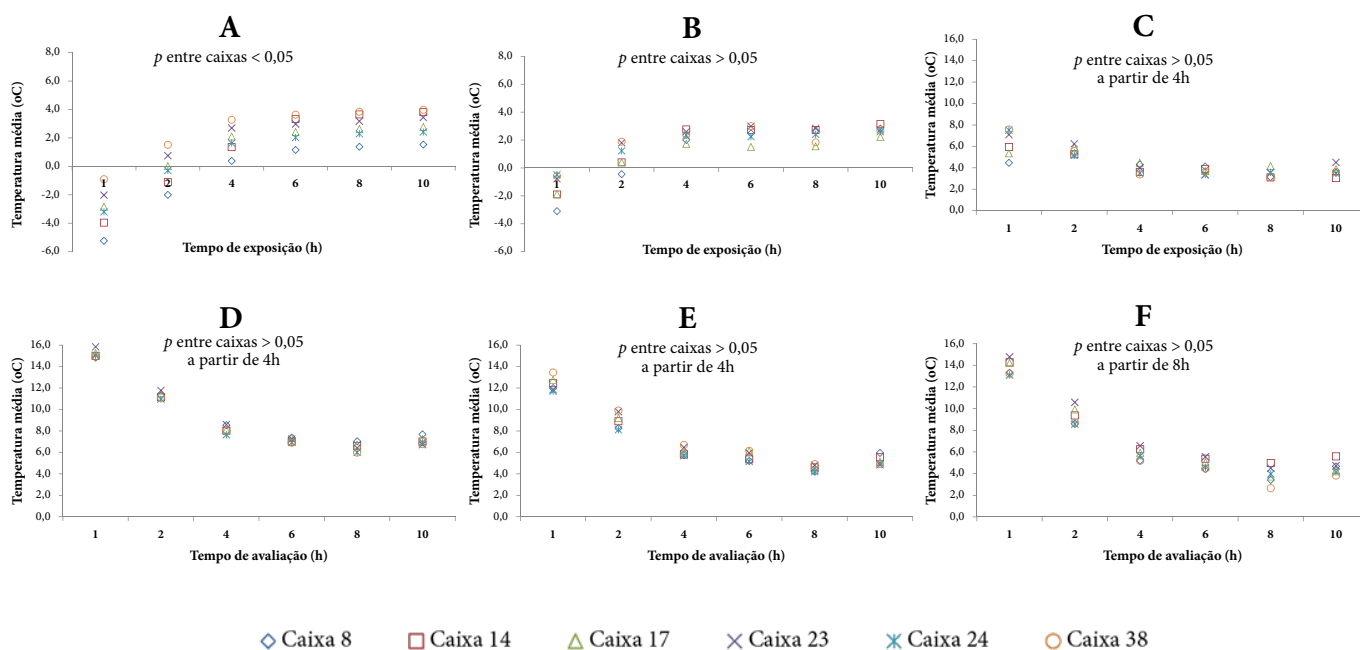


Figura 3. Temperaturas médias obtidas na qualificação do transporte de amostras em carga total: (A) interior da caixa térmica, com sensor acoplado; (B) interior da caixa térmica com termômetro de infravermelho; (C) parede externa do fundo do frasco; (D) parede externa na porção mediana do frasco; (E) parede externa da porção superior do frasco e (F) água contida no frasco

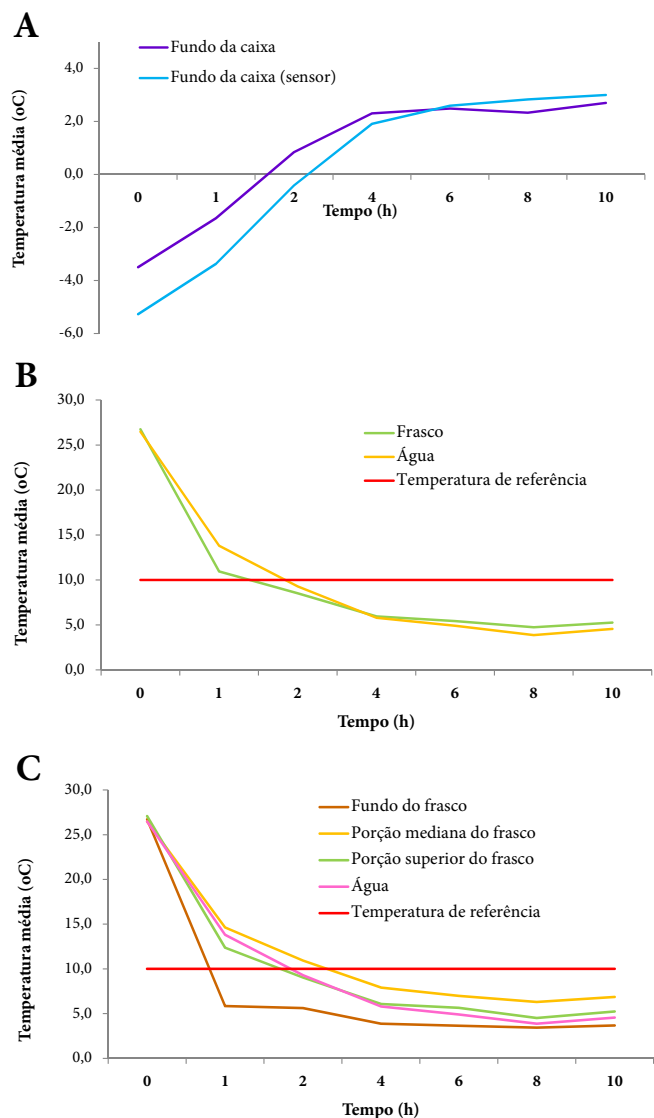


Figura 4. Temperaturas médias obtidas na qualificação do transporte, com carga total e período de observação de 10 horas: (A) fundo da caixa; (B) frasco e água; (C) fundo do frasco, porção mediana do frasco, porção superior do frasco dentro da caixa, água do frasco

A garantia de condições adequadas em termos de temperatura durante o transporte de se alteram significativamente durante o transporte ao laboratório, mesmo se mantidas a temperatura ambiente, sendo recomendado que as amostras sejam mantidas abaixo de 10,0 °C, somente para a preservação, nas dependências do laboratório¹².

Na literatura mais recente, dentre os guias e manuais de orientação de procedimento de coleta de águas disponíveis¹⁴⁻²⁶, um número de referências

limitado disponibiliza informações relacionadas ao controle de qualidade na amostragem o que diz respeito à temperatura de acondicionamento para o transporte de amostras de águas até as dependências dos laboratórios. Em geral, nestes documentos, a temperatura também se situa abaixo de 10,0 °C e, portanto, as amostras devem ser armazenadas e transportadas em ambiente frio, ou seja, em temperaturas controladas que não excedam esta temperatura^{12,22}, tornando compatível com os valores obtidos no emprego de caixas térmicas, número de unidades refrigerantes e pontos de controle de temperatura adotados no presente estudo.

CONCLUSÃO

A utilização de caixas térmicas contendo gelo reutilizável dispostos em seu interior – 08 unidades dispostas em duas camadas no fundo da caixa, 06 unidades nas paredes laterais e 02 unidades dispostas entre os frascos empregados na coleta de água é suficiente para manter, por 10 horas, a temperatura média abaixo de 10,0 °C durante o transporte rodoviário de cada conjunto de frascos contendo as amostras coletadas nos Serviços de Diálise do estado de São Paulo até a recepção no laboratório para o procedimento de análises.

Os resultados indicam que as condições mais críticas estabelecidas para o acondicionamento e o transporte de amostras de água tratada para diálise no âmbito do Programa Estadual de Monitoramento estão adequadas para garantir a manutenção das características biológicas e físicas das amostras, desde o ponto de coleta nos Serviços de Diálise até o laboratório analítico.

Os resultados apresentados nesta qualificação também podem ser aplicados a outro seguimento de coleta como, por exemplo, água para consumo humano, visto que a efetivação do procedimento de coleta, bem como o tipo de frasco de coleta pode ser análoga àquela estudada na presente pesquisa.

Ainda, o estudo visa fornecer subsídios aos demais laboratórios analíticos no estabelecimento de estratégias na implementação de programas de monitoramento em águas, a fim de promover continuamente a Saúde Pública no país.

REFERÊNCIAS

1. Klinger R. Volunteer water monitoring program, Karnataka, India. Karnataka State Pollution Control Board. 2015. <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.1546.2568>
2. Deutsch WG, Ruiz-Córdova S. Trends, challenges, and responses of a 20-year, volunteer water monitoring program in Alabama. *Ecol Soc*. 2015;20(3):14. <http://dx.doi.org/10.5751/ES-07578-200314>
3. Buckland-Nicks A, Castleden H, Conrad C. Aligning community-based water monitoring program designs with goals for enhanced environmental management. *J Sci Commun*. 2016;15(03):A01. Disponível em: https://jcom.sissa.it/sites/default/files/documents/JCOM_1503_2016_A01.pdf
4. Storey RG, Wright-Stow A, Kin E, Davies-Colley RJ, Stott R. Volunteer stream monitoring: Do the data quality and monitoring experience support increased community involvement in freshwater decision making? *Ecol Soc*. 2016;21(4):32. <https://doi.org/10.5751/ES-08934-210432>
5. U. S. Environmental Protection Agency – EPA. Drinking Water Action Plan. Office of Water. 2016. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-11/documents/508.final_usepa_drinking_water_action_plan_11.30.16.v0.pdf
6. Buzzo ML, Bugno A, Almodovar AAB, Kira CS, Carvalho MFH, Souza A, et al. A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):1-6. Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/6373>
7. Ramirez SS, Delgado AG, Romão CMA, Almeida AECC. Água para hemodiálise: estudo comparativo entre os resultados das análises fiscais e as análises de rotina realizadas em unidades de diálise no estado do Rio de Janeiro. *Vigil Sanit Debate*. 2015;3(3):104-9. <http://doi.org/10.3395/2317-269X.00488>
8. Dovidauskas S, Okada IA, Iha MH, Cavallini AG, Okada MM, Briganti RC. Avaliação da qualidade da fluoretação de águas de abastecimento público em 88 municípios da região Nordeste do estado de São Paulo (Brasil). *Vigil Sanit Debate*. 2017;5(3):14-23. <http://doi.org/10.22239/2317-269x.00926>
9. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867923/\(1\)RDC_11_2014_COMP.pdf/5e552d92-f573-4c54-8cab-b06efa87036e](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867923/(1)RDC_11_2014_COMP.pdf/5e552d92-f573-4c54-8cab-b06efa87036e)
10. Almodovar AAB, Buzzo ML, Bugno A, Ferreira MLD, Cardoso RL. Programa Estadual de Monitoramento da Água Tratada para Diálise: Capacitação de Equipe Técnica. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2017;27(U):art. 4. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial_27/27u_art-4.pdf
11. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-Brasil). Programa Estadual de Monitoramento da Água tratada para Diálise. Manual de Orientação de Colheita de Água. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2017. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2017_5_30/manual-para-colheita-de-agua-para-dialise/final_manual_para_colheita_de_agua_para-dialise.pdf
12. American Public Health Association – APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd edition. Washington, DC 20001-370, 2017.
13. World Health Organization – WHO. Guidelines for drinking-water quality. Water sampling and analysis. p. 51-72. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/2edvol3d.pdf
14. Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN/SC. Manual de orientação para coleta de água e amostras ambientais (MCA 01). 2016. 11 p. Disponível em: <http://lacen.saude.sc.gov.br/arquivos/MOCAAA.pdf>
15. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos/Companhia Ambiental do Estado de São Paulo: Organizadores: Brandão CJ et al. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA; 2011. 326 p. Disponível em: <http://arquivos.ana.gov.br/institucional/sge/CEDOC/Catalogo/2012/GuiaNacionalDeColeta.pdf>

16. Laboratório Dr. Pio Análises Clínicas. Instruções de coleta para análise de água – INT. 302. 2 p. Disponível em: http://www.drpio.com.br/labalimentos/files/INT.302_instrucoes_coleta_analise_agua.pdf
17. Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN, PR. Manual de coleta envio de amostras de vigilância ambiental. Manual 1.40.002; 2014. 19 p. Disponível em: http://www.lacen.saude.pr.gov.br/arquivos/File/MANUAL_COLETA_AGUA_DVLSA_ABR2014.pdf
18. Governo do Estado do Rio Grande do Norte. Secretaria de Estado da Saúde Pública. Manual técnico de orientações básicas para atuação no programa de vigilância da qualidade da água para consumo humano - VIGIAGUA. Disponível em: http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/defesa_civil_estadual/DOC/DOC00000000037195.PDF
19. Ministério da Saúde. Orientações técnicas para coleta, acondicionamento e transporte de amostras de água para consumo humano; 2013. 18 p. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/24/Proceds-e-progr-de-coleta-de---gua.pdf>
20. Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN, ES. Manual de coleta e transporte de amostras de água para consumo humano; 2017. 25 p. Disponível em: <http://saude.es.gov.br/Media/sesa/LACEN/Manuais/MANUAL%20DE%20COLETA%20DE%20AMOSTRAS%20DE%20AGUA%20PARA%20CONSUMO%20HUMANO%20LACEN%20ES%20REV%2003.pdf>
21. Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN, MS. Manual de coleta de amostras de produtos sujeitos a vigilância sanitária e ambiental; 2011. 32 p. Disponível em: <ftp://balcao.saude.ms.gov.br/horde/sisppi/MANUAL%20DE%20COLETA%20DE%20AMOSTRAS%20DA%20DBQ%20-%202011.pdf>
22. Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN, PA. Manual de orientações para coleta de água, amostras ambientais e produtos sujeitos à vigilância sanitária. 2. ed; 2017. 56 p. Disponível em: <http://www.lacen.pa.gov.br/arquivos/manuais/Manual%20de%20Orienta%C3%A7%C3%B5es%20para%20Coleta%20de%20C3%81gua%20atualizado%20CQB.pdf>
23. Fundação Ezequiel Dias – FUNED. Manual de coleta de amostras; 2010. 61 p. Disponível em: http://funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2011/05/Manual_Divisa_2011.pdf
24. Laboratório Central de Saúde Pública – LACEN, TO. Manual de coleta para análises de água de consumo humano; 2017. 16 p. Disponível em: <https://central3.to.gov.br/arquivo/326941/>
25. Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI). *ANSI/AAMI 13959:2014. Water for hemodialysis and related therapies*. Arlington: Association for the Advancement of Medical Instrumentation; 2014. p. 5-14.
26. UNITED States Pharmacopeia. 40th ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention; 2017. p. 117-123, 1756-1770, 1851-1888, 6717-6719.



Avaliação dos níveis de cromo total em águas para consumo humano

Evaluation of total chromium levels in drinking water

RIALA6/1748

Lidiane Raquel Verola MATAVELI^{1*}, Márcia Liane BUZZO¹, Maria de Fátima Henriques CARVALHO¹, Luciana Juncioni de ARAUZ¹, Guilherme Augusto Verola MATAVELI²

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Contaminantes Inorgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Doutor Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-902. Tel: 11 3068 2923. E-mail: lidianemataveli@gmail.com

²Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 07.03.2018 - Aceito para publicação: 17.07.2018

RESUMO

Níveis elevados de cromo associados às águas naturais não são comuns, mas concentrações elevadas desse elemento, de ocorrência natural, têm sido relatadas nas águas subterrâneas de vários sistemas aquíferos, incluindo o Aquífero Bauru, SP, Brasil. Este fato está associado à ocorrência de rochas máficas/ultramáficas e às condições alcalinas e oxidantes. Neste estudo foi desenvolvido e aplicado um método para monitorar a concentração de cromo total em amostras de água da cidade de São José do Rio Preto. Esta cidade está localizada no estado de São Paulo, na região onde concentrações superiores ao limite estabelecido pela legislação brasileira (0,05 mg/L) foram detectadas em águas subterrâneas de poços de abastecimento. O cromo total foi determinado usando-se Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) em 104 amostras de água coletadas, entre 2013 e 2017, em diferentes pontos de distribuição (zona rural, residencial, distrito industrial, comercial, reservatório de distribuição e estação de tratamento de água), considerando-se 52 locais. Em 99 % das amostras as concentrações de Cr estavam acima do limite de quantificação calculado para o método (0,001 mg/L). E 15% apresentaram concentrações acima do limite de regulação na água potável (Portaria 2914/2011), sendo, portanto, consideradas impróprias para o consumo humano.

Palavras-chave. cromo total, água, espectrometria de massas.

ABSTRACT

Elevated chromium levels in the natural waters are not common, but the high concentrations of naturally occurring Cr have been reported in the groundwater of several aquifer systems. This finding is linked with the occurrence of mafic/ultramafic rocks and associated with the alkaline and oxidizing conditions. This study aimed at monitoring the total chromium concentration in drinking water samples from São José do Rio Preto city. Cr concentrations higher than the limit established by the Brazilian Legislation (0.05 mg/L) were detected in the groundwater from the deep supply wells. Total chromium was determined by using an Inductively Coupled Mass Spectrometer (ICP-MS) in 104 samples collected from the public drinking water distribution networks in 52 sites, from 2013 to 2017. Cr concentrations above the method limit of quantification (0.001 mg/L) were found in 99% of the analyzed samples. Approximately 15% of the collected samples presented Cr in concentrations above the established legislation limit for drinking water (Ordinance 2914/2011), that should be considered as improper for consumption.

Keywords. total chromium, water, mass spectrometry.

INTRODUÇÃO

O cromo é o décimo elemento mais abundante na crosta terrestre¹. Está naturalmente presente nos solos e águas em dois estados de oxidação principais: cromo trivalente (Cr (III)), considerado essencial devido ao seu papel na regulação dos metabolismos de glicose, proteínas e gorduras¹; e cromo hexavalente (Cr (VI)), um agente oxidante forte identificado como tóxico que pode causar vários tipos de câncer e danos no DNA, que geralmente é produzido por processos industriais, sob a forma de cromatos, dicromatos, ou ácido crômico^{2,3}. De acordo com a *US Food Nutrition Board*⁴, a recomendação de ingestão diária para Cr é de 35 e 25 mg/dia para adultos do sexo masculino e feminino, respectivamente.

É importante notar que, apesar da crescente preocupação com a especiação deste metal, dispositivos legais apontam somente para limites de cromo total em águas para consumo. No Brasil, a Portaria nº 2914 do Ministério da Saúde, de 12 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água de consumo humano e seu padrão de potabilidade, estabelece para cromo total valor máximo de 0,05 mg/L⁵. Este limite para cromo total também é preconizado por países da União Europeia⁶.

O aumento da percepção dos efeitos significativos dos metais tóxicos na saúde da população humana, principalmente em crianças, que são consideradas uma população mais sensível, resulta no aumento dos esforços da comunidade científica para identificar as causas e investigar a ocorrência do agravo ambiental⁷. A exposição das crianças aos contaminantes ambientais é intensificada pela sua maior ingestão de água⁸, quando comparada aos adultos, devido à taxa metabólica mais acelerada⁷.

O cromo pode estar presente nas águas provenientes de fontes naturais ou antropogênicas. De origem antropogênica, pode penetrar nos sistemas aquáticos sob a forma de descargas de efluentes complexos e substâncias químicas tóxicas em bacias de drenagem^{2,9}. Quanto à sua origem natural, a lixiviação é considerada a principal causa da ocorrência de cromo na água¹⁰. Altos níveis de Cr associados às águas naturais não são comuns, pois este elemento ocorre na forma de compostos insolúveis de Cr (III) em rochas e no solo².

No entanto, concentrações elevadas de Cr (VI) de ocorrência natural em rochas máficas/ultramáficas, associada a condições alcalinas e oxidantes, foram relatadas nas águas subterrâneas de vários sistemas aquíferos em vários locais¹¹⁻¹³, incluindo o Sistema Aquífero Bauru^{14,15}.

As águas subterrâneas representam grande importância no abastecimento público e privado no país, e vêm sendo exploradas gradativamente para o abastecimento de municípios e núcleos urbanos, indústrias, irrigação e turismo, atendendo a cerca de 30 a 40% da população¹⁵. No Estado de São Paulo, estima-se que 70% dos municípios paulistas são abastecidos total ou parcialmente por águas subterrâneas, incluindo municípios de porte como Ribeirão Preto, Marília, Bauru e São José do Rio Preto¹⁶, totalizando 10.500.000 habitantes¹⁷.

Dentre as fontes de suprimento de água utilizadas para o abastecimento público no Estado de São Paulo, destaca-se o Sistema Aquífero Bauru (SAB). Este sistema ocupa pouco mais de 40% da área do Estado, e destaca-se como importante manancial de abastecimento de água subterrânea para a maioria dos municípios da porção oeste do Estado. Apresenta espessura média saturada de 75 m, atingindo entre 150 a 200 m na região de São José do Rio Preto e Presidente Prudente, e de 300 m no Planalto Residual de Marília, condicionada pela morfologia da superfície e pelo substrato rochoso representado pelos basaltos da Formação Serra Geral¹⁷.

De acordo com a CETESB, que realiza o monitoramento da qualidade das águas subterrâneas de modo sistemático nos Sistemas Aquíferos do Estado, os resultados sobre a qualidade de análises químicas e biológicas das águas do SAB executadas no triênio 2013 a 2015, apresentaram concentrações pontuais em não conformidade com os padrões de risco à saúde humana para vários parâmetros físico-químicos, que inclui o elemento cromo, com valores mínimo e máximo de 0,45 e 108 µg/L¹⁷.

Na área de estudo deste trabalho, o município de São José do Rio Preto localizado a noroeste da capital do Estado de São Paulo, a água subterrânea proveniente de poços representa mais de 70% do volume de água distribuído pelo município, sendo que a maior parte deste volume é proveniente do Sistema Aquífero Bauru¹⁸. O principal tipo de uso

de água subterrânea do município é o doméstico, correspondendo a 31%, embora 79% dos poços não possuam outorga¹⁹. Pesquisas prévias revelaram que concentrações de Cr excediam o limite permitido para consumo humano (0,05 mg/L) em águas provenientes de poços utilizados para abastecimento da população para verificação de conformidade com a legislação em vigor^{5,14,15,17}.

Assim, com base no exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de concentração de cromo total de ocorrência natural em amostras de água para consumo humano, coletadas em diferentes pontos do município de São José do Rio Preto, entre 2013 e 2017, utilizando Espectrometria de Massas por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), para verificação de conformidade com a legislação em vigor.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e soluções analíticas

Todos os materiais foram descontaminados em dois banhos consecutivos de solução de ácido nítrico P.A. 65% (Merck - Darmstadt, Alemanha) a 10% (v/v) durante 24 h e enxaguados cuidadosamente com água ultrapura antes da utilização. A água ultrapura utilizada (resistividade 18,2 MΩ.cm) foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Millipore, modelo Integral 10 (Bedford, EUA). As soluções padrão de cromo (Cr) e escândio (Sc) foram adquiridas da Inorganic Ventures (Christiansburg, EUA). O HNO₃ Suprapur[®] foi adquirido da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). A solução multielementar para verificação de desempenho diário do instrumento foi adquirida da empresa Perkin Elmer (Shelton, EUA).

A calibração externa foi realizada utilizando uma curva analítica de seis pontos, preparada por diluição do padrão de Cr 1000 mg/L em solução de HNO₃ a 0,2% (v/v). As concentrações da curva analítica variaram de 0,001 a 0,050 mg/L. Se as amostras apresentassem concentrações de Cr acima da faixa de concentração contemplada pela curva de calibração, essas eram diluídas utilizando solução HNO₃ 0,2% (v/v), e analisadas novamente.

Solução de padrão interno (Sc) foi preparada pela diluição da solução padrão 1000 mg/L para 0,005 mg/L em solução HNO₃ 0,2% (v/v), adicionada às amostras em linha, utilizando um bloco de mistura.

Instrumentação

Todas as medidas de determinação de cromo em água foram realizadas utilizando Espectrômetro de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado/ICP-MS (Elan DRC II, Perkin Elmer), equipado com um nebulizador de vidro tipo Meinhard[®] e câmara de nebulização ciclônica. Foram utilizados injetor padrão de quartzo com diâmetro interno de 2,0 mm, cone amostrador (1,10 mm de diâmetro de orifício) e skimmer (0,9 mm de diâmetro de orifício) de platina. As soluções padrão da curva analítica, brancos e amostras foram injetadas no equipamento utilizando-se um amostrador automático S10 (Perkin Elmer). As condições operacionais relevantes foram: potência RF = 1450W; fluxo do gás do plasma = 18 mL/min; fluxo do gás auxiliar = 1,1 mL/min; fluxo do gás nebulizador = 1,02 mL/min; tempo de integração = 750 ms e isótopo monitorado = ⁵²Cr.

Todas as medições foram realizadas no modo padrão do equipamento. Para verificar a ocorrência de interferências isobáricas, o isótopo ⁵³Cr também foi monitorado. Concentrações de Cr encontradas usando ⁵²Cr estão em boa concordância com as encontradas quando analisando ⁵³Cr.

Coleta de amostras de água

Um total de 104 amostras de água no ponto do cavalete (torneira), descritas pelo Sistema de Vigilância do Estado de São Paulo como provenientes de manancial subterrâneo município de São José do Rio Preto (), em diferentes períodos compreendidos entre 2013 e 2017. O estudo foi conduzido nas zonas urbana (residencial, comercial, distrito industrial, estação de tratamento de água e reservatório de distribuição) e rural do município, e as descrições das origens das amostras coletadas foram delineadas pelo Grupo de Vigilância Sanitária e distribuídas em:

- i. Solução Alternativa Individual/Canalizada/ Não Tratada/Local de Coleta: zona rural – 4 amostras;
- ii. Solução Alternativa Coletiva/Canalizada/ Tratada/Cavalete/Local de Coleta: distrito industrial – 7 amostras;
- iii. Abastecimento Público/Canalizada/Fluoretada/ Tratada/Cavalete/Local de Coleta: residência – 62 amostras;

- iv. Abastecimento Público/Canalizada/Fluoretada/Tratada/Cavalete/Local de Coleta: comércio – 26 amostras;
- v. Abastecimento Público/Canalizada/Fluoretada/Tratada/Cavalete/Local de Coleta: reservatório de distribuição de água – 3 amostras;
- vi. Abastecimento Público/Canalizada/Fluoretada/Tratada/Cavalete/Local de Coleta: estação de tratamento de esgoto – 2 amostras.



Figura 1. Localização do município de São José do Preto no Estado de São Paulo (destaque em vermelho).

A disposição anual das coletas e respectivas recoletas das amostras de água para consumo em 52 locais distintos, foram definidas da seguinte forma: 4 amostras em 2013, 10 amostras em 2014, 31 amostras em 2015, 40 amostras em 2016 e 19 amostras em 2017.

Para procedimento de coleta das amostras, foram fornecidos pelo laboratório frascos Nalgene® contendo conservante ácido nítrico suficiente para concentração final de 0,2% (v/v), com a finalidade de preservação das amostras. Todas as amostras foram coletadas em duplicata e analisadas diretamente.

Verificação de desempenho do método analítico

O método analítico para determinação de cromo total em água para consumo humano por ICP-MS foi validado seguindo as recomendações descritas no Método EPA 200.8²⁰, para os parâmetros de avaliação de limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intermediária e tendência.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método foram calculados como três e dez vezes o desvio padrão de 10 leituras independentes de uma solução de Cr com concentração de 0,005 mg/L, referente ao primeiro ponto da curva analítica, respectivamente. A linearidade foi estabelecida por meio da preparação de curvas analíticas de Cr usando regressão linear de mínimos quadrados não ponderada. A tendência das medições foi avaliada através da análise do Material de Referência Certificado de água TM-25.4 A low level fortified sample for trace elements (Environment Canada), com valor certificado de cromo de $0,0241 \pm 0,0001$ mg/L.

A estimativa de incerteza do método foi calculada com base nas diretrizes da Eurachem/CITAC²¹, considerando-se as seguintes fontes: curva analítica, precisão e incertezas de equipamentos volumétricos (pipetadores automáticos e balões volumétricos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação de desempenho do método analítico

Os parâmetros obtidos da avaliação de desempenho do método analítico proposto para a determinação de cromo total em água para consumo humano são apresentados a seguir: limite de detecção (LD) = 0,0002 mg/L; limite de quantificação = 0,001 mg/L; faixa linear = 0,001-0,05 mg/L; coeficiente de correlação = 0,9988; tendência (bias) = -7 a +10%.

Os valores de LD e LQ foram considerados aceitáveis, uma vez que os valores obtidos foram inferiores aos limites permitidos pela legislação brasileira⁵. Em relação à linearidade, a análise de regressão mostrou que a correlação linear entre a concentração e a intensidade de sinal é significativa ($p = 1,60 \times 10^{-8}$). A tendência foi avaliada em condições de precisão intermediária, utilizando o Material de Referência Certificado TM-25.4. A tendência variou de -7 a +10% (93-110% de recuperação), e foi considerada satisfatória por estar dentro da faixa de aceitação (60-115%)²². Assim os resultados obtidos indicaram que o método analítico foi considerado adequado para a determinação de cromo total em água para consumo humano.

É importante destacar que desde 2013, o

Núcleo de Contaminantes Inorgânicos do Instituto Adolfo Lutz é acreditado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) em cumprimento aos requisitos gerenciais e técnicos da Norma ABNT NBR ISO/IEC 17.025:2005 para os ensaios de determinação de metais e semimetais em águas para consumo humano e que estão sob regime de vigilância (número de acreditação CRL 0679), contemplando a análise de cromo total em água potável²³.

Avaliação do nível de cromo total em águas de consumo provenientes do município de São José do Rio Preto, 2013 a 2017

Os resultados obtidos de concentração de cromo total nas amostras em estudo e os valores de incerteza expandida são mostrados na Tabela 1. Esta Tabela também apresenta valores referentes à média, mediana, valores mínimo e máximo de cromo obtidos no estudo. O número da amostra representa a ordem de recebimento das mesmas no laboratório no período avaliado, entre 2013 e 2017. Do total de 52 endereços de coleta de água, a tabela apresenta 28 pontos onde foram realizadas coletas nos mesmos endereços, ocorridas em campanhas distintas definidas pelo Sistema de Vigilância: 1, 11, 36 e 37; 3, 4 e 38; 5, 16, 39, 57 e 77; 6, 17, 40 e 89; 7 e 18; 8, 12, 19, 42, 49 e 69; 9, 13, 20, 43, 50 e 70; 14, 21, 52 e 72; 15 e 22; 25, 55 e 75; 27 e 98; 29 e 86; 30 e 97; 41 e 90; 46, 56, 66, 76, 92 e 101; 47 e 67; 48, 68 e 87; 51 e 71; 53 e 73, 54 e 74; 58 e 78; 59 e 79; 60 e 80; 61 e 81; 62 e 82; 63 e 83; 64 e 84; 65 e 85. Com relação às demais localizações indicadas na Tabela 1, correspondentes a 24 locais, foi efetuada somente uma coleta de amostra de água em cada endereço. Ainda, a Tabela 1 mostra os pontos de coleta de água para análise de cromo.

A análise inicial dos dados apresentados assinalou que o cromo é um elemento que se distribui pela região em concentrações semelhantes, embora fossem observados valores anômalos em alguns locais da zona urbana abaixo do limite. As concentrações de Cr total obtidas variaram entre valores abaixo do LQ (0,001 mg/L) e 0,070 mg/L. Para 85% das amostras, os níveis de cromo total encontraram-se abaixo do limite permitido pela legislação nacional, que estabelece valor máximo de 0,05 mg/L⁵. Dentre as amostras coletadas e analisadas,

15% apresentaram níveis igual ou superiores ao valor máximo permitido para cromo total preconizado na legislação brasileira, com valores entre 0,050 e 0,070 mg/L, sendo que em sua maioria, estes pontos estão localizados na região oeste da cidade: 6 em torno do ponto central 20°47'S e 49°27'O; 4 em torno do ponto central 20°45'S e 49°23'O; um localizado no ponto 20°47'22"S e 49°21'08"O e um localizado no ponto 20°49'41"S e 49°22'38"O. Níveis de cromo anômalos também foram detectados por Bertolo et al²⁴ no município de Urânia, região próxima ao município de São José do Rio Preto.

Por outro lado, todos os pontos de coleta e de coleta das amostras, considerando aquelas que foram monitoradas em períodos diferentes e que apresentaram concentrações de cromo total igual ou superior a 0,05 mg/L, foram provenientes da zona urbana do município de São José do Rio Preto (Tabela 1). Do total dos 12 locais coletados em sistema de abastecimento público, canalizada, fluoretada e tratada (A a L), cerca de 80% referiram-se a residências e o restante foram provenientes do comércio. Este fato pode indicar a possível exposição da população ao consumo de água fora dos padrões preconizados pela legislação brasileira, o que em longo prazo pode ocasionar a vulnerabilidade para a saúde humana.

Além disso, a análise dos resultados encontrados apontou que, para aquelas amostras que foram coletadas em períodos distintos, quando ocorreram as concentrações mais elevadas de cromo total (A a F, e H a K), para as amostras A, B e E, houve aumento da concentração de cromo total ao longo do tempo de coleta, enquanto que para as amostras C, D, F, H, I, J e K verificou-se decréscimo dos níveis de cromo total. Para os locais representados pelas amostras G e L, houve apenas uma coleta.

Apesar de o presente estudo indicar resultados de concentrações de cromo total nas amostras de água para consumo, para aqueles que se apresentaram acima do valor máximo permitido pela legislação, estes estão, de modo geral, abaixo dos valores máximos apontados em outras pesquisas realizadas em diferentes países, como Grécia (entre < 2 e 180 µg/L)^{9,11,25,26}; Estados Unidos (entre < 0,01 e 60 µg/L)^{27,28}; Sérvia (entre 1,0 e 27,8 µg/L)²⁹; Austrália (entre 10 e 430 µg/L)³⁰; Itália (entre 5 e 73 µg/L)³¹ e Islândia (entre <0,01 e 600 µg/L)³².

Tabela 1. Concentrações de cromo total obtidas nas amostras analisadas de água para consumo humano coletadas em diferentes pontos de distribuição de manancial subterrâneo do município de São José do Rio Preto/SP, no período de 2013 a 2017, e respectivos valores de incerteza expandida

Amostra	Origem do ponto de coleta	[Cr] (mg/L)*	U (mg/L)**
1	SAI/C/NT/LC: zona rural	0,017	0,001
2	SAC/C/NT/LC: zona rural	0,019	0,002
3	SAC/C/T/LC: distrito industrial	0,021	0,002
4	SAC/C/T/LC: distrito industrial	0,020	0,002
5	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,028	0,002
6	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,041	0,003
7	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,037	0,003
8	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,033	0,003
9	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,030	0,003
10	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,026	0,002
11	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,018	0,001
12	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,053	0,004
13	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,039	0,003
14	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,031	0,003
15	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,021	0,003
16	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,051	0,004
17	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,067	0,006
18	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,061	0,005
19	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,061	0,005
20	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,060	0,005
21	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,015	0,001
22	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,021	0,002
23	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,028	0,002
24	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,020	0,002
25	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,018	0,002
26	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,031	0,003
27	AP/C/F/T/CV/LC: reservatório de distribuição de água	0,066	0,006
28	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,070	0,006
29	AP/C/F/T/CV/LC: reservatório de distribuição de água	0,059	0,005
30	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,062	0,005
31	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,015	0,001
32	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,020	0,002
33	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,028	0,002
34	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,019	0,002
35	AP/C/F/T/CV/LC: residência ou comércio	0,021	0,002
36	SAC/C/NT/LC: zona rural	0,016	0,001
37	SAI/C/NT/LC: zona rural	0,019	0,002
38	SAC/C/T/LC: distrito industrial	0,018	0,001
39	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,050	0,004
40	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,018	0,002
41	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,069	0,006
42	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,061	0,005
43	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,057	0,005
44	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,024	0,002
45	AP/C/F/T/CV/LC: reservatório de distribuição de água	0,009	0,001
46	AP/C/F/T/CV/LC: reservatório de distribuição de água	< LQ	-
47	AP/C/F/T/CV/LC: estação de tratamento de esgoto	0,021	0,002
48	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,034	0,003
49	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,033	0,003
50	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,027	0,002
51	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,028	0,002
52	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,016	0,001
53	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,027	0,002
54	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,023	0,002
55	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,024	0,002
56	AP/C/F/T/CV/LC: reservatório de distribuição de água	0,040	0,003

Continua na página 7/9

Continuação

57	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,033	0,003
58	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,025	0,002
59	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,019	0,002
60	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,019	0,002
61	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,018	0,002
62	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,018	0,002
63	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,018	0,002
64	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,017	0,001
65	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,018	0,002
66	AP/C/F/T/CV/LC: reservatório de distribuição de água	0,034	0,003
67	AP/C/F/T/CV/LC: estação de tratamento de esgoto	0,020	0,002
68	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,031	0,003
69	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,032	0,003
70	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,037	0,003
71	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,013	0,001
72	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,018	0,002
73	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,016	0,001
74	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,015	0,001
75	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,021	0,002
76	AP/C/F/T/CV/LC: reservatório de distribuição de água	0,035	0,003
77	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,033	0,003
78	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,022	0,002
79	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,022	0,002
80	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,016	0,001
81	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,015	0,001
82	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,016	0,001
83	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,015	0,001
84	AP/C/F/T/CV/LC: comércio	0,015	0,001
85	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,011	0,001
86	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,035	0,003
87	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,032	0,003
88	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,044	0,004
89	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,022	0,002
90	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,053	0,005
91	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,023	0,002
92	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,046	0,004
93	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,025	0,002
94	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,019	0,002
95	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,032	0,003
96	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,033	0,003
97	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,045	0,004
98	AP/C/F/T/CV/LC: reservatório de distribuição de água	0,021	0,002
99	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,052	0,004
100	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,023	0,002
101	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,045	0,004
102	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,030	0,003
103	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,018	0,002
104	AP/C/F/T/CV/LC: residência	0,034	0,003
Valor médio das concentrações ± desvio padrão (mg/L)**			0,030±0,015
Mediana das concentrações (mg/L)**			0,025
Valor mínimo de concentração (mg/L)			< LQ
Valor máximo de concentração (mg/L)			0,070

SAI/C/NT/LC – Solução Alternativa/Canalizada/Não Tratada/Local de Coleta

SAC/C/NT/LC – Solução Alternativa Coletiva/Canalizada/Não Tratada/Local de Coleta

SAC/C/T/LC – Solução Alternativa Coletiva/Canalizada/Tratada/Local de Coleta

AP/C/F/T/CV – Abastecimento Público/Canalizada/Fluoretada/Tratada/Cavalete/Local de Coleta

* valor médio obtido para n = 2

** com um nível de confiança de 95,45% e k = 2,28

*** para os cálculos, foram considerados somente valores acima do limite de quantificação

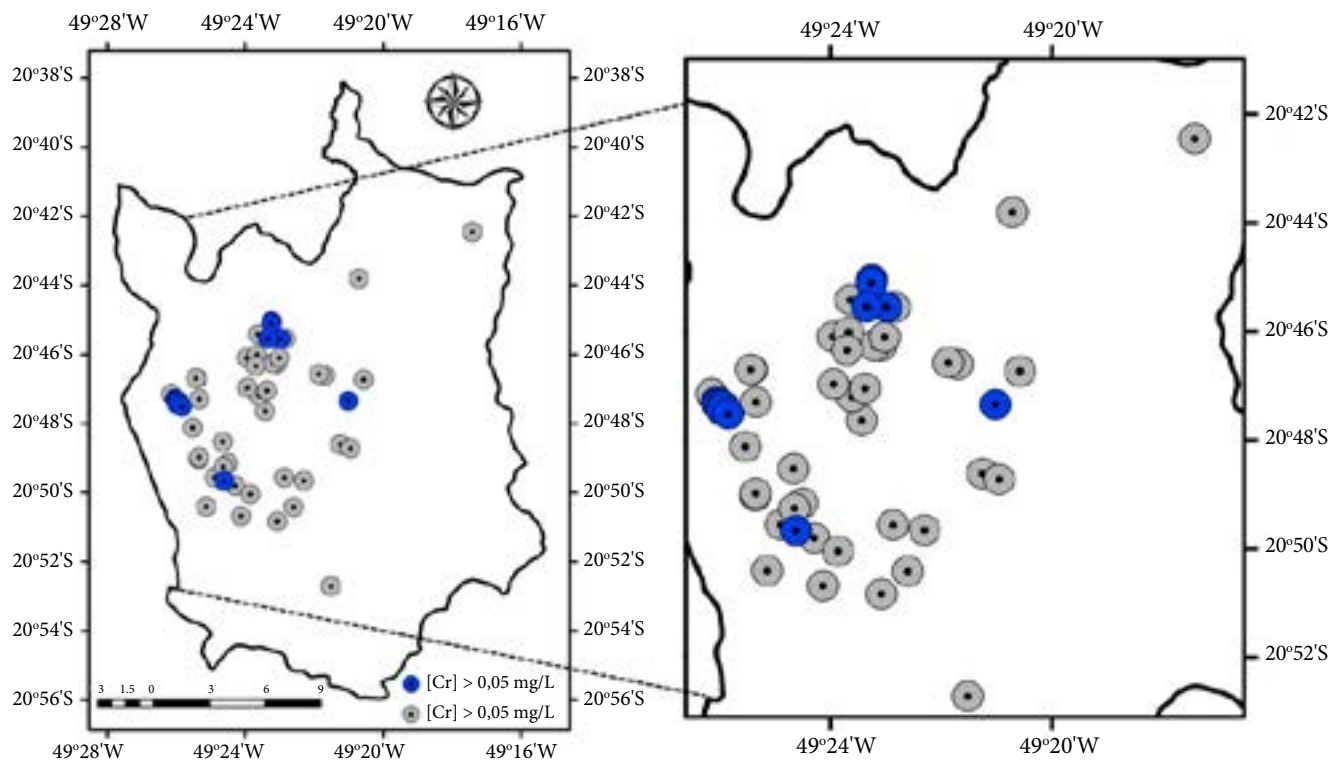


Figura 2. Mapa do município de São José do Rio Preto, indicando os locais em que as coletas para análise de cromo foram realizadas. Em azul, os locais onde a concentração de cromo encontrada foi maior do que o limite estabelecido pela legislação brasileira, e em cinza os locais onde a concentração de cromo não excedeu o limite da legislação. *Há pontos de coleta sobrepostos devido à proximidade de localização

Tabela 2. Níveis de cromo total e período de coleta e de recoleta (quando pertinente), referentes aos locais designados pela Vigilância Sanitária

Local	Amostra	Período de coleta	[Cr] (mg/L)
A. Comércio	8	Set/2014	0,033
	12	Dez/2014	0,053
	19	Jan/2015	0,061
	42	Set/2015	0,061
B. Residência	9	Set/2014	0,030
	13	Dez/2014	0,039
	20	Jan/2015	0,060
C. Residência	5	Set/2014	0,028
	16	Jan/2015	0,051
	39	Set/2015	0,050
	58	Jun/2016	0,033
D. Residência	78	Nov/2016	0,033
	6	Set/2014	0,041
	17	Jan/2015	0,067
D. Residência	40	Set/2015	0,018
	89	Jul/2017	0,022

Local	Amostra	Período de coleta	[Cr] (mg/L)
E. Comércio	7	Set/2014	0,037
	18	Jan/2015	0,061
F. Rede de distribuição de água	27	Jan/2015	0,066
	98	Jul/2017	0,021
G. Residência	28	Jan/2015	0,070
H. Residência	29	Jan/2015	0,059
	86	Jul/2017	0,035
I. Residência	30	Jan/2015	0,062
	97	Jul/2017	0,045
J. Residência	41	Set/2015	0,069
	90	Jul/2017	0,053
K. Residência	43	Set/2015	0,057
	50	Jun/2016	0,027
	70	Nov/2016	0,037
L. Residência	99	Jul/2017	0,052

Os valores obtidos no presente estudo foram também inferiores àqueles encontrados em estudos realizados anteriormente na mesma região, com valores de Cr variando de 0,48 a 139 $\mu\text{g/L}$ ^{14,16,24}. Cabe ressaltar que a concentração elevada de cromo não tem origem em ações antrópicas, mas sim naturais, já que os maiores níveis de concentração foram encontrados em amostras de água coletadas em maiores profundidades^{14,16,24}. Embora esta pesquisa tenha levado em consideração apenas cromo total, como indicado na legislação brasileira, é importante notar que, devido à baixa solubilidade comparativamente de Cr (III) ($< 0,005 \text{ mg/L}$) dentro da faixa de pH comum de águas naturais (6,5-8,5), é esperado que a forma hexavalente predomine sempre que ocorrer um aumento dos níveis de cromo naturalmente³³.

Os níveis de cromo médios obtidos em cada estágio de estudo podem estar associados à sazonalidade, conforme assinalado na , na qual os baixos índices pluviométricos correspondem a maiores concentrações de cromo total nas amostras. Nos anos de 2014, 2015 e 2017, onde os índices pluviométricos foram mais baixos, a concentração média de cromo foi mais alta. Outros estudos, porém, registraram concentrações mais elevadas de cromo em período chuvoso, revelando influência da sazonalidade, pois a chuva pode promover a maior lixiviação do metal das rochas. Estas conclusões diferem dos valores encontrados no presente estudo.

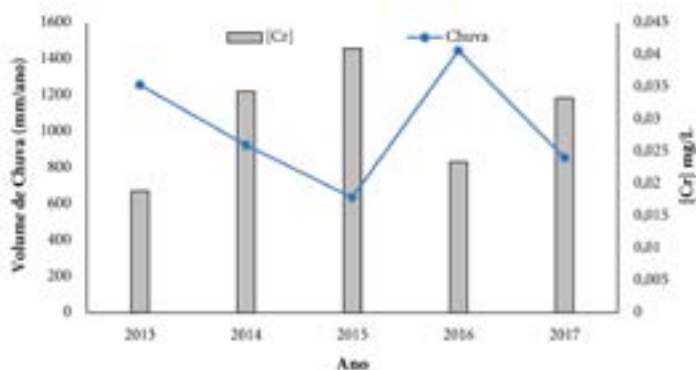


Figura 3. Concentrações médias de cromo total obtidas nos diferentes períodos de estudo, considerando valores de precipitação pluviométrica

Fonte: CIIAGRO³⁴

CONCLUSÃO

O cromo é um elemento que se distribui pela região de São José do Rio Preto em concentrações similares. Porém, observaram-se valores anômalos em pontos localizados na zona urbana. Do total de amostras analisadas cerca de 15% excederam o valor máximo permitido pela legislação brasileira pertinente à época do estudo, de 0,05 mg/L , e todos os pontos de coleta das referidas amostras foram oriundos de sistema de abastecimento público, canalizada, fluoretada e tratada, e localizavam-se em região residencial e comercial do município de São José do Rio Preto. Estes resultados apontam para possíveis riscos à saúde humana quando da ingestão da água.

Os níveis de cromo médios obtidos em cada período de estudo podem estar associados à sazonalidade, onde os baixos índices pluviométricos correspondem às maiores concentrações de cromo obtidas.

A avaliação do presente estudo visa contribuir e fornecer subsídios aos serviços de abastecimento de água e aos órgãos de vigilância em saúde do município, na avaliação da qualidade da água fornecida à população, bem como na proteção do aquífero.

Os resultados obtidos no presente estudo também reforçam a importância de se efetivar a monitoração constante da água para consumo humano na região de São José do Rio Preto, de forma a evitar a exposição da população a níveis elevados de cromo.

REFERÊNCIAS

- Freitas EC, Rocha O. Acute and chronic toxicity of chromium and cadmium to the tropical cladoceran *pseudosida ramosa* and the implications for ecotoxicological studies. *Environ Toxicol*. 2014;29(2):176-86. <https://dx.doi.org/10.1002/tox.20784>
- Pereira CD, Techy JG, Ganzarolli EM, Quináia SP. Chromium fractionation and speciation in natural waters. *J. Environ. Monit*. 2012;14(6):1559-64. <https://dx.doi.org/10.1039/C2EM10949B>

3. Linos A, Petralias A, Christophi CA, Christoforidou E, Kouroutou P, Stoltidis M et al. Oral ingestion of hexavalent chromium through drinking water and cancer mortality in an industrial area of Greece – an ecological study. *Environ Health*. 2011;10:50. <https://dx.doi.org/10.1186/1476-069X-10-50>
4. Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Subcommittee on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, DRI Dietary Reference Intakes. Application in Dietary Assessment. Washington (DC): National Academy Press;2000. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK222890/>
5. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União. Brasília, DF, [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html
6. Official Journal of the European Communities. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083&from=EN>
7. Perloth NH, Castelo Branco CW. Current knowledge of environmental exposure in children during the sensitive developmental periods. *J Pediatr (Rio J)*. 2017;93(1):17-27. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2016.07.002>
8. Ferguson A, Penney R, Solo-Gabriele H. A review of the field on children's exposure to environmental contaminants: A risk assessment approach. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(3):pii:E265. <https://dx.doi.org/10.3390/ijerph14030265>
9. Kowalski KP, Nielsen SS, Jensen PE, Larsen TH, Terkelsen M, Bagge C et al. Feasibility of integration of an electro-dialytic process into soil remediation procedure for removal of copper, chromium and arsenic. International Conference Contaminated sites; 2015 may; Bratislava. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: http://orbit.dtu.dk/files/112268031/Kowalski_ContSites_paper_release_1.pdf
10. Kaprara E, Kazakis N, Simeonidis K, Coles S, Zouboulis AI, Samaras P et al. Occurrence of Cr (VI) in drinking water of Greece and relation to the geological background. *J Hazard Mater*. (2015);281:2-11. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.084>
11. Izbicki JA, Wright M, Seymour WA, McCleskey RB, Fram MS, Belitz K et al. Cr (VI) occurrence and geochemistry in water from public-supply wells in California. *Appl Geochem*. 2015;63:203-17. <https://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.08.007>
12. Moraetis D, Nikolaidis NP, Karatzas GP, Dokou Z, Kalogerakis N, Winkel LHE et al. Origin and mobility of hexavalent chromium in North-Eastern Attica, Greece. *Appl Geochem*. 2012;27(6):1170-8. <https://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2012.03.005>
13. Gotkowitz MB, McLaughlin PI, Grande JD. Sources of naturally occurring chromium in bedrock aquifers underlying Madison, Wisconsin. Wisconsin Geological & Natural history survey; 2012. 17p. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: <http://wgnhs.uwex.edu/pubs/wofr201208/>
14. Bertoloto R, Bourotte C, Hirata R, Marcolan L, Sracek O. Geochemistry of natural chromium occurrence in a sandstone aquifer in Bauru Basin, São Paulo State, Brazil. *Appl Geochem*. 2011;26(8):1353-63. <https://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.05.009>
15. Bourotte C, Bertoloto R, Almodovar ML, Hirata R. Natural occurrence of hexavalent chromium in a sedimentary aquifer in Urânia, State of São Paulo, Brazil. *An Acad Bras Ciênc*. 2009;81(2):227-42. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652009000200009>
16. Hirata R, Zoby JLG, Oliveira FR. Água subterrânea: reserva estratégica ou emergencial. In: Bicudo CEM, Tundisi JG, Scheuenstuhl, MCB, organizadores. Águas do Brasil: análises estratégicas. São Paulo (SP): Instituto de Botânica; 2010. 222 p. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/downloads/%C3%A1gua%20subterr%C3%A2nea%20-%20reserva%20estrat%C3%A9gica%20ou%20emergencial.pdf>
17. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB. Governo do Estado de São Paulo/ Secretaria do Meio Ambiente. Qualidade das águas subterrâneas no Estado de São Paulo, 2013-2015. São Paulo;2016. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: http://cetesb.sp.gov.br/aguas-subterraneas/wp-content/uploads/sites/13/2013/11/Cetesb_QualidadeAguasSubterraneas2015_Web_20-07.pdf

18. São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente, Instituto Geológico; Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos. Cadernos do Projeto Ambiental Estratégico Aquíferos, Número 4. Projeto São José do Rio Preto. Restrição e Controle de Uso de Água Subterrânea. São Paulo;2011. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: <http://www.igeologico.sp.gov.br/downloads/livros/SJRP.pdf>
19. Carvalho AM. Modelagem numérica como ferramenta para a gestão das águas subterrâneas em São José do Rio Preto, SP [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo;2013. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/44/44138/tde-25092014-101823/pt-br.php>
20. Long SE, Martin TD, Martin ER. Method 200.8 Determination of trace elements in waters and waste by inductively coupled plasma-mass spectrometry. Creed JT, Brockhoff CA, Martin TD. Revision 5.4; 1994. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: [https://yosemite.epa.gov/oa/eab_web_docket.nsf/Attachments%20By%20ntFilingId/482881CDAF52A73985257D55005D9BEB/\\$FILE/EPA%20Method%20200.8%20\(00608866xB76D6\).pdf](https://yosemite.epa.gov/oa/eab_web_docket.nsf/Attachments%20By%20ntFilingId/482881CDAF52A73985257D55005D9BEB/$FILE/EPA%20Method%20200.8%20(00608866xB76D6).pdf)
21. Ellison SLR, Williams A, editors. Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 3.ed. Eurachem/CITAC;2012. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf
22. Association of Official Agricultural Chemists - AOAC. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. AOAC International;2016. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: http://www.eoma.aoc.org/app_f.pdf
23. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO. Escopo da acreditação – ABNT NBR ISO/IEC 17025 – Ensaio. Acreditação Nº CRL 0679. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/laboratorios/rble/docs/CRL0679.pdf>
24. Bertolo RA, Marcolan LNO, Bourette CLM. Relações água-rocha e a hidrogeoquímica do cromo na água subterrânea de poços de monitoramento multiníveis de Urânia, SP, Brasil. *Geol USP Sér. Cient*, São Paulo. 2009;9(2):47-62. <http://dx.doi.org/10.5327/Z1519-874x2009000200003>
25. Economou-Eliopoulos M, Megremi I, Vasilatos C. Factors controlling the heterogeneous distribution of Cr (VI) in soil, plants and groundwater: Evidence from the Assopos basin, Greece. *Chem Erde*. 2011;71:39–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemer.2011.01.001>
26. Kelepertzis E. Investigating the sources and potential health risks of environmental contaminants in soils and drinking waters from the rural clusters in Thiva area (Greece). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2014;100:258-65. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.09.030>
27. Ball JW, Izbicki JA. Occurrence of hexavalent chromium in ground water in the western Mojave Desert, California. *Appl Geochem*. 2004;19(7):1123-35. <https://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2004.01.011>
28. Gonzalez AR, Ndung'u K, Flegal AR. Natural occurrence of hexavalent chromium in the Aromas Red Sands Aquifer, California. *Environ Sci Technol*. 2005;39(15):5505-11. <https://dx.doi.org/10.1021/es048835n>
29. Devic G, Djordjevic D, Sakan S. Natural and anthropogenic factors affecting the groundwater quality in Serbia. *Sci Total Environ*. 2014;468-469:933-42. <https://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.011>
30. Gray DJ. Naturally occurring Cr⁶⁺ in shallow groundwaters of the Yilgarn Craton, Western Australia. *Geochemistry: Exploration, Environment, Analysis*. 2003;3(4):359-68. <https://dx.doi.org/10.1144/1467-7873/03-012>
31. Fantoni D, Brozzo G, Canepa M, Cipolli F, Marini L, Ottonello G, Zuccolini M. Natural hexavalent chromium in groundwaters interacting with ophiolitic rocks. *Environ Geol*. 2002;42(8):871-82. <https://dx.doi.org/10.1007/s00254-002-0605-0>
32. Stefánsson A, Gunnarsson I, Kaasalainen H, Arnósson S. Chromium geochemistry and speciation in natural waters, Iceland. *Appl Geochem*. 2015;62:200-6. <https://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2014.07.007>
33. Coimbra CD, Carvalho G, Philippini H, Silva MFM, Neiva E. Determinação da concentração de metais traço em sedimentos do estuário do Rio Maracaípe – PE/Brasil. *Braz J Aquat Sci Technol*. 2015;19(2):58-75. <https://dx.doi.org/10.14210/bjast.v19n2.4863>
34. Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas – CIIAGRO. Portal do Estado de São Paulo. Monitoramento climatológico: Início da Estação EMA: 08/03/2008 até 20/09/2017. Município: São José do Rio Preto. [acesso 2018 Abr 25]. Disponível em: http://www.udop.com.br/download/estatistica/economia_chuvas/2008a2017_historico_sjose_rio_preto.pdf



Atividade *in vitro* do extrato etanólico de própolis e do digluconato de clorexidina sobre as espécies de *Candida* isoladas da mucosa bucal de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI)

In vitro activity of ethanolic extract of propolis and chlorhexidine digluconate on *Candida* species isolated from the oral mucosa of patients hospitalized in the Intensive Care Unit (ICU)

RIALA6/1750

Maria Luisa MAKABE¹, Patricia de Souza SANTOS², Maria de Fátima Costa PIRES^{2*}

*Endereço para correspondência: ²Núcleo de Microscopia Eletrônica, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2909. E-mails: patyfatima@hotmail.com; mfpieres@saude.sp.gov.br

¹Faculdade de Odontologia, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 25/06/2018 - Aceito para publicação 15/10/2018

RESUMO

Avaliou-se a atividade dos extratos de própolis e digluconato de clorexidina em *Candida sp* isoladas da mucosa bucal de pacientes em UTI. Foram determinadas as concentrações fungicidas mínimas (CFM) e comparadas, nas doses sub-inibitórias, à produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e formação de franjas. Em 72 isolados foram avaliadas a atividade antifúngica pela técnica de microdiluição em série, na “base 2”, a produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase, e a formação de franjas, antes e após a exposição às própolis e clorexidina. Dos 72 isolados, 53 eram *C. albicans*, 11 *C. tropicalis*, quatro *C. guilhermondii* e quatro sugestivas de *C. dubliniensis*. CFM 90% do extrato de própolis foi de 5% para *C. albicans*, 20% *C. tropicalis*, 0,625% *C. guilhermondii* e 0,312% sugestivas de *C. dubliniensis*. CFM 90% da clorexidina foi de 0,0018% para *C. albicans*, 0,012% *C. tropicalis*, de 0,0018% *C. guilhermondii* e de 0,00375% sugestivas de *C. dubliniensis*. Ocorreu inibição das exoenzimas e franjas, em ambos os produtos. Apesar da inibição da clorexidina ser menor que a da própolis, seu uso diário não causa efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar e sensação de queimação na mucosa bucal.

Palavras-chave. *Candida albicans*, própolis, clorexidina.Z.

ABSTRACT

The activity of propolis extract and chlorhexidine digluconate on *Candida sp* isolated from oral mucosa of patients in ICU was evaluated. The minimum fungicidal concentrations (MFC) were determined, and also the production of proteinase and phospholipase exoenzymes and the fringe formation. Seventy-two isolates were used and identified by the API 20C AUX® System. The antifungal activity was evaluated by “at base 2” serial microdilution technique. Also the exoenzymes production (proteinase and phospholipase), the fringes formation, before and after being exposed to propolis and chlorhexidine, were analysed. Of 72 isolates, 53 were *C. albicans*, 11 *C. tropicalis*, four *C. guilhermondii* and four suggestive *C. dubliniensis*. The MFC 90% of propolis extract was 5% *C. albicans*, 20% *C. tropicalis*, 0.625% *C. guilhermondii*; and 0.312% suggestive of *C. dubliniensis*. MFC 90% of chlorhexidine was 0.0018% *C. albicans*, 0.012% *C. tropicalis*, 0.0018% *C. guilhermondii* and 0.00375% suggestive of *C. dubliniensis*. The inhibition of exoenzymes and fringes occurred in the both products. Although the inhibition of chlorhexidine is lower than that showed by propolis, its daily use neither cause undesirable side effects as blemishes on the teeth and tongue, nor the loss of the taste and the burning sensation in the oral mucosa.

Keywords. *Candida albicans*, propolis, chlorhexidine.

INTRODUCTION

Candida albicans é a espécie responsável pelo maior número de casos de morbidade e mortalidade em indivíduos hospitalizados infectados por fungos, pois podem causar infecções tanto superficiais como sistêmicas¹. Apesar de *C. albicans* ter sido a espécie mais isolada, nos últimos anos houve um aumento do número de infecções invasivas por espécies não-*albicans*, como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, entre outras e mais recentemente por *Candida auris*^{2,3}.

Os focos de infecção na boca têm sido associados ao comprometimento da saúde do indivíduo, e tem despertado o interesse de médicos e dentistas⁴. A infecção nosocomial é frequente e de elevada mortalidade em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Podem-se dividir as infecções em exógenas, quando o agente patogênico infectante é adquirido no meio externo, ou endógenas quando este pertence à microbiota do hospedeiro. O paciente na UTI é colonizado precocemente por agentes potencialmente patogênicos adquiridos no meio externo. E estes modificam a microbiota residente de tal maneira que as infecções endógenas podem ser subdivididas em primárias (infecções produzidas pela microbiota do paciente) e secundárias (infecções produzidas pela microbiota adquirida em UTI)⁵.

As leveduras, como muitos micro-organismos patogênicos, possuem fatores de virulência que têm um papel essencial na evolução do processo infeccioso⁶.

Os fungos representam um grande desafio no desenvolvimento de substâncias terapêuticas, considerando-se as semelhanças que existem entre a célula fúngica e a célula humana. Uma grande quantidade de medicamentos obtida da síntese orgânica é utilizada no tratamento de infecções fúngicas. Os antissépticos como tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzóico, derivados sulfamídicos, quinonas e antifúngicos poliênicos como a nistatina e anfotericina são amplamente utilizados nesta terapia^{7,8}. Além disso, há os azóis (cetoconazol, econazol, sulconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol, voriconazol), alilaminas (naftina, terbinafina), hidroxipiridona,

morfolina, compostos de selênio e anfotericina B lipossomal⁷.

O fluconazol é o medicamento antifúngico mais utilizado no tratamento das candidíases⁹. Mas, *C. albicans* tem demonstrado uma crescente resistência a este medicamento, bem como aos outros antifúngicos existentes no mercado¹⁰. Nova espécie de *Candida* também tem demonstrado ser mais resistente aos antifúngicos de primeira linha¹¹.

Existe urgência na descoberta de novos fármacos em função destas resistências. A literatura, há tempos, relata a atividade antimicrobiana de extratos naturais, extraídos das mais diversas fontes.

Própolis é uma substância resinosa, elaborada pelas abelhas a partir da coleta de exsudados das plantas que rodeiam as colmeias, e estes são adicionados às secreções salivares e às ceras produzidas pelas abelhas. É utilizada como proteção contra os micro-organismos na colmeia, e para embalsamar pequenos animais mortos (besouros e insetos), para evitar putrefação, infecções e doenças¹². Reconhecida pelas suas propriedades medicinais por médicos gregos e romanos, como Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno, a própolis foi empregada como antisséptico e cicatrizante no tratamento de feridas de soldados em batalhas, bem como “desinfetante” bucal. Própolis possui cheiro característico e mostra propriedades adesivas por interagir fortemente com os óleos e proteínas da pele^{13,14}.

O interesse em se pesquisar a própolis aumentou consideravelmente e este fato está associado às suas várias propriedades biológicas^{15,16}. A própolis tem se destacado pela sua aplicabilidade na indústria de alimentos e cosméticos, e por ser utilizada como princípio ativo em vários produtos, como dentifrícios e cremes dermatológicos¹⁷.

Os estudos sobre o uso e a aplicação da própolis já foram realizados em diferentes especialidades da odontologia, entre elas na cariologia, cirurgia bucal, endodontia e periodontia¹⁸. O emprego de produtos naturais na clínica odontológica tem sido justificado pelo seu uso popular, por seu baixo custo e pelos efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios¹⁵.

A solução aquosa de digluconato de clorexidina possui amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos filamentosos, leveduras e vírus lipofílicos.

Possui permanência ativa de 12 horas na cavidade bucal e é comumente utilizada como solução aquosa na concentração de 0,12%¹⁹.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade do extrato etanólico de própolis a 20% e de digluconato de clorexidina a 0,12% sobre *C. albicans* e não-albicans, isoladas da mucosa bucal de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). E também, para determinar as concentrações fungicidas mínimas e comparar antes e após o contato com extrato etanólico de própolis e digluconato de clorexidina nas doses sub-inibitórias, a produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e as características fenotípicas das leveduras. Espera-se com este estudo identificar o produto mais adequado na higienização bucal de pacientes internados em UTI.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 72 isolados de leveduras da mucosa bucal de pacientes adultos, de ambos os sexos, internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um Hospital Público na cidade de São Paulo. Em função da situação dos pacientes, o convite para a participação na pesquisa foi realizado aos respectivos parentes ou responsáveis. Após serem devidamente esclarecidos, os responsáveis consentiram voluntariamente que os pacientes participassem da pesquisa, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Como critério de inclusão para participarem nesta pesquisa, os pacientes deveriam ser: maiores de 18 anos e não serem portadores de deficiência mental.

Para a pesquisa de leveduras, a coleta das amostras foi realizada na mucosa jugal com o auxílio de swabs estéreis umedecidos em solução fisiológica 0,85%. Para o isolamento das leveduras, o material contido nos swabs foi semeado em placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose (Difco), e acrescido de 200 µg/mL de cloranfenicol. As placas foram identificadas e incubadas a 25°C até 7 dias.

O extrato etanólico de própolis na concentração a 20% foi adquirido da empresa Apis Flora®, localizada na cidade de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo.

O digluconato de clorexidina foi adquirido da Índia pela empresa Deg Importação de Produtos Químicos LTDA na concentração de 20%. Para o uso,

este reagente foi diluído em água destilada estéril para obter a concentração de 0,12%; e este processamento foi realizado pela Farmácia de manipulação - Pró Manipulação localizada em São Paulo, SP.

Todos os isolados foram mantidos em ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA) e identificados no Sistema API 20C AUX da BioMerieux®. A produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase e a produção de franjas foram avaliadas antes e após o contato com a dose sub-inibitória, utilizando-se as técnicas descritas por Ruchel et al²⁰, Price et al²¹ e Hunter et al²², respectivamente. A atividade enzimática da proteinase e da fosfolipase foi observada pela formação de um halo de precipitação (proteinase) e de degradação (fosfolipase) ao redor da colônia (PZ). PZ é igual à razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia (dc) + diâmetro de precipitação (zd), $PZ = dc/dc + zd$, sendo $Pz = 1,0$ - ausência de produção; $1,0 < Pz < 0,64$ - produtor; $Pz < 0,64$ - altamente produtor.

A produção de franjas foi avaliada analisando-se os aspectos macro-morfológicos da franja, de acordo com o modelo de tipificação de Hunter et al²²: 1º Franja - distribuição: Ausente (0); Descontínua (>20% da margem) (1); Descontínua (21 a 50% da margem) (2); Descontínua (51 a 90% da margem) (3); Contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leques (5); Contínuas com filamentos paralelos (7). 2º Franja- comprimento: Ausente (0); Igual ou menor do que 2 mm (2), De 3 a 5 mm (3); Igual ou maior do que 6 mm (5).

A atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis (a partir de 20%) e do digluconato de clorexidina (a partir de 0,12%) foi pesquisada utilizando-se o teste de microdiluição em série, na “base 2”, em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), sem adição de solvente ou produto tensoativo.

Neste teste foram incluídos (i) controle negativo - para verificar a esterilidade do meio de RPMI-1640, (ii) controle negativo do extrato etanólico de própolis e (iii) controle positivo para crescimento da levedura (meio + inóculo). Foi ainda utilizado o etanol a 58°GL, como controle do extrato etanólico de própolis.

A concentração fungicida mínima (CFM) foi obtida semeando-se 5µL de cada microdiluição (amostra) em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose, e incubadas a 37°C durante 24 h.

Considerações éticas

A presente pesquisa seguiu inicialmente a Resolução 196/96 e na seqüência 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (Brasil 2012). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Nove de Julho, sob o protocolo n° 293253 - PH/CEP.

RESULTADOS

Dos 72 isolados de leveduras identificados, 53 foram *C. albicans*, 11 *C. tropicalis*, quatro *C. guilhermondii* e quatro sugestivas de *C. dubliniensis*.

O etanol 58°GL não interferiu na inibição do crescimento em nenhum dos 72 isolados de leveduras.

As concentrações fungicidas mínimas (CFM) do extrato etanólico de própolis e de digluconato de

clorexidina estão apresentadas na **Tabela**.

Quanto à atividade do extrato etanólico de própolis sobre a produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase, observou-se que antes do contato com o extrato de própolis, dos 53 isolados de *C. albicans*, 26 (49,05%) foram produtores de proteinase, um (1,90%) foi altamente produtor e 26 (49,05%) não produtores. Após o contato com o extrato de própolis, 23 (88,46%) dos 26 isolados de *C. albicans* deixaram de produzir esta enzima. Três (11,54%) isolados passaram de produtor para altamente produtor, e um não produtor passou a produzir esta enzima. Para *C. tropicalis*, três (27,27%) isolados produziram proteinase; mas após o contato com o extrato de própolis, os três isolados deixaram de produzir a referida enzima e oito dos 11 isolados mantiveram-se não produtores. *C. guilhermondii* (4/4) não produziram esta enzima, e este comportamento se manteve mesmo após o contato com o extrato de própolis. Quatro isolados sugestivos de *C. dubliniensis* não foram produtores;

Tabela. Atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis e digluconato de clorexidina sobre as leveduras isoladas da mucosa bucal de pacientes internados em UTI

Amostras: 72 Isolados	*Extrato etanólico de Própolis	**CFM 90- do Extrato etanólico de Própolis	*Digluconato de clorexidina	**CFM 90 do Digluconato de clorexidina
<i>C. albicans</i> - 53 isolados	100% inibição (53/53)	5%	88,7% inibição (47/53)	0,0018%
<i>C. tropicalis</i> - 11 isolados	90,9% inibição (10/11)	20%	81,8% inibição (09/11)	0,00012%
<i>C. guilhermondii</i> - 04 isolados	100% inibição (04/04)	0,63%	100% inibição (04/04)	0,0018%
Sugestiva de <i>C. dubliniensis</i> - 04 isolados	100% inibição (04/04)	0,31%	100% inibição (04/04)	0,00375%

*Pesquisa de Concentração inibitória mínima (CIM) em placas de microdiluição e leitura em 24; resultados em porcentagem

**Pesquisa da Concentração fungicida mínima CFM em placas de ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas; resultado em porcentagem

CFM 90 de antifúngico capaz de inibir o crescimento de 90% dos isolados

mas passou a produzi-los após o contato com o extrato de própolis (25%).

A produção de fosfolipase por *C. albicans* ocorreu em 71,70% (38/53) dos isolados e após o contato com o extrato de própolis, a produção desta enzima foi inibida em 81,57% (31/38) isolados. Sete (18,43%) isolados mantiveram a produção de fosfolipase, e oito (15,10%) isolados foram altamente produtores. E após o contato com o extrato de própolis deixaram de produzi-la e um isolado não-produtor passou a ser produtor.

Dos 11 isolados de *C. tropicalis*, oito (72,72%) foram produtores dessa enzima; e após o contato com o extrato de própolis, todas deixaram de produzi-la. O mesmo fato ocorreu com os isolados de *C. guilhermondii* (4/4) e com as cepas sugestivas de *C. dubliniensis* (4/4).

Após o contato de *C. albicans* com a clorexidina, 73,10% (19/26) dos isolados mantiveram-se produtores, oito (30,76%) deixaram de produzir e um isolado diminuiu a produção. Em *C. tropicalis*, 27,27% (3/11) foram produtores, e após o contato com a clorexidina 66,66% (2/3) deixaram de produzir e um manteve a produção de proteinase. Para *C. guilhermondii*, os quatro (100%) isolados não produtores passaram a produzir, após o contato com a clorexidina. Para as sugestivas de *C. dubliniensis*, 100% (4/4) não produziram esta enzima e assim se mantiveram após o contato com a clorexidina.

A produção de fosfolipase ocorrida após o contato de *C. albicans* com a clorexidina, 36,84% (14/38) dos isolados deixaram de produzir esta enzima, 63,16% (24/38) mantiveram a produção, quatro isolados altamente produtores deixaram de produzir e um considerado não-produtor passou a produzir. Quanto aos 11 isolados de *C. tropicalis*, após o contato com a clorexidina, 62,50% (5/8) deixaram de produzir, 25% (2/8) aumentaram a produção e um passou a produzir esta enzima. Os quatro (100%) isolados de *C. guilhermondii* mantiveram a sua produção, mesmo após o contato com a clorexidina. Dos quatro (100%) isolados das amostras sugestivas de *C. dubliniensis*, 50% (2/4) mantiveram a produção e 50% (2/4) aumentaram a produção de fosfolipase após o contato com a clorexidina.

A produção de franjas foi também estudada antes e após o contacto com o extrato etanólico de própolis e digluconato de clorexidina. Antes do

maior número de pacientes infectados por fungos e hospitalizados. Contudo, as espécies de *Candida não-albicans* tornaram-se importantes no acometimento desta infecção em indivíduos com sistema imunológico comprometido²³.

C. albicans são difíceis de erradicar, uma vez que estas leveduras podem apresentar resistência à maioria dos antifúngicos atualmente utilizados²⁴.

As leveduras são de ocorrência comum na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sendo *C. albicans* a espécie predominante na microbiota da boca, a qual corresponde à proporção de 60 a 70% do total de isolamento, seguida pela *C. tropicalis* e *C. glabrata*²⁵.

As dificuldades relacionadas ao tratamento das candidíases, associadas ao controle de infecções, são fatores importantes para a descoberta de novos agentes antifúngicos, com amplo espectro de atividade anti-*Candida* e no combate de isolados resistentes às drogas já em uso.

A investigação de produtos naturais com atividade antimicrobiana tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, motivados principalmente pelo aumento da resistência microbiana aos agentes antimicrobianos tradicionais e aos efeitos adversos²⁶.

Atualmente, inúmeros produtos para higiene bucal e controle da microbiota bucal encontram-se disponíveis no mercado. E cabe aos profissionais de saúde e às pessoas responsáveis pela aquisição destes produtos em procurar informações dentro da ampla literatura existente sobre sua eficácia, posologia e principalmente a indicação.

Novos compostos naturais foram investigados para mudar este quadro, como os produtos derivados de plantas que podem agir como antifúngicos^{27,28}, bem como os opoterápicos e os óleos essenciais que são substâncias aromáticas, voláteis e hidrofóbicas²⁹.

No presente estudo utilizou-se o extrato etanólico de própolis até a concentração de 20% e o digluconato de clorexidina até a concentração de 0,12%, para avaliar *in vitro* a atividade antifúngica sobre *C. albicans* e *não-albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes internados em UTI. Apesar de estes produtos apresentarem reconhecida atividade antimicrobiana, sua utilização para uma possível higiene bucal nesses pacientes ainda não havia sido realizada. Para tanto, foram inicialmente efetuados o isolamento e os testes de sensibilidade para leveduras

em função de sua reconhecida resistência. A escolha desses produtos se deu pela fácil aquisição, baixo custo e poucos efeitos colaterais.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a própolis é um produto natural, de características físicas resinosas e de composição variável, coletada de várias espécies vegetais em adição às secreções da abelha. E esta é classificada como medicamento opoterápico. Os requisitos para realizar o seu registro estão definidos na RDC nº 132/2003.

Esta agência relata que o mencionado produto pode ser utilizado na concentração máxima de 20%.

A composição química da própolis inclui basicamente 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E³⁰. Os principais grupos químicos são flavonóides, terpenóides e fenilpropanóides³¹. A presença de diversos compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, explicam a grande variedade das propriedades terapêuticas da própolis³².

Ota et al³³ testaram a sensibilidade de *C. albicans* ao extrato etanólico de própolis, e observaram que as concentrações fungicidas mínimas contra os 15 isolados avaliados foi de 1,56%, o que mostrou o seu uso na prevenção de doenças bucais. Em 2001, estes mesmos autores avaliaram o efeito *in vitro* do extrato etanólico de própolis sobre 80 espécies de leveduras do gênero *Candidae*, e observaram que todas as cepas eram sensíveis a este extrato.

O extrato etanólico de própolis tem mostrado ação fungicida sobre as espécies como *C. albicans*, *C. parapsiloses*, *C. tropicalis* e *C. guilhermondii*, *C. cruzei*, *C. glabrata*, *C. lusitanea*, *C. stelladoidea*, *Sacaromyces cerevisiae*, *Geotrichum*, *Trichosporon* e *Rhodotorula*^{34,35}.

Santos et al³⁶ utilizaram o extrato etanólico de própolis a 10% e 20% e demonstraram a atividade antifúngica e antibacteriana nestas concentrações. Gomes et al³⁷ observaram que as cepas de *Candida* foram sensíveis a própolis nas concentrações de 5, 10, 15 e 20%.

Resultados semelhantes foram detectados no presente estudo, quando o extrato etanólico

de própolis inibiu o crescimento de 100% (53/53) dos isolados de *C. albicans*, *C. guilhermondii* (4/4) e as cepas sugestivas de *C. dubliniensis* (4/4) até a concentração de 20%. Para os isolado de *C. tropicalis*, a inibição ocorreu em 90,9% (10/11). A concentração fungicida mínima que inibiu 90% dos isolados pelo extrato etanólico de própolis foi de 5% para *C. albicans*, 20% para *C. tropicalis*, 0,625% para *C. guilhermondii* e de 0,312% para as sugestivas de *C. dubliniensis*.

Ota et al³⁸ relataram que apesar da ação antibacteriana da própolis estar bem estabelecida na literatura, pouco se mencionasuaação antimicrobiana sobre as leveduras; e a própolis foi efetiva sobre *C. albicans*, mesmo em concentrações mais diluídas.

A composição da própolis varia de acordo com as plantas encontradas na região da colmeia. Na Europa e América do Norte as substâncias são principalmente extraídas de árvores da espécie *Populus*. Em regiões tropicais, essa espécie não é nativa. Neste caso, as abelhas encontram outras plantas para efetuar a coleta de substâncias que tenham ação antimicrobiana similar. Esta ocorrência é de suma importância para a sobrevivência da colmeia e a atividade antimicrobiana da própolis deve ser atribuída ao conjunto dos seus componentes³⁹.

Schett³² correlacionou à atividade antimicrobiana do extrato de própolis de diversas regiões brasileiras com a quantidade de flavonóides, e observaram que o poder da ação antimicrobiana é diretamente proporcional à quantidade dessa substância.

Junior et al⁴⁰ avaliaram a atividade *in vitro* de extrato etanólico de própolis, produzido em três diferentes regiões, sobre cinco espécies de microrganismos como *C. albicans*. Os autores detectaram a ocorrência de diferença estatística da Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre os três extratos.

A clorexidina é um composto que, na sua estrutura, contém dois anéis clorofenólicos e dois bis-biguanida ligados simetricamente por meio de cadeias de hexametil. Esta bis-biguanida é uma base forte, com carga positiva, praticamente insolúvel em água. Por isto o seu uso na área de Odontologia

é preconizado em forma de sal digluconato, para proporcionar maior solubilidade à substância. Possui a propriedade de “substantividade” (retenção), pois permanece ativa e retida no local de ação (superfície dental, gengiva e mucosa bucal), e é liberada lentamente, para evitar que seu efeito seja rapidamente neutralizado⁴¹. É um agente químico de amplo espectro antimicrobiano, utilizado para efetuar a manutenção da saúde gengival e no tratamento da gengivite^{42,43}.

Quando absorvida, a clorexidina é rapidamente metabolizada no fígado, sendo excretada nas fezes pela bile. Em um estudo com ratos, 20% da dose de clorexidina marcada foram encontradas nos animais até cinco dias após o seu uso⁴².

Segundo Batista et al⁴², esta substância em baixas concentrações tem efeito bacteriostático e fungistático; e em altas concentrações tem ação bactericida e fungicida, provocando lise celular. Esta atividade é reduzida na presença de altas concentrações de soro, proteína, sangue e outros compostos orgânicos.

A clorexidina foi introduzida na Odontologia há mais de quarenta anos como soluções para enxaguar bocas, e apresenta ação de largo espectro contra bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras. Tem sido utilizada em diferentes fórmulas para o controle da placa dental. No Brasil, ela é frequentemente encontrada em soluções de enxague bucais na concentração de 0,12%, e também pode ser usada na concentração de 0,20%⁴³.

Há estudos que demonstraram a eficácia do digluconato de clorexidina a 0,12% na redução e na formação do biofilme bucal. Nesta concentração há redução dos efeitos adversos causados pela substância, quando em concentrações mais elevadas. Entretanto, o uso diário desta solução pode apresentar efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar e sensação de queimação na mucosa bucal. Por isso, outras formulações têm sido desenvolvidas para melhorar estes aspectos, e mantendo-se o adequado controle da formação do biofilme bucal. Neste sentido, a associação do xilitol com a clorexidina tem sido recomendada⁴⁴.

Este produto pode ter finalidade profilática e/ou terapêutica, em forma de solução para bochechos, verniz, gel, irrigação sub-gengival, dispositivos intra-orais de liberação lenta, entre outros veículos. Tem sido utilizada como padrão em relação a outros agentes antimicrobianos para antisepsia bucal⁴³⁻⁴⁵.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) indica o uso de digluconato de clorexidina, no formato de veículo bucal, a 0,12% ou a 0,20%, como uma das medidas recomendadas para a prevenção de pneumonias hospitalares e de mortalidade associada à ventilação mecânica. Esta medida tem o objetivo de erradicar a colonização bacteriana da orofaringe e reduzir a ocorrência de pneumonia associada à ventilação mecânica⁴⁶.

O digluconato de clorexidina tem sido ativo contra bactérias e leveduras, segundo Candido et al⁴⁷, e é um fato que foi confirmado no presente estudo. No trabalho de Candido et al⁴⁷, todas as cepas de *C. albicans* avaliadas foram sensíveis ao digluconato de clorexidina a 0,12% na concentração de 1,56%. No entanto, Ferguson et al⁴⁸ ao avaliarem a efetividade do digluconato de clorexidina a 0,20% sobre *C. albicans*, observaram que a concentração inibitória mínima para a levedura foi menor do que 0,19%.

O digluconato de clorexidina inibiu o crescimento de 88,7% (47/53) dos isolados de *C. albicans*, 100% dos isolados de *C. guilhermondii* (4/4) e de sugestivas de *C. dubliniensis* (4/4) até a concentração de 0,12%. Para os isolado de *C. tropicalis* a inibição ocorreu em 81,8% (9/11).

A concentração fungicida mínima que inibiu 90% dos isolados pelo digluconato de clorexidina foi de 0,0018% para *C. albicans*, 0,012% para *C. tropicalis*, de 0,0018 % para *C. guilhermondii* e de 0,00375 % para as sugestivas de *C. dubliniensis*.

As leveduras, como muitos micro-organismos patogênicos, possuem fatores de virulência que têm um papel essencial na evolução do processo infeccioso. Entre os principais fatores de virulência estão a produção de enzimas extracelulares, a produção e a extensão de franjas marginais, e na topografia das colônias. Mas não foram encontrados trabalhos que avaliassem o efeito da própolis e

da clorexidina sobre esses fatores de virulência.

Diante dos resultados obtidos e nas condições em que foi conduzido o presente estudo, pode-se concluir que os isolados de leveduras foram sensíveis ao digluconato de clorexidina até a concentração de 0,12% e o extrato etanólico de própolis até a concentração de 20%. O extrato etanólico de própolis inibiu 80,56% das leveduras isoladas até a concentração de 5%. A produção de exoenzimas proteinase e fosfolipase e a produção de franjas foram inibidas nas concentrações sub-inibitórias do digluconato de clorexidina e do extrato etanólico de própolis.

Apesar dos índices de inibição do digluconato de clorexidina tenham sido menores do que aqueles encontrados no extrato etanólico de própolis, a própolis torna-se viável pelo fato de ser um produto de origem natural. E o uso diário não causa efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar e sensação de queimação na mucosa bucal.

Espera-se que o presente estudo venha contribuir com mais um produto natural com atividade antifúngica sobre as leveduras do gênero *Candida*.

REFERÊNCIAS

1. Boonyasiri A, Jearanaisilavong J, Assanasen J. Candidemia in Siriraj Hospital: epidemiology and factors associated with mortality. *J Med Assoc Thai*. 2013;96(Suppl 2):S91-7.
2. Pupulin ÁR, Carvalho PG, Nakamura CV. Susceptibility to antifungal and enzyme production by *Candida* yeasts isolated from HIV/AIDS patients. *Salud(i)Ciencia*. 2014; 20(5):471-6.
3. Sears D, Schwartz BS. *Candida auris*: an emerging multidrug-resistant pathogen. *Int J Infect Dis*. 2017;63:95-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.08.017>
4. Gonçalves PE, Rodrigues NALR, Seixas FL. Ações de promoção de saúde bucal no âmbito hospitalar. *Rev. Ciênc. Méd., Campinas*. 2014; 23(1):15-23. <https://dx.doi.org/10.24220/2318-0897v23n1a2411>
5. Martins ST, Moreira M, Furtado GHCF, Marino CGJ, Machado FR, Wey SB et al. Application of control measures for infections caused by multi-resistant gram-negative bacteria in intensive care unit patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(3):331-4. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000300017>
6. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE. Microbiological identification and *in vitro* sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(3):272-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000300004>
7. Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO, Barbosa Júnior AM et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: Uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17(1):108-13. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100020>
8. Lee SC, Li A, Calo S, Heitman J. Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PloS Pathog*. 2013;9(9):e1003625. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003625>
9. Heizmann P, Klefisch F, Heizmann WR. Basic research - Significance of detection and clinical impact of *Candida albicans* in non-immunosuppressed patients. *Pharmacol Pharm*. 2011;2:354-60.
10. Khan MS, Malik A, Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2012;50(1):33-42. <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2011.582890>
11. López-Montéon A, Gómez-Figueroa FS, Ramos-Poceros G, Guzmán-Gómez D, Ramos-Ligonio A. Codetection of *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* by PCR in urine samples in a low-risk population attended in a clinic first level in central Veracruz, Mexico. *BiomeRes Int*. 2013;2013:281892. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/281892>

12. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid Based Complement. Alternat Med*. 2005;2(1):33-8. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/neh060>
13. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol*. 2007; 113(1):1-14. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.012>
14. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*. 2001;15(7):561-71.
15. Oliveira LC, Carneiro PP, Fischer RG, Tinoco EM. A presença de patógenos respiratórios no biofilme bucal de pacientes com pneumonia nosocomial. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2007;19(4):428-33.
16. Chan GC, Cheung KW, Sze DM. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;44(3):262-73. <https://dx.doi.org/doi:10.1007/s12016-012-8322-2>
17. Simões CC, Araújo DB, Araújo RPC. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Ver Braz Farmacon*. 2008;18(1):84-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000100016>
18. Gebara ECE, Lima LA, Mayer MPA. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Braz J Microbiol*. 2002;33(4):365-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822002000400018>
19. Huang M, Kao KC. Population dynamics and the evolution of anti fungal drug resistance in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett*. 2012;333(2):85-93. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02587.x>
20. Rùchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1982; 20(3):233-44.
21. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1982;20(1):7-14.
22. Hunter PR, Fraser CA. M. Application of a numerical index of discriminatory power to a comparison of four physiochemical typing methods for *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 1989;27(10):2156-60. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/jcm/27/10/2156.full.pdf>
23. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(5):599-07 <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000500010>
23. Budzýnska A, Sadowska B, Lipowczan G, Maciag A, Kalemba D, Rózalska B. Activity of selected essential oils against *Candida* spp. strains. Evaluation of new aspects of their specific pharmacological properties, with special reference to lemon balm. *Adv Microbiol*. 2013;3(4):317-25. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2013.34045>
25. Williams D, Lewis D. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol*. 2011;3:5771. <https://dx.doi.org/10.3402/jom.v3i0.5771>
26. Libério SA, Pereira AL, Araújo MJ, Dutra RP, Nascimento FR, Monteiro-Neto V et al. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J Ethnopharmacol*. 2009;125(1):1-9. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2009.04.047>
27. Abrantes MR, Lima EO, Medeiros MAP, Menezes CP, Guerra FQS, Milan EP. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não-albicans. *Rev Bras Farm*. 2013;94(3):227-33. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-v94n3-05.pdf>
28. Santana DP, Ribeiro TF, Ribeiro EL, Aquino GLB, Naves PLF. Ação de chalconas contra a formação de biofilme de *Candida albicans*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2015;36(1):83-90. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <http://seer.fcfa.unesp.br/rcfba/index.php/rcfba/article/view/211/119>
29. Matsuzaki Y, Tsujisawa T, Nishihara T, Nakamura M, Kakinoki Y. Antifungal activity of chemotype essential oils from rosemary against *Candida albicans*. *Open J Stomatol*. 2013;3:176-82. <http://dx.doi.org/10.4236/ojst.2013.32031>

30. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008;5(3):313-6. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nem059>
31. Santos FA, Bastos EMA, Uzeda MC, Carvalho MA, Farias LM, Moreira ESA et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J. Ethnopharmacol*. 2002;80:1-7. [https://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00003-X](https://dx.doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00003-X)
32. Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(12):1361-6. <https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2011.02545.x>
33. Ota C, Valente PHM, Unterkicher CS, Shimizu MT. Atividade da própolis sobre bactérias isoladas da cavidade bucal. *LECTA, Bragança Paulista*. 1998;16:73-7.
34. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol*. 2005;99(1):69-73. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.046>
35. Oliveira ACP, Shinobu CS, Longhini R, Franco SL, Svidzinski TIE. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(5):493-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000500002>
36. Santos VR, Gomes RT, Mesquita RA, Moura MD, França EC, Aguiar EG et al. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. *Phytother Res*. 2008;22(11):1544-7. <https://dx.doi.org/10.1002/ptr.2541>
37. Gomes RT, Teixeira KIR, Cortés ME, Santos VR. Antimicrobial activity of a propolis adhesive formulation on different oral pathogens. *Braz J Oral Sci*. 2007;6(22):1387-91. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/bjos/article/view/8642997>
38. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*. 2001;44(9-10):375-8.
39. Parker JE, Luz MMS. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17:102-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100019>
40. Fernandes Junior A, Lopes MR, Colombari V, Monteiro AV, Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Cienc Rural [online]*. 2006;36(1):294-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782006000100047>
41. Araujo MTB, Araujo RPC, Campos EJ. Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade bactericida da clorexidina 0,12% e 0,2% e dos produtos farmacológicos Listerine e Duplax. *Rev Odonto Ciênc*. 2001;16(33):187-201.
42. Batista AL, Lins RD, Coelho RS, Barbosa DN, Belém NM, Celestino FJA. Clinical efficacy analysis of the mouth rinsing with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction. *Complement Ther Clin Pract*. 2014;(20):93-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctcp.2013.08.002>
43. Simões RCS, Merlini SP, Silva RPR, Bastos RS, Torres AS, Bastos JRM. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais. *Rev Bras Odontol*. 2011;68(1):91-4.
44. Souza ELC. Comparação do digluconato de clorexidina 0,12% sem xilitol com álcool e com xilitol sem álcool para controle do biofilme oral e efeitos adversos associados. [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Veiga de Almeida; 2007.
45. Hortense SR, Carvalho ES, Carvalho FS, Silva RPR, Bastos JRM, Bastos RS. Uso de clorexidina como agente preventivo e terapêutico na odontologia. *Rev Odontol Univ Cidade de São Paulo*. 2010;22,(2):178-84.
46. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7, de 24 de fevereiro de 2010. Dispõe sobre os requisitos

- mínimos para funcionamento de Unidades de Terapia Intensiva e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2010. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0007_24_02_2010.html
47. Candido RC, Azevedo RVP, Ito IY. Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Cepacol, Malvona e Periogard, Frente *C. albicans* Isoladas da Cavidade Bucal. *Rev. Odontol. UNESP*. 1996;25(1):79-84. [acesso 2018 Jun 17]. Disponível em: <http://www.revodontolunesp.com.br/article/588017787f8c9d0a098b4742>
48. Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *J Endod*. 2002;28(2):68-71. <https://dx.doi.org/10.1097/00004770-200202000-00004>



Análise comparativa entre os diferentes protocolos utilizados para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina

Comparative analysis among the different protocols used for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis

RIALA6/1752

Denise Maria Bussoni BERTOLLO², Jose Eduardo TOLEZANO^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2889. E-mail: tolezano@hotmail.com

²Centro de Laboratório Regional, Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto, SP, Brasil

Recebido: 05.07.2017 - Aceito para publicação: 31.03.2018

RESUMO

Foi realizada análise comparativa entre os diferentes protocolos utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, em inquéritos soropidemiológicos, na região de São José do Rio Preto, no período de 2008 a 2012. Para cada protocolo avaliou-se o total de exames processados, o tempo médio para examinar as amostras coletadas nos diferentes períodos e a análise de concordância bruta. Foram utilizados quatro protocolos: diagnóstico apenas pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em 12.871 (28,4%) cães, por ensaio imunoenzimático (EIE) e RIFI em 632 (1,4%); 22.387 (49,4%) por EIE/RIFI, e 9.453 (20,8%) pelo teste rápido (TR) *Dual Path Platform* (DPP[®])/EIE. Nos dois primeiros grupos, as análises foram no eluato de sangue coletado em papel de filtro, e nos dois últimos no soro sanguíneo. O protocolo TR-DPP[®]/EIE demandou menor tempo (dias) desde a execução até a liberação dos resultados, em comparação aos demais. Na avaliação das taxas de concordância bruta, o TR-DPP[®]/EIE apresentou melhor desempenho (58,5%). Apesar de, o atual protocolo TR-DPP[®]/EIE tenha contribuído para diminuir a discordância entre os resultados obtidos nos EIE/RIFI, o EIE confirma menos de 60% dos TR-DPP[®] reagentes, o que indica a necessidade de buscar novas alternativas para efetuar o diagnóstico em cães.

Palavras chaves. leishmaniose visceral, inquéritos epidemiológicos, técnicas e procedimentos diagnósticos.

ABSTRACT

The comparative analysis was performed among the different protocols proposed for diagnosing the canine visceral leishmaniasis in the seroepidemiological surveys performed in the region of São José do Rio Preto, from 2008 to 2012. Each protocol evaluated the total number of processed tests, the mean time for examining the collected samples, in different periods, and the gross agreement analysis. Four protocols were used: diagnosis only by indirect immunofluorescence test (IFT), in 12,871 (28.4%) dogs samples; by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and IFT in 632 (1.4%); (ELISA/IFT) in 22,387 (49.4%) and the rapid test (RT) *Dual Path Platform* (DPP[®])/ ELISA in 9,453 (20.8%). In the first two groups, the tests were performed using eluates from blood collected in the filter paper, and in the two last employed serum samples. RT-DPP[®]/ELISA demanded less time (days), from the test starting until the results release. In the of gross agreement rates, RT-DPP[®]/ELISA showed the best performance (58.5%). Although the new protocol RT-DPP[®]/ELISA has contributed to decrease in the mismatch between ELISA and IFT results, ELISA confirms less than 60% of RT-DPP[®] reagent samples, indicating the need for searching the new alternatives for the canine diagnosis.

Keywords. visceral leishmaniasis, health surveys, diagnostic techniques and procedures.

INTRODUÇÃO

No Brasil, responsável por 90% dos casos da América Latina, a leishmaniose visceral (LV) é causada por *Leishmania infantum chagasi*¹⁻³. Os cães infectados são considerados os principais reservatórios desse protozoário no ciclo urbano de transmissão da LV, para o homem e outros animais, via de regra através da picada de dípteros da subfamília Phlebotominae, sendo *Lutzomyia longipalpis* o principal vetor^{1,4}.

Para o diagnóstico da LV, tanto nos seres humanos quanto para os animais, são considerados os sinais clínicos, os dados epidemiológicos e o diagnóstico laboratorial^{2,3}.

O diagnóstico clínico da LV canina baseia-se na observação de sinais e sintomas, principalmente: linfadenopatia, caquexia, hipertermia, esplenomegalia, ceratoconjuntivite, alterações dermatológicas, hiporexia, onicogrifose e diarreia². Na fase terminal observa-se paresia das patas posteriores, caquexia, inanição culminando com o óbito do animal^{2,5}. As manifestações clínicas estão associadas ao tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado, entre os quais, a interação dos fatores do sistema imunológico, antigenicidade e carga parasitária⁶.

Na LV canina, os sinais clínicos observados podem ser confundidos com outras doenças que apresentam quadros clínicos semelhantes, tais como: dermatites, erliquiose e babesiose^{2,7}. Portanto, é essencial a existência de métodos laboratoriais sensíveis e específicos para o diagnóstico da LV^{2,3,8}.

Os dados epidemiológicos são baseados na investigação detalhada da história clínica do animal, na investigação de deslocamento do cão nos últimos 12 meses, no tempo de permanência do cão infectado na residência ou local provável de infecção, na busca de presença de vetores e na identificação de fatores que possam contribuir para a ocorrência do caso^{3,9}.

O diagnóstico laboratorial da LV canina pode ser realizado, por meio de técnicas parasitológicas e imunológicas¹⁰. Para o diagnóstico parasitológico utiliza-se o exame microscópico direto (após coloração), isolamento *in vivo* (inoculação em animais de laboratório) e *in vitro* (cultura em meios de cultura acelular), análise histopatológica e técnicas moleculares^{2,11,12}.

No diagnóstico imunológico da LV canina,

as técnicas sorológicas mais utilizadas, realizadas a partir de amostras de sangue, são: reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (EIE)¹⁴ e teste rápido (TR)-DPP[®] (*Dual Path Platform*)¹³.

A RIFI consiste na reação de anticorpos presentes no soro com os parasitos, forma promastigota (*Leishmania sp.*), fixados em lâmina¹⁴. Posteriormente, emprega-se conjugado anti-IgG de cão marcada com isotiocianato de fluoresceína para evidenciar a ligação antígeno anticorpo. Para alguns pesquisadores a RIFI pode atingir sensibilidade superior a 90% e especificidade superior a 70%^{15,16}. A utilização da reação com antígeno de *Leishmania donovani*, aumenta significativamente a sensibilidade, sem perder a especificidade do teste, e resulta em maior detecção do diagnóstico em animais assintomáticos ou oligossintomáticos¹⁷.

Para o diagnóstico canino, até meados de 2012, a RIFI foi utilizada nas investigações em foco de transmissão, em inquéritos sorológicos censitários ou amostrais, para avaliar a prevalência da doença. E como teste confirmatório para as amostras reagentes pelo EIE^{2,3,18}.

O EIE baseia-se na utilização de antígenos solúveis de *Leishmania major like* adsorvido em microplacas, e anticorpos marcados com a enzima peroxidase, no qual permite a detecção, titulação e quantificação de substâncias de interesse biológico. A sensibilidade do EIE pode alcançar 90% a 100% e a especificidade entre 85% a 94%¹⁵. O teste é sensível, permite detectar baixos títulos de anticorpos, porém não tão preciso na detecção em cães assintomáticos¹⁰.

Durante muitos anos, desde a década de 1970 e até o ano de 2002, o Ministério da Saúde recomendava a utilização da RIFI para a realização de inquéritos epidemiológicos caninos para a identificação dos animais infectados por *Leishmania infantum chagasi*. Nesse período, a RIFI era a única técnica laboratorial utilizada para esse diagnóstico quando da realização dos inquéritos soroparasitológicos no contexto das ações de vigilância e controle da LV. A partir de 2002 e até 2012, para o diagnóstico laboratorial da LV canina foi empregado o protocolo que incluía o EIE como teste de triagem e a RIFI como teste confirmatório¹⁹.

Nos últimos anos, diferentes versões de testes imunocromatográficos, dotados com proteínas

recombinantes, foram desenvolvidas a partir de antígenos do complexo *Leishmania donovani*^{12,20}. A imunocromatografia representa a alternativa às técnicas sorológicas convencionais. É tecnologia que proporciona a realização da ligação antígeno-anticorpo num suporte sólido, executada em temperatura ambiente²¹. Por conter antígeno recombinante apresenta elevada sensibilidade e especificidade²². De fácil operacionalização, mesmo em campo, baixo custo e fácil interpretação, o teste imunocromatográfico DPP® – Biomanguinhos – Fiocruz, patenteado pela Chembio Diagnostics – EUA e desenvolvido por Instituto Biomanguinhos, rapidamente foi incorporada como teste para a triagem de amostras no protocolo desde 2012, e ainda em vigor para o diagnóstico da LV canina^{20,23}.

Trata-se de um teste qualitativo que visa à detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza como antígeno a proteínas recombinantes (r)K28 de *Leishmania infantum chagasi*^{24,25}.

O antígeno rK28 é uma fusão poliproteica que inclui regiões de haspb1 e haspb 2 de *Leishmania donovani*, homólogos de k26 e k9 de *Leishmania infantum*, respectivamente e, *Leishmania donovani kinesin*, homólogo k39 de *Leishmania infantum*^{24,26,27}.

Em 2012, ocorreu uma alteração significativa no protocolo visando o diagnóstico sorológico canino. Desta forma, a metodologia de EIE, anteriormente utilizada para a triagem sorológica, foi substituída pelo TR-DPP® LV e a RIFI utilizada como ensaio confirmatório foi substituída pelo EIE, passando a triagem a ser uma atividade realizada pelos municípios quando possível (Nota Técnica nº 01/2011 – CGDT/CGLAB/DEVIT/SVS/MS).

Neste trabalho objetivou-se realizar uma análise comparativa entre os diferentes protocolos utilizados para diagnóstico da leishmaniose visceral canina na região de São José do Rio Preto, no período de 2008 a 2012.

MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de um estudo com base em dados secundário, obtidos por meio de inquéritos soropidemiológicos canino, utilizado no diagnóstico da LV canina realizado no período de 2008 a 2012.

Local e período estudado

O estudo foi desenvolvido na região administrativa de São José do Rio Preto localizada no noroeste paulista, composta por 102 municípios. (Figura 1).

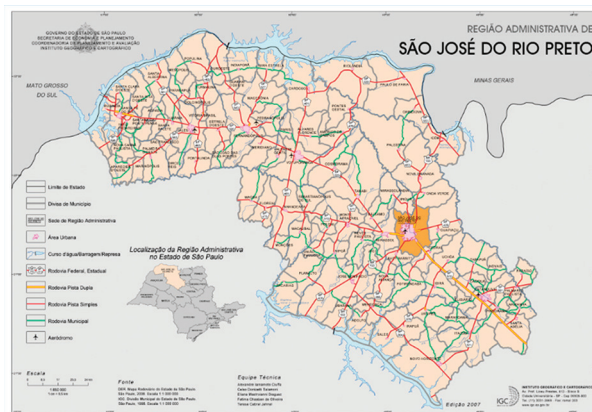


Figura 1. Mapa da região administrativa de São José do Rio Preto. Fonte: Disponível em: http://www.igc.sp.gov.br/produtos/mapas_ra.aspx?ra=7

Inquéritos epidemiológicos e protocolos para o diagnóstico da LV canina

Foram analisados os resultados dos testes sorológicos para o diagnóstico da LV canina, dos municípios participantes dos inquéritos caninos, no período 2008 a 2012.

Durante o período de estudo dos cães incluídos nos inquéritos sorológicos foi utilizada amostra de sangue coletado em papel de filtro tipo Whatman nº1 ou soro sanguíneo obtido de sangue venoso coletado em tubo seco. Por recomendação do Ministério da Saúde (MS), ao longo do tempo, foram utilizados quatro diferentes protocolos para a realização do diagnóstico sorológico para a LV canina:

(a) A partir de eluato de amostra de sangue coletado em papel de filtro Whatman nº1 examinado somente pela RIFI (protocolo 1) e, pelo EIE como teste de triagem e RIFI como confirmatório (protocolo 2);

(b) A partir de soro sanguíneo examinado pelo EIE como teste de triagem e RIFI como confirmatório (protocolo 3) e, pelo TR-DPP® como teste de triagem e o EIE como confirmatório (protocolo 4) (Figura 2).

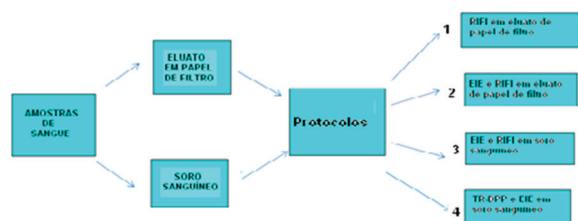


Figura 2. Esquema representativo dos protocolos utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, nos inquéritos sorológicos caninos no período de 2008 a 2012

No estado de São Paulo, até junho de 2010, as amostras de sangue dos cães eram coletadas em papel de filtro marca Whatman nº1, através de punção da ponta da orelha com uma lanceta, impregnando-se uma área mínima de 3x3 cm do papel de filtro padronizada, distribuída uniformemente na frente e no verso. As amostras eram acondicionadas à temperatura de 4°C ou 20°C por até 30 dias ou à -20°C até 60 dias da coleta, protegidas em saco plástico livre de umidade, conforme orienta a Nota Técnica da Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD) nº 03/2007 publicada no Diário Oficial do Estado (DOE) de São Paulo de 15/11/07.

A partir junho de 2010, as amostras de sangue dos cães passaram a ser coletadas por punção venosa, transferidas para tubo seco para obtenção de soro sanguíneo e submetidas ao diagnóstico da LV canina, conforme Nota Técnica da CCD nº2 02/2009 publicada no DOE de São Paulo de 24/12/09, que determina a substituição da utilização do eluato de sangue em papel de filtro por amostra de soro sanguíneo. O volume coletado varia de 1,0 a 3,0 ml, de acordo com o tamanho do cão.

Em 2012, o MS recomendou a uma nova substituição do protocolo, para o diagnóstico da LV canina quando da realização dos inquéritos sorológicos caninos em municípios com transmissão e/ou sob investigação de LV. No novo protocolo emprega-se o ensaio imunocromatográfico TR-DPP® como triagem

sorológica e o EIE como confirmatório.

Análise dos dados coletados

Para a análise dos dados, digitalizaram-se os resultados dos exames utilizados nos inquéritos soroepidemiológicos caninos em planilha *Excel*. Analisou-se o tempo médio para examinar todas as amostras coletadas nos diferentes períodos e protocolos, amostras consideradas inadequadas, ou de maior rejeição, ou seja, coletadas de forma incorreta ou apresentaram lipemia e hemólise e solicitação de nova amostra.

Na análise de concordância bruta entre os métodos empregados na triagem sorológica e teste confirmatório de diagnósticos da LV canina, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de concordância} = \frac{\text{Concordâncias}}{\text{Concordâncias} + \text{Discordâncias}} \times 100$$

Ética Animal

O estudo foi elaborado e executado seguindo-se as diretrizes e normas que regem as pesquisas envolvendo seres animais, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Instituto Adolfo Lutz sob o Parecer nº 06/2013.

RESULTADOS

Ao longo do período do estudo foram utilizados diferentes protocolos para o diagnóstico da LV canina. Das 45.343 amostras, 12.871 (28,4%) foram examinadas somente pela RIFI e 632 (1,4%) por EIE e RIFI, tendo sido ambos os grupos de amostras examinadas a partir de eluato de sangue coletado em papel de filtro; 22.387 (49,4%) por EIE e RIFI e 9.453 (20,8%) por TR-DPP® e EIE, sendo que nesses dois grupos foram examinadas amostras com soro sanguíneo (**Figura 3**).

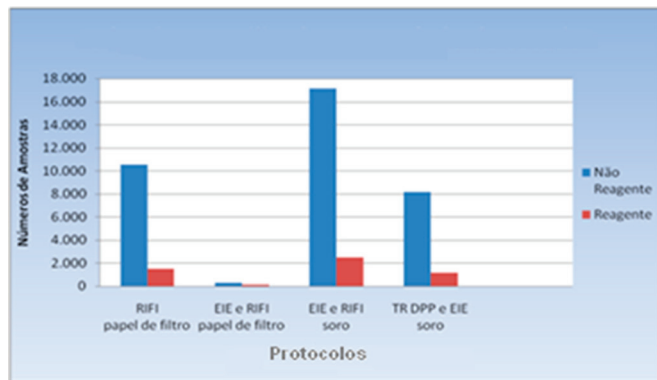


Figura 3. Resultados observados na utilização de diferentes protocolos para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no período 2008 a 2012

Neste estudo o primeiro protocolo utilizado, no período de setembro 2008 a junho de 2010, considerava a RIFI realizada com eluato de sangue coletado em papel de filtro como a única técnica laboratorial para o diagnóstico da LV canina. Nesse período a RIFI foi utilizada com objetivo duplo, teste de triagem para identificar as amostras não reagentes e, teste confirmatório para diagnosticar os animais infectados.

Das 12.871 amostras de sangue examinadas somente pela RIFI, 10.532 (81,8%) foram consideradas não reagentes, isto é, sem anticorpos anti-*Leishmania*, detectáveis pela técnica sorológica empregada; 1.519 (11,8%) apresentaram reatividade frente às promastigotas e 820 (6,4%) amostras foram consideradas inadequadas para realização do exame.

Concomitante ao período de utilização do protocolo 1, e por um período curto de avaliação, entre janeiro e fevereiro de 2010 foi utilizado o EIE como método de triagem sorológica e a RIFI como teste confirmatório, em amostras de eluato de sangue coletados em papel de filtro (protocolo 2). Foram examinadas 632 amostras, sendo que destas 458 (72,5%) foram consideradas não reagentes, 153 (24,2%) reagentes e 21 (3,3%) amostras inadequadas. Devido ao curto período em que este protocolo foi utilizado, procedeu-se apenas análise de concordância bruta entre os métodos que foi de 28,4%.

A partir de julho de 2010 até junho de 2012 utilizou-se o protocolo 3 para o diagnóstico da LV canina, substituindo-se o eluato de sangue coletado em papel de filtro por soro sanguíneo. Foram coletadas 22.387 amostras, sendo 17.123 (76,5%

não reagentes, 2.484 (11,1%) reagentes e 2.507 (11,2%) amostras consideradas inadequadas para a realização do exame. Não se observou diferença no percentual de reatividade entre os protocolos 2 e 3, ou seja, eluato de sangue colhido em papel de filtro e sangue total colhido em tubo seco.

A partir de julho de 2012 um novo protocolo 4, preconizado pelo MS inclui o ensaio imunocromatográfico TR-DPP® para a realização da triagem sorológica e o EIE como teste confirmatório. Das 9.453 amostras analisadas, 8.173 (86,5%) foram não reagentes, 1.185 (12,5%) reagentes, e 95 (1,0%) das amostras estavam inadequadas para análise.

Na análise das amostras consideradas inadequadas para a realização do diagnóstico da LV canina, foi observado que as amostras de sangue coletadas em tubos secos, para o protocolo 3, EIE como teste de triagem e RIFI como confirmatório foram as de maior rejeição, com solicitação de nova amostra (11,2%) 2.507/22.387. Dentre as causas estão: hemólise, lipemia; erros no tempo/rotação de centrifugação; armazenamento e transporte inadequados.

No período em que se utilizaram os protocolos 1,2 e 3, a quase totalidade das amostras foi processada, tanto por EIE quanto por RIFI, no Laboratório de Leishmaniose do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto. A partir da implantação do protocolo 4, com introdução do teste TR-DPP®, ocorreu um processo de descentralização, passando a responsabilidade da realização dos testes para os serviços municipais de saúde. Com a capacitação continuada dos agentes de zoonoses, houve uma diminuição expressiva do percentual de rejeição das amostras, de 11,2% (2.507/22.387) para 0,4% (95/9.453) (**Figura 4**).

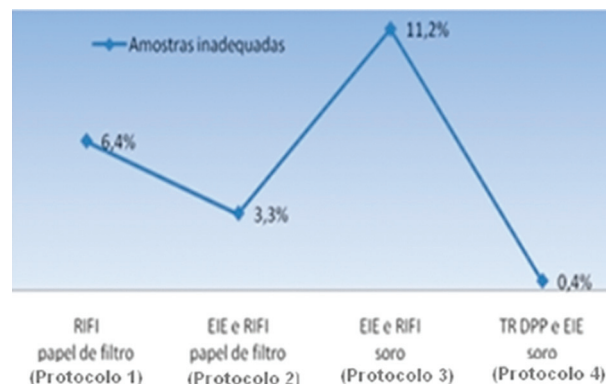


Figura 4. Taxas de rejeição de amostras coletadas no período de 2008 a 2012, para a realização do diagnóstico da leishmaniose visceral canina, segundo o protocolo utilizado

Comparando-se o tempo médio para examinar todas as amostras coletadas nos diferentes períodos e os protocolos diagnósticos utilizados, observou-se que o protocolo 1, de teste único, exame pela RIFI em amostras de eluato de sangue coletado em papel de filtro, consumiu 630 dias para o processamento de 12.785 amostras, o que representou a necessidade, em média, entre 60 e 90 dias para a liberação dos resultados de cada amostra examinada. No protocolo 4 com TR-DPP[®] como triagem sorológica e o EIE como teste confirmatório, foram 180 dias para examinar 9.801 amostras, em média, entre 15 a 20 dias para a liberação dos resultados. A linearidade aponta que o protocolo 4 demanda menor tempo (dias) em relação aos demais (Figura 5).

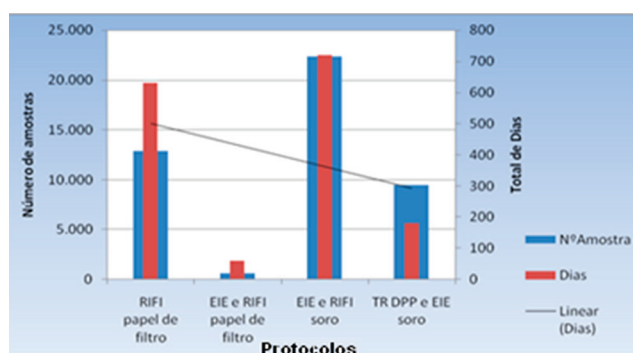


Figura 5. Relação entre os protocolos utilizados no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, no período de estudo, e o tempo (dias) gasto para examinar todas as amostras recebidas

Em relação à avaliação das taxas de concordância bruta entre os métodos de diagnósticos da LV canina utilizados na triagem sorológica e teste confirmatório, o TR-DPP[®]/EIE apresentou melhor desempenho 58,5%.

DISCUSSÃO

O período entre 2008 e 2012 em análise no presente estudo incluiu a utilização de quatro diferentes protocolos para a realização dos diagnósticos para a LV canina. Além disso, até a metade do ano de 2010 trabalhou-se com eluato de amostras de sangue coletadas em papel de filtro. A partir de então somente foram examinadas amostras de soro sanguíneo.

No primeiro deles, apenas a RIFI foi utilizada para o diagnóstico laboratorial. Isso ocorreu num

período inicial de registros e investigações de focos de transmissão da LV canina em diversos municípios da região de São José do Rio Preto.

Nesse período a RIFI cumpria simultaneamente dois papéis: teste de triagem para diagnosticar os animais soronegativos e teste confirmatório da infecção, tal como preconizado pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. A disponibilidade de uma única técnica para a identificação de animais que, em tese, uma vez diagnosticados sororreagentes deveriam ser recolhidos e submetidos à eutanásia representou uma das condições relacionadas por Costa e Vieira²⁸ sobre a insuficiência técnica para suportar o componente controle do reservatório canino.

As taxas de prevalência da infecção canina estiveram sempre em valores $\geq 9,5\%$, com média de 14,1% para todo o período. O quantitativo de novas coletas, em decorrência de amostras consideradas inadequadas variou entre 5,9 e 10,8% podendo ser explicado, em parte, por resultados “indeterminados”, em situações de zona cinza no ensaio imunoenzimático e, pela qualidade da amostra enviada ao laboratório.

Mesmo considerando as dificuldades para uma análise de desempenho entre os vários protocolos em razão de se tratar de conjuntos de amostras coletadas de animais e municípios distintos, em diferentes períodos, pode-se destacar que a cada novo protocolo utilizado adicionou características favoráveis à sua implementação.

Além da diminuição das taxas de rejeição de amostras foi possível: a inclusão de um segundo teste laboratorial e a necessidade de resultados reagentes em ambos os testes para a liberação de resultados positivos; a substituição do eluato de amostra coletada em papel de filtro pelo soro sanguíneo diminuindo assim as incertezas em relação à qualidade e tipo de papel de filtro utilizado eliminou as distorções relativas ao volume de amostra aplicado por unidade de área e sobre as condições de armazenamento até a entrega no laboratório; a inclusão de um novo teste no formato imunocromatográfico, como teste de triagem, com antígeno recombinante específico possibilitou a diminuição das taxas de rejeição de amostras e aumento do número de amostras examinadas, bem como descentralizando a execução do teste até o nível municipal pelas equipes de controle de zoonoses.

Observações semelhantes foram registradas por Costa e Vieira²⁸ e por Grimaldi et al²⁹.

O protocolo 4 atualmente em uso favorece uma diminuição considerável no tempo necessário para a realização do diagnóstico laboratorial, ou seja, desde a coleta da amostra até a liberação dos resultados. No período de utilização da RIFI em amostras coletadas em papel de filtro, em média eram necessários de 60 a 90 dias para a liberação dos resultados. Atualmente, com a utilização do teste imunocromatográfico são necessários entre 15 e 20 dias apenas.

Em relação às taxas de concordância bruta entre os métodos diagnósticos utilizados, ainda que protocolo 4 TR-DPP[®] (triagem) e EIE (confirmatório) tenha contribuído para a diminuição na discordância, atualmente, o teste EIE confirma pouco menos de 60% dos TR-DPP[®] reagentes.

De acordo com Laurenti et al³⁰, o TR-DPP[®] apresenta um bom desempenho como teste sorológico para LV canina, visto que detecta tanto cães assintomáticos e sintomáticos em proporções iguais. Apesar da sua sensibilidade ainda não ser a ideal, melhorou a precisão do novo protocolo de diagnóstico LV canina no Brasil, especialmente para os cães infectados. Considerando a maior especificidade de TR-DPP[®] (95,1% vs 77,8%), valor preditivo positivo (95,1% vs 81,1%) e valor de probabilidade positiva (18,3% versus 4,1%) em comparação com o EIE Biomanguinhos. Faz-se necessário a realização de estudos que considerem a utilização do TR-DPP[®] como um teste de confirmação, em vez de um teste de triagem como sugerido.

Coura-Vital et al²⁵, a partir de estudos realizados por inquéritos soropidemiológicos e de seguimento de uma coorte de cães, verificaram que com a utilização do protocolo TR-DPP[®] como teste de triagem e EIE como confirmatório, equivalente ao protocolo 4 do presente estudo, as taxas de prevalência e incidência para LV canina foram maiores do que aquelas observadas quando da utilização do EIE triagem e RIFI confirmatório, equivalente ao protocolo 3 do presente estudo, indicando que a magnitude da infecção em áreas endêmicas possa ter sido subestimada no passado. Esses mesmos autores²⁵ sugerem que em municípios endêmicos e com grande demanda de exames, dever-se-ia utilizar o

EIE para triagem e DPP para confirmação, pois isso facilitaria execução e reduziria o custo dessas ações.

Laurenti et al³⁰ afirma que os kits do EIE e RIFI distribuídos pelo MS, fornecidos por Biomanguinhos utilizam como antígeno de *Leishmania major like* (espécie causadora da leishmaniose cutânea), determinar resultados falso-positivos e negativos.

CONCLUSÃO

Ao longo do período considerado no presente estudo, cada protocolo utilizado adicionou características favoráveis à sua implementação, e diminuição das taxas de rejeição de amostras inadequadas. O protocolo 4 com o TR-DPP[®] como teste triagem, contribuiu para a diminuição das taxas de rejeição de amostras, e a descentralização da execução deste teste aumentou o número de amostras examinadas pelas equipes de controle de zoonoses dos municípios.

O protocolo atual, TR-DPP[®] e EIE, diminuiu o tempo (horas/dias) necessário para realização do diagnóstico laboratorial da LV canina. A concordância bruta entre os métodos utilizados no diagnóstico da LV canina revelou que embora o novo protocolo TR-DPP[®] (triagem) e EIE (confirmatório) tenha contribuído para a diminuição na discordância atualmente, o teste EIE confirma menos de 60% dos TR-DPP[®] reagentes. A discordância nos resultados entre o teste de triagem e o confirmatório indica a necessidade de busca por novas alternativas para o diagnóstico canino.

AGRADECIMENTOS

A Margarida G. Bassi, Diretora do Centro de Laboratórios Regional do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto, pelo apoio e incentivo. Aos colegas Roberto M. Hiramoto e Helena H. Taniguchi, pela colaboração na revisão do texto.

Originado da Dissertação de Mestrado: Bertollo DMB – Aspectos soropidemiológicos da leishmaniose visceral no DRS XV Região de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, Brasil. Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. 2016.

REFERÊNCIAS

1. Costa CHN. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(2):232-42. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000014>
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília; 2014. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
3. Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo (SES/SP). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo (SP): CCD/SUCEN; 2006. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/publicacoes/manuais-tecnicos>
4. Young DG, Duncan MA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 1994;54:1-881.
5. Pastorino AC, Jacob CMA, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MMS. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *J Pediatr*. 2002;78(2):120-7. Disponível em: <http://www.jped.com.br/conteudo/02-78-02-120/port.asp>
6. Magalhães LF, Wilson TM, Magalhães AP. Quadro clínico de cães com leishmaniose visceral e sua correlação com a sensibilidade do teste parasitológico. *Vet Not. (Online)*. 2013;18(Supl 2):77-82.
7. Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J*. 2008;175(1):45-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.019>
8. Manson-Bahr PE. Diagnosis. In: Peters W, Killic-Kendrick R. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press; 1987. p.703-29.
9. Medeiros MMC, Abreu MM. Epidemiologia clínica. In: Rouquayrol MZ, Gurgel M. *Epidemiologia e Saúde*. 7.ed. Rio de Janeiro(RJ): MedBook; 2013. p.149-76.
10. Gontijo CME, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7(3):338-49. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v7n3/11.pdf>
11. Rey L. *Bases da Parasitologia Médica*. 3.ed. São Paulo (SP): Guanabara Koogan; 2011.
12. Drummond KO, Costa FAL. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011;53(1):3-11. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652011000100002>
13. Marcondes M et al. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. *Vet Parasitol*. 2011;175(1-2):15-9. Available at: <http://hdl.handle.net/11449/42279>
14. Ikeda-Garcia FA, Marcondes M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clin Vet*. 2007;12(71):34-42. Disponível em: <https://issuu.com/clinicavet/docs/clinica-veterinaria-n7117>
15. Vexenat JA, Fonseca de Castro JA, Cavalcante R, Silva MRP, Batista WH, Campos JH et al. Preliminary observations on the diagnosis and transmissibility of canine visceral leishmaniasis in Terezina, N. E. Brasil. *Arch Inst Pasteur Tunis*. 1993; 70(3-4):467-72.
16. Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 1995;59(1):13-21. [https://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)00738-X](https://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(94)00738-X)
17. Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saude Publica*. 2004;20(1)259-65. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2004000100043>

18. Vigilato MAN. Distribuição especial da leishmaniose visceral canina e humana no município de Birigui [dissertação]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2004. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/98349>
19. Donato LR, Lima Junior FEF, Albuquerque R, Gomes MLS. Vigilância e controle de reservatórios da leishmaniose visceral no Brasil: aspectos técnicos e jurídicos. *Rev Educ Contin Med Vet Zoot*. 2013;11(2):18-23. Disponível em: <https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/16219>
20. Assis TSM, Braga ASC, Pedras MJ, Barral AMP, Siqueira IC, Costa CHN et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH[®] para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Epidemiol Serv Saúde*. 2008;17(2):107-16. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742008000200004>
21. Lemos EM, Laurenti MD, Moreira MAB, Reis AB, Giunchetti RC, Raychaudhuri S et al. Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar DetectTM) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop*. 2008;107(2):205-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.023>
22. Lima VMF, Fattori KR, Michelin AF, Neto LS, Vasconcelos RO. Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2010;173(3-4):330-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.07.012>
23. Bisugo MC, Araújo MFL, Taniguchi HH, Cunha E, Santos AA, Pessoto-Junior M et al. Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66(2):185-93. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/2000/rial66_2_completa/1127.pdf
24. Pattabhi S, Whittle J, Mohamath R, El-Safi S, Moulton GG, Guderian JA et al. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(9):e822. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000822>
25. Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Leal GG, Mopreira N et al. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS One*. 2014;9(3):e91009. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0091009>
26. Mendonça IL, Batista JF, Schallig H, Pires e Cruz MS, Alonso DP, Ribolla PEM et al. The performance of serological tests for *Leishmania infantum* infection screening in dogs depends on the prevalence of the disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 2017;59: e39. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201759039>
27. Burns-Junior JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(2):775-9. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.2.775>
28. Costa CHN, Vieira JBF. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(2):223-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822001000200013>
29. Grimaldi GJr, Teva A, Ferreira AL, Santos CB, Pinto I, Azevedo CT et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path-Platform technology (DPP[®] CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(1):54-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.001>
30. Laurenti MD, Santana Leandro MVJr, Tomokane TY, De Lucca HR, Aschar M, Souza CSF et al. Comparative evaluation of the DPP[®] CVL rapid test for canine serodignosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2014;205(3-4):444-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.002>



Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de méis comercializados em Natal, RN

Evaluation of the physical-chemical and microbiological qualities of honeys sold in Natal, RN

RIALA6/1735

Joyce Karoline Lopes MARINHO, Camila Vanessa da Silva MOREIRA, Letícia Costa FERREIRA, Karla Suzanne Florentino da Silva Chaves DAMASCENO, Jéssica Anarellis Barbosa dos SANTOS, Nely HOLLAND*

*Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição - CCS - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Campus Universitário, Lagoa Nova, S/N, Rio Grande do Norte, RN, Brasil, CEP: 59078-970. Tel: 84 3342 2291. E-mail: nely@ufrnet.br

Recebido: 17.04.2017 - Aceito para publicação: 09.04.2018

RESUMO

Este trabalho avaliou a presença de fraudes e as condições higiênicossanitárias de méis comercializados em Natal-RN. Foram analisadas 20 amostras de méis, a maioria sem rótulo, coletadas em pequenos comércios. Foram realizadas análises físico-químicas qualitativas (reação de Fiehe, enzimas diastásicas, reação de Lund e de Lugol); quantitativas [umidade, cinzas, pH, acidez e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF)]; e microbiológicas (contagem de bolores e leveduras, coliformes a 45 °C e presença de *Salmonella* sp). Na reação de Fiehe, 40% das amostras indicaram aquecimento excessivo e em 60% houve ausência de enzimas diastásicas. Na reação de Lund, 35% mostraram adulteração, e 30% na reação de Lugol. Os teores de umidade variaram de 15,80 a 20,53%, e uma amostra (5%) esteve acima do permitido. Os valores de cinzas (0,02 a 0,36%) estavam dentro do limite determinado. O pH foi de 3,08 a 4,31; para acidez (21,99 a 78,88 mEq/kg) 40% dos valores estavam superiores ao permitido, e 20% dos obtidos para 5-HMF (9,60 a 88,70 mg/kg) não estavam em conformidade. Não houve crescimento de microrganismos nas análises microbiológicas. A maior parte dos méis estava em desacordo com a legislação por superaquecimento, e/ou más condições de armazenamento ou fraude. As amostras de méis estavam em boas condições higiênicossanitárias.

Palavras-chave. mel, análises físico-químicas, adulteração, análises microbiológicas.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the occurrence of fraud, and the sanitary conditions of honeys sold in Natal, Brazil. Twenty samples of honey were analyzed, being the majority without labels, and obtained in small trades. The samples were subjected to qualitative physical-chemical analysis (Fiehe reaction, diastases enzymes, Lund and Lugol reaction); quantitative evaluation (moisture, ash, pH, acidity and 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF)); and microbiological (molds and yeasts, coliforms at 45 °C and *Salmonella* sp). In the Fiehe reaction, 40% of samples indicated excessive heating; diastase enzymes were absent in 60%. In the Lund reaction, 35% indicated adulteration, and 30% by the Lugol reaction. The humidity values varied from 15.80 to 20.53%, and one sample (5%) showed higher rate. The ash values (0.02 to 0.36%) were within the limit; pH values were from 3.08 to 4.31. For acidity (21.99 to 78.88 mEq/kg) 40% of the values were higher than those allowed, and 20% of the 5-HMF (9.60 to 88.70 mg/kg) did not comply with the legislation. No microorganism growth was observed. The majority of the honey samples were in disagreement with the legislation, indicating overheating, and/or poor storage conditions or some form of fraud. Honey samples were in good hygienic-sanitary conditions.

Keywords. honey, physical-chemical analysis, adulteration, microbiological analysis.

INTRODUÇÃO

A produção apícola do Brasil é de 35365 t, o 8º país na lista de maiores produtores de mel de abelha¹. A região Nordeste produz 7534 t¹, sendo o Rio Grande do Norte um dos estados que contribuem para essa produção; entretanto a estiagem prolongada que atinge o estado há cinco anos tem provocado uma queda considerável na produção de mel de abelha. Tal fato promove uma valorização do produto e o torna mais susceptível à adulteração.

As principais adulterações ocorrem através da utilização de elementos de baixo valor comercial tais como: açúcar comercial, glicose, melado, solução de açúcar invertido, açúcar da cana e beterraba, xarope de milho ou de maltose e a superalimentação das abelhas com sacarose². A qualidade do mel também é afetada durante os processos de aquecimento, extração, liquefação ou clarificação ou por período de estocagem prolongado³, modificando os constituintes do mel. Por exemplo, o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), o qual é um produto da reação de Maillard, pode ser formado quando o mel é submetido a tratamento pelo calor ou a longo período de armazenamento⁴, tornando volátil ou tóxico, dependendo de sua concentração⁵.

As análises físico-químicas do mel são consideradas úteis para detectar prováveis adulterações e também para confirmar as condições de manipulação e armazenamento do mel². Os resultados das análises são comparados com os valores de referência das legislações e recomendações dos órgãos internacionais para confirmar a identidade e qualidade do produto disponibilizado para o consumo.

O controle microbiológico do mel também está relacionado à qualidade e segurança deste alimento, pois de acordo com Lopes⁶, a microbiota do mel pode variar, tendo além de microrganismos introduzidos pelas próprias abelhas, outros introduzidos de forma indesejada por falta de higiene na manipulação ou durante a extração e beneficiamento do mel.

A limitada disponibilidade de mel, principalmente quando ocorrem períodos prolongados de estiagem, causa maior preocupação quanto à segurança alimentar do mel comercializado sem rótulo. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade físico-química e microbiológica de méis comercializados em estabelecimentos comerciais pequenos e informais em Natal, RN.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 20 amostras de méis comercializados em embalagens variadas sem rótulos, em feiras livres e pequenos estabelecimentos comerciais, no ano de 2015, na cidade de Natal, RN. As amostras foram encaminhadas para o Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN para a realização das análises físico-químicas e microbiológicas.

As análises físico-químicas realizadas foram qualitativas como: reação de Fiehe⁷, reação de Lund⁷, reação de Lugol⁷ e determinação de enzimas diastásicas⁸ e quantitativas como umidade⁸, cinzas⁸, pH⁸, acidez⁸ e determinação de 5-HMF⁷, realizadas em triplicata.

A reação de Fiehe detecta a presença de 5-HMF resultando em coloração vermelha, se houver a presença de glicose comercial ou mel superaquecido. Na determinação de enzimas diastásicas (enzimas amilolíticas como α e β -amilases), naturais do mel, a ausência destas indica o armazenamento em condições inadequadas ou aquecimento acima de 60 °C. A reação de Lund determina a presença de proteínas naturais do mel, a qual é verificada por ação da solução de ácido tânico a 0,5% m/v, por precipitação. Com a reação de Lugol, na presença de glicose comercial ou xaropes de açúcar, a solução de lugol torna o mel diluído em água em uma coloração marrom-avermelhada a azul. A determinação de umidade foi realizada pelo método refratométrico de Chataway, baseado na determinação do índice de refração a 20 °C, sendo que para cada grau acima ou abaixo, foi adicionado ou subtraído o valor de 0,00023, respectivamente; o teor de umidade pode atingir até 20%. O teor de cinzas foi determinado pela incineração e eliminação de toda substância orgânica das amostras em mufla a 550 °C até peso constante e este deve atingir um limite máximo de 0,6%⁸. A determinação de pH foi realizada por meio de um pHmetro calibrado, após diluição do mel com água destilada (a faixa de pH do mel é de 3,3 a 4,6). O método de acidez livre é baseado em titulação com hidróxido de sódio 0,05 M até pH de 8,5, após o mel ser diluído em água, com valor máximo permitido de 50 mEq/kg⁸. A determinação de 5-HMF foi realizada através do método espectrofotométrico a 284 e 336 nm e não deve ultrapassar 60 mg/kg⁸.

Com os dados obtidos nas análises quantitativas foram realizadas médias e desvios-padrão pelo programa Excel®.

As análises microbiológicas para bolores e leveduras, coliformes a 45 °C e *Salmonella* sp foram realizadas de acordo com as metodologias descritas na Instrução Normativa nº 62⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto aos resultados obtidos nas análises qualitativas realizadas com as amostras de mel, na reação de Fiehe, oito méis apresentaram coloração vermelho fugaz (amostras 2, 3, 5, 7, 11, 12, 13 e 16) e seis apresentaram uma coloração vermelho persistente (amostras 1, 4, 6, 8, 9, 10 e 14). Sendo assim, verificou-se que em 40% dos méis analisados houve indício de aquecimento intenso ou armazenamento inadequado e em 35% uma provável adulteração, devido à presença de 5-HMF proveniente da desidratação da frutose, que pode ser resultado da inversão da sacarose em meio ácido. Ribeiro et al¹⁰, ao analisarem amostras de méis clandestinos comercializados no Rio de Janeiro, também verificaram que 30% de 10 amostras apresentaram coloração vermelho persistente, indicando provável presença de açúcar invertido, e 20% coloração vermelho fugaz, sugerindo aquecimento intenso ou estocagem prolongada.

A determinação das enzimas diastásicas das amostras do presente trabalho demonstrou que doze (60%) amostras (1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 16) obtiveram uma coloração castanho escuro, indicando ausência das enzimas diastásicas, provavelmente devido ao aquecimento excessivo, acima de 60 °C durante o beneficiamento ou condições inadequadas de armazenamento, e/ou adulterações nos méis. Semelhante a determinação de 5-HMF, as enzimas diastásicas podem ser usadas como um indicador de envelhecimento e aumento de temperatura, pois a atividade diastásica pode ser reduzida durante o armazenamento ou quando o produto é submetido a aquecimento acima de 60 °C¹¹.

Com a reação de Lund verifica-se a ausência ou diminuição de proteínas naturais do mel (adulteração) quando não se forma precipitado, e caracteriza como mel de boa qualidade quando há 0,5 a 3 mL de

precipitado⁸. Dentre as amostras avaliadas, sete (35%) delas (1, 7, 8, 9, 13, 14 e 16) apresentaram indicação de provável fraude por adulteração destes méis. Abadio Finco et al¹² identificaram 8 dentre 24 amostras (33,33%) com resultados acima do valor de referência para a reação de Lund em Tocantins, demonstrando um comprometimento na qualidade dessas amostras.

Na reação de Lugol, seis (30%) amostras (6, 8, 9, 13, 14 e 16) analisadas apresentaram coloração castanho escuro, sugerindo a presença de dextrinas. Ribeiro et al¹⁰ obtiveram um resultado positivo para a reação de Lugol de 70% das amostras clandestinas e 12% das amostras de méis inspecionadas comercializadas no Rio de Janeiro.

Neste estudo, os conteúdos de umidade variaram de 15,80 a 20,53%, estando somente a amostra 17 um pouco acima do valor máximo de 20% estabelecido pela legislação⁶ (). Esta faixa de variação de umidade também foi verificada por Liberato et al¹³, de 13,63% a 20,80%, analisando méis do estado do Ceará. A umidade representa a quantidade de água presente no produto, que pode influenciar na viscosidade, maturação, cristalização, sabor e conservação¹⁴. Um conteúdo de umidade superior a 20% pode ser devido à colheita prematura do mel, ou absorção de água do ambiente durante o armazenamento, por ser altamente higroscópico, ou ainda pela quantidade de chuvas na época em que foi produzido, o que pode diminuir a vida de prateleira do mel¹⁵.

O conteúdo de cinzas () nas amostras analisadas variou de 0,02 a 0,36%, apresentando-se de acordo com a legislação brasileira que determina o limite máximo de 0,6% para méis florais⁸. A determinação de cinzas é um parâmetro utilizado para verificar a qualidade do mel, pois demonstra a riqueza de minerais presentes nele, podendo ser influenciada por fatores como clima e solo, dentre outros¹⁴.

Os valores de pH () encontrados nas amostras do presente trabalho variaram de 3,08 a 4,31, os quais estão dentro da faixa de pH encontrada por Marchini et al¹⁴, para méis silvestres e de eucalipto, de diferentes localidades do estado de São Paulo. A análise de pH pode auxiliar na avaliação da qualidade de méis, em conjunto com a análise de acidez.

Neste estudo, os valores de acidez variaram de 21,99 a 78,88 mEq/kg (), sendo que 8 (40%) amostras (2, 3, 4, 7, 8, 10, 11 e 13) apresentaram valores superiores ao estabelecido pela legislação, que é de 50 mEq/kg⁸. A acidez do mel é um componente de extrema relevância, pois além de conferir características químicas e sensoriais, contribui para a sua estabilidade frente ao desenvolvimento de microrganismos, assim como permitem indicar más condições de manuseio e armazenamento que resultaram em processos fermentativos.

Ribeiro et al¹⁰ obtiveram resultados para acidez de méis entre 15 e 63 mEq/kg, portanto também alguns valores acima do preconizado pela legislação. Marchini et al¹⁴ verificaram acidez livre de 12,50 a 55,00 mEq/kg para méis de eucaliptos e 14,00 a 75,50 mEq/kg para méis silvestres, ou seja, maiores valores de acidez nesses últimos.

Quanto ao conteúdo de 5-HMF, determinado

de maneira quantitativa (), as amostras do presente trabalho variaram de 9,60 a 88,7 mg/kg, ficando quatro (20%) amostras (3, 6, 9 e 12) acima do valor máximo recomendado pela legislação que é 60 mg/kg⁸, indicando um superaquecimento. Estes méis, na avaliação de 5-HMF pela reação de Fiehe, apresentaram coloração vermelho persistente ou fugaz. Os valores de 5-HMF abaixo do limite permitido indicam que os méis estejam frescos, não adulterados por açúcares invertidos e não submetidos a períodos prolongados de armazenamento^{4,12}.

Marchini et al¹⁴, ao analisarem 121 amostras de méis coletadas no estado de São Paulo, encontraram valores para méis de eucaliptos e méis silvestres, que atingiram até 207,20 mg/kg e 122,00 mg/kg de 5-HMF, respectivamente. Alto conteúdo de 5-HMF em mel pode ser uma indicação de falsificação por adição de xarope invertido, pois o 5-HMF pode ser produzido pela inversão da sacarose na presença de um ácido¹¹.

Tabela. Resultados das análises quantitativas de méis comercializados sem rótulos, em Natal-RN

Amostras	Umidade (%)	Cinzas (%)	pH	Acidez livre (mEq/kg)	5-HMF (mg/kg)
1	18,87 ± 0,31	0,05 ± 0,03	3,40 ± 0,00	31,67 ± 1,03	17,0 ± 0,75
2	16,60 ± 0,00	0,03 ± 0,02	3,89 ± 0,01	65,63 ± 1,53	32,9 ± 0,08
3	18,93 ± 0,12	0,36 ± 0,01	3,92 ± 0,00	52,26 ± 0,95	65,5 ± 1,36
4	15,80 ± 0,00	0,26 ± 0,02	3,93 ± 0,00	55,23 ± 1,02	51,6 ± 0,06
5	18,20 ± 0,00	0,12 ± 0,01	3,76 ± 0,00	39,62 ± 0,01	34,7 ± 0,01
6	17,00 ± 0,00	0,04 ± 0,05	3,52 ± 0,00	47,85 ± 0,74	66,6 ± 0,31
7	18,20 ± 0,00	0,23 ± 0,01	3,66 ± 0,00	69,71 ± 0,57	49,8 ± 0,25
8	19,73 ± 0,12	0,06 ± 0,05	3,35 ± 0,02	57,78 ± 1,69	23,3 ± 0,00
9	17,73 ± 0,12	0,06 ± 0,00	3,27 ± 0,06	32,80 ± 0,78	88,7 ± 1,22
10	16,20 ± 0,35	0,07 ± 0,01	3,08 ± 0,01	78,40 ± 2,38	9,60 ± 0,03
11	19,80 ± 0,00	0,04 ± 0,03	4,20 ± 0,00	51,84 ± 1,28	44,2 ± 0,06
12	17,60 ± 0,20	0,03 ± 0,01	3,87 ± 0,00	48,70 ± 2,34	84,8 ± 0,21
13	20,80 ± 0,00	0,16 ± 0,01	3,64 ± 0,02	59,18 ± 0,78	30,9 ± 0,42
14	18,47 ± 0,23	0,02 ± 0,01	3,25 ± 0,00	44,37 ± 1,74	56,4 ± 0,11
15	17,93 ± 0,23	0,33 ± 0,05	3,91 ± 0,01	43,75 ± 0,72	19,4 ± 0,20
16	17,40 ± 0,00	0,09 ± 0,01	3,67 ± 0,23	21,99 ± 0,08	52,8 ± 0,23
17	20,53 ± 0,31	0,12 ± 0,02	3,90 ± 0,09	29,97 ± 3,03	45,2 ± 0,25
18	18,20 ± 0,00	0,19 ± 0,04	4,31 ± 0,03	40,31 ± 2,88	16,5 ± 0,06
19	17,40 ± 0,00	0,05 ± 0,01	4,05 ± 0,06	36,58 ± 0,29	19,3 ± 0,11
20	19,13 ± 0,23	0,08 ± 0,03	4,16 ± 0,00	30,71 ± 0,64	18,9 ± 0,14

Uma significativa elevação na determinação de 5-HMF pode ser devido ao tratamento térmico e ao tempo de armazenamento, mas somente esta análise não pode estabelecer a severidade e a extensão destes, porque outros fatores influenciam os níveis de 5-HMF, tais como o perfil de açúcar, presença de ácidos orgânicos, pH, teor de umidade, atividade de água e fonte floral. Portanto, o conteúdo de 5-HMF fornece apenas um indicativo de superaquecimento ou inadequadas condições de armazenamento⁴. O Comitê de Açúcares do *Codex Alimentarius* determina um valor máximo do teor de 5-HMF de 40 mg/kg para um mel misto ou processado e um valor máximo de 80 mg/kg, se o mel e mistura de méis declaram sua origem de regiões com clima tropical⁵. Portanto, o valor máximo de 60 mg/kg determinado pela legislação brasileira deveria ser reavaliado para regiões de climas mais quentes.

As análises que mostraram um maior número de amostras não conformes com a legislação foram as de enzimas diastásicas (60%), seguidas de acidez (40%), Fiehe (35%) e Lund (35%). Todas as amostras que não estavam em conformidade para Fiehe e Lund também apresentaram ausência ou inativação das enzimas próprias do mel, assim como 42% das amostras com acidez elevada; e cerca de 30% das amostras com provável adulteração por açúcares invertidos, provenientes da sacarose, também apresentaram elevado conteúdo de 5-HMF.

Quanto aos resultados obtidos nas análises microbiológicas, verificou-se ausência de crescimento de todos os micro-organismos investigados, como coliformes a 45°C, *Salmonella* sp, bolores e leveduras. Tal fato pode ter sido favorecido pela alta acidez e baixo pH e conteúdo de umidade encontrada nas amostras analisadas, auxiliando na inibição do crescimento de microrganismos. Ou seja, a alta acidez encontrada não foi produzida por micro-organismos presentes nos méis analisados. Outros fatores como a origem geográfica e/ou botânica e estação de colheita também podem afetar a acidez dos méis⁴.

CONCLUSÃO

A maior parte dos méis analisados estava em desacordo com os parâmetros recomendados pela legislação, em uma ou mais das análises

físico-químicas, indicando superaquecimento, más condições de armazenamento ou até algum tipo de fraude. A acidez livre, em 40% dos méis, atingiu valores acima do determinado pela legislação, porém não pôde ser relacionada com a presença de microrganismos, pois nas análises realizadas não se detectou o crescimento destes. Os resultados obtidos causam preocupação quanto a processos de degradação e/ou diminuição de compostos nutritivos e funcionais próprios do mel, assim quanto à formação de composto tóxico como o 5-HMF, dependendo de sua concentração, oferecendo potenciais perigos à saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Prod Pec munic [Internet]. 2013;41:1-108. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2013_v41_br.pdf
2. Pucas A, Hosu A, Cimpoi C. Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. *J Chromatogr A*. 2013;1272:132-5. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.064>
3. Mendes CG, Silva JBS, Mesquita LX, Maracajá PB. As análises de mel: revisão. *Rev Caatinga* [Internet]. 2009;22(2):7-14. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/caatinga/article/view/789/633>
4. Tornuk F, Karaman S, Ozturk I, Toker OS, Tastemur B, Sagdic O et al. Quality characterization of artisanal and retail turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. *Ind Crops Prod*. 2013;46:124-31. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.042>
5. Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R. Honey: chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem*. 2016;196:309-23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
6. Lopes MTR. As boas práticas na colheita e qualidade do mel. Embrapa. [Internet]. 2008. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/saudeanimal/artigo/as-boas-praticas-na-colheita-e-qualidade-do-mel_65668.html

7. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4.ed. [1. ed. Digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf
8. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. [acesso 2018 Mar 26]. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=7797>
9. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. [acesso 2018 Mar 26]. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>
10. Ribeiro ROR, Silva C, Monteiro ML, Baptista RF, Guimarães CF, Mársico ET et al. Avaliação comparativa da qualidade físico-química de méis inspecionados e clandestinos, comercializados no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Ciênc Vet*. 2009;16(1):3-7. <https://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.160>
11. Yücel Y, Sultanoglu, P. Characterization of honeys from Hatay region by their physicochemical properties combined with chemometrics. *Food Biosci*. 2013;1:16-25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2013.02.001>
12. Abadico Finco FDB, Moura LL, Silva IG. Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010;30(3):706-12.
13. Liberato MCTC, Morais SM, Magalhães CEC, Magalhães IL, Cavalcanti DB, Silva MMO. Physicochemical properties and mineral and protein content of honey samples from Ceará state, Northeastern Brazil. *Food Sci. Technol*. 2013;33(1):38-46. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013005000028>
14. Marchini LC, Moreti ACCC, Otsuk IP. Análise de agrupamento, com base na composição físico-química de amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no Estado de São Paulo. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25(1):8-17.
15. Moraes FJ, Garcia RC, Vasconcelos E, Camargo SC, Pires BG, Harleben AM et al. Caracterização físico-química de amostras de mel de abelha africanizada dos municípios de Santa Helena e Terra Roxa (PR). *Arq Bras Vet Zootec*. 2014;66(4):1269-75. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-6865>



Avaliação da qualidade de pepinos em conserva

Evaluation of the quality of canned cucumbers

RIALA6/1736

Grez Roberta Oliveira SANTANA, Taiana Ferreira MACHADO, Paula Ferreira de Araújo RIBEIRO, Aline TIECHER*

*Endereço para correspondência: Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, Rua Luiz Joaquim de Sá Britto, S/N, Bairro Promorar, Itaqui, RS, Brasil, CEP: 97650-000. Tel: 55 3432 1850. E-mail: alinetiecher@unipampa.edu.br

Recebido: 27.10.2017 - Aceito para publicação: 14.04.2018

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar as características físicas, as físico-químicas e a rotulagem de 11 marcas de pepinos em conserva comercializados no município de Itaqui, RS. Foram realizadas a contagem do número de pepinos nos recipientes, a determinação do diâmetro e do comprimento dos pepinos, peso bruto, peso líquido, peso drenado, espaço livre, vácuo, pH, acidez total titulável e cloretos. Os rótulos das amostras de pepinos em conserva avaliados obedeceram às normas de rotulagem geral de acordo com a legislação. Os valores de peso líquido e drenado foram superiores aos especificados pelos fabricantes. O espaço livre no frasco continente variou de 0,83 a 2,23 cm e o vácuo apresentou valores entre 2,67 e 8,33 pol. Hg. A acidez total titulável apresentou valores entre 0,48 e 0,92 g de ácido acético/100 g. O pH em todas as amostras foi menor do que 4,5. Os teores de cloretos variaram de 1,70 a 3,47 g de cloreto de sódio/100 g. Pode-se afirmar que os pepinos em conserva avaliados são seguros, pois apresentaram pH menor que 4,5. No entanto, as marcas comercializadas não apresentaram padrão para as demais variáveis, pois foram encontradas diferenças nesses parâmetros avaliados.

Palavras-chave. conserva de vegetais, análise física, análise química, rotulagem de alimentos.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the physical, the physical-chemical characteristics and the labeling of 11 brands of canned cucumbers commercialized in the municipality of Itaqui, RS. The cucumbers quantity, diameter, length, gross weight, net weight, drained weight, free space, vacuum, pH, total titratable acidity and chlorides were determined. All of the evaluated canned cucumber labels complied with the general labeling standards in accordance with the legislation. The values of liquid weight and drained weight were higher than those stated by the manufacturers. The free space in the container ranged from 0.83 to 2.23 cm, and the vacuum values were from 2.67 to 8.33 in pol. Hg. The titratable total acidity presented values from 0.48 to 0.92 g of acetic acid/100 g. The pH for all of the samples was less than 4.5. The chloride contents (g sodium chloride/100 g) ranged from 1.70 to 3.47. It can be stated that the evaluated canned cucumbers are safe, since they presented pH lower than 4.5. However, the commercial brands did not show the standard for the other variables, as differences were found in these evaluated parameters.

Keywords. vegetable preserve, physical analysis, chemical analysis, food labeling.

INTRODUÇÃO

Conforme a Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005, produtos vegetais são obtidos a partir de partes comestíveis de espécies vegetais tradicionalmente consumidas como alimento, submetidos a diferentes processos tecnológicos. Esses produtos podem conter líquido de cobertura e serem adicionados de sal, açúcar, tempero ou especiarias, ou qualquer outro ingrediente desde que não descaracterize o produto¹. Dentre os produtos vegetais mais consumidos, destacam-se as hortaliças em conserva.

Hortaliça em conserva é o produto preparado com tubérculos, raízes, rizomas, bulbos, talos, brotos, folhas, inflorescências, pecíolos, frutos, sementes e cogumelos cultivados, cujas partes comestíveis são envasadas praticamente cruas, reidratadas ou pré-cozidas, imersas ou não em líquido de cobertura apropriado, submetidas a processamento tecnológico antes ou depois de fechadas hermeticamente nos recipientes utilizados a fim de evitar sua alteração².

Ainda segundo a Resolução RDC nº 352, de 23 de dezembro de 2002², as hortaliças em conserva são divididas em:

- a) Hortaliças de baixa acidez, aquelas elaboradas com hortaliças que apresentam o pH maior que 4,5 e atividade de água maior que 0,85, devendo ser submetidas ao tratamento térmico de esterilização para conservação;
- b) Hortaliças acidificadas artificialmente, elaboradas com hortaliças de baixa acidez, na qual é feita a adição de ácido orgânico ou alimento ácido para se obter pH de equilíbrio igual ou menor que 4,5 no produto final, devendo ser submetidas ao tratamento térmico de pasteurização para conservação;
- c) Acidificadas por fermentação, hortaliças submetidas à fermentação láctica, de forma a atingir pH do produto final igual ou menor que 4,5, devendo ser submetidas ao tratamento térmico de pasteurização;
- d) Naturalmente ácidas, são aquelas que o pH é igual ou menor que 4,5, devendo ser submetidas ao tratamento térmico de pasteurização para conservação, podendo ser adicionadas de açúcar.

O pepino (*Cucumis sativus* L.) é uma hortaliça que apresenta alto teor de água (96,8 g/100g) e pequenas quantidades de vitaminas C (5 mg/100 g) e sais minerais (0,3 g/100g)³. Esta hortaliça contém baixa acidez, assim sua conservação é feita por adição de ácido acético (vinagre), com o objetivo de diminuir o pH, tornando o meio com condições inapropriadas para o desenvolvimento de microrganismos, como *Clostridium botulinum*².

O processamento segue algumas etapas fundamentais, tais como recepção, seleção da hortaliça conforme estágio de maturação, lavagem para retirada de sujidades, sanitização com água clorada, branqueamento (inativação de enzimas deteriorantes), acondicionamento, adição de líquido de cobertura (salmoura), exaustão (retirada de O₂ para criar vácuo), fechamento, tratamento térmico, resfriamento e armazenamento⁴.

O tratamento térmico de hortaliças em conserva tem como objetivos eliminar microrganismos patogênicos, toxinas e enzimas que causam alterações nos alimentos, e melhorar a textura. Para as hortaliças ácidas ou passíveis de acidificação, como é o caso do pepino, que possuem baixa acidez, um tratamento térmico brando, usando temperaturas de pasteurização inferiores a 100 °C é aplicado^{2,4}. Após sofrerem tratamento térmico, a conserva é submetida ao resfriamento até a temperatura interna de 40 °C e posteriormente submetida a rotulagem do produto final².

A rotulagem do produto é de responsabilidade da empresa fabricante, a qual deve obedecer às normas de rotulagem geral, nutricional e específicas^{2,5,6,7}. Considerando a forma de expressar o conteúdo metrológico a ser utilizado em hortaliças em conserva, o rótulo deve apresentar em caracteres iguais em dimensão e destaque as expressões: “peso líquido” e “peso drenado”⁵. Conceitua-se peso líquido como a quantidade total do produto declarada na embalagem, excluindo o peso da mesma e de qualquer outra substância acondicionada com esse produto. Peso drenado é a quantidade de produto declarada na embalagem, excluindo a mesma e qualquer outra substância líquida adicionada⁵. A indicação quantitativa do conteúdo líquido deve constar na rotulagem da embalagem, na vista principal, de modo a transmitir

ao consumidor uma fácil, fiel e satisfatória informação da quantidade comercializada⁵.

Este trabalho teve o objetivo de avaliar os parâmetros físicos e físico-químicos de marcas comerciais de pepinos em conserva, além de avaliar as informações contidas nos rótulos das embalagens, a fim de verificar a adequação desses parâmetros com a legislação vigente, uma vez que existem poucos trabalhos para essa categoria de produto alimentício.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridas 33 amostras de pepino em conserva, de 11 marcas diferentes, totalizando três amostras do mesmo lote por marca, comercializadas no município de Itaqui, Rio Grande do Sul, RS, em setembro de 2016, sendo que a escolha das amostras teve como critérios as informações na rotulagem, tais como a designação do produto (pepino em conserva), peso líquido, ingredientes (pepino, água, vinagre, sal e condimentos), data de fabricação, lote e data de validade. Os pepinos em conserva estavam acondicionados em embalagens de vidro com tampa de rosca.

Análises físicas e físico-químicas

As análises físicas e físico-químicas foram realizadas nos laboratórios da Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, RS.

Foram avaliados o peso bruto (g), espaço livre (cm), peso drenado (g), peso líquido (g), número de pepinos, diâmetro dos pepinos (mm) e comprimento dos pepinos (mm) de acordo com a metodologia proposta por Seixas⁸.

O vácuo foi determinado utilizando-se um vacuômetro analógico, com amplitude de 0 a -30 pol. Hg (0 a -760 mm Hg), de acordo com o procedimento padrão⁸. A determinação de pH, acidez total titulável por volumetria potenciométrica e determinação de cloretos em cloreto de sódio, dosado pelo método argenométrico de Mohr, foram realizadas de acordo com as metodologias preconizadas pelo Instituto Adolfo Lutz⁹. Para essas análises, utilizou-se amostras da parte sólida macerada com a parte líquida do produto.

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de *Tukey*, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa *Assistat*, versão 7.7¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os rótulos das amostras analisadas possuíam a designação de venda, a lista de ingredientes que compõem o produto, os conteúdos líquidos, o endereço do fabricante (identificação de origem), o número de lote e o prazo de validade, seguindo a recomendação descrita pela Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002⁶ e informação nutricional, estabelecida pela Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003⁷. Do total de amostras pesquisadas, cinco não apresentavam a data de fabricação, visto que essa não é uma informação obrigatória para alimentos embalados.

Apresenta-se na os resultados obtidos na determinação de peso bruto, peso líquido, peso drenado, número de pepinos contidos nas amostras, comprimento e diâmetro médio dos pepinos das 11 marcas de pepino em conserva.

Não foi verificada diferença significativa ($p>0,05$) para o peso bruto nas 11 marcas avaliadas. Com relação ao peso líquido, a amostra B apresentou o maior peso e diferiu-se estatisticamente ($p<0,05$) da amostra F, que apresentou o menor peso líquido médio. No peso drenado, a amostra E apresentou o maior peso médio, diferindo significativamente ($p<0,05$) das demais.

Em produtos como pepinos em conserva, que apresentam duas fases (uma sólida e outra líquida), a embalagem deve indicar as quantidades referentes ao peso líquido e ao peso drenado⁵. Verificou-se que todas as amostras analisadas apresentaram massas, para o peso líquido e peso drenado, superiores às indicadas no rótulo.

Em relação ao número de pepinos, a amostra B apresentou o maior número, enquanto que a amostra I apresentou o menor número de pepinos na embalagem. Com isso, o comprimento e o diâmetro acompanharam o comportamento dessa variável de forma inversa, ou seja, o maior comprimento médio foi verificado nos pepinos da amostra I, enquanto que os pepinos da amostra B apresentaram o menor

Tabela 1. Valores das características físicas de peso bruto (g), peso líquido (g), peso drenado (g), número de pepinos, comprimento (mm), diâmetro (mm), espaço livre (cm) e vácuo (pol. Hg) nas amostras de pepino em conserva

Amostras	Peso bruto	Peso líquido	Peso drenado	Nº de pepinos	Comprimento	Diâmetro	Espaço livre	Vácuo
A	875,53 ± 1,28 ^a	561,63 ± 1,53 ^{ab}	307,83 ± 20,79 ^b	19,33 ± 1,15 ^{bcd}	58,77 ± 9,06 ^d	17,52 ± 2,55 ^{cd}	1,23 ± 0,15 ^b	6,67 ± 2,89 ^a
B	860,87 ± 4,03 ^a	585,43 ± 3,70 ^a	342,80 ± 5,81 ^b	30,33 ± 0,58 ^a	48,74 ± 8,99 ^e	11,37 ± 2,78 ^e	1,53 ± 0,45 ^{ab}	nd
C	862,63 ± 4,07 ^a	577,33 ± 7,94 ^{ab}	364,36 ± 55,05 ^b	19,00 ± 2,65 ^{bcde}	69,15 ± 10,52 ^{bc}	17,85 ± 1,94 ^{bcd}	1,33 ± 0,23 ^b	6,67 ± 3,51 ^a
D	854,13 ± 1,68 ^a	575,53 ± 3,31 ^{ab}	323,63 ± 6,88 ^b	23,33 ± 2,08 ^{abc}	64,11 ± 8,43 ^{cd}	18,44 ± 2,89 ^{bcd}	1,63 ± 0,41 ^{ab}	4,00 ± 1,73 ^a
E	864,73 ± 6,53 ^a	575,06 ± 8,27 ^{ab}	466,10 ± 15,22 ^a	19,66 ± 2,22 ^{bcd}	64,55 ± 11,24 ^{cd}	17,11 ± 3,11 ^{cd}	1,27 ± 0,06 ^b	6,67 ± 2,89 ^a
F	855,93 ± 1,62 ^a	535,40 ± 49,65 ^b	330,86 ± 38,36 ^b	15,66 ± 5,51 ^{cde}	69,92 ± 8,47 ^{bc}	19,15 ± 2,28 ^{bc}	1,43 ± 0,40 ^{ab}	5,67 ± 4,04 ^a
G	858,13 ± 3,33 ^a	567,00 ± 3,38 ^{ab}	346,73 ± 10,96 ^b	16,66 ± 1,53 ^{cde}	69,55 ± 4,96 ^{bc}	19,33 ± 2,32 ^{bc}	1,63 ± 0,40 ^{ab}	8,33 ± 1,52 ^a
H	859,40 ± 3,32 ^a	575,50 ± 2,59 ^{ab}	308,36 ± 7,69 ^b	20,66 ± 4,16 ^{bcd}	67,15 ± 11,01 ^{bcd}	17,00 ± 3,58 ^{cd}	0,90 ± 0,00 ^b	2,67 ± 2,31 ^a
I	862,10 ± 2,44 ^a	578,66 ± 5,90 ^{ab}	305,36 ± 4,02 ^b	10,66 ± 2,08 ^c	78,48 ± 7,44 ^a	22,26 ± 2,89 ^a	0,83 ± 0,30 ^b	nd
J	874,43 ± 4,97 ^a	563,40 ± 7,16 ^{ab}	322,16 ± 15,70 ^b	25,33 ± 3,79 ^{ab}	63,07 ± 5,82 ^{cd}	15,85 ± 2,83 ^d	1,26 ± 0,25 ^b	3,67 ± 3,21 ^a
K	846,43 ± 2,17 ^a	556,26 ± 3,15 ^{ab}	351,70 ± 8,66 ^b	13,33 ± 2,08 ^{de}	74,74 ± 12,30 ^{ab}	20,63 ± 3,99 ^{ab}	2,23 ± 0,05 ^a	8,33 ± 2,89 ^a

Médias ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey nd: não determinado

comprimento. O maior diâmetro médio dos pepinos foi verificado na amostra I, enquanto que a amostra B apresentou o menor diâmetro. De acordo com Carvalho et al¹¹, o pepino é caracterizado por frutos que possuem entre 5 a 7 cm de comprimento, os quais estão próximos aos verificados nas conservas de pepino comerciais.

O espaço livre verificado nas amostras de pepino em conserva variou de 0,83 a 2,23 cm. A amostra que apresentou o maior espaço livre foi a K, diferindo-se estatisticamente das amostras A, C, E, H, I e J, que apresentaram valores de espaço livre significativamente menores ($p < 0,05$). As demais amostras não diferiram significativamente entre si.

De acordo com Oetterer et al¹², deve-se deixar sempre um espaço livre nas embalagens, variando de 0,8 a 1 cm, para evitar a perda de material durante a exaustão, reduzir a pressão interna durante o tratamento térmico e possibilitar a formação do vácuo. Portanto, se for considerado o valor da média (sem o desvio padrão), somente as amostras H e I estariam de acordo com a recomendação. Dessa forma, fica evidenciado uma falha no processamento das amostras, uma vez que não foi adicionado líquido de cobertura suficiente para cobrir todo conteúdo sólido, o que pode ocasionar o escurecimento da hortaliça que não se apresenta todo tempo em contato com o líquido de cobertura⁴.

Não foi possível determinar o vácuo da amostra I devido à resistência da tampa. A amostra B não apresentou vácuo, sendo que as demais amostras não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Não existe um valor permitido de vácuo mínimo, estabelecido pela legislação brasileira, para pepino em conservas. No entanto, se considerar o padrão para palmito envasado em embalagens de vidro, o vácuo mínimo estabelecido é de 380 mm Hg¹³, o que corresponde a 14,96 pol. Hg. Sendo assim, nenhuma das amostras de pepino em conserva apresentou valor dentro do permitido para palmito em conserva acondicionado em embalagens de vidro. A ausência de vácuo na amostra B possivelmente é decorrente de falhas nas operações de exaustão ou recravação da embalagem. Conforme Dantas et al¹⁴, o vácuo inicial é influenciado pelas condições de enchimento do produto e de exaustão do líquido de cobertura, e sua alteração durante a estocagem deve-se as reações de oxidação dos pigmentos, ao crescimento microbiano e ao desenvolvimento de corrosão com liberação de hidrogênio.

Apresenta-se, na , os resultados obtidos nas análises de acidez total titulável, determinação de cloretos e pH nas 11 marcas de pepino em conserva.

Tabela 2. Valores de acidez total titulável (g de ácido acético por 100 g), cloretos (g de cloreto de sódio por 100 g) e pH

Amostras	Acidez	Cloretos	pH
A	0,86 ± 0,06 ^{abc}	2,08 ± 0,25 ^{bcd}	3,94 ± 0,07 ^c
B	0,74 ± 0,03 ^{cde}	3,47 ± 0,12 ^a	4,14 ± 0,02 ^b
C	0,72 ± 0,04 ^{de}	3,01 ± 0,12 ^{abcd}	4,08 ± 0,06 ^{bc}
D	0,67 ± 0,03 ^{ef}	3,29 ± 1,21 ^{ab}	3,98 ± 0,05 ^c
E	0,88 ± 0,02 ^{ab}	1,70 ± 0,06 ^d	3,97 ± 0,06 ^c
F	0,66 ± 0,02 ^{ef}	2,53 ± 0,25 ^{abcd}	4,00 ± 0,04 ^{bc}
G	0,59 ± 0,04 ^{fg}	1,80 ± 0,05 ^{cd}	3,93 ± 0,05 ^c
H	0,63 ± 0,02 ^{ef}	2,22 ± 0,32 ^{abcd}	4,05 ± 0,07 ^{bc}
I	0,80 ± 0,02 ^{bcd}	2,05 ± 0,25 ^{bcd}	4,00 ± 0,01 ^{bc}
J	0,92 ± 0,08 ^a	3,05 ± 0,65 ^{abc}	4,43 ± 0,05 ^a
K	0,48 ± 0,02 ^g	2,14 ± 0,30 ^{abcd}	4,14 ± 0,02 ^b

Médias ± desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey

A variação da acidez total titulável ficou entre 0,48 e 0,92 g de ácido acético/100g. Em hortaliças em conserva acidificada artificialmente, a acidez é decorrente da adição de ácidos orgânicos acrescentados ao líquido de cobertura a fim de garantir o pH de equilíbrio com valor igual ou menor que 4,5². Além do efeito acidificante, o ácido acético (vinagre) é o mais utilizado pela indústria de pepinos em conserva, devido a aceitação do sabor do produto e compatibilidade com o vegetal¹².

O maior teor de cloretos foi verificado na amostra B, onde se obteve 3,47%, sendo que as amostra E apresentou o menor teor de cloretos com 1,70%. De acordo com Oetterer et al¹², a salmoura utilizada como líquido de cobertura deve apresentar uma concentração de 2 a 3% de sal. Sendo assim, somente duas amostras (E e G) se apresentaram abaixo desse percentual, e uma amostra (B) apresentou-se acima desse percentual. A adição de salmoura ácida melhora a qualidade sensorial dos pepinos em conserva. No entanto, manter os teores de cloreto de sódio em níveis reduzidos é um importante quesito de acordo com as orientações nacionais¹⁵.

Quanto ao pH, a amostra J apresentou o maior valor médio (4,43). Os menores valores de pH foram verificados nas amostras A, D, E e G. Todas as amostras de pepino em conserva

avaliadas apresentaram pH de equilíbrio menor que 4,5, estando de acordo com o estabelecido pela legislação vigente². O pH é a variável de maior importância no controle de qualidade de hortaliças em conserva, a fim de controlar o desenvolvimento de bactérias anaeróbicas como o *C. botulinum*, microrganismo muito comum em produtos fechados hermeticamente².

CONCLUSÃO

Os rótulos dos pepinos em conserva obedeceram às normas de rotulagem geral, nutricional e da indicação quantitativa do conteúdo líquido e peso drenado, de acordo com a legislação vigente. No entanto, os valores médios de peso líquido e peso drenado eram superiores aos especificados pelas empresas fabricantes, indicando a presença de maior quantidade de pepinos nas embalagens.

Todas as amostras avaliadas atenderam o requisito específico para o pH, não oferecendo riscos de ordem sanitária, pois apresentaram valores menores que 4,5.

Os teores de cloretos encontrados nos pepinos em conserva, expressos em cloreto de sódio, estão próximos ao recomendado pela literatura. Do mesmo modo, o comprimento e diâmetro dos pepinos nas marcas comerciais avaliadas se apresentaram conformes ao padrão de pepino de conserva. No entanto, visto que não existe uma legislação específica com padrões de identidade e qualidade para pepino em conserva, foram verificadas diferenças nos valores encontrados para o espaço livre e vácuo em relação à literatura, sendo que essas diferenças podem estar relacionadas com falhas no processamento.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005. Dispõe sobre produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 set 2005. Seção 1(184): 374-5. Disponível em: http://http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0272_22_09_2005.html

2. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 352, de 23 de dezembro de 2002. Dispõe sobre boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de frutas e ou hortaliças em conserva. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 08 jan 2003. Seção 1(6):140-2. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_N%25C2%25BA_352.pdf/84837cf4-18d3-441c-92f7-de748e8ea79
3. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA). Tabela brasileira de composição de alimentos. 4. ed. Campinas (SP): NEPA-UNICAMP; 2011. Disponível em: http://www.cfn.org.br/wp-content/uploads/2017/03/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf
4. Krolow ACR. Hortaliças em conserva. Brasília (DF): Embrapa Informação Tecnológica; 2006. 40p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11953/2/00078030.pdf>
5. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (BR). Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Portaria nº 157, de 19 de agosto de 2002. Dispõe sobre o regulamento técnico metrológico. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 20 ago 2002. Seção 1(160):41-2. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393963/PORTARIA_INMETRO_157.pdf/c9a181fe-f18f-4d67-80aa-7091ada74e6c
6. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Dispõe sobre a rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 set 2002. Seção 1(184):33-4. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_259_2002.pdf/e40c2ecb-6be6-4a3d-83ad-f3cf7c332ae2
7. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a rotulagem nutricional de alimentos embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 26 dez 2003. Seção 1 (251):33-4. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360_23_12_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc
8. Seixas RHM. Avaliação da qualidade de pêssego em calda de marcas nacionais “tipo especial” e importadas, das safras 1999/2000 e 2010/2011 [dissertação de mestrado]. Pelotas (RS): Universidade Federal de Pelotas; 2011.
9. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. [1. ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/ediorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf
10. Silva FAS, Azevedo CAV. The Assisat Software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *Afr J Agric Res*. 2016;11(39):3733-40. <https://dx.doi.org/10.5897/AJAR2016.11522>
11. Carvalho ADF, Amaro GB, Lopes JF, Vilela NJ, Michereff Filho M, Andrade R. Circular técnica 113: a cultura do pepino. Brasília (DF): Embrapa Hortaliças; 2013. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/956387/1/ct113.pdf>
12. Oetterer M, Regitano-d'Arce MAB, Spoto M. Fundamentos da ciência e tecnologia de alimentos. Barueri (SP): Manole; 2006. 612p.
13. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 85, de 27 de junho de 2016. Dispõe sobre o padrão de identidade e qualidade para palmito em conserva. Altera a Resolução RDC nº 17, de 19 de novembro de 1999, que dispõe sobre o padrão de identidade e qualidade para palmito em conserva. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 28 jun 2016. Seção 1 (122):23-4. Disponível em: http://imprensanacional.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/23160205/do1-2016-06-28-resolucao-rdc-n-85-de-27-de-junho-de-2016-23160171
14. Dantas ST, Saron ES, Gatti JAB, Kiyataka PHM, Dantas FBH. Estabilidade de ervilha em conserva em embalagem metálica com baixo revestimento de estanho. *Braz J Food Technol*. 2011;14(3):249-57. <https://dx.doi.org/10.4260/BJFT2011140300030>
15. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira. 2. ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2014. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvms/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf



Condições higienicossanitárias do comércio ambulante de alimentos

Hygienic and Sanitary conditions of the street food trade

RIALA6/1746

Jéssica Queiroz PEREIRA, Tatiana Salgado TONIATO, Jackline Freitas Brilhante de SÃO JOSÉ*

*Endereço para correspondência: Departamento de Educação Integrada em Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo. Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, ES, Brasil, CEP: 29040-090. TEL: +55 27 3335 7017. E-mail: jackline.jose@ufes.br

Recebido: 08.01.2018 - Aceito para publicação: 29.06.2018

RESUMO

O comércio ambulante de alimentos é uma opção de trabalho e de fonte de renda, mas, devido as condições de manipulação e comercialização, os alimentos podem apresentar qualidade insatisfatória. No presente estudo transversal foram avaliadas as condições higienicossanitárias de comércios ambulantes de alimentos nos municípios de Vila Velha e Vitória, Espírito Santo, Brasil. A avaliação foi feita pela observação direta e aplicação de lista de verificação estruturada com 38 itens. Os comércios foram classificados conforme os critérios estabelecidos pela RDC nº 275/2002: Grupo 1 (76 a 100% de atendimento dos itens), Grupo 2 (51 a 75% de atendimento) e Grupo 3 (0 a 50% de atendimento). Quarenta e oito (80%) dos pontos de venda classificaram-se no Grupo 3 e 20% (n=12) no Grupo 2, e este resultado indica alto percentual de inadequação quanto as boas práticas de manipulação nos comércios ambulantes visitados. Foram detectadas falhas como inexistência de lixeiras, armazenamento sem controle de temperatura, inadequada higienização de superfícies, manipuladores sem apropriada higienização de mãos e ausência de licença sanitária. Neste contexto, sugere-se que sejam realizadas a adequação das condições de infraestrutura dos locais de comercialização, a adoção de programas de treinamento e a elaboração de regulamentos governamentais para este tipo de comércio.

Palavras-chave. lista de verificação, higiene dos alimentos, vigilância sanitária.

ABSTRACT

Street food is an option and a source of income, but, due to the conditions of handling, the food quality could be unsatisfactory. Thus, a cross-sectional study was carried out to evaluate the hygienic and sanitary conditions of street foods trade in Vila Velha and Vitória - Espírito Santo State, Brazil. The evaluation was done by means of the direct observation and applying a checklist with 38 items. The street vended foods were classified according to the criteria established by DRC N°. 275/2002: Group 1 (76 to 100% of the items attendance), Group 2 (51 to 75% of attendance) and Group 3 (0 to 50% of attendance). Eighty percent (n = 48) of the points of sale were classified into Group 3 and 20% (n = 12) into Group 2, and this result indicates a high percentage of inadequacy regarding good handling practices in the visited trades. Failures as the absence of dumps, the storage without temperature control, the inadequate surface cleaning, the incorrect hand hygiene and the absence of sanitary license were observed. Thus, it is suggested to adapt the infrastructure conditions, to adopt the training programs and to elaborate government regulations for this type of trade.

Keywords. checklist, food hygiene, health surveillance.

INTRODUÇÃO

O hábito do “comer fora de casa” deve-se principalmente aos aspectos relacionados à introdução e o desenvolvimento da mulher no mercado de trabalho e a atividade social¹. Assim, observa-se o significativo aumento do comércio ambulante de alimentos, pois muitas vezes trata-se de uma oportunidade de ocupação econômica alternativa para desempregados, principalmente em países em desenvolvimento afetados por problemas socioeconômicos². Em muitos países desenvolvidos, esse tipo de comércio é regulamentado, diferente do que ocorre nos países em desenvolvimento, em que ainda as normas são insuficientes e falhas, como no Brasil, onde ainda não há leis federativas para esta atividade^{1,2}. Sendo assim, em diversas situações, não há a execução das legislações específicas em relação ao preparo, conservação e venda deste tipo de alimento, o que contribui para que a comida de rua ofereça riscos à saúde do consumidor³. Várias condições estão envolvidas na contaminação dos alimentos comercializados em vias públicas, tendo como um dos determinantes do processo, a manipulação inadequada. Além disso, a isenção do controle, os conhecimentos específicos de manipulação e a precariedade da infraestrutura também são condições determinantes para propagação do risco^{1,2}. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar as condições físicas e higienicossanitárias dos locais de preparo/comercialização de alimentos por ambulantes nos municípios de Vitória e Vila Velha, Espírito Santo, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo de corte transversal, descritivo, conduzido de janeiro a agosto de 2015, no qual foram avaliadas as condições higienicossanitárias dos pontos de comércio ambulante de alimentos. Quanto ao critério de seleção dos locais para desenvolvimento da pesquisa, foram avaliados seis bairros, sendo três localizados no município de Vila Velha – ES (20° 19' 48" S 40° 17' 31") e três no município de Vitória – ES (20° 19' 08" S 40° 20' 16"). Inicialmente foi feito levantamento de quais

bairros apresentavam maior número de vendedores ambulantes. Em seguida foram escolhidos aqueles que se caracterizavam como locais com grande circulação de pessoas e que eram de fácil acesso para deslocamento dos pesquisadores. O critério adotado foi a amostragem itinerante, sendo que dois pesquisadores permaneceram em cada local para identificar o número máximo de vendedores ambulantes de alimentos. Desta forma, foram avaliados 30 pontos em cada cidade totalizando 60 comércios ambulantes de alimentos.

Os dados foram coletados por meio de observação direta seguido do preenchimento de uma lista de verificação estruturada com 38 itens baseados na Resolução RDC nº 216/2004⁴ e em listas de verificação desenvolvidos por Pinho⁵, Torres⁶ e Pierre⁷. Observou-se que estes autores adotaram lista com blocos de itens para avaliação das condições dos equipamentos, condições de obtenção e manipulação dos alimentos, aspectos relacionados aos manipuladores e presença do documento de licença sanitária visível no local de venda. Como os estudos apresentavam lista de itens extensas, buscou-se selecionar itens que permitiram a avaliação mais rápida por observação direta. A lista desenvolvida apresentava duas partes, a saber: identificação do comércio e avaliação das condições higienicossanitárias. A avaliação constituiu de itens relacionados às condições dos carrinhos (barracas), equipamentos e utensílios utilizados no preparo e manipulação de alimentos (referente ao bloco 1), manipuladores (bloco 2), avaliação das boas práticas na manipulação e na comercialização dos alimentos (bloco 3), condições ambientais nos arredores do comércio (bloco 4) e documentação (bloco 5). Cada item apresentou três possibilidades de resposta: “C” - Conforme/Adequado; “NC” - Não conforme/Inadequado; “NA” – não se aplica. Para a classificação, levou-se em consideração o número de itens conformes, classificando os estabelecimentos como Grupo 1 (quando atendiam 76 a 100% dos itens observados), Grupo 2 (51 a 75%) e Grupo 3 (0 a 50%), de acordo com os critérios de classificação da RDC nº 275/2002⁸.

Após a coleta dos dados, foi realizada estatística descritiva com uso de frequência e

valores percentuais. Foi realizada a análise do percentual de adequação de itens por blocos avaliados. Para análise dos estabelecimentos visitados, os itens da lista de verificação foram dispostos em blocos e realizada a soma de todos os tópicos conformes dos três bairros de cada município referente a cada bloco, e realizado cálculo para encontrar o percentual de atendimento ao item por município. Ainda, foi feita uma análise geral por bloco, considerando todos os pontos de comercialização de alimentos visitados. Para avaliar a correlação entre os blocos de avaliação pela lista de verificação foi realizado o teste de correlação de Pearson (r), considerando as forças pontuais de correlações e respectivas probabilidades de erros ($p \leq 5\%$), no qual as forças das correlações são classificadas em despre-zível (0,01 a 0,09), baixa (0,10 a 0,29), moderada (0,30 a 0,49), substancial (0,5 a 0,69) e muito forte ($\geq 0,70$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do comércio

Dos 60 pontos avaliados, 20% ($n=12$) comercializam salgados, 18,33% ($n=11$) churrasquinho, 11,66% ($n=7$) cachorro quente, 8,33% ($n=5$) hambúrguer, 8,33% ($n=5$) churros, 5% ($n=3$) milho verde e os demais comercializavam produtos como queijos, pipoca, doces e balas. Cortese et al⁹ em pesquisa no comércio ambulante de Florianópolis observaram que, em 43 pontos de venda, os alimentos mais comercializados foram pipoca (35%), doces e lanches industrializados (23%) e cachorro quente (16%). Nos pontos de comercialização de alimentos avaliados, observou-se que em 58,33% ($n=35$) dos comércios havia apenas um funcionário. Já a presença de dois e três funcionários foi encontrada em 28,33% ($n=17$) e 11,33% ($n=8$) dos comércios avaliados, respectivamente. A presença de apenas um funcionário pode envolver condições de higiene e manipulação inadequadas, pois a prática dos ambulantes de serem auto empregados ocasiona o desenvolvimento de todas as atividades envolvidas no preparo/manipulação/comercialização, como a manipulação do alimento e do dinheiro, que é um ponto crítico relatado nos estudos que avaliaram este tipo de comércio^{9,10}.

Avaliação das condições higienicossanitárias

Classificação geral

Do total de pontos avaliados, 80% ($n=48$) classificaram-se no Grupo 3 e os demais foram classificados no Grupo 2. Desta forma, os locais visitados apresentaram várias inadequações quanto as boas práticas de manipulação. Isso caracteriza risco à saúde do consumidor, tendo em vista que as inadequações estão relacionadas a técnicas de higiene, manipulação e comercialização inadequadas.

Na , pode-se observar que, os pontos de comercialização de alimentos localizados na cidade de Vila Velha apresentaram maior percentual de adequação para todos os blocos de itens avaliados. A presença da licença para o funcionamento é um fator que provavelmente está diretamente relacionado às boas práticas ligadas ao exercício do comércio ambulante. No município de Vitória, ES existe o Código de Posturas e de Atividades Urbanas do Município¹¹ e este estabelece na seção I, art. 135 que a administração deverá regulamentar as condições sanitárias, de higiene e salubridade dos estabelecimentos, que já não estejam definidas em legislação específica, observando a peculiaridade de cada atividade, de forma a proteger a saúde e o bem estar dos seus respectivos usuários.

Avaliação dos carrinhos (barracas), equipamentos e utensílios

Dos comércios ambulantes analisados nos bairros de Vila Velha, foi observada média de adequação igual a 66,25% para este bloco. Nos pontos de comercialização de alimentos de Vitória a média de adequação foi igual a 51,66%. Deste modo, para este bloco de itens, os pontos comercialização de alimentos de ambos municípios foram classificados no Grupo 2. A principal inadequação observada das condições dos carrinhos foi à presença de fissuras e ferrugens em 16,6% dos comércios ($n=10$). Em 5% dos comércios visitados ($n=3$) havia apenas uma caixa isotérmica apoiada em superfícies como mesa e/ou cadeira e em 3,33% ($n=2$) utilizava-se o porta-malas de automóveis. Cortese et al⁹ observaram que entre os vendedores de alimentos que relataram armazenar alimentos

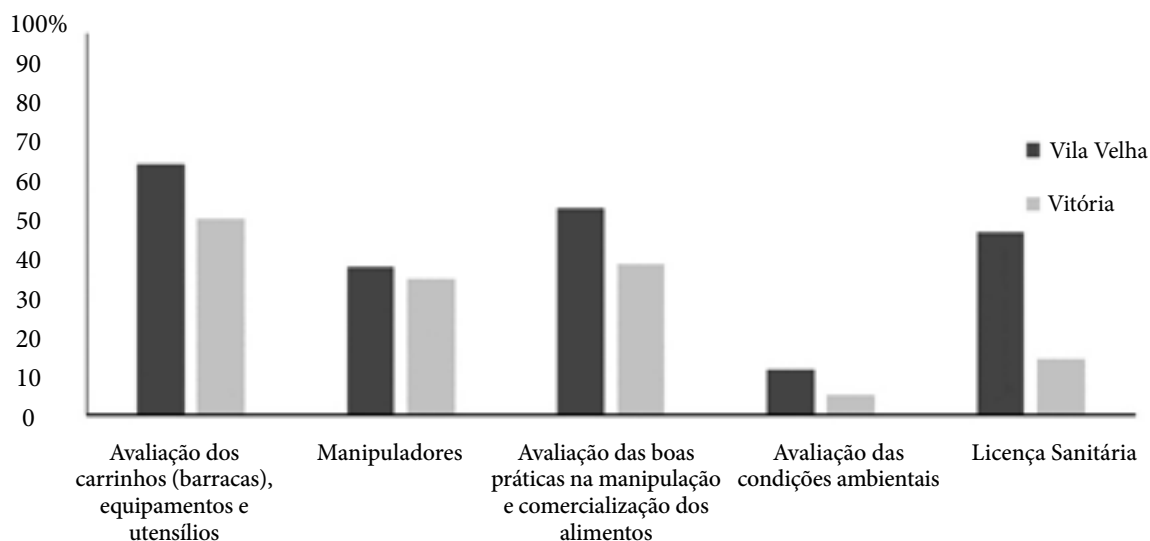


Figura. Percentual de atendimento aos itens da lista de verificação por blocos no comércio ambulante de alimentos nos municípios de Vila Velha e Vitória, ES, 2015

em gelo, nenhum deles tinha meios ou condições de repor o gelo durante o período de venda. A ausência de controle de temperatura é preocupante pois em ambas cidades as condições climáticas (temperaturas de 30 a 35°C) favorecem a exposição prolongada dos alimentos a condições que permitam a multiplicação microbiana.

Quanto aos utensílios, apesar de em geral atenderem aos critérios relacionados às características das superfícies, 55% dos locais visitados (n=33), estes materiais eram armazenados sem proteção e em 98,3% (n=59) não eram higienizados antes e imediatamente após o uso. A falta de higienização pode favorecer a contaminação cruzada dos alimentos através de tábuas de corte com resíduos de alimentos, por exemplo¹⁰. A estufa foi o equipamento para armazenamento sob temperatura controlada encontrada em 33,3% (n=20) dos locais observados. No entanto, foram encontrados locais em que não havia o controle da temperatura em 30% (n=18) em 3,3% (n=2) a mesma permanecia desligada e encontrava-se sem o vidro lateral. Falhas no armazenamento dos alimentos que são comercializados nas ruas bem como o uso de sobras sem a aplicação de métodos de conservação adequados são considerados pontos críticos e podem favorecer a multiplicação microbiana¹⁰.

Foi verificado que em 25% dos locais visitados, a proteção dos equipamentos contra o sol, chuva, poeira e outras formas de contaminação era realizada por meio de toldos e guarda-sol. Locais de comercialização de alimentos protegidos sem acúmulo de lixo, indícios de insetos e de roedores indicam cuidados e condições de higiene voltadas à prevenção contaminação e consequentemente contribuem para proteção da saúde do consumidor.

Avaliação dos manipuladores

Neste bloco, nos municípios de Vila Velha e Vitória foram classificados no Grupo 3, com média de 39,04% e 35,71% de adequação, respectivamente. Dentre as inadequações observadas, destacam-se a utilização de adornos em 71,6% (n=43) dos comércios visitados, manipulação de dinheiro em 91,6% (n=55), uniforme incompleto (não utilização de calça comprida e sapatos fechados) em 70% (n=42) e a ausência da higienização correta das mãos antes de manipular os alimentos em 91,6% (n=55). O fato dos vendedores não realizarem o procedimento de higienização de mãos durante o processo de manipulação e comercialização (manuseio de dinheiro, de lixo e de utensílios) favorecem a contaminação dos produtos disponíveis para

venda. Oliveira et al¹² verificaram que a falta de capacitação da maioria dos manipuladores e realização de várias funções (manipulação de alimentos, remoção de lixo e manuseio de dinheiro) por um mesmo indivíduo representa um relevante fator de risco para a contaminação de alimentos. Os manipuladores devem lavar com cuidado as mãos ao iniciar as atividades, antes e após manipular alimentos, após qualquer interrupção do serviço, após tocar materiais contaminados, após usar os sanitários e sempre que se fizer necessário⁶.

Avaliação das boas práticas na manipulação e comercialização dos alimentos

Observou-se para os pontos de comercialização de alimentos em Vila Velha e Vitória média de adequação de 54,25 % (Grupo 2) e 40 % (Grupo 3), respectivamente. Foram observadas inadequações na manipulação e na comercialização dos alimentos como a utilização de gelo em risco de contaminação devido à forma de manuseio em 8,3% (n=5), produtos saneantes armazenados em local inadequado e próximo aos alimentos em 28,3% (n=17), contato direto entre alimentos crus e prontos para o consumo em 8,3% (n=5), condições de tempo e temperatura não controladas em 63,3% (n=38), presença de maionese preparada de maneira artesanal em 31,6% (n=19) e higienização precária da área de manipulação dos alimentos em 55% (n=33). Este cenário indica despreparo dos vendedores ambulantes para manipulação e comercialização de alimentos e consequentemente facilitam a contaminação e proliferação de micro-organismos. Resultados semelhantes foram observados por Loukieh et al¹³ que observaram em estudo realizado no comércio ambulante de Beirute, Líbano, que 56,7% dos alimentos preparados eram armazenados em recipientes cobertos e limpos enquanto nos demais locais havia exposição às condições ambientais. Estes mesmos autores, também verificaram que 63,3% das barracas armazenavam em um mesmo ambiente matérias-primas, produtos crus e cozidos.

Estas falhas registradas em muitas ocasiões são cometidas por falta de capacitação dos vendedores para a atividade. Segundo Muyanja

et al¹⁴, manipuladores com nível primário de instrução, situação comum entre os vendedores do comércio ambulante, tendem a ter práticas de higiene e de manipulação de alimentos inadequadas e dificuldades no aprendizado de novas condutas, o que pode comprometer a qualidade sanitária do alimento preparado.

Avaliação das condições ambientais

Neste bloco, os comércios ambulantes de Vila Velha e Vitória apresentaram baixa média de adequação, sendo este de 12,22% e 5,55%, respectivamente, sendo ambos classificados no Grupo 3. Por tratar-se de comércio de rua, a ausência de sujidades e animais nos arredores do comércio torna-se um item de difícil controle. Outra inadequação verificada foi o uso de recipientes de lixo sem tampa e pedal em 86,6% (n=52) dos comércios visitados. Ainda foram observados locais em que o lixo se encontrava totalmente cheio, de forma a atingir a capacidade máxima, o que pode contribuir para a atração de vetores e pragas e a proliferação de micro-organismos. Em algumas ocasiões foi observado o uso apenas de uma sacola plástica pendurada junto ao carrinho em 1,6% (n=1). Este fato é preocupante, pois o lixo acumulado e acondicionado inadequadamente é um fator de risco para atrair insetos e roedores para as proximidades dos pontos de venda dos alimentos. Monteiro¹⁵ também observou que em 31,2% dos comércios ambulantes localizados na região leste de Belo Horizonte, MG não existiam lixeiras com tampa. O local de comercialização é o ponto crítico para a contaminação da comida de rua⁹. Além do risco da contaminação ambiental, a falta de água corrente ou armazenamento de água potável tornam as condições de segurança alimentar nesses locais insustentáveis, pois é essencial para higienização de alimentos, mãos, utensílios e equipamentos.

Documentação

Para este bloco, ambos os municípios foram classificados no Grupo 3. Vila Velha apresentou média de 48,33% de adequação, enquanto Vitória apresentou apenas 15% de adequação. A presença de licença sanitária no comércio ambulante pode

indicar que o vendedor tem preocupação em regularizar sua atividade bem como cumprir as normas higienicossanitárias para manipulação e comercialização dos alimentos.

Após análise dos resultados descritivos, determinaram-se as correlações pontuais entre grupos de itens avaliados com na Lista de verificação das boas práticas (). Houve correlação positiva moderada entre os grupos A e C, B e C, A e E. Este resultado indicou que a estrutura dos carrinhos e os manipuladores são variáveis que podem estar associadas às práticas de manipulação. Deste modo, quando não há estrutura adequada para produção de alimentos, os manipuladores tendem a adotar hábitos inadequados durante a manipulação e favorecer a contaminação.

Tabela. Correlação entre os itens avaliados na Lista de verificação de Boas Práticas para comércio ambulante de alimentos em 60 pontos nos municípios de Vila Velha e Vitória - ES, 2015

	A	B	C	D	E
A	1.00000	0.04806	0.4077*	0.19237	0.41512*
B		1.00000	0.39095*	0.12469	0.08937
C			1.00000	0.21901	0.08937
D				1.00000	0.19021
E					1.00000

A = Avaliação Dos Carrinhos; B = Manipuladores; C = Práticas de manipulação; D = Condições Ambientais; E = Outros itens. *A correlação é significativa no nível 0,01, de acordo com a correlação de Pearson

CONCLUSÃO

Os comércios ambulantes avaliados apresentaram diversas inadequações quanto as boas práticas de manipulação de alimentos. Este resultado indica a necessidade de mudanças no local de comércio. Cabe ressaltar que muitas das falhas observadas estão associadas a condutas inadequadas dos manipuladores bem como as condições de estrutura física nos comércios. Sendo assim, os treinamentos são medidas indispensáveis, pois representam o início do processo de capacitação do vendedor

ambulante, e forma a repassar técnicas e condutas imprescindíveis para a garantia da qualidade higienicossanitária do alimento. Além disso, a vigilância neste comércio deve ser reforçada por meio da elaboração de regulamentações governamentais específicas para este tipo de serviço, uma vez que, ao se tratar de alimentos, irregularidades podem culminar em risco a saúde do consumidor.

REFERÊNCIAS

1. Furlaneto-Maia L, Oliveira MT de, Oliveira AF. Condições higiênico-sanitárias, qualidade microbiológica e teste de susceptibilidade antimicrobiana de cepas isoladas de sanduíches comercializados por ambulantes. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(4):489-96. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial69_4_completa/1319.pdf
2. Souza GC de, Santos CTB dos, Andrade AA, Alves L. Comida de rua: avaliação das condições higiênico-sanitárias de manipuladores de alimentos. *Cien Saude Colet*. 2015;20(8):2329-38. <http://dx.doi.org/10.1590/1413-81232015208.14922014>
3. Okojie PW, Isah EC. Sanitary conditions of food vending sites and food handling practices of street food vendors in Benin City, Nigeria: implication for food hygiene and safety. *J Environ Public Health*. 2014;2014:701316. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/701316>
4. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 16, set. 2004. Seção 1(179):25-8.
5. Pinho MFH. Condições higiênico-sanitárias na venda ambulante de alimentos: introdução ao tema em Belém do Pará [monografia]. Belém(PA): Universidade Castelo Branco; 2008.
6. Torres SAM. Locais de preparação e comércio de cachorro-quente: avaliação higiênico-sanitária e o ponto de vista do consumidor [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2008. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/3303>

7. Pierre LT. Condições higiênico-sanitárias de alimentos prontos para o consumo comercializados por ambulantes no município de Ouro Preto-MG [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2008. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/MAFB-7PZG7N>
8. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 275 de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento técnico de procedimentos operacionais padronizados aplicados aos estabelecimentos produtores/ industrializadores de alimentos e a lista de verificação das boas práticas de fabricação nesses estabelecimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 out. 2002. Seção 1(206):126. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_275_2002_COMP.pdf/fce9dac0-ae57-4de2-8cf9-e286a383f254
9. Cortese RDM, Veiros MB, Feldman C, Cavalli SB. Food safety and hygiene practices of vendors during the chain of street food production in Florianópolis, Brazil: A cross-sectional study. *Food Control*. 2016;62(1):178-86. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.027>
10. Trafialek, J, Drosinos EH, Kolanowski W. Evaluation of street food vendors' hygienic practices using fast observation questionnaire. *Food Control*. 2017;80(1):350-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.022>
11. Prefeitura Municipal de Vitória. Lei nº 6.080 de 29 de dezembro de 2003. Institui o Código de Posturas e de Atividades Urbanas do Município de Vitória. Disponível em: <https://camara-municipal-da-vitoria.jusbrasil.com.br/legislacao/584037/lei-6080-03>
12. Oliveira ACG, Nogueira FAG, Zanão CFP, Souza CWO, Spoto MHF. Análise das Condições do Comércio de Caldo de Cana em Vias Públicas de Municípios Paulistas. *Segur Aliment Nutr*. 2006;13(2):06-18. <https://doi.org/10.20396/san.v13i2.1828>
13. Loukieh M, Mouannes E, Jaoudeh CA, Wakim LH, Fancello F, Zeidan MB. Street foods in Beirut city: An assessment of the food safety practices and of the microbiological quality. *J Food Saf*. 2018;38(3):e12455. <https://doi.org/10.1111/jfs.12455>
14. Muyanja C, Nayiga L, Brenda N, Nasinyama G. Practices, knowledge and risk factors of street food vendors in Uganda. *Food Control*. 2011;22(10):1551-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.016>
15. Monteiro MAM. Caracterização do Comércio Ambulante de Alimentos em Belo Horizonte-MG. *Demetra*. 2015;10(1):87-97. <https://doi.org/10.12957/demetra.2015.13364>



Validação de metodologia analítica para determinação de endotoxina bacteriana em água para diálise por meio de método cromogênico cinético

Analytical methodology validation for determining the bacterial endotoxin in the dialysis water by means of kinetic chromogenic technique

[RIALA6/1734](#)

Ellen Gameiro HILINSKI^{*}, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR¹, Fernando Pontes de Lima e SILVA¹, Terezinha de Jesus Andreoli PINTO², Adriana BUGNO³

^{*}Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz. Av Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 30682963. E-mail: ellen.hilinski@ial.sp.gov.br

²Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

³Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 05.12.2017 - Aceito para publicação: 07.02.2018

RESUMO

O nível de endotoxina presente na água tratada para hemodiálise é um importante indicador de qualidade, uma vez que altas concentrações de endotoxina atuam como a principal fonte de inflamação crônica em pacientes submetidos à diálise. Este estudo visa validar o método analítico para determinar quantitativamente a endotoxina bacteriana em amostras de água de hemodiálise pelo método cromogênico cinético e de comparar com o método de coagulação em gel. Os ensaios pelo método de coagulação em gel foram realizados de acordo com a Farmacopeia Brasileira em três amostras de água de hemodiálise. A validação do método cromogênico cinético foi realizada utilizando-se as mesmas amostras por meio de sistema de teste portátil. As médias geométricas das concentrações dos pontos finais obtidos nos testes de confirmação de sensibilidade LAL e de interferência por método de coagulação em gel apresentaram resultado de 0,125 UE/mL. Os resultados obtidos pelo método cromogênico para a recuperação do controle positivo do produto variaram de 89 a 186% e o coeficiente de variação de 2,5 a 18,2%, demonstrando que as amostras não apresentaram interferência. Foram obtidos resultados equivalentes em ambos os métodos, o que permite a implementação do método em laboratórios de saúde pública.

Palavras-chave. validação, endotoxina, água, diálise renal.

ABSTRACT

The occurrence of endotoxin in the treated water for hemodialysis is an important indicator of quality, since high concentrations of endotoxin constitute the main source for causing chronic inflammation in patients undergoing dialysis. This study aims at validating the analytical method for determining quantitatively the bacterial endotoxin in hemodialysis water samples. The data from the kinetic chromogenic method were compared with the results obtained from the gel coagulation technique. The gel coagulation assays were performed in three samples of hemodialysis water, according to the Brazilian Pharmacopoeia. The validation of the kinetic chromogenic method was performed using the same samples through the portable test system. The geometric means of the concentrations of the endpoints obtained from the tests for confirming the LAL sensitivity and the interference by gel coagulation method showed a result of 0.125 EU/mL. The results obtained by the chromogenic method for recovering the product positive control varied from 89 to 186% and the coefficient of variation from 2.5 to 18.2%, demonstrating that the samples did not show interference. Equivalent results were obtained in both methods, therefore being viable the implementation of this methodology in the public health laboratories.

Keywords. validation, endotoxin, water, renal dialysis.

A qualidade microbiológica da água tratada para diálise está diretamente relacionada à ocorrência de infecções e de reações pirogênicas nos pacientes¹. Manutenção inadequada do sistema de tratamento, distribuição da água e alterações na integridade das membranas dos dialisadores têm sido descritas como prevalentes causas de contaminação, especialmente por bactérias Gram negativas, potenciais formadoras de biofilme, que atuam como fonte permanente de bactérias e endotoxinas, aumentando o risco aos quais os pacientes estão expostos^{2,3}. Assim, um importante indicador de qualidade da água tratada para a diálise é o nível de endotoxina, constituindo a principal fonte de inflamação crônica em pacientes submetidos ao tratamento dialítico¹.

Estudos indicam que o estabelecimento de padrões rigorosos de qualidade para a água utilizada para diálise diminui a mortalidade dos pacientes sob tratamento dialítico⁴. Neste sentido, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu o padrão de qualidade para a água tratada para diálise, por meio da Resolução RDC N° 11/2014, com a adoção do valor limite de 0,25 unidades de endotoxina (UE) por mL para a presença de endotoxina⁵.

A Farmacopeia Brasileira⁶ descreve duas técnicas com sensibilidades distintas para a realização dos ensaios de determinação de endotoxinas bacterianas: coagulação em gel, a mais comumente empregada, caracterizada por ser uma técnica semi-quantitativa baseada na formação de gel, e as técnicas fotométricas, caracterizadas por serem técnicas quantitativas baseadas no desenvolvimento de turbidez após a quebra de um substrato endógeno (método turbidimétrico) ou no desenvolvimento de cor após a quebra de um complexo peptídeo sintético cromógeno (método cromogênico)⁶.

A necessidade de quantificação do nível de endotoxina presente nas amostras de água tratada para diálise tem conduzido à busca estratégica de métodos alternativos que permitam a obtenção de dados exatos e precisos, com o auxílio de métodos sujeitos à menores interferências quando comparados aos métodos clássicos^{7,8}.

O sistema de teste portátil (PTS[®]) é utilizado para a determinação quantitativa de endotoxinas bacterianas por meio do método cromogênico cinético.

Seu funcionamento é baseado na introdução de um cartucho acrílico com 4 canais contendo o reagente *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) e um substrato cromogênico, sendo dois canais utilizados para a avaliação do produto e os demais como controles positivos, uma vez que contém endotoxina pré-ensada na concentração de 0,69 UE/mL. Cada lote de cartucho possui um código de calibração relacionado a uma curva padrão do *log* do tempo de reação pelo *log* da concentração de endotoxina, construída na faixa de 2 *log*. Depois que a reação ocorre, a intensidade da cor é medida e a densidade óptica é comparada com a curva padrão arquivada internamente, específica para cada lote de cartucho. Nesta técnica, mede-se o tempo necessário para se atingir uma absorvância pré-determinada da mistura de reação ou a velocidade de desenvolvimento da cor⁹. Suas vantagens estão relacionadas à facilidade de execução do ensaio, bem como à obtenção dos resultados em aproximadamente 15 minutos⁹.

Este estudo teve por finalidade validar o método analítico para determinação de endotoxina bacteriana em água tratada para diálise pelo método cromogênico cinético, por meio do PTS[®] e comparar os resultados obtidos ao método de coagulação em gel a fim de garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade dos resultados, permitindo a implementação do ensaio nos laboratórios centrais de saúde pública (LACEN).

De forma a obter os dados para comparação entre as duas metodologias, foi realizada previamente a validação pelo método de coagulação em gel, através da execução dos ensaios de confirmação da sensibilidade do LAL e do teste de interferências no método de coagulação em gel (Inibição/Potencialização), utilizando três amostras de água tratada para diálise com resultados prévios negativos para endotoxina, na diluição 1:2 em água grau reagente LAL, seguindo as orientações descritas pela Farmacopeia Brasileira⁶. A formação de gel firme foi considerada como um indicativo da presença de endotoxina e o resultado, então, considerado positivo.

A sensibilidade (λ) do LAL foi determinada através da preparação de uma série de diluições do padrão de endotoxina (CSE), com razão geométrica igual a 2 para obtenção das concentrações de $\frac{1}{4}\lambda$, $\frac{1}{2}\lambda$, 1λ , 2λ e 4λ , onde λ é a sensibilidade declarada do LAL em UE/mL (neste caso, 0,125 UE/mL). Foram utilizadas cinco concentrações do padrão de endotoxina (quadruplicata) e controle negativo da água grau reagente LAL (duplicata).

Após a obtenção dos resultados, procedeu-se à determinação do ponto final de gelificação, considerado o último teste da série decrescente de concentração de endotoxina padrão que formou gel, e calculou-se a média geométrica logarítmica dos pontos finais de gelificação e o *antilog* da média.

Os testes de interferências no método de coagulação em gel (Inibição/Potencialização) foram realizados em amostras sem adição de endotoxina (solução A) e em amostras com endotoxina adicionada (solução B), nas concentrações de $\frac{1}{4}\lambda$, $\frac{1}{2}\lambda$, 1λ e 2λ , em quadruplicatas, e testando também em paralelo as mesmas concentrações de endotoxina em água (solução C) e controle negativo em água grau reagente LAL (solução D) em duplicata. Após a obtenção dos resultados, procedeu-se à determinação do ponto final de gelificação e calculou-se a média geométrica logarítmica dos pontos finais de gelificação e o *antilog* da média.

Para a validação do método cromogênico cinético foi utilizado o equipamento PTS[®] bem como cartuchos Endosafe[®] (Charles River, Estados Unidos da América). Os ensaios foram realizados com as mesmas amostras avaliadas no método de coagulação em gel, na diluição 1:2 em água grau reagente LAL.

Para o método de coagulação em gel, a Farmacopeia Brasileira⁶ estabelece que a sensibilidade declarada do lisado é válida quando o resultado da média geométrica do ponto final de gelificação estiver entre $\frac{1}{2}\lambda$ e 2λ . Além disso, para que o teste seja considerado válido quanto à inibição e potencialização da formação de gel, a média geométrica das concentrações de ponto final também deve estar entre $\frac{1}{2}\lambda$ e 2λ . Desta forma, os resultados obtidos satisfazem os critérios de aceitação, uma vez que as médias geométricas das

concentrações de ponto final dos ensaios de confirmação da sensibilidade do LAL e no teste de interferências no método de coagulação em gel (Inibição/Potencialização) foram de 0,125 UE/mL (λ) para as três amostras avaliadas (diluição 1:2). Portanto, a validação pode ser considerada válida para esta diluição.

Para o método cromogênico, a porcentagem de recuperação do controle positivo do produto representa a relação entre a concentração de endotoxina do controle positivo do produto e uma concentração específica de endotoxina (0,69 UE/mL). Se o valor de porcentagem de recuperação estiver fora da faixa de 50 a 200%, significa que, na diluição avaliada, está ocorrendo interferência do produto. Para ser considerada livre de fatores interferentes sob as condições do ensaio, a porcentagem de recuperação do controle positivo do produto deve estar entre 50 e 200% da concentração conhecida de endotoxina adicionada e o coeficiente de variação (CV) de leitura entre as amostras deve ser menor que 25%.

Portanto, de acordo com os dados da , pode-se afirmar que o produto não apresenta interferência frente às condições do ensaio, uma vez que os resultados obtidos pelo método cromogênico satisfazem o critério de aceitação para recuperação do controle positivo do produto e do coeficiente de variação entre as amostras.

Verificou-se que as amostras ensaiadas apresentaram resultados equivalentes pelos dois métodos empregados frente à legislação vigente⁵, permitindo afirmar que o método cromogênico foi validado com êxito para a diluição 1:2 da amostra.

Deste modo, consideramos que é possível o emprego desta metodologia para a determinação quantitativa de endotoxinas bacterianas em amostras de água tratada para diálise através do método cromogênico cinético utilizando o PTS. O principal benefício em sua utilização está associado à liberação de resultados quantitativos em menor tempo, o que permitirá antecipar a tomada de decisões dos grupos de vigilância sanitária, a fim de que os pacientes renais crônicos que utilizam os serviços de diálise estejam expostos a menores riscos.

Tabela. Média dos resultados obtidos nos ensaios de validação do método cromogênico cinético

Amostra	Diluição da amostra	Amostra		Controle positivo do produto		
		UE/mL	CV (%)	UE/mL	CV (%)	Recuperação (%)
1	1:2	<0,10	0,0	0,646	2,5	94
2	1:2	<0,10	0,0	0,616	2,9	89
3	1:2	<0,10	0,0	1,28	18,2	186

Nota: Controle negativo da água = Negativo

REFERÊNCIAS

1. Ferreira JAB, Nobrega HN, Vieira VV, Abrantes SMP. Diversidade genética e produção de biofilme de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas da água utilizada em unidades de Terapia Renal Substitutiva. *Rev Analytica* [Internet]. 2013;65:56-69. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8504/2/analytica_65_56-70.pdf
2. Coulliette AD, Arduino MJ. Hemodialysis and water quality. *Semin Dial*. 2013;26(4):427-38. <http://doi.org/10.1111/sdi.12113>
3. Suman E, Varghese B, Joseph N, Nisha K, Kotian MS. The bacterial biofilms in dialysis water systems and the effect of the sub inhibitory concentrations of chlorine on them. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(5):849-52. <http://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5118.2956>
4. Hasegawa T, Nakai S, Masakane I, Watanabe Y, Iseki K, Tsubakihar Y et al. Dialysis fluid endotoxin level and mortality in maintenance hemodialysis: A nationwide cohort study. *Am J Kidney Dis*. 2015;65(6):899-904. <http://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.12.009>
5. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 11, de 13 de março de 2014. Dispõe sobre os requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Diálise e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 14 mar 2014. Seção 1(50):40.
6. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Farmacopeia Brasileira*. 5. ed. v.1. Brasília (DF): Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf
7. Parenteral Drug Association – PDA. Technical Report Nº 33. Evaluation, validation and implementation of alternative and rapid microbiological methods. Bethesda: Parenteral Drug Association; 2013. Disponível em: https://store.pda.org/TableOfContents/TR3313_TOC.pdf
8. Sutton S. Validation of alternative microbiology methods for product testing. *Pharm Tech*. 2005;29(4):118-22. Disponível em: <http://www.pharmtech.com/validation-alternative-microbiology-methods-product-testing>
9. Suzuki Y, Suzuki K, Shimamori T, Tsuchiya M, Niehaus A, Lakritz J. Evaluation of a portable test system for assessing endotoxin activity in raw milk. *J Vet Med Sci*. 2016;78(1):49-53. <http://www.doi.org/10.1292/jvms.15-0370>



O papel das nucleases no laboratório de biologia molecular: vilãs ou aliadas?

The role of nucleases in the molecular biology laboratory: villains or allies?

[RIALA6/1747](#)

Silvana Beres CASTRIGNANO*

*Endereço para correspondência: Núcleo de Doenças Respiratórias, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel. 11 3068 2906. E-mail: silbc@uol.com.br

Recebido: 18.04.2018 - Aceito para publicação: 27.08.2018

RESUMO

Em laboratório de biologia molecular existem normas para prevenir que nucleases destruam os ácidos nucleicos em análise. Rígida adesão a estas normas é primordial, principalmente em laboratórios de análises clínicas e ao se lidar com amostras com número restrito de cópias do genoma-alvo. Em contraposição, diversas nucleases têm tido importância fundamental, por exemplo, na identificação do ácido nucleico de vírus, investigação de RNA mensageiro, purificação de vírus em abordagem metagenômica, edição de genomas com o sistema CRISPR/Cas e descoberta de enzimas. O conhecimento de como nucleases podem ser tanto vilãs quanto aliadas é essencial na formação de todos que trabalham no campo de biologia molecular.

Palavras-chave. desoxirribonucleases, ribonucleases, vírus, biologia molecular, técnicas de laboratório clínico.

ABSTRACT

In a molecular biology laboratory there are standards to prevent nucleases from destroying the nucleic acids under analysis. Strict adherence to these standards is paramount, mainly in clinical analysis laboratories and when dealing with samples with a limited number of copies of the target genome. In contrast, several nucleases have been of fundamental importance, for example, in the identification of the type of viral nucleic acid, investigation of messenger RNA, virus purification in metagenomic approach, genome editing with the CRISPR/Cas system, and enzyme discovery. Knowledge of how nucleases can be both villains and allies is essential in the training of all working in the field of molecular biology.

Keywords. deoxyribonucleases, ribonucleases, virus, molecular biology, clinical laboratory techniques.

É altamente recomendável que todos que ingressem em laboratório de biologia molecular recebam orientações exaustivas sobre prevenção da degradação dos ácidos nucleicos com que irão trabalhar. Esta preocupação é especialmente importante quando se tem pouco material-alvo na amostra a ser analisada e em laboratórios voltados ao diagnóstico, como os de análises clínicas, onde a inobservância dessa prevenção pode implicar em resultados falsamente negativos.

As enzimas que degradam ácidos nucleicos são chamadas de nucleases, e estão presentes em todos os seres vivos¹. As nucleases têm a capacidade de hidrolisar a ligação fosfodiéster, que é a mais estável entre todas as ligações químicas encontradas nas moléculas biológicas, e podem ser divididas em ribonucleases (RNases) e desoxirribonucleases (DNases), dependendo da especificidade do seu ataque em relação às moléculas de ácido nucleico¹.

As orientações para evitar a ação de nucleases durante a manipulação da amostra incluem regras para evitar a contaminação com nucleases do próprio manipulador e também de contaminantes externos como bactérias e outros microrganismos (enumeradas por Farrell²; Miller et al.³; Sambrook e Russell⁴). Além disso, os integrantes do laboratório também devem zelar para que a amostra não fique susceptível às nucleases da própria amostra, principalmente RNases, provenientes das células e tecidos (vide orientações de Farrell²).

No entanto há outro lado, oposto a essa mensagem de evitar nucleases, que merece ser igualmente ressaltado: do quanto as nucleases podem ser aliadas do pesquisador na investigação científica. Revisitaremos o papel positivo que as nucleases têm tido, em diferentes abordagens, através de alguns exemplos no campo da virologia.

Nos seres constituídos por células, o genoma consiste uniformemente de DNA de fita dupla (dsDNA, do inglês *double-stranded DNA*). Já os vírus podem ter genoma dsDNA, DNA de fita simples (ssDNA, do inglês *single-stranded DNA*), RNA de fita simples (ssRNA, do inglês *single-stranded RNA*) e RNA de fita dupla (dsRNA, do inglês *double-stranded RNA*)⁵. Ao ser descoberto um novo vírus, portanto, o tipo de genoma é uma das características necessárias para sua descrição e classificação.

Lançando mão de algumas nucleases, é possível caracterizar o genoma de vírus. Nas publicações a seguir, o genoma foi associado a partículas semelhantes a vírus visualizadas por microscopia eletrônica.

Enquanto investigavam a presença de genoma de rotavírus em fezes de animais e humanos através de eletroforese em gel de poliacrilamida, Pereira et al.⁶ detectaram, em algumas amostras, duas bandas bem definidas diferentes dos segmentos genômicos característicos dos rotavírus. Os autores decifraram que eram segmentos genômicos do antes desconhecido picobirnavírus. Ao submeterem o genoma purificado do novo vírus separadamente a DNase I^a, RNase pancreática (RNase A)^b e RNase T1^c, concluíram que era constituído por dsRNA⁶.

Após purificarem e concentrarem partículas semelhantes a vírus encontradas dentro da alga marinha unicelular denominada *Chaetoceros lorenzianus*, cientistas extraíram o ácido nucleico e submeteram-no separadamente às seguintes nucleases: RNase A, DNase I, nuclease S1^d. Demonstraram ser o genoma suscetível a DNase I mas não a RNase A; e que parte do genoma não foi digerida com o uso de nuclease S1. Com o auxílio desses testes, foi possível concluir que o genoma do vírus DNA de *Chaetoceros lorenzianus* é composto por ssDNA em aproximadamente 5 kb e dsDNA em aproximadamente 0,9 kb¹⁰.

DNase I e RNase A também foram utilizadas, juntamente com tripsina (enzima proteolítica) e nuclease de micrococos^e, para uma descoberta fundamental: a existência na natureza de transferência de informação do RNA para o DNA. Dois grupos independentes de investigadores comprovaram que a síntese de DNA usando RNA como molde era realizada por proteína, denominada transcriptase reversa, existente em vírions de genoma RNA que hoje sabemos ser retrovírus^{12,13}.

a. DNase I — age em ssDNA ou dsDNA, estejam isoladas ou incorporadas na cromatina⁷

b. RNase A — cliva principalmente ssRNA na posição 3' e também RNA em híbridos DNA/RNA nos locais onde houver mal-pareamento (*mismatch*) simples⁷; também é responsável por clivar dsRNA em condições de baixa concentração de sal⁸

c. RNase T1 — cliva ssRNA onde houver nucleotídeos G^{7,9}

d. nuclease S1 — endonuclease que degrada ssRNA e ssDNA^{7,9}

e. nuclease de micrococos — hidroliza DNA e RNA¹¹

Em relação à investigação de RNA mensageiro (mRNA), um tipo de abordagem é a pesquisa da ocorrência, naquele momento, de replicação de um vírus de genoma DNA. Esta abordagem tem especial aplicação no estudo de vírus que ficam latentes após a infecção primária, e que podem se reativar. Na investigação de um vírus de genoma DNA que não fica latente após a infecção, o encontro de DNA e/ou de mRNA virais em amostra de paciente indica infecção ativa. Já ao se investigar um vírus que fica latente, a interpretação de um resultado positivo não é tão óbvia. Os vírus da Família *Herspesviridae* são bons exemplos de vírus que, após a infecção primária, ficam latentes por toda a vida do hospedeiro e que podem se reativar periodicamente. Ao se reativarem, podem ou não causar doença e, alguns deles, mesmo em estado de latência, podem estar associados a algumas doenças. A diferenciação entre o encontro de mRNA ou DNA do vírus é importante, sendo que é também essencial o conhecimento dos mRNAs produzidos durante a fase de latência e aqueles produzidos durante a replicação viral¹⁴.

Muitos dos artigos da literatura que examinam a importância da quantificação do mRNA viral para associação a doença têm como foco os vírus da Família *Herspesviridae* que causam doença em seres humanos, devido à gama de órgãos acometidos, diferentes doenças a eles atribuídas e possibilidade de gravidade dos quadros clínicos, principalmente entre os pacientes com comprometimento do sistema imune. A nuclease DNase I tem sido utilizada para eliminar ao máximo o DNA residual após extração de ácidos nucleicos e, assim, o mRNA viral poder ser avaliado¹⁵⁻¹⁸.

Outro tipo de estudo do mRNA é a investigação de suas estruturas secundárias e terciárias, de suma importância para as suas funções. Como exemplo, citaremos estudos que analisaram a existência de estruturas em haste-alça (do inglês, *stem-loop*) e pseudonós (do inglês, *pseudoknot*) no sítio interno de entrada no ribossomo (IRES, do inglês *internal ribosome entry site*) de giardiavírus, que infecta o protozoário *Giardia lamblia*. Através de pesquisas com esse vírus de genoma dsRNA, já eram conhecidas a sequência nucleotídica completa do genoma, a extensão do segmento que alberga a função de IRES no transcrito viral de senso positivo

e também já se acumulavam indícios da existência de vários elementos estruturais necessários para o início da tradução das proteínas virais^{19,20}. O mesmo grupo de pesquisa, em publicações posteriores, sintetizou *in vitro* moléculas de RNA representando a região do IRES a ser analisada e, entre outros ensaios realizados, utilizou RNase T1, RNase A, RNase V1^f e RNase T2^g para verificar onde a molécula de mRNA era clivada. Estes testes enzimáticos ajudaram a confirmar a existência de várias estruturas secundárias no IRES do giardiavírus e contribuíram para a compreensão de quais estruturas são importantes na tradução das proteínas do giardiavírus^{19,20}.

Metagenômica viral é uma abordagem que permite a análise do conjunto de sequências genômicas associadas a vírus de uma amostra, através da amplificação sequência-independente de segmentos de ácidos nucleicos^{21,22}. Seja a amostra a ser analisada biológica ou ambiental, primeiramente excluem-se células do hospedeiro ou de outros organismos que possam estar na amostra, como, por exemplo, bactérias. Como, após essa purificação, além dos vírus ainda restam ácidos nucleicos livres, nucleases têm sido usadas para diminuir a quantidade desses ácidos nucleicos. A ideia que embasa a estratégia de usar nucleases nesta fase é estar o genoma viral, desde que dentro da cápside viral, protegido das nucleases²²⁻²⁴.

O uso de DNase I no preparo de amostra a ser submetida a metagenômica viral foi descrito primeiramente por Allander et al²³ em amostras de soro. Durante a avaliação do método com vírus conhecidos, conseguiram detectar, no soro bovino utilizado como diluente, dois parvovírus previamente desconhecidos.

Já Djikeng et al²⁴, para análise de sequências virais de uma amostra ambiental, utilizaram DNase I e RNase A após a concentração de partículas virais (e antes da extração de ácidos nucleicos) para eliminar os ácidos nucleicos livres das células degradadas. Após a amplificação randômica do material obtido, descreveram sequências virais com similaridade significativa com aproximadamente 30 famílias de vírus, incluindo sequências de dois potenciais novos vírus.

f. RNase V1 — cliva preferencialmente dsRNA ou regiões estruturadas, sem especificidade de base⁹

g. RNase T2 — cliva ssRNA com preferência para resíduos de adenosina^{7,9}

Três sistemas de edição de genoma baseados em nucleases têm sido foco de bastante estudo: sistema CRISPR/Cas (CRISPR, acrônimo da língua inglesa para *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, traduzível por conjunto de repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas; e Cas, proveniente de *CRISPR-associated protein*, ou seja, proteína associada ao CRISPR), nucleases dedos de zinco (ZFN, do inglês *zinc-finger nucleases*) e nucleases efetoras semelhantes a ativadores de transcrição (TALEN, do inglês *transcription activator-like effector nucleases*)^{25,26}. Estes sistemas têm sido vistos como extremamente promissores em vários campos, incluindo tratamento de doenças genéticas e câncer, erradicação de doenças endêmicas e tratamento antiviral, pois têm a capacidade de modificar sítios específicos do genoma, dentro das células²⁶⁻²⁸. A mais utilizada dessas ferramentas é o sistema CRISPR/Cas, que, simplificada, é formado por um dsRNA que guia o sistema (já que sua sequência deve ser específica para que se ligue ao DNA a ser clivado), um motivo adjacente (PAM, do inglês *protospacer adjacent motif*) e por enzima nuclease Cas9^{h,26,27,29}. Em relação a vírus e doenças virais, o sistema CRISPR/Cas9 tem sido pesquisado para fins de (I) eliminar, de dentro das células do hospedeiro, vírus com genoma DNA (ou que têm um intermediário dsDNA em qualquer estágio de ciclo de vida viral) e que se mantêm persistentes após a infecção primária como o vírus da hepatite B, papilomavírus, herpesvírus, vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e poliomavírus JC; (II) eliminar vírus de genoma RNA que se mantêm persistentes após a infecção primária, como o vírus da hepatite C, desde que foi conseguida a adaptação para que o sistema clivasse RNA; (III) identificar fatores das células do hospedeiro essenciais para a infecção de vírus, seja para vírus que ficam persistentes, como HIV-1, seja para aqueles passíveis de causar epidemia como vírus da dengue, zika, Ebola, influenza e (IV) induzir mutação em insetos para impedi-los de continuar a ser vetores virais²⁷⁻²⁹.

Vale a pena ainda mencionar que várias polimerases que são usadas para sintetizar ácidos nucleicos no laboratório podem ter função nuclease associada.

h. Cas 9 — cliva dsDNA^{27,29}

São exemplos de DNA polimerases que têm atividade de exonuclease 3'→5', conhecida como de revisão (do inglês, *proofreading*): DNA Polimerase I, Klenow (fragmento maior da DNA Polimerase I), DNA polimerases termoestáveis de alta fidelidade^{1,7}. Já as transcriptases reversas, além da atividade DNA polimerase RNA-/DNA-dependente têm também ação de nuclease RNase H^{i,7}.

Os exemplos acima citados são só alguns dos inúmeros existentes na literatura de como diferentes nucleases têm sido úteis no laboratório de biologia molecular, seja na análise de amostras humanas, animais, vegetais ou ambientais.

Dois pontos de vista distintos sobre as nucleases, como vilãs e como aliadas, precisam ser incutidos e discutidos com todos os iniciantes na área de biologia molecular. Tanto a orientação sobre respeitar as técnicas corretas para evitar um falso negativo devido à ação das nucleases indesejáveis, assegurando assim a qualidade dos resultados, quanto o incentivo ao conhecimento mais profundo das nucleases e discussão de possíveis utilizações das mesmas em investigação científica fazem parte da formação dos profissionais de laboratório de biologia molecular.

REFERÊNCIAS

1. Mishra NC. Nucleases: Molecular biology and applications. Hoboken (NJ): Wiley-Interscience;2002.
2. Farrell Jr. RE. RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. 4.ed. Boston (MA): Academic Press;2010.
3. Miller JM, Astles R, Baszler T, Chapin K, Carey R, Garcia L et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. Recommendations of a CDC-convened, Biosafety Blue Ribbon Panel. *MMWR Suppl.* 2012;61(1):1-102. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/other/su6101.pdf>
4. Sambrook J, Russell DW, editors. Molecular cloning: a laboratory manual. 3.ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press;2001.
5. Whelan S. Viral replication strategies. In: Knipe DM, Howley, PM, editors. *Fields virology*. 6.ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins; 2013. pp. 105-26.

i. RNase H — degrada a molécula de RNA que está em dímero RNA/DNA⁷

6. Pereira HG, Flewett TH, Candeias JAN, Barth OM. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. *J Gen Virol*. 1988; 69(Pt 11):2749-54. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-69-11-2749>
7. Rittié L, Perbal B. Enzymes used in molecular biology: a useful guide. *J Cell Commun Signal*. 2008;2(1-2):25-45. <http://dx.doi.org/10.1007/s12079-008-0026-2>
8. Ludert JE, Hidalgo M, Gil F, Liprandi F. Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double stranded RNA genome. *Arch Virol*. 1991;117(1-2):97-107.
9. Ehresmann C, Baudin F, Mougél M, Romby P, Ebel J-P, Ehresmann B. Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(22):9109-28. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC306456/>
10. Tomaru Y, Takao Y, Suzuki H, Nagumo T, Koike K, Nagasaki K. Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting *Chaetoceros lorenzianus* Grunow. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(15):5285-93. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00202-11>
11. Alexander M, Heppel LA, Hurwitz J. The purification and properties of micrococcal nuclease. *J Biol Chem*. 1961;236(11):3014-9. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/236/11/3014.long>
12. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*. 1970;226(5252):1209-11.
13. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. 1970;226(5252):1211-3.
14. Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 6.ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins;2013.
15. Weinberger B, Plentz A, Weinberger KM, Hahn J, Holler E, Jilg W. Quantitation of Epstein-Barr virus mRNA using reverse transcription and real-time PCR. *J Med Virol*. 2004;74(4):612-8. <https://doi.org/10.1002/jmv.20220>
16. Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-related gene expression in patients with chronic active EBV infection. *J Gen Virol*. 2010;91(Pt 1): 42-50. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.013482-0>
17. Bressollette-Bodin C, Nguyen TV, Illiaquer M, Besse B, Peltier C, Chevallier P et al. Quantification of two viral transcripts by real time PCR to investigate human herpesvirus type 6 active infection. *J Clin Virol*. 2014; 59(2):94-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.11.014>
18. Greijer AE, Ramayanti O, Verkuijlen SA, Novalić Z, Juwana H, Middeldorp JM. Quantitative multi-target RNA profiling in Epstein-Barr virus infected tumor cells. *J Virol Methods*. 2017;241:24-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.12.007>
19. Garlapati S, Wang CC. Identification of an essential pseudoknot in the putative downstream internal ribosome entry site in giardavirus transcript. *RNA*. 2002;8(5):601-11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1370281/>
20. Garlapati S, Wang CC. Structural elements in the 5'-untranslated region of giardavirus transcript essential for internal ribosome entry site-mediated translation initiation. *Eukaryot Cell*. 2005;4(4):742-54. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.4.4.742-754.2005>
21. Ambrose HE, Clewley JP. Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Rev Med Virol*. 2006;16(6):365-83. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.515>
22. Delwart EL. Viral Metagenomics. *Rev Med Virol*. 2007;17(2):115-31. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.532>
23. Allander T, Emerson SU, Engle RE, Purcell RH, Bukh J. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(20):11609-14. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.211424698>
24. Djikeng A, Kuzmickas R, Anderson NG, Spiro DJ. Metagenomic analysis of RNA viruses in a fresh water lake. *PLoS One*. 2009;4(9):e7264. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007264>
25. Conklin BR. Sculpting genomes with a hammer and chisel. *Nat Methods*. 2013;10(9):839-40. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2608>
26. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF III. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013;31(7):397-405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>
27. Soppe JA, Lebbink RJ. Antiviral goes viral: harnessing CRISPR/Cas9 to combat viruses in humans. *Trends Microbiol*. 2017;25(10):833-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.04.005>
28. Saey TH. Gene drivers spread their wings. *Science News*. 2015;188(12):16. Disponível em: <https://www.sciencenews.org/article/gene-drives-spread-their-wings>
29. Chen S, Yu X, Guo D. CRISPR-Cas targeting of host genes as an antiviral strategy. *Viruses*. 2018;10(1):e40. <http://dx.doi.org/10.3390/v10010040>



Dia Mundial do HTLV - 10 de Novembro

World HTLV Day – November 10th

RIALA6/1751

Adele CATERINO-DE-ARAUJO*

*Endereço para correspondência: Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-902. Tel: +55 11 3068 2898. E-mail: adele.caterino@ial.sp.gov.br

Recebido: 12.11.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

RESUMO

O dia 10 de novembro foi instituído como Dia Mundial do HTLV pela Associação Internacional de Retrovirologia (IRVA – *International Retrovirology Association*). O objetivo deste ato foi de informar e mobilizar a sociedade e o poder público para o significado da infecção ocasionada pelo primeiro retrovírus humano descrito, o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1), as doenças a ele associadas, seu impacto na saúde pública e os meios de contê-lo. Como o Brasil é o país da América Latina com o maior número absoluto de casos desta infecção viral, foi elaborado o presente texto que traz as informações relevantes sobre o HTLV-1 para a comunidade científica.

Palavras-chave. HTLV-1, doença negligenciada, saúde pública, transmissão.

ABSTRACT

The November 10th was instituted as the World HTLV Day by the International Retrovirology Association (IRVA), aiming informing and mobilizing the society and the public authorities on the significance of this infection caused by the first known human retrovirus, the human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1). The associated diseases, the impact in the public health, and the means to block its transmission were reviewed. Considering that Brazil, the country in the Latin America, has been presenting the highest number of HTLV-1-infected individuals, this text was written for giving the relevant information concerning the HTLV-1 infection to the scientific community.

Keywords. HTLV-1, neglected disease, public health, transmission.

O Dia Mundial do HTLV (10 de novembro) foi instituído pela Associação Internacional de Retrovirologia (IRVA – *International Retrovirology Association*, <https://htlv.net/>) para dar visibilidade a um dos retrovírus humanos, o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1), que é o responsável pelo menos por duas doenças: a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL-*adult T-cell leukemia/lymphoma*), de alta letalidade, e a mielopatia associada ao HTLV-1 ou paraparesia espástica tropical (HAM / TSP - HTLV-1-*associated mielopathy/tropical spastic paraparesis*), de elevada morbidade. Não há cura para estas doenças e elas não têm tido devida atenção, e sequer constam da lista de doenças consideradas negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde.

O HTLV-1 é transmitido principalmente pelas vias: parenteral (por transfusão sanguínea, compartilhamento de seringas e agulhas infectadas e por acidente com material perfurocortante infectado), vertical (pelo aleitamento materno prolongado por mais de seis meses) e sexual (pelo sexo desprovido de uso de preservativo)¹. Quanto à transmissão por transfusão de sangue, esta via deixou de ter importância, desde a obrigatoriedade da realização de sorologia para HTLV em bancos de sangue do Brasil, em 1993². No entanto, a execução de sorologia para HTLV não é recomendada, tampouco é obrigatória no exame pré-natal para as gestantes, devido ao alto custo dos exames e da assistência às mães e crianças positivas. Uma vez que, existem três milhões de gestantes por ano no país e, nos casos positivos deve-se: encaminhar a mãe e o bebê para uma equipe multidisciplinar capacitada para o acompanhamento clínico, recomendar para a mãe não amamentar a criança e garantir a fórmula infantil, gratuitamente.

Como o Brasil é o país da América Latina com o maior número absoluto de indivíduos infectados por HTLV-1³, a recomendação da sorologia no pré-natal poderia resultar na diminuição de casos de transmissão por esta via e na erradicação futura do HTLV-1, à semelhança do que vem ocorrendo no Japão. Em Nagasaki, onde havia 20,3% de transmissão vertical do HTLV-1 na década de 1980 passou a 2,5% na década de 2000, após a introdução da sorologia para HTLV no pré-natal. E nessa ocasião, as mães foram aconselhadas a não amamentarem, a darem o leite materno por curto período de tempo ou,

ainda, a aquecerem o leite a 60°C por 30 minutos ou congelarem durante uma noite para efetuarem a inativação do vírus⁴.

Quanto à via sexual, pela prática de sexo sem o uso de preservativo, a transmissão desse vírus só poderá ser bloqueada se forem aplicadas as medidas educativas.

Ademais, pelo fato do HTLV-1 compartilhar as vias de transmissão com outros vírus, as coinfeções são frequentes e podem interferir na evolução das doenças a eles associadas. A coinfeção HIV/HTLV-1, por exemplo, é frequente em usuários de drogas injetáveis (UDI)⁵, e nesta população a coinfeção tem sido apontada como responsável pela evolução mais rápida para aids e pela menor sobrevida dos pacientes^{6,7}. Nestes indivíduos, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda efetuar a sorologia para HTLV pelo menos uma vez, durante o seu acompanhamento clínico/laboratorial⁸. Porém, não há esta recomendação para as pessoas infectadas pelo HCV no Brasil e no mundo, cujos estudos mostram resultados discordantes. No Brasil, muitos estudos de coinfeção HCV/HTLV-1 apontam uma melhor evolução da hepatite C [menor carga viral (CV) de HCV, clareamento espontâneo de HCV e menos lesão hepática]. E esses fatos ocorreram ao contrário dos observados em outros países que detectaram mais casos com evolução para cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e menor sobrevida dos coinfectados⁹. O mesmo perfil foi evidenciado no estudo recentemente conduzido em São Paulo, que descreveu a ocorrência de maior CV de HCV nas amostras de pacientes coinfectados por HCV/HIV, HCV/HTLV-1 e HCV/HIV/HTLV-1¹⁰. Portanto, mais estudos se fazem necessários para elucidar esta questão.

Outra matéria a ser abordada diz respeito ao diagnóstico confirmatório de infecção por HTLV-1. O diagnóstico confirmatório de HTLV-1 deve ser colocado à disposição em toda a rede pública de saúde (SUS), pois na atual situação, os testes têm sido disponíveis nacionalmente apenas para casos de ATLL¹¹. Ainda, devem-se realizar esforços no sentido de divulgar esta infecção e as doenças associadas para a população geral e comunidade médica, na tentativa de diminuir as formas de transmissão e para melhor acompanhar os pacientes.

Neste contexto, no dia 10 de novembro, houve várias manifestações no Brasil e no mundo,

incluindo-se a apresentação de palestras, bem como a realização de caminhadas e de iluminação especial (em vermelho) em vários monumentos localizados no Brasil, como: Cristo Redentor, RJ; Castelo Mourisco na FIOCRUZ, RJ; Ponte Otávio Frias de Oliveira, SP; Monumento às Bandeiras, SP; Instituto de Infectologia Emílio Ribas, SP e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP. Ademais, foram programados eventos em universidades como na Universidade Federal de Minas Gerais, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, e pelas Organizações Não Governamentais (ONGs) Vitamore, RJ (<http://vitamore.com.br/>) e HTLVida, BA (<http://htlvida.org/site/>); e foram confeccionadas camisetas com o logotipo idealizado pela IRVA ou criados pelos ativistas. Outrossim, foram promovidos videoconferências, *chats* e *lives* com a participação de profissionais médicos que atuam no atendimento aos pacientes HTLV-positivos em todo o mundo, visando esclarecer as dúvidas da população geral. Em São Paulo, o Dr. Augusto Cesar Penalva de Oliveira, Chefe do Ambulatório de HTLV do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e o Dr. Jorge Casseb, Diretor do Núcleo de Apoio a Pesquisa em Retrovírus do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, e no Rio de Janeiro, a Dra. Marzia Puccioni, da UNIRIO, representante do Brasil junto a IRVA, deram suas contribuições por meio de esclarecimentos e divulgação sobre a infecção e as doenças associadas na mídia e nas Instituições onde atuam.

Outrossim em São Paulo, a Pesquisadora Adele Caterino de Araujo do Instituto Adolfo Lutz (IAL) da Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD) da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES/SP), divulgou a específica matéria em várias mídias com destaque para a Biblioteca Virtual em Saúde, Rede de Informação e Conhecimento da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - BVS SES/SP (<http://ses.sp.bvs.br/>) e IAL (<http://www.ial.sp.gov.br/>). Ademais, em nome do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (PPG-CCD - SES/SP), a coordenadora Maria de Fátima Costa Pires e a professora/orientadora Adele Caterino de Araujo (pesquisadoras do IAL) providenciaram a confecção de um *banner* que foi exposto no saguão de entrada do prédio, em que estão sediados a CCD e parte dos laboratórios do IAL. O *banner* foi também exibido

nos *sites* da BVS e do IAL, e teve como público-alvo a população geral.

Desde o ano de 1992, o IAL tem realizado os estudos de vigilância, diagnóstico e análise de marcadores de valor prognóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2, bem como tem oferecido os testes sorológicos para o diagnóstico de HTLV-1/2 desde 1998. Neste contexto, a Revista do Instituto Adolfo Lutz não poderia se furtar de participar da divulgação desta data tão importante, principalmente para os pacientes e indivíduos infectados por esses vírus.

REFERÊNCIAS

1. Paiva A, Casseb J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(3):265-74. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0232-2013>
2. Ministério da Saúde (BR). Portaria no 1.376, de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria no 721/GM, de 9 de agosto de 1989, que aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e da outras providências. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 2 dez 1993. Disponível em: http://sna.saude.gov.br/legisla/legisla/hemo/GM_P1376_93hemo.doc
3. Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol*. 2012;3:388. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388>
4. Hino S. Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Sci*. 2011;87(4):152-66. <http://dx.doi.org/10.2183/pjab.87.152>
5. Caterino-de-Araujo A, Sacchi CT, Gonçalves MG, Campos KR, Magri MC, Alencar WK; Group of Surveillance and Diagnosis of HTLV of São Paulo (GSuDiHTLV-SP). Short Communication: Current prevalence and risk factors associated with HTLV-1 and HTLV-2 infections among HIV/AIDS patients in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;31(5):543-9. <http://dx.doi.org/10.1089/AID.2014.0287>

6. Brites C, Alencar R, Gusmão R, Pedroso C, Neto EM, Pedral-Sampaio D et al. Co-infection with HTLV-1 is associated with a shorter survival time for HIV-1-infected patients in Bahia, Brazil. *AIDS*. 2001;15(15):2053-5. <http://doi.org/10.1097/00002030-200110190-00023>
7. Brites C, Sampaio J, Oliveira A. HIV/human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. *AIDS Rev*. 2009;11(1):8-16. Disponível em: <http://www.aidsreviews.com/resumen.php?id=1030&indice=20091111&u=unp>
8. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2018. 412p. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos>
9. Castro E, Roger E. Hepatitis C virus/human T lymphotropic virus 1/2 co-infection: regional burden and virological outcomes in people who inject drugs. *World J Virol*. 2016;5(2):68-72. <http://dx.doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.68>
10. Alves FA, Campos KR, Lemos MF, Moreira RC, Caterino-de-Araujo A. Hepatitis C viral load in HCV-monoinfected and HCV/HIV-1, HCV/HTLV-1/-2-, and HCV/HIV/HTLV-1/-2- co-infected patients from São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2018;22(2):123-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2018.03.002>
11. Ministério da Saúde (BR). Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias do SUS. Relatório de recomendação nº 220 Junho/2016. Western Blot e PCR em tempo real em pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto associado ao HTLV-1. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2016/Relatorio_WesternBlot-PCR_HTLV_final.pdf



Microrganismos e parasitos em água destinada ao consumo humano proveniente da zona rural de Santo Antônio de Jesus - BA

Microorganisms and parasites in water reserved for human consumption from the rural area of Santo Antônio de Jesus – BA

RIALA6/1733

Miranda FS. Microrganismos e parasitos em água destinada ao consumo humano proveniente da zona rural de Santo Antônio de Jesus – BA. Santo Antônio de Jesus, BA. 2017. [Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB. Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos]. Orientador: Isabella de Matos Mendes da Silva. Coorientador: Ana Lúcia Moreno Amor.

O acesso à água tratada é um direito humano básico. Porém ela pode ser contaminada na origem, durante a sua distribuição, bem como nos reservatórios domiciliares. As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) representam um importante problema de saúde pública e possuem diversos agentes etiológicos, como bactérias, vírus, helmintos, protozoários e fungos. Esses microrganismos possuem distribuição cosmopolita e mecanismos de transmissão similares. A sua ocorrência vem aumentando significativamente em nível mundial principalmente onde são mais precárias as condições socioeconômicas da população, como em zonas rurais. Ademais, o tratamento da água em comunidades da zona rural é um desafio. Tratamentos alternativos nem sempre são eficientes ou são realizados da forma correta. Desta forma, este estudo objetivou avaliar a qualidade bacteriológica, parasitológica, física e química da água destinada para consumo humano numa comunidade da zona rural do Recôncavo da Bahia (Brasil), e os fatores relacionados a uma possível contaminação. As coletas foram realizadas em dois momentos: na estação chuvosa (agosto a setembro de 2015) e na estação seca (abril de 2016). Foi avaliada a presença de coliformes totais, *Escherichia coli*; quantificadas bactérias heterotróficas; realizados os métodos parasitológicos de exame direto, Faust modificado; analisados pH, temperatura, oxigênio dissolvido, cor aparente, turbidez e salinidade; aplicada lista de verificação com questões referentes à fonte da água e seu armazenamento. Dos 53 domicílios, 67,9% estavam fora dos padrões bacteriológicos de potabilidade, 5,7% fora dos padrões parasitológicos, 92,5% fora dos padrões físicos e químicos. Todas as amostras estavam em desacordo em relação aos parâmetros permitidos e recomendados pela legislação brasileira (Portaria MS 2914/2011). As quantificações chegaram a ter 28 vezes (4,15 log UFC/mL) os valores máximos recomendados para bactérias heterotróficas, do mesmo modo que foram encontrados cistos de *Giardia* spp. em três amostras. A origem da água ($p=0,002$), presença de reservatório no domicílio ($p=0,004$), destino de esgoto ($p=0,004$) e o tempo de limpeza do reservatório ($p=0,003$) tiveram relação direta com os resultados bacteriológicos. O consumo desta água representa um risco à saúde da população, podendo ocasionar surtos de DTA. Considerando que essa comunidade da zona rural é desprovida de abastecimento de água tratada pela companhia de águas e saneamento do Estado, medidas alternativas e efetivas de tratamento da água devem ser tomadas para minimizar o risco à saúde humana.

Palavras-chave. microbiologia da água, contaminação da água, água subterrânea, abastecimento rural de água, qualidade da água.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado por Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

Dissertação disponível em: <https://www.ufrb.edu.br/pgmicrobiologia/dissertacoes>
E-mail: felipemiranda2004@hotmail.com



Tratamentos para descontaminação de tomates contendo resíduos de imidacloprido

Treatment for decontamination of tomatoes containing imidacloprid residues

RIALA6/1742

Bissacotti AP. Tratamentos para descontaminação de tomates contendo resíduos de imidacloprido. Santa Maria, RS. 2018. [Dissertação de Mestrado, Área de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM]. Orientador: Ijoni Hilda Costabeber. Coorientadora: Patrícia Medianeira Grigoletto Londero.

O tomate é considerado um alimento funcional, pois seus componentes nutricionais promovem benefícios à saúde do homem. Contudo, preocupações tem surgido devido esse alimento apresentar resíduos de agrotóxicos. Por ser suscetível a pragas e doenças, a aplicação de agrotóxicos no tomate tem sido um dos métodos empregados para o controle deste problema. Dentre os agrotóxicos permitidos para a tomaticultura está o inseticida neonicotinóide imidacloprido, substância prejudicial à saúde do homem. O estudo teve por objetivos avaliar os efeitos de lavagens sobre os resíduos de imidacloprido em tomate, determinar a ingestão diária estimada (IDE) deste agrotóxico, além de divulgar métodos de descontaminação do fruto para a população. Testou-se, em triplicatas, a lavagem de tomates com água de torneira e as soluções de ácido acético a 5, 10 e 15%, clorada a 100, 150 e 200 ppm, bicarbonato de sódio a 5, 10 e 15% e suco de limão a 5, 10 e 15%, seguidas de enxágue com água corrente. A extração e a determinação das concentrações de imidacloprido nos tomates foram realizadas pelo método mini-Luke modificado e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS), respectivamente. Verificou-se o pH das soluções de lavagem e caracterizou-se a composição física e química das amostras. Ao final, foi elaborada uma cartilha com a descrição das lavagens mais eficientes na redução da concentração de imidacloprido em tomate. Determinou-se a IDE para mulheres, homens, adolescentes, adultos e idosos brasileiros. A lavagem com água de torneira foi o método mais efetivo na redução de imidacloprido nas amostras, resultado inverso ao promovido pelas soluções de bicarbonato de sódio a 10%, ácido acético a 10% e clorada a 150 ppm. Não ocorreram diminuições lineares nas concentrações de imidacloprido à medida que se aumentou a concentração das soluções de lavagem. As amostras não diferiram com relação aos teores de umidade, acidez e sólidos solúveis totais presentes nas mesmas. O pH das soluções não interferiu no pH dos tomates. A relação sólidos solúveis totais e acidez demonstrou que os tomates estavam adequados ao padrão de qualidade para o consumo. Não se observou relação linear entre os parâmetros físicos e químicos e as concentrações de imidacloprido nos tomates. As IDE foram menores que a ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida no Brasil, nos Estados Unidos da América, na Europa e pelo *Codex Alimentarius*. Os tomates analisados eram adequados para o consumo humano, pois estavam conforme os parâmetros considerados toxicologicamente seguros.

Palavras-chave. *Lycopersicon esculentum* Mill, resíduos de agrotóxicos, imidacloprido, descontaminação, lavagens.

Dissertação disponível na Biblioteca do Centro de Ciências Rurais da
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM. <http://site.ufsm.br/>
E-mail: ijonicostabeber@gmail.com



Caracterização genética e perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* presentes em um hospital de ensino

Genetic characterization and antimicrobial susceptibility of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains present in a teaching hospital

RIALA6/1745

Tavares LCB. **Caracterização genética e perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* presentes em um hospital de ensino.** São Paulo, 2018. [Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, USP]. Orientador: Carlos Henrique Camargo.

As espécies do Complexo *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* (ACB) são importantes causadoras de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde em todo o mundo. Detêm maior relevância os isolados com resistência aos antimicrobianos, os quais impactam negativamente no prognóstico, na mortalidade e custos associados ao cuidado com o paciente. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética e o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de 134 isolados multirresistentes de *A. baumannii* presentes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, entre 2007 e 2014. A identificação de *A. baumannii* deu-se pela pesquisa dos genes *bla*_{OXA-51-like} e *gltA*, detectados em 85% (n=114) dos isolados. Os isolados de *Acinetobacter* não-*baumannii* foram identificados por sequenciamento gênico como *A. nosocomialis* (n=4; 3,1%), *A. pittii*, *A. bereziniae* (n=2; 1,7%, cada), *A. ursingii*, *A. variabilis*, *A. gyllenbergii* (n=1; 0,9% cada) e *Acinetobacter* spp. (n=2; 1,7%). Os isolados de *A. baumannii* foram submetidos às técnicas de PCR multiplex para detecção de outras oxacilinases, pesquisa de *ISAbal1*, teste de susceptibilidade antimicrobiana, tipagem molecular por eletroforese em campo pulsado (PFGE), por sequência trilocus (3LST) e por sequenciamento multilocus (MLST). Detectou-se o gene *bla*_{OXA-23-like} em 105 isolados (92,1%), estando 100% associados a *ISAbal1*; *bla*_{OXA-72} em um isolado (0,9%) e *bla*_{OXA-231} em dois isolados (1,7%). A maior parte (n=66; 57,9%) dos isolados foi classificada como extensivamente resistentes (XDR). O PFGE agrupou os isolados em 11 clusters (A-K) e o MLST identificou os isolados pertencentes majoritariamente aos clones CC79 (42,4%), CC1 (16,6%), CC15 (12,1%) e ao ST317 (18,2%). Os resultados do MLST e 3LST concordaram em 95,6%. Foi verificada a ocorrência de diferentes perfis de PFGE em *A. baumannii* MDR e XDR, predominando cepas carreadoras de *ISAbal1*/_{OXA-23-like} e pertencentes aos CC1, CC15, CC79, ST317. Predominaram o ST317 nos anos iniciais e o CC79 (ST730) de 2011 a 2014. Estes resultados fornecem subsídios que ressaltam a necessidade de monitoramento e controle de patógenos multirresistentes.

Palavras-chave. *Acinetobacter baumannii*, Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde, resistência antimicrobiana, oxacilinases, Complexos Clonais, 3LST.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2015/13179-4), pelo auxílio financeiro, e ao Instituto Adolfo Lutz, pela parceria no projeto.

Dissertação disponível em: <http://www.teses.usp.br>

E-mail: laiscb.tavares@usp.br

Simpósio Internacional
“Leishmaniose Visceral: Desafios para o Controle no Contexto da Diversidade dos Cenários”



Leishmaniose visceral: cenários epidemiológicos e desafios

Visceral leishmaniasis: epidemiological scenarios and challenges

RIALA6/1753

Mauro Celio de Almeida MARZOCHI*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses – LaPClinVigiLeish, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21045-900. Tel: 21 3865 9595/ 21 3865 9541.

E-mail: mauro.marzochi@ini.fiocruz.br, mauromarzochi@uol.com.br

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

RESUMO

Um retrospecto histórico e epidemiológico da leishmaniose visceral (LV) no mundo e no Brasil e possíveis cenários dependentes de condicionantes ambientais, biológicos e sociais ressalta estratégias de vigilância e controle, enfatizando: associação de procedimentos com continuidade; conquistas e controvérsias em diagnóstico, tratamento, vacinação e uso de coleira com deltametrina, no cão; e ineficácia da terapêutica canina com as drogas disponíveis, mas boas perspectivas da vacina, na proteção individual, e da coleira impregnada, no controle coletivo. Considera a situação epidemiológica potencializada pela galopante urbanização da LV e sua dispersão geográfica, salientando desafios de controle por deslocamento do vetor e do cão infectado a novas áreas através do transporte rodoviário e ferroviário, e conflitos de rejeição à eutanásia canina. Alerta sobre a alta letalidade da LV humana em áreas de instalação recente e por associação crescente com HIV, impondo diagnóstico e tratamento precoces, para evitar agravamento clínico e óbitos, e adoção da busca ativa de casos humanos e caninos incorporada à rotina das visitas domiciliares periódicas da Estratégia Saúde da Família, para detecção de febre prolongada e outros sinais de LV e o encaminhamento a unidades de Saúde. Admite que a introdução do cão infectado em áreas indenes continuará um grande desafio.

Palavras-chave. leishmaniose visceral, urbanização, vigilância, controle, busca ativa, infecção canina.

ABSTRACT

A historical and epidemiological retrospect of visceral leishmaniasis (VL) in the world and in Brazil, and possible scenarios dependent of environmental, biological and social conditions stands out strategies of surveillance and control, emphasizing the association of procedures with continuity; conquests and controversies in diagnosis, treatment, vaccination and use of deltametrin collar in the dog; and ineffectiveness of canine therapy with available drugs, but good vaccine prospects, in individual protection, and impregnated collar, in collective control. It considers the epidemiological situation potentiated by the galloping urbanization of VL and its geographical dispersion, highlighting control challenges by moving the vector and the infected dog to new areas through road and rail transport, and conflicts of rejection to canine euthanasia. Alert on the high lethality of human LV in areas of recent installation and by increasing association with HIV, imposing early diagnosis and treatment, to avoid clinical worsening and death, and adoption of the active search of human and canine cases incorporated into the routine of the periodic home visits of the Family Health Strategy to detect prolonged fever and other signs of LV and referral to health units. Introducing the infected dog into free transmission areas will remain a major challenge.

Keywords. visceral leishmaniasis, urbanization, surveillance, control, active search, canine infection.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses, com distribuição mundial em áreas temperadas e tropicais do Velho e Novo Mundo, constituem um conjunto de doenças metaxênicas, tanto nas formas cutâneas, como na forma visceral, envolvendo diferentes hospedeiros, em meio ambiente natural ou condicionado à ação humana. Estão envolvidos os agentes etiológicos - diferentes espécies de *Leishmania*, os insetos vetores, os portadores animais e o humano, e fatores ambientais, epidemiológicos, sociais e clínicos.

Qualquer mudança em algum desses elementos pode ser capaz de provocar as diversidades epidemiológicas conhecidas, e por conhecer, sendo a urbanização da leishmaniose visceral (LV), surgida e crescente há poucas décadas no Brasil, um dos maiores desafios a enfrentar e por explicar.

Dos 82 países em que já foi identificada a LV, sete concentram 90% dos casos: Índia (6.249 casos), Sudão do Sul (4.175), Sudão (3.810), Brasil (3.336), Etiópia (1.593), Somália (781) e Quênia (692). Em 2015, a OMS registrou 23.084 mortes de pessoas no mundo causadas pela doença¹.

Cenários epidemiológicos e históricos

A LV na região do Mediterrâneo, presente em áreas rurais - aldeias localizadas em regiões montanhosas - e em algumas áreas peri-urbanas, também ocorre no Afeganistão, República Islâmica do Irã, Paquistão e na Ásia Central, sendo de transmissão zoonótica. É endêmica ou endêmico-espórádica e acomete principalmente crianças, com baixa letalidade. Dá-se pela *Leishmania infantum*, através de flebotomíneos mais cinofílicos (*Phlebotomus perniciosus*), isto é, que tem preferência de se alimentar no cão doméstico, mas também picam o homem. Nessas regiões, a presença de cães infectados, e eventualmente outros animais, ao atrair os flebotomíneos no peridomicílio, favorece a transmissão a humanos, se picados depois pelo vetor albergando a *Leishmania*.

Outro tipo de transmissão é a antroponótica, que ocorre em Bangladesh, Índia e Nepal, cujo agente é a *L. donovani*, transmitida de homem a homem por um flebotomíneo antropofílico, que

se alimenta mais no hospedeiro humano que em outros animais, domésticos ou não. *Phlebotomus argentipes*, com grande potencial de transmissão, ao picar o homem doente, leva o parasito ao picar o suscetível. A não intermediação do animal na cadeia de transmissão provoca, principalmente em aldeias rurais da Índia e outras áreas, epidemias frequentes, de difusão rápida e alta letalidade, acometendo principalmente os adultos.

Nas Américas, a LV pela *L. infantum chagasi*, endêmica no Brasil e rara nos outros países, reproduz o que acontece na bacia do Mediterrâneo; é o mesmo parasito transportado durante a colonização, com variantes que ocorrem na América Central e Venezuela². Assim também é de transmissão zoonótica e o cão doméstico a principal fonte de infecção. No Brasil, além do cão, a presença de galinheiros, chiqueiros e outros abrigos de animais no peridomicílio também atraem o principal vetor, o flebotomíneo *Lu. longipalpis*, de hábito mais eclético, alimentando-se em animais do peridomicílio e no homem. Quase todos os estados do Brasil registram casos de LV, exceto Amazonas e Acre³.

A descoberta e caracterização do agente etiológico da LV data de 1903, feita, independentemente, por Willian Leishman em paciente indiano e Charles Donovan em soldado inglês procedente da Índia. Em 1913, no Paraguai, Migone diagnosticou o primeiro caso de leishmaniose visceral provavelmente autóctone do Brasil. Em 1926, na Argentina, Mazza e Cornejo detectaram dois casos de leishmaniose visceral e em 1934 Cecilio Romaña relatou LV no Chaco Argentino.

Em 1934, no Brasil, Henrique Penna, patologista da Fundação Rockefeller, examinando fragmentos de fígado (obtidos por viscerotomia) de pacientes de varias regiões, predominantemente Norte e Nordeste, falecidos com suspeita de febre amarela, encontrou 41 positivos para *Leishmania* em 4.700 exames. Informando a Carlos Chagas, diretor do Instituto Oswaldo Cruz, este repassou ao filho Evandro Chagas que ali dirigia o Hospital Oswaldo Cruz, no campus de Manguinhos, Rio de Janeiro. Como até então não se encontrara LV no

país, Evandro admitiu de início tratar-se de nova doença, que pretenderia descrever seguindo os passos do pai na descoberta da doença de Chagas⁴.

E em 1936, no Nordeste, Evandro Chagas atende, em Aracaju, o primeiro paciente, um rapaz de 16 anos com doença avançada, no qual confirma o diagnóstico de LV. Como sendo uma suposta doença nova, acreditava que teria algo diferente do conhecido na bacia do Mediterrâneo, onde o cão doméstico era um reservatório natural. E admitiu que o hospedeiro principal fosse um animal silvestre e não o cão doméstico⁴. Naquele mesmo ano criou no Hospital Oswaldo Cruz o Serviço de Estudo das Grandes Endemias (SEGE), a partir do qual replicou as pesquisas em LV no Brasil ao criar centros associados em alguns estados, destacando-se o do Pará⁴.

Em 1937, o parasito isolado do primeiro paciente de LV é denominado de *Leishmania chagasi* por Cunha e Chagas. Em 1938, Cunha descreve a infecção por *L. chagasi* em cães.

E entre 1940 e 1950, a LV humana e canina é detectada em Pernambuco, Bahia, Ceará, Paraíba, Minas Gerais, Mato Grosso e Alagoas⁵.

Na década de 1950, Deane e Deane⁵ descrevem o parasitismo natural na raposa, a infecção natural da *Lu. longipalpis* e a infecção experimental da *Lu. longipalpis* em cães, humanos e raposas⁵.

A LV humana não apresenta grande variação clínica, caracterizando-se por evolução crônica, febre irregular, emagrecimento, grande hepatoesplenomegalia; sem relevância quanto a manifestações cutâneas. Estas, porém, são vistas com frequência e aspecto variável em outros locais. Na Índia, ocorre a leishmaniose dérmica pós-calazar caracterizada por nódulos não ulcerados na pele, ricos em *Leishmania*, fonte de infecção do vetor para outros humanos. No Mediterrâneo, são referidas lesões cutâneas ulceradas. Na América Central também são vistas eventualmente manifestações nodulares e não ulceradas, e no Brasil, no Rio de Janeiro, Ceará e Mato Grosso do Sul, têm sido descritas lesões ulceradas, semelhantes à leishmaniose cutânea localizada⁶. Isso seria devido a biologia do próprio vetor ou relacionada à imunidade do hospedeiro. No entanto, as lesões de pele em pacientes do Mediterrâneo e Américas são mais pobres em parasitos.

Novo cenário epidemiológico – Urbanização da LV

Desde que se conhecia LV no país até a década de 1970, a doença tinha um padrão de ocorrência predominante rural, em áreas de clima semi-árido, de parca vegetação ou nos sopés de serra, em moradias muito precárias, cujas crianças, mais atingidas, costumavam apresentar desnutrição prévia, e onde o inseto vetor seria criado tanto em resíduos orgânicos vegetais como em frestas de pedras e árvores, alimentando-se predominantemente em animais domésticos - cães, aves, equinos e muares - e por vezes, silvestres⁵.

A primeira mudança, como se fosse um comportamento de transição da LV, emigrando da zona rural estrita para vir chegar a áreas altamente urbanizadas, observa-se no final da década de 1970, no município do Rio de Janeiro⁷. Na periferia de alguns bairros de classe média e pobre das zonas norte e oeste (Bangu, Realengo, Campo Grande, Senador Camará, Mendanha, Jacarepaguá), em locais em geral de elevação suave, no sopé do Maciço da Pedra Branca, surgem os primeiros casos de LV do município, que até 2006 somaram 87, sem mais registro a seguir, sendo que a ocorrência concentrou-se entre 1979 e 1983, caracterizando um surto⁷. As moradias de madeira, alvenaria e pau a pique eram precárias, distando 50 a 100 m umas das outras, podendo ter quintal, cães, galinhas, árvores e arvoredos, em ruas ou arruados sem calçamento. Em alguns locais havia mata nas proximidades, a cerca de 500m⁷.

Desde o início destacou-se o trabalho contínuo da SUCAM, órgão do Governo Federal responsável pelo controle de endemias, que teve seguimento durante a Municipalização das ações nos anos 2000, nas áreas de ocorrência. São cerca de 40 anos de controle ininterrupto, baseado principalmente na busca ativa de casos humanos e caninos. De porta em porta, os agentes perguntam se há alguém com manifestação compatível com LV, principalmente febre, além de cães doentes. As pessoas sintomáticas são levadas a serviços hospitalares de doenças infecciosas. E os cães, submetidos à coleta de sangue para inquérito sorológico, se soro-reagentes são retirados. As casas e construções do peridomicílio foram borrifadas com inseticidas, organoclorados até 2001 e, em sequência, organofosforados e

piretróides, com aspersão sistemática a cada seis meses, em todas as áreas onde se identificava um paciente humano ou um cão infectado, atualmente em desuso⁷. A Dra. Keyla Marzochi com um grupo de alunos acompanhou por mais de 10 anos famílias inteiras que tiveram a doença e que se agregavam em novas famílias, apresentando cicatriz imunológica da LV tratada e curada. Os ex-pacientes, com taxas de 60% de reação intradérmica positiva e cerca de 30% com sorologia positiva ainda para *Leishmania*, diferiam significativamente do que ocorria entre comunicantes e vizinhos⁸.

Em 2011, diferentemente, em área plenamente urbana do Rio de Janeiro detectou-se um surto de LV canina, associada a *Lutzomyia longipalpis*, em um cemitério do Caju onde havia um canil com mais de 200 cães, dos quais mais de 20% com sorologia positiva. E dois casos humanos em mulheres, uma de 85 anos, com lesões ulceradas cutâneas, onde se isolou a *Leishmania infantum chagasi*, e sem nenhuma manifestação viscerotrópica, e outra de 23 anos, caso típico de LV. Outros dois casos com lesões ulceradas cutâneas, ocorridos no local, mas sem isolamento do agente infeccioso, foram diagnosticados como LTA e tratados com antimonial pentavalente, com sucesso⁶.

O Cemitério do Caju reproduziria o que Deane descreveu no Ceará, na década de 1950, grotões de pé de serra com afloramentos rochosos e vegetação arbustiva, onde convivem o vetor e as fontes de alimento e de infecção. Aqui representado por um canil com cães infectados, na presença do vetor provavelmente se procriando nos vasos de plantas, as quais, assim como o adubo orgânico utilizado, provêm da Zona Oeste do Rio de Janeiro, endêmica de LV.

Preocupa-nos muito a dispersão da LV, controlada no entorno do maciço da Pedra Branca no município do Rio de Janeiro, mas aparecendo a partir de 2010 em outras regiões do estado nas divisas com São Paulo e Minas Gerais, em vários municípios do Vale do Paraíba e da Mata Atlântica na Costa Verde. Curiosamente, estes últimos (Mangaratiba, Angra dos Reis, Paraty) com o mesmo ecossistema de municípios vizinhos de São Paulo (Queluz, Bananal, Ubatuba), dos quais, porém, ainda não há relatos de LV. E nem de Minas Gerais, onde, porém, é outro o ecossistema, regido pela barreira da Serra da Mantiqueira⁹.

Cenários e desafios nacionais

O maior desafio seria impedir a expansão da doença. Embora predomine na Região Nordeste do País, avança para as Regiões Centro-Oeste, Sudeste, e Sul mais recentemente. Em 2016, o Brasil registrou 3.626 casos humanos de LV, dos quais 9,9% co-infectados com HIV, e 275 mortes. E em 2017, Rondônia e Amapá registraram os primeiros casos em cães, e as cidades de Florianópolis e Porto Alegre os primeiros casos humanos. À medida que a LV avança a áreas novas, a letalidade aumenta, atingindo em alguns locais cerca de 20%, por falta de informação, que retarda o diagnóstico e o tratamento³.

No Brasil, o cão, como reservatório doméstico, continua a principal fonte de infecção, admitindo-se entre os portadores 40% sintomáticos e 60% assintomáticos, nas áreas endêmicas. E a relação de 1 caso humano para 20 a 200 casos caninos.

A partir de população canina sorologicamente positiva, considera-se, depois de um ano de acompanhamento, que, entre os sintomáticos, 10% assim se mantem e 90% vão a óbito; e entre os assintomáticos, 10% se mantem, 20% adoecem e morrem, e 50% evoluem à cura espontânea¹⁰. Estes 50% são suficientes para dificultar a avaliação de medicamentos, vacinas e outros procedimentos, constituindo fator de erro importante, daí a necessidade de adoção dos novos critérios de seleção amostral para estudos.

Com relação à eutanásia como método de controle, sobretudo pela rejeição de proprietários, há crescentes questionamentos, levados à Justiça, com grande mobilização da comunidade científica visando alternativas. Por enquanto, via *judicialização*, proprietários conseguem liminares impedindo a retirada do cão com indicação de eutanásia, resultando o estímulo ao tratamento. Algumas cidades como Belo Horizonte, Campo Grande e Fortaleza tiveram, no período *pós-judicialização*, elevação da incidência da infecção canina, não se tendo dados da infecção humana.

A vigilância entomológica na LV tem o papel de verificar, em áreas definidas, a existência da *Lu. longipalpis*, e de outros flebotomíneos, pois outras espécies podem estar envolvidas na transmissão.

Nas ações de vigilância e controle da LV

humana impõem-se o diagnóstico e o tratamento precoces, para reduzir o agravamento da doença e os óbitos. Por seu potencial de gravidade, em áreas onde ocorreu um caso canino ou humano, tais ações, por meio das equipes de atenção básica de saúde, devem se antecipar aos pacientes na busca do serviço, visitando e perguntando, casa a casa, se há alguém com febre ou outros sinais clínicos de LV.

Em 2013, foi elaborada e discutida em evento técnico a “A Carta de Votuporanga” que toma por base as equipes de Saúde da Família existentes nos municípios. E propôs a visita domiciliar pelo agente de saúde ou enfermeiro às residências no entorno do caso índice humano ou canino, cerca de 300 m; capacitação dos médicos, pessoal de enfermagem, agentes de saúde, e elaboração de ficha clínica-epidemiológica para aplicação pelos mesmos, relativa aos casos suspeitos e às moradias; Educação em Saúde para a população; identificação e encaminhamento dos casos suspeitos de LV à avaliação clínica¹¹.

Toma-se como paciente suspeito, havendo relato de febre contínua ou variável com duração igual ou maior que duas semanas, com ou sem outras manifestações; e/ou emagrecimento, tosse, palidez, diarreia, com ou sem outras manifestações. A ser, de imediato, encaminhado ao Posto de Saúde para a consulta médica implicando investigação de LV e diagnósticos diferenciais; cuja detecção de hepatoesplenomegalia associada à sorologia positiva indica, em sequência, a internação hospitalar¹¹.

No Hospital, procede-se a punção de medula óssea para evidenciação do parasito; se positiva, inicia-se o tratamento com antimonial ou anfotericina, sob controle estrito de efeitos adversos e eventual resistência. A anfotericina B lipossomal é disponível na rede para tratamento dos casos graves e potencialmente mais graves e/ou apresentando resistência às drogas previamente utilizadas¹¹.

Quanto à população canina, as medidas de vigilância incluem, igualmente, capacitação dos médicos veterinários e outros profissionais de saúde na busca ativa de cães infectados ou doentes a partir do caso índice canino ou humano; sensibilização de clínicas veterinárias/ONGS/Sociedades protetoras dos animais sobre o problema e a notificação obrigatória dos casos caninos por clínicas e laboratórios privados; fiscalização pelos Conselhos

Regionais de Medicina Veterinária de veterinários sobre indicação de drogas de uso humano ou não registradas; controle de populações caninas errantes e carentes; de doação de animais para posse responsável; do uso de telas em canis individuais ou coletivos; avaliação do uso de coleiras impregnadas com Deltametrina a 4%¹¹.

O tratamento canino com antimoniais pentavalentes vem sendo feito na Europa desde a década de 1950. Mas, no Brasil a Portaria Interministerial n.º 1.426, de 11 de julho de 2008, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério da Saúde (MS), proíbe a utilização de produtos de uso humano ou não registrados no MAPA para tratamento de cães infectados por *L. infantum chagasi*. A justificativa é a possibilidade de indução de resistência da *Leishmania*.

Uma conquista recente foi de autorização pelo MAPA da utilização de miltefosina para tratamento canino, não como uma medida de saúde pública, mas como intervenção individual. E se estimula diferentes estratégias, como a combinação de fármacos não utilizados na saúde humana ou associados à imunoterapia¹². Mas, até o momento, nenhum esquema terapêutico se mostrou efetivo para cura parasitológica.

A vantagem da autorização da miltefosina é requerer acompanhar os cães em tratamento. O tratamento exige um protocolo de avaliação clínica, laboratorial e parasitológica por médico veterinário, devendo os cães serem mantidos em canis telados, com coleira de deltametrina e borrifação desses abrigos com inseticidas. No entanto, a terapêutica possui alto custo e deve ser manter para a vida toda dos cães doentes (já que não existe cura parasitológica comprovada), tornando a parcela que pode pagar muito pequena considerando a doença como de forte determinação social.

Outra estratégia são as vacinas de uso canino. A grande novidade é a suspensão do uso da vacina Leishmune[®] pelo Ministério, por não ter estudo de Fase 3. Já com a Leish-Tec[®], alguns estudos têm demonstrado eficiência, como o de Porteirinha-MG mostrando eficácia parasitológica de mais de 70%, redução da transmissão pelo xenodiagnóstico de 43%, e eficácia parasitológica mais o xenodiagnóstico de 58%¹³, sendo liberada para uso individual canino, mas não como

medida de saúde pública. Pelas evidências apresentadas, e para avaliação, a Leish-Tec® poderia ser utilizada nas áreas endêmicas de LV associada à campanha da vacinação anti-rábica, com acompanhamento clínico-epidemiológico. O inconveniente da vacinação em massa é o de mascarar a positividade dos animais realmente infectados, nos inquéritos sorológicos.

Também vem apresentando bons resultados no controle o uso de coleiras impregnadas pelo inseticida Deltametrina a 4%, como utilizada em áreas endêmicas da região do Mediterrâneo. Onde, porém, a transmissão se dá durante três a quatro meses do ano devido às baixas temperaturas. Entre nós, há transmissão o ano inteiro. Mesmo assim, alguns estudos mostram resultados promissores comparando custo-efetividade da coleira impregnada, com proteção dos cães 100 vezes maior e menor custo que o tratamento adotado pelas clínicas veterinárias privadas¹⁴.

Desafios contemporâneos

Novos investimentos devem ser dirigidos à redução dos casos humanos e caninos e da letalidade por LV, presente hoje em áreas rurais e urbanas, nestas em expansão. O controle de casos e óbitos requerem estratégias complementares, com táticas variáveis, dependendo do local e situação, exigindo continuidade.

Para tal, tenha-se em mente fatores mais prováveis de instalação e expansão da LV urbana: fluxo migratório rural-urbano (população humana e canina); crescimento desordenado das cidades (alterações ambientais); adaptação da *Lu. longipalpis* ao ambiente urbano (possível introdução por transporte rodoviário e ferroviário de adubos orgânicos, resíduos de cereais, plantas ornamentais, contendo ovos, larvas e pupas do flebotomíneo), transferência de cães infectados de uma área endêmica à outra indene^{9,15}. E, como regra, que a doença canina precede os casos humanos, não havendo LV humana sem cães infectados e flebotomíneos envolvidos. Sendo que, o maior desafio ao controle, é conhecer a condição do cão como fonte ou não de infecção quando tratado, vacinado e/ou encoleirado, além do judicializado sabidamente portador.

A redução da letalidade humana, maior em áreas de expansão, requer, sobretudo, a busca ativa de pacientes evitando o agravamento da doença e o óbito, paralelamente com informação, diagnóstico e tratamento acessíveis.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Keyla Belizia Feldman Marzochi pelo incentivo, sugestões e revisão do artigo.

Financiamento: Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia – CNPq: Bolsa de Produtividade Sênior, Processo No. 308889/2017-7.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization - WHO. Leishmaniasis; 2018. [acesso 2018 Jun 27]. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
2. Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R et al. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(6):e1155. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001155>
3. Ministério da Saúde (BR). Leishmaniose Visceral; 2018. [acesso 2018 Jun 27]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>
4. Gualandi FC. Medicina tropical no Brasil: Evandro Chagas e os estudos sobre a Leishmaniose visceral americana na década de 1930 [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Casa de Oswaldo Cruz, Fiocruz; 2013. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/18984/2/172.pdf>
5. Deane LM, Deane MP – Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1962; 4:198-212.
6. Lyra MR, Pimentel MI, Madeira MF, Antonio LF, Lyra JP, Fagundes A et al. First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania)*

- infantum chagasi* in an urban area of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(5):451-4. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000500016>
7. Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(5): 570-80. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000500017>
 8. Marzochi KBF, Marzochi MCA, Silva VL, Carvalho RW, Souza MB, Gomes MZG et al. Prospective evaluation of human visceral leishmaniasis after treatment in Rio de Janeiro, 1977-1993. In: Brandão-Filho S, editor. *Research and control of human leishmaniasis in Brazil*. Recife (PE): Fundação Oswaldo Cruz; 1993. p.275-83.
 9. Marzochi, MCA. Visceral leishmaniasis in Southern Rio de Janeiro State and the risk of propagation to São Paulo State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(2):147-9. <https://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0442-2015>
 10. Marzochi, MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza MA, Parigot de Sousa P, Toledo LM et al. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro - Brasil. *Cad Saúde Pública*. 1985;1(4):432-46. <https://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1985000400004>
 11. Marzochi MCA – Votuporanga e a leishmaniose visceral: a importância da busca ativa de casos suspeitos. *A Cidade*, pág.5, 7 fev. 2017.
 12. Miró G, Oliva G, Cruz I, Cañavate C, Mortarino M, Vischer C et al. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol*. 2009;20(5-6):397-404. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x>
 13. Regina-Silva S, Feres AM, França-Silva JC, Dias ES, Michalsky ÉM, de Andrade HM et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *Vaccine*. 2016;34(19):2233-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.019>
 14. Shimozako HJ, Wu J, Massad E. The preventive control of zoonotic visceral leishmaniasis: efficacy and economic evaluation. *Comput Math Methods Med*. 2017;2017:4797051. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/4797051>
 15. Marzochi MCA, Marzochi KBF, Fagundes A, Conceição-Silva F. A questão do controle das leishmanioses no Brasil. In: Conceição-Silva F, Alves CR, organizadores. *Leishmanioses do continente americano*. Rio de Janeiro (RJ): Editora Fiocruz; 2014. p.429-63.



Reflexões sobre cenários, vigilância epidemiológica e controle da transmissão de leishmaniose visceral no estado de São Paulo

Analysis of epidemiological scenarios and the relationship with surveillance and control of visceral leishmaniasis transmission in the state of São Paulo

[RIALA6/1754](#)

Oσίας RANGEL^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Superintendência de Controle de Endemias SUCEN, Rua Fernão Pompeu de Camargo, Campinas, SP, Brasil, CEP: 13041-025. Tel: 19 3272 9891.
E-mail: osias@sucen.sp.gov.br

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

RESUMO

Diferenças regionais nos padrões de transmissão da leishmaniose visceral tem se constituído ao longo do tempo em diferentes cenários para enfrentamento da doença no estado de São Paulo. Entre 1999 a 2016, *Lutzomyia longipalpis* foi detectado em 95,8% (137/143) dos municípios com transmissão humana, canina ou ambas. Todavia, a ocorrência de casos humanos em município do litoral e aumento de casos caninos na região metropolitana de São Paulo sem detecção do vetor, sugere novos desafios à vigilância e ao controle da doença. No oeste do estado, prevalece à forma clássica de transmissão com 19,70% (13/66) dos municípios prioritários, acumulando 63,8% (245/384) dos casos no triênio 2015-2016-2017. Esse padrão epidemiológico é compatível com a regra empírica 80/20. Alguns destes municípios houve remissão da transmissão, porém com posterior aumento no decorrer dos anos. Desse modo conclui-se que a vigilância e o controle da leishmaniose visceral terá como desafio a busca por novas ferramentas para o enfrentamento da transmissão nos diversos cenários e para o efetivo controle da doença.

Palavras-chave. *Lutzomyia longipalpis*, leishmaniose visceral, vigilância epidemiológica, vigilância entomológica.

ABSTRACT

Regional characteristics influence the patterns of transmission of visceral leishmaniasis revealing over time different scenarios for the control of the disease in the state of São Paulo. Between 1999 and 2016, *Lutzomyia longipalpis* was detected in 95.8% (137/143) of the municipalities with human, canine or both transmissions. However, the occurrence of human cases in a new municipality and an increase in canine cases in the metropolitan region of São Paulo without detection of the vector suggest new challenges to surveillance and control of the disease. In the western part of the state, the classic form of transmission prevails with 19.70% (13/66) of the priority municipalities, accumulating 63.8% (245/384) of cases in the triennium 2015-2016-2017. This epidemiological pattern is compatible with the 80/20 empirical rule. Some of these municipalities had remission of the transmission with a subsequent increase in the number of cases over the years. Thus, it is concluded that the surveillance and control system of visceral leishmaniasis should seek new tools for coping with transmission in the various scenarios and for effective control of the disease.

Keywords. *Lutzomyia longipalpis*, visceral leishmaniasis, epidemiological surveillance, entomological surveillance.

INTRODUÇÃO

A transmissão de leishmaniose visceral (LV) é mantida em um complexo sistema biológico e social envolvendo o hospedeiro humano, parasito, flebotomíneo e reservatório animal^{1,2}. No Brasil, a doença foi registrada em 22 estados de cinco regiões, incluindo o estado de São Paulo (ESP)³. Aqui, a transmissão teve início em 1999, quando já tinha sido constatada a presença do vetor em área urbana e transmissão canina nos anos de 1997 e 1998 respectivamente⁴.

Diferenças regionais aos padrões de transmissão têm apontado ao longo do período, diferentes cenários para o enfrentamento da doença (Ciaravolo et al)⁴. Segundo os autores, em 70% dos municípios das mesorregiões de Araçatuba, Assis, Bauru, Marília, Presidente Prudente e São José do Rio Preto, o vetor *Lu. longipalpis* foi primeiramente detectado, seguida pela transmissão canina e humana, enquanto nas mesorregiões de Campinas, Piracicaba e Macro Metropolitana Paulista não foi observado transmissão humana após vários anos de transmissão canina. Na mesorregião Metropolitana de São Paulo, os municípios de Embu das Artes e Cotia apresentaram transmissão canina desde 2003 sem que fosse detectado *Lu. longipalpis*⁴.

A ocorrência de casos humanos e novos casos caninos sem detecção do vetor *Lu. longipalpis* na região metropolitana de São Paulo^{5,6} bem como a evolução da transmissão nas diversas mesorregiões suscitou o presente estudo, com objetivo de descrever os atuais cenários e os desafios da vigilância e do controle para o enfrentamento da doença no ESP.

MATERIAL E MÉTODOS

A população do estado de São Paulo para 2016 foi estimada em 43.359.005 habitantes distribuída em 645 municípios de 15 mesorregiões geográficas⁷. O território abrange 248.209,3 km² que segundo a classificação climática de Koeppen predomina

o tipo Cwa na maior área que abrange toda a parte central do estado. Este tipo climático é caracterizado pelo clima tropical de altitude com chuvas no verão e seca no inverno. A temperatura média do mês mais quente é superior a 22°C^{7,8}.

O estudo realizado foi do tipo descritivo retrospectivo, considerando a detecção e a frequência dos principais elementos da cadeia de transmissão da LV e período de ocorrência nos diversos municípios e mesorregiões do estado de São Paulo. Na estratificação epidemiológica dos municípios foi considerado o atual modelo adotado pelo Ministério da Saúde (MS) representado pelas medias de casos no triênio: a partir da observação das médias de casos maiores que zero, o grupo com transmissão foi estratificado em esporádica quando <2,4 casos, moderada $\geq 2,4$ a <4,4 e intensa $\geq 4,4$ casos³. Os municípios de transmissão moderada a intensa foram considerados prioritários.

Os dados analisados foram obtidos de fontes oficiais dos sistemas de informação da Superintendência de Endemias-SUCEN, Centro de Vigilância Epidemiológica-CVE e Instituto Adolfo Lutz-IAL do estado de São Paulo sem identificação dos sujeitos. O estudo foi realizado em conformidade com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº466, de 12 de dezembro de 2012.

RESULTADOS

A transmissão de LV entre 1999 até 2017 ocorreu em 15,03% (97/645) dos municípios paulistas. Neste período, o percentual médio de letalidade se manteve em torno de 8,6% (246/2857).

Em 2016 e 2017 foram registrados pela primeira vez casos humanos autóctones na mesorregião Metropolitana e Macro Metropolitana de São Paulo respectivamente. Nestes anos, foi observado crescimento da ocorrência de cães com leishmaniose visceral na mesorregião Metropolitana de São Paulo sem detecção do vetor *Lu. longipalpis*. Nesta mesorregião, as pesquisas entomológicas

demonstraram predominância de *Pintomyia fischeri* e *Migonemyia migonei* (Figura 1).

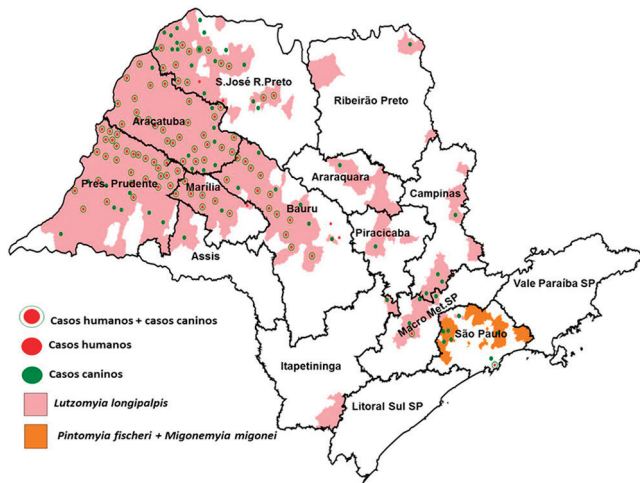


Figura 1. Distribuição dos vetores, casos humanos e caninos de leishmaniose visceral entre 1999 a 2017 no estado de São Paulo

No oeste do estado prevaleceu à forma clássica de transmissão com 19,7% (13/66) dos municípios prioritários (=sete com transmissão moderada e seis com transmissão intensa) acumulando 63,8% (245/384) dos casos no triênio 2015-2016-2017. Em 62,1% (41/66) dos municípios ocorreu a transmissão esporádica com 30,2% (116/384) dos casos, e 18,18% (12/66) dos municípios com transmissão recente com 6,0% (23/384) dos casos.

Comparando a estratificação epidemiológica do triênio 2001-2002-2003 com 2015-2016-2017 foi observado que oito dos 13 municípios já eram prioritários no primeiro triênio, sendo que cinco se mantiveram, dois passaram para transmissão esporádica e um município sem transmissão no segundo triênio. No segundo triênio, oito municípios novos apresentaram transmissão moderada e intensa que somados aos cinco que se mantiveram desde o primeiro triênio totalizaram 13 municípios prioritários no segundo triênio. Em três municípios prioritários houve remissão das médias do número de casos entre o primeiro e o segundo triênio enquanto outros dois as médias se

elevaram (Figura 2).

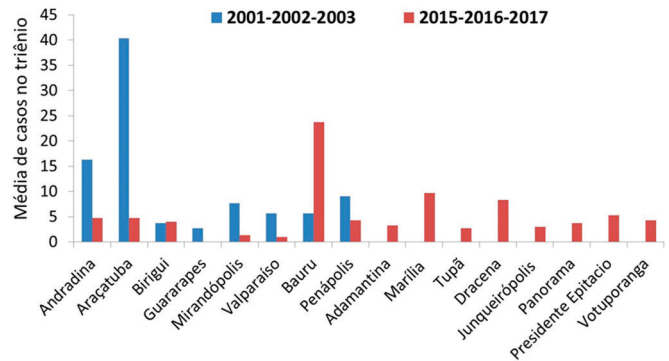


Figura 2. Evolução das médias do número de casos nos municípios prioritários do estado de São Paulo em dois triênios

DISCUSSÃO

Embora não haja clara definição para o conceito de cenário epidemiológico na transmissão da LV, diferentes padrões para ocorrência da doença definem situações diversas para o enfrentamento da doença. Isto requer por parte da vigilância e do controle compreender quais são os elementos desafiadores que predomina numa determinada região em um determinado período de tempo. Neste sentido foram relatados cenários epidemiológicos no estado de São Paulo entre 1999 a 2014 nas situações em que o vetor *Lu. longipalpis* não foi detectado para elucidação do local provável de transmissão⁴. Surgiu então o desafio para vigilância entomológica em demonstrar capacidade e competência vetorial de outras espécies. Para o ministério da Saúde este é um desafio localizado que deve ser estudado, não sendo possível de imediato generalizar⁹. Os estudos apontaram para algumas espécies nativas amplamente distribuídas nestas regiões⁹⁻¹¹ o que implica em outro questionamento contextual do porque só recentemente a transmissão se estabeleceu por vetores que já se encontrava há muito tempo nestas regiões^{11,12}.

Outro desafio refere-se à ausência de casos humanos em mesorregiões onde a transmissão canina prevalece alguns anos⁴. De maneira análoga, esta questão necessita ser contextualizada, considerando que na mesorregião de Araçatuba onde a transmissão teve início no estado, alguns

municípios também só apresentaram transmissão canina, da mesma forma que as mesorregiões de Campinas, Piracicaba e a Macro Metropolitana de São Paulo. Além disto, a transmissão humana em 2017 na mesorregião Macro Metropolitana pela primeira vez altera todo entendimento desta questão, e sugere outros fatores determinantes não conhecidos que dificultam definir um único cenário epidemiológico mesorregional. Levando em conta que a LV compartilha especificidades de doenças de transmissão focal¹³ e outras questões aqui discutidas, prevalece a necessidade de maior detalhamento das investigações em espaços menores para melhor compreender e contextualizar a transmissão da LV. Desse modo compreendem-se como desafio a vigilância epidemiológica a busca de novas tecnologias, estratégias e inovações que possam contribuir para construção de conhecimentos definidores de cenários epidemiológicos e efetivo controle da doença.

No oeste do estado até 2017, predominou a forma clássica de transmissão com envolvimento do principal vetor *Lu. longipalpis*. Esse padrão epidemiológico é compatível com a regra empírica 80/20¹⁴ que sugere a priori 20% dos municípios contribuindo com 80% dos casos. Esse valor não é preciso, apenas indicativo de transmissão agregada e que as ações de controle poderiam ser direcionadas para clusters da doença nos diversos municípios. Neste contexto, a redução do número de casos representou o principal desafio para vigilância e controle da doença. Parte do objetivo foi alcançada como revelou a **Figura 2**, onde se observou redução das médias na maioria dos municípios prioritários em dois triênios subsequentes, mas que alguns municípios as médias aumentaram.

De modo geral, o modelo atual de programa de vigilância e controle da LV no Brasil recomendou sistematicamente a intensificação e diferenciação das ações de controle em áreas com concentração de casos como forma de reduzir a média do número de casos. Apesar dos resultados favoráveis, em alguns municípios foi observado recrudescimento da transmissão com posterior aumento das médias do número de casos e expansão para municípios novos¹⁵, semelhante ao observado no estado de

São Paulo. Neste aspecto, a sustentabilidade do controle surge como o mais importante dos desafios e sugere a necessidade de ações de saneamento do meio ambiente mais efetiva, tornando-o desfavorável a colonização e proliferação do vetor.

CONCLUSÃO

Os dados analisados no presente estudo permitiu concluir que a vigilância e o controle da leishmaniose visceral terão como desafio a busca por novas ferramentas para o enfrentamento da transmissão nos diversos cenários epidemiológicos e para o efetivo controle da doença.

REFERÊNCIAS

1. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Technical Report Series. Geneva: WHO; 2010. [acesso 2018 Mai 18]. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>
2. Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMS, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(7): 831-46. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150207>
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas, 1990 a 2016. [acesso 2018 Mai 18]. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LV-Casos.pdf>
4. Ciaravolo RMC, Henriques LF, Rangel O, Sampaio SMP. Vigilância entomológica e controle vetorial no Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no estado de São Paulo. Bol Epidemiol Paulista. 2015; 12(135-136):24-34. [acesso 2018 Mai 18]. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicao-2015/135-136_site_2.pdf
5. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de controle de Endemias. Relatórios de Resumos de Inquéritos caninos. [acesso 2018 Mai 18]. Disponível em: <http://200.144.1.21/flebwebvlv/>

6. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. Dados/leish/lv. [acesso 2018Mai 18]. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/zoonoses/leishmaniose-visceral/dados-estatisticos>
7. São Paulo. Biblioteca virtual do Estado de São Paulo. Geografia do Estado de São Paulo. [boletim na internet]. Síntese da geografia do estado de São Paulo. [acesso 2018 maio 30]. Disponível em: <http://www.bv.sp.gov.br>
8. Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura – Cepagri. Clima dos municípios paulistas: a classificação climática de Köppen para o estado de São Paulo. [acesso 2018 maio 30]. Disponível em: <https://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>
9. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 2.ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2017. [acesso 2018 30 maio]. Disponível em: <http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf>
10. Galvis-Ovallos F, da Silva MD, Bispo GB, de Oliveira AG, Neto JR, Malafronte RD et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. *Parasite*. 2017; 24:2. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2017002>
11. Barreto MP. Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebótomos do estado de São Paulo (Díptera: Psychodidae). [Tese-Livre Docência] São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 1943.
12. Forattini OP. Entomologia Médica. Psychodidae. Phlebotominae. Leishmaniose. Bartonelose. São Paulo (SP): Edgard Blücher Ltda; 1973.
13. Pavlovsky EN. Natural nidality of transmissible diseases. Moscow: Peace Publishers, 1964.
14. Woolhouse MEJ, Dye C, Etard JF, Smith T, Charlwood JD, Garnett GP et al. Heterogeneities in the transmission of infectious agents: Implications for the design of control programs. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94(1): 338-42. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.1.338>
15. Donato LE. Apresentação da situação de indicadores epidemiológicos da leishmaniose visceral. Reunião de coordenadores estaduais da vigilância epidemiológica e entomológica das leishmanioses. Dezembro/2016. Brasília/BR.



Diversidade clínica e tratamento da leishmaniose visceral Clinical diversity and treatment of visceral leishmaniasis

RIALA6/1755

José Angelo Lauletta LINDOSO*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Protozoologia. Instituto de Medicina Tropical. Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, CEP: 05403-000. Tel: 11 3061 7014. E-mail: jlindoso@usp.br

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo as duas principais espécies: *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum*, as quais tem ocorrência geográfica diversa e estão relacionadas com diversidade de manifestações clínicas e de resposta terapêutica. Notadamente, a LV que ocorre, principalmente, na Índia, Sudão, Sudão do Sul, Bangladesh e Etiópia é causada pela espécie *L. donovani*, enquanto nas Américas e em algumas regiões da África e Europa, a espécie causadora é a *L. infantum*. A LV causada pela *L. (L.) donovani* tem um espectro clínico variando de comprometimento visceral à lesão cutânea que ocorre após um episódio de LV, que é a leishmaniose dérmica pós-kalazar (PKDL), manifestação esta que não é muito frequente na LV causada pela *L. infantum*. Ademais, a resposta terapêutica é divergente entre essas espécies, visto que na LV causada por *L. donovani* há pobre resposta ao antimônio pentavalente, configurando um padrão de resistência elevado, enquanto que na LV causada pela *L. infantum* essa informação não é muito clara. Neste artigo abordamos a diversidade clínica e a resposta terapêutica da LV causada principalmente por *L. infantum*, que é de ocorrência nas Américas.

Palavras-chave. leishmaniose visceral, diversidade clínica, resposta terapêutica, *Leishmania infantum*.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is caused by protozoa of the genus *Leishmania*, of the species *Leishmania (Leishmania) donovani* and *Leishmania (Leishmania) infantum*, which occur in different geographic regions and are related to the diversity of clinical manifestations and therapeutic response. Notably, VL occurring mainly in India, Sudan, South Sudan, Bangladesh and Ethiopia is caused by *L. donovani*, while in the Americas and in some regions of Africa and Europe is caused by *L. infantum*. Visceral leishmaniasis caused by *L. donovani* has a clinical spectrum ranging from visceral involvement to cutaneous lesion that occurs after a VL episode, which is post-kala-azar-dermal-leishmaniasis (PKDL), which is not very frequent in the VL caused by *L. infantum*. In addition, the therapeutic response is divergent among these species, since in VL caused by *L. donovani* there is poor response to pentavalent antimony, setting a high resistance pattern, whereas in VL caused by *L. infantum* this information is not very clear. In this article, we discuss the clinical diversity and therapeutic response of VL caused mainly by *L. infantum*, which is occurring in the Americas.

Keywords. visceral leishmaniasis, clinical diversity, therapeutic response, *Leishmania infantum*.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença metaxênica, com envolvimento de diversos atores, que participam do seu ciclo de transmissão, tais como reservatórios vertebrados, vetores alados, parasito e o hospedeiro susceptível. Não obstante, a ocorrência da LV em uma determinada região é regida, também pelas alterações geográficas produzidas pelo homem, dentre as quais podemos destacar fatores físicos, sociais e biológicos^{1,2}. Tais fatores alteram a relação parasito hospedeiro, seja favorecendo a proliferação do vetor, em decorrência das alterações ambientais, tal como acúmulo de matéria orgânica no solo, que propicia a replicação vetorial, mas também o transito de animais infectados para uma área livre de LV, quando da sua mobilidade^{1,2}. Fatores de risco têm sido avaliados para relacioná-los com a ocorrência da LV em uma determinada região geográfica. Quando da avaliação de população susceptível ao desenvolvimento da LV, fatores intrínsecos do hospedeiro são fundamentais, entretanto fatores ambientais ou comportamentos de risco de determinada população podem contribuir. Dentre alguns fatores de risco já descritos, observa-se que a exposição ao flebotomíneo é fator preponderante para risco de infecção³, assim como a coinfeção com HIV³, desnutrição^{4,5}, presença de alta prevalência de cães infectados e baixo nível sócio-econômico da população⁶. Em áreas de transmissão de LV é possível distinguir grupos de pacientes com manifestações clínicas ou somente infectados, sem apresentar qualquer sinal ou sintoma da LV⁷, sendo que a maioria da população apresenta infecção por *Leishmania*, sem sintomas ou sinais da mesma e apenas um pequeno percentual (5 a 10%) evolui com doença plenamente manifesta. A ocorrência dessa disparidade clínica está relacionada com a resposta imune do hospedeiro humano, pois utilizando-se marcadores de resposta imune celular e humoral é possível definirmos perfis clínico-imunológico de polo de resistência ou de susceptibilidade⁸. Crescente et al⁹ utilizando o teste de Montenegro e quantificação de anticorpos anti-*Leishmania*, através de imunofluorescência indireta (IFI), conseguiram definir cinco perfis: 1) Infecção assintomática, caracterizada por teste de Montenegro positivo e IFI negativa; 2) Infecção resistente subclínica,

caracterizada por teste de Montenegro positivo e IFI positiva; 3) Infecção inicial indeterminada, caracterizada por teste de Montenegro negativo e IFI positiva; 4) Infecção sintomática, caracterizada por manifestações clássica de LV, teste de Montenegro negativo e IFI positiva; 5) Infecção oligossintomática subclínica, caracterizada por teste de Montenegro negativo e IFI positiva e discretos sinais de doença ativa. Além da caracterização dos polos de resistência e de susceptibilidade através de teste de Montenegro e IFI, outros marcadores biológicos podem ser usados para definir o perfil de resistência, pois em pacientes assintomáticos e infectados por *Leishmania infantum* observa-se título elevados de IL-2, sendo este um possível bom marcador biológico para determinar a resistência à infecção, visto que esses pacientes não desenvolvem manifestação clínica da LV¹⁰

Imunopatogenia da LV

Uma vez que o hospedeiro vertebrado não consegue conter a infecção e a doença se manifesta clinicamente, eventos imunopatogênicos acontecem principalmente nos órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, havendo alterações em baço, fígado, medula óssea e linfonodos¹¹. Na medula óssea, esse comprometimento se traduz por desvio na produção de diferentes tipos celulares, podendo haver diminuição da produção de hemácias (anemia), leucócitos (leucopenia) e plaquetas (plaquetopenia). Ao mesmo tempo há hiperplasia e hipertrofia das células do sistema fagocítico em baço, fígado e linfonodos^{11,12}. Concomitante a esses eventos imunopatogênicos, observa-se comprometimento do sistema imune, pois durante a fase ativa da doença encontra-se uma imunossupressão antígeno específica, mensurada por ausência de proliferação de células T frente a antígenos de *Leishmania* e também por negatividade do teste de Montenegro, que é indicador de resposta celular^{11,13}. Associado ao fenômeno de imunossupressão antígeno-específica, observa-se que na fase ativa da LV há ativação imune sistêmica, caracterizada por ativação policlonal de células B, definida por hipergamaglobulinemia e também ocorre ativação de policlonal de células T, definida pela produção de elevados níveis de citocinas pro-inflamatórias, caracterizando uma síndrome inflamatória sistêmica^{11,14}. Um fato extremamente interessante, é que após a cura clínica da LV,

estes eventos imunopatogênicos são plenamente reversíveis (Figura 1).

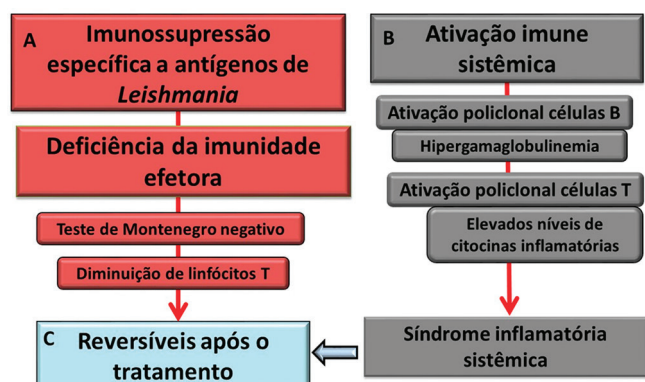


Figura 1. Representação esquemática da imunopatogenia que ocorre durante a leishmaniose visceral ativa. A) Imunossupressão antígeno-específica (definida por teste de Montenegro negativo, ausência de resposta proliferativa de células T a antígenos de *Leishmania*). B) Ativação policlonal de linfócitos B (hipergamaglobulinemia) e ativação de linfócitos T (elevados níveis de citocinas inflamatórias) caracterizando síndrome inflamatória sistêmica. C) reversão do processo após resposta terapêutica para leishmaniose visceral. Gentilmente cedido por Dra. Alda Maria da Cruz, -Instituto Oswaldo Fiocruz-Fiocruz, RJ.

Diversidade clínica na infecção por *Leishmania infantum*

Como já descrito anteriormente, a manifestação da LV depende da resposta do hospedeiro. Classicamente, definem-se três formas clínicas: 1) Assintomáticos, caracterizados somente por infecção sem sintomatologia; 2) Oligossintomáticos, caracterizados por manifestações clínicas de pequena monta e 3) Sintomáticos, caracterizados por hepatoesplenomegalia (Figura 2A), febre^{1,8,9}. Estes sinais e sintomas da forma clínica plenamente manifesta são o resultado dos eventos imunopatogênicos, em que há acometimento de baço, fígado e medula óssea. Concomitante a estes achados clínicos observa-se alterações laboratoriais traduzidas por hipergamaglobulinemia, com hipoalbuminemia e pancitopenia¹⁴. Outras formas clínicas menos usuais da LV podem ser observadas. Uma das mais citadas é a leishmaniose dérmica pós-kalazar (PKDL) secundária a um episódio de LV causada pela *L. donovani* (Figura 2B), que é encontrada principalmente na Índia e Sudão. A manifestação clínica se caracteriza por lesões cutâneas, tipos nodulares ou papulares^{15,16}. Também a infecção por *L. donovani* pode cursar com lesões

cutâneas ulceradas, sem que haja manifestação visceral (Figura 2C), como se observa no Sri Lanka¹⁷. Apesar de classicamente a infecção por *L. infantum* cursar com comprometimento visceral, observa-se em algumas regiões, uma forma cutânea atípica causada por esta espécie, sem que envolvimento visceral, principalmente em alguns países da América Central, como Costa Rica, Honduras, Nicarágua e El Salvador. Esta forma clínica é caracterizada por pequenas lesões nodulares, circunscritas (Figura 2D), acometendo principalmente face e tronco^{18,19}. Afora estas manifestações pouco usuais, pode-se observar também lesões ulceradas por *L. infantum*²⁰. Recentemente, Lindoso et al²¹ descreveram a leishmaniose dérmica para-kala-azar (Figura 2E), caracterizada por manifestação cutânea, tipo pápulas e máculas, associada a manifestação visceral.



Figura 2. Diversidade de apresentação clínica de leishmaniose, causada por espécies viscerotrópicas. 2A) Leishmaniose visceral, forma plenamente manifesta, com hepatoesplenomegalia evidente, causada por *Leishmania infantum* (Fotografia gentilmente cedida por Dr. Igor Thiago Borges de Queiroz e Silva, Universidade Potiguar, RN, Brasil). 2B) Leishmaniose dérmica pós-kalazar (PKDL), causada por *Leishmania donovani* (Obtida do atlas de PKDL-OMS. ID: 265044 Permission authorization for WHO copyrighted material). 2C) Leishmaniose cutânea ulcerada, causada por *Leishmania donovani*, Sri Lanka (Fotografia gentilmente cedida por Dra. Shalindra Ranasinghe-Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, University of Sri Jayewardenepura). 2D) Leishmaniose cutânea atípica causada por *Leishmania infantum* (Fotografia gentilmente cedida pela Dra. Ana Nilce S. Maia Elkhoury (OPAS-OMS). 2E) Leishmaniose dérmica para-kala-azar, causada por *Leishmania infantum* (Fotografia pertencente ao acervo do autor: José Angelo Lauletta Lindoso).

Em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a leishmaniose visceral pode se apresentar com a forma clínica plenamente manifesta (hepatoesplenomegalia febril), porém outras manifestações são mais prevalentes nesta população, destacando-se a tosse e diarreia, pouco comum em pacientes sem infecção pelo HIV²²⁻²⁴. Também em pacientes coinfectados (HIV-*Leishmania*) pode-se encontrar manifestações completamente esdrúxulas, tal como: lesão em esôfago, comprometimento de pleura pulmonar ou também lesão intestinal²⁵.

Letalidade e recidiva na Leishmaniose visceral

A LV plenamente manifesta se não tratada apresenta letalidade próxima a 100%, entretanto o tratamento específico reduz muito o risco de morte, porém mesmo em pacientes tratados observa-se uma letalidade variável, em decorrência de fatores relacionados ao hospedeiro ou em decorrência de dificuldade de diagnóstico e retardo no início da terapêutica anti-leishmania²⁶. A letalidade por LV no Brasil é em torno de 7%, porém em alguns estados essa letalidade é menor ou maior. Em pacientes com infecção associada ao HIV, a letalidade é quase o dobro daquela observada em pacientes sem infecção pelo HIV^{26,27}. Alguns fatores já foram descritos como preditores de morte por LV, destacando-se: aumento de bilirrubina, anemia severa, presença de infecção bacteriana concomitante, manifestações hemorrágicas, diarreia, anormalidades cardíacas²⁶. Também infecção pelo HIV, idade menor de 5 anos e maior de 50 anos, neutropenia severa e dispneia são fatores realcioandos ao desfecho desfavorável²⁷. O manuseio adequado de pacientes com LV e identificação precoce de fatores relacionados ao óbito por LV faz com que haja diminuição na letalidade. Um modelo de prognóstico de LV foi criado com intuito de definir, quais pacientes tem maior probabilidade de evoluírem com desfecho desfavorável²⁸. Este modelo de prognóstico se baseia em critérios demográficos (idade), clínicos (manifestações clínicas) e alterações laboratoriais. Uma pontuação maior ou igual a 4 levando-se em consideração somente critérios demográficos e clínicos indica que o pacientes tem maior risco de morrer por LV e quando alcança pontuação maior ou igual a 6 pelos critérios demográficos, clínicos

e laboratoriais também apresenta maior risco de morte²⁸.

Outro ponto a se considerar na evolução da LV é o risco de falha terapêutica. A recidiva na população geral, sem infecção pelo HIV é em torno de 3%, entretanto em pacientes coinfectados (HIV-LV) a recidiva é bastante elevada, podendo ser de 17% ou mais. Em pacientes coinfectados (HIV-LV), alguns fatores já foram descritos como preditores de falha terapêutica, dentre os quais se destaca: 1) Contagem de linfócitos TCD4+ abaixo de 100 células/mm³; recuperação insuficiente da contagem de linfócitos TCD4+ após o tratamento da LV, episódios prévios de LV²⁹.

Tratamento da Leishmaniose Visceral

O tratamento da LV se baseia no uso de medicamentos que tem ação sobre o parasito ou ainda que tenha ação imunomodulatória. Destacam-se três medicamentos atualmente usados no tratamento da LV, sendo que os mesmos apresentam resposta adequada dependendo da espécie de *Leishmania* e da apresentação clínica^{11,14}.

Um dos mais antigos medicamentos utilizados é antimonial pentavalente, que apresenta duas formulações: N-metil glucamina e estibogluconato de sódio. Estes antimoniais são metias pesados e seu mecanismo de ação não está bem definido, podendo atuar na inibição da via de glicosilação do parasito. Os antimoniais são utilizados somente por via sistêmica (intravenosa ou intramuscular) na dose de 20 mg/kg/dia do antimônio, por 28 dias e apresenta toxicidade elevada, sendo que cardiotoxicidade é o efeito adverso mais severo e relacionado com morte. Outro medicamento utilizado é anfotericina B, seja na sua formulação deoxicolato, com na sua formulação lipossomal. Este antibiótico poliênico atua na membrana do parasito e é um dos mais potentes medicamentos utilizados no tratamento da LV. É usado somente por via sistêmica (endovenosa), na dose total de 20 a 21 mg/kg. A formulação deoxicolato apresenta como principal toxicidade, a alteração da função renal^{11,14}. Recentemente, um estudo conduzido no Brasil, avaliou a eficácia e segurança do tratamento da LV, utilizando antimoniato de meglumina, anfotericina B deoxicolato e anfotericina B lipossomal. Claramente esse estudo observou inicialmente alta taxa de efeitos adversos no

grupo de pacientes tratados com anfotericina B deoxicolato, sendo necessária a interrupção deste grupo do estudo. Ao final do estudo, os autores observaram que os grupos tratados com anfotericina B lipossomal ou antimoniato de meglumina apresentaram cura clínica semelhante após 6 meses de acompanhamento, no entanto o grupo tratado com anfotericina B lipossomal apresentou menos efeitos adversos³⁰. Avaliando-se o desfecho dos pacientes com diagnóstico de LV, no estado de São Paulo e tratados com os mesmos medicamentos, observou-se que o grupo tratado com anfotericina B deoxicolato apresentou maior letalidade. Estes achados deram suporte ao programa de controle de LV do Ministério da Saúde do Brasil de não mais recomendar o uso da anfotericina B deoxicolato no tratamento da LV.

Outro medicamento que vem usado no tratamento da LV, é a miltefosina, que inicialmente foi descrito com antitumoral, mas posteriormente foi observado que o mesmo tinha ação antiparasitária. Este medicamento é usado principalmente no tratamento do calazar indiano, com boa resposta terapêutica¹¹, entretanto estudos preliminares no Brasil mostraram que este medicamento apresenta eficácia inferior ao antimônio pentavalente (dados não publicados) não sendo, portanto, recomendado para o tratamento da LV no Brasil. Em pacientes de grupo especial, sendo principalmente aqueles coinfectados com HIV ou que apresentem imunodeficiência outra, ou transplantados a droga de escolha é anfotericina B lipossomal, porém a dose recomendada é mais elevada (até 40 mg/kg de dose total). Estes grupos específicos de pacientes apresentam maior toxicidade com uso de antimônio, sendo este medicamento não recomendado para tratamento da LV. Nestes grupos a recidiva é frequente e em muitas situações há necessidade de profilaxia secundária, que pode ser feita com antimônio pentavalente, mas principalmente com anfotericina B lipossomal^{14,31,32}. Como se percebe, o arsenal terapêutico para tratamento da LV é bastante restrito, limitando-se a apenas dois medicamentos, no Brasil, por isso a busca por novas opções terapêuticas se faz necessária, sejam aquelas baseadas em compostos líderes, tais como derivados nitro-heterocíclicos³³ ou ainda repondo-se fármacos, tal como buparvacona³⁴, já utilizados no tratamento de outras doenças.

CONCLUSÃO

A LV pode ser causada por duas principais espécies de *Leishmania*, a depender da área geográfica de ocorrência e as manifestações decorrentes da infecção dependem de fatores do parasito e principalmente do hospedeiro. Sendo que fatores de risco são fundamentais para ocorrência da doença e mesmo da manifestação clínica da LV ou relacionados a um desfecho desfavorável. As manifestações clínicas e os desfechos da doença são dependentes ainda da resposta imune do hospedeiro vertebrado, porém atraso no diagnóstico e consequente retardo do início do tratamento podem ser fatores determinantes de óbito por LV. As manifestações clínicas variam desde forma assintomática, passando pela forma clássica, caracterizada por hepatoesplonomegalia volumosa e febre, havendo até manifestações cutâneas que são denominadas PKDL ou para-kala-azar. O arsenal terapêutico é extremamente restrito e busca por novas opções terapêuticas se faz necessária. Ademais em população de pacientes imunossuprimidos, que constitui um grupo a parte, a LV pode apresentar manifestação clínica não usual, pior resposta ao tratamento e necessidade de profilaxia secundária. Por fim a LV é uma doença tropical negligenciada, em que diversos atores participam da manutenção da transmissão e a qual requer a participação de toda comunidade civil, acadêmica e de governantes para que busquemos opções de controlar a expansão da doença e diminuir a letalidade.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2014. Disponível em: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
2. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the

- WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 2010. Disponível em: <http://www.who.int/iris/handle/10665/44412>
- Argaw D, Mulugeta A, Herrero M, Nombela N, Teklu T, Tefera T et al. Risk factors for visceral Leishmaniasis among residents and migrants in Kafta-Humera, Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(11):e2543. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002543>
 - Cerf BJ, Jones TC, Badaro R, Sampaio D, Teixeira R, Johnson WD Jr.. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1987;156(6):1030-3.
 - Mengesha B, Endris M, Takele Y, Mekonnen K, Tadesse T, Feleke A et al. Prevalence of malnutrition and associated risk factors among adult visceral leishmaniasis patients in Northwest Ethiopia: a cross sectional study. *BMC Res Notes*. 2014;7:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-7-75>
 - de Araújo VE, Pinheiro LC, Almeida MC, de Menezes FC, Morais MH, Reis IA et al. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(11):e2540. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002540>
 - Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis*. 1986;154(4):639-49.
 - Silveira FT, Lainson R, Crescente JA, de Souza AA, Campos MB, Gomes CM et al. A prospective study on the dynamics of the clinical and immunological evolution of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104(8):529-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.05.002>
 - Crescente JA, Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. A cross-sectional study on the clinical and immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in the Brazilian Amazon region. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103(12):1250-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.06.010>
 - Ibarra-Meneses AV, Carrillo E, Sánchez C, García-Martínez J, López Lacombe D, San Martín JV et al. Interleukin-2 as a marker for detecting asymptomatic individuals in areas where *Leishmania infantum* is endemic. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(8):739.e1-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.021>
 - van Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):309-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.005>
 - Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *Int J Infect Dis*. 2013;17(8):e572-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2012.12.024>
 - Goto H, Prianti Md. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009;51(5):241-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652009000500002>
 - Lindoso JAL, Goto H. Leishmaniose visceral. *In: Lopes AC. Tratado de Clínica Médica*. 3 ed. Rio de Janeiro (RJ): Roca; 2016.
 - Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EA, el-Hassan IM, el-Hassan AM. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2003;3(2):87-98. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00517-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00517-6)
 - Zijlstra EE. PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with Leishmaniasis: review of clinical presentation in relation to immune responses. *PLoS Neg Trop Dis*. 2014;8(11):e3258. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003258>
 - Iddawela D, Vithana SMP, Atapattu D, Wijekoon L. Clinical and epidemiological characteristics of cutaneous leishmaniasis in Sri Lanka. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):108. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-2999-7>
 - Belli A, García D, Palacios X, Rodríguez B, Valle S, Videá E et al. Widespread atypical cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania*

- (*L.*) *chagasi* in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;61(3):380-5.
19. Araujo Flores GV, Sandoval Pacheco CM, Tomokane TY, Sosa Ochoa W, Zúniga Valeriano C, Castro Gomes CM et al. Evaluation of regulatory immune response in skin lesions of patients affected by nonulcerated or atypical cutaneous leishmaniasis in Honduras, Central America. *Mediators Inflamm*. 2018;2018:3487591. <https://doi.org/10.1155/2018/3487591>
 20. Lyra MR, Pimentel MIF, Madeira MF, Antonio LF, Lyra JP, Fagundes A et al. First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in an urban area of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(5):451-4. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500016>
 21. Lindoso JAL, Moreira CHV, Celeste BJ, Oyafuso LKM, Folegatti PM, Zijlstra EE. Para-kala-azar dermal leishmaniasis in a patient in Brazil: a case report. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2018;51(1):105-7. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0487-2016>
 22. Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury AN, Romero GA et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):e3136. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003136>
 23. Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(8):e3021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003021>
 24. Lindoso JA, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CH. Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges. *HIV AIDS (Auckl)*. 2016;8:147-156. <https://doi.org/10.2147/HIV.S93789>
 25. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(2):334-59. <https://doi.org/10.1128/CMR.00061-07>
 26. Madalosso G, Fortaleza CM, Ribeiro AF, Cruz LL, Nogueira PA, Lindoso JA. American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the state of São Paulo, Brazil. *J Trop Med*. 2012;2012:281572. <https://doi.org/10.1155/2012/281572>
 27. Belo VS, Struchiner CJ, Barbosa DS, Nascimento BWL, Horta MAP, da Silva ES et al. Risk factors for adverse prognosis and death in American visceral leishmaniasis: a meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7):e2982. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002982>
 28. Costa DL, Rocha RL, Chaves EB, Batista VG, Costa HL, Costa CH. Predicting death from kala-azar: construction, development, and validation of a score set and accompanying software. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(6):728-40. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0258-2016>
 29. Cota GF, de Sousa MR, Rabello A. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1153. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001153>
 30. Romero GAS, Costa DL, Costa CHN, de Almeida RP, de Melo EV, de Carvalho SFG et al; Collaborative LVBrasil Group. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):e0005706. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005706>
 31. Cota GF, de Sousa MR, de Mendonça AL, Patrocínio A, Assunção LS, de Faria SR et al. Leishmania-HIV coinfection: clinical presentation and outcomes in an urban area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(4):e2816. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002816>
 32. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção

- Leishmania-HIV. Brasília (DF): Editora do Ministério da Saúde; 2011. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_pacientes_leishmania.pdf
33. Petri e Silva SC, Palace-Berl F, Tavares LC, Soares SR, Lindoso JA. Effects of nitro-heterocyclic derivatives against *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes and intracellular amastigotes. *Exp Parasitol*. 2016;163:68-75. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.007>
34. da Costa-Silva TA, Galisteo AJ Jr, Lindoso JA, Barbosa LR, Tempone AG. Nanoliposomal buparvaquone immunomodulates *Leishmania infantum*-infected macrophages and is highly effective in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(4):e02297-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02297-16>



Addressing the recent dispersion of urban visceral leishmaniasis in the border of Argentina, Brazil, Paraguay + Uruguay + Bolivia – Project IDRC

Abordando a recente dispersão da leishmaniose visceral urbana nas fronteiras da Argentina, Brasil e Paraguai + Uruguai + Bolívia - Projeto IDRC

RIALA6/1756

Oscar Daniel SALOMÓN^{1*}

*Endereço para correspondência: Dirección, Instituto Nacional de Medicina Tropical, Neuquén y Jujuy s/n, Puerto Iguazú, Argentina, CP: 3370. Tel: 54 3757 425001. E-mail: dsalomon@msal.gov.ar

¹Instituto Nacional de Medicina Tropical, Ministerio de Salud de la Nación, Puerto Iguazú, Argentina

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

ABSTRACT

The territory located in the border of Argentina, Brazil and Paraguay is endemic for tegumentary leishmaniasis (TL). However, *Lutzomyia longipalpis* first report in the area was in 2010-Argentina, in 2012-Brazil, and no records in the Paraguayan border despite of reports of human visceral leishmaniasis (VL) cases. Therefore, we developed a research from 2014 to 2017 to study VL in the three-country border at locality level; Uruguay-2015, and Bolivia-2016 joined latter due to the alerts of VL in the Argentinean borders. The space-time distributions of vectors, infected dogs and environmental variables were recorded and associated at three progressive scales, while anthropological surveys were performed. Three scenarios were characterized based on canine VL prevalence, vector presence-abundance and the spatial distribution consistency between them: settled VL, incipient VL, and steady TL with imported canine VL. The vector abundance was clustered in ‘hot spots’ persistent in time that could act as ‘source populations’. The clustering distribution was associated with environmental variables at the different scales studied. Therefore, the vector distribution (proxy of human-dog exposure) could be modeled in recent southern scenarios to focus the surveillance and interventions on predicted ‘hot spots’, in order to increase the effectiveness and efficiency of program activities.

Keywords. *Lutzomyia longipalpis*, canine visceral leishmaniasis, eco-epidemiology, modeling.

RESUMO

O território localizado na fronteira da Argentina, Brasil e Paraguai é endêmico para leishmaniose tegumentar (LT). Entretanto, o primeiro relato de *Lutzomyia longipalpis* na área foi em 2010-Argentina, em 2012-Brasil, sem registros na fronteira em Paraguai apesar dos casos de leishmaniose visceral humana (LV). Portanto, desenvolvemos uma pesquisa de 2014 a 2017 para estudar a LV na tríplice fronteira em nível de localidades; Uruguai-2015 e Bolívia-2016 aderiram mais tarde devido aos alertas de LV nas fronteiras argentinas. As distribuições espaço-temporais de vetores, cães infectados e as variáveis ambientais foram registradas e associadas em três escalas progressivas, enquanto se realizou o inquérito antropológico. Três cenários foram caracterizados com base na prevalência de LV canina, na abundância-presença de vetores, e a coerência da distribuição espacial entre eles: LV instalada, LV incipiente e LT estável com LV canina importada. A abundância de vetores foi agrupada em “pontos quentes” persistentes no tempo que poderiam atuar como “populações fonte”. A distribuição de agrupamento foi associada a variáveis ambientais nas diferentes escalas. Portanto, a distribuição vetorial (proxy da exposição humana a cães) poderia ser modelada em cenários recentes do sul para focar a vigilância e as intervenções nos “pontos quentes” previstos, a fim de aumentar a eficácia e a eficiência das atividades do programa.

Palavras-chave. *Lutzomyia longipalpis*, leishmaniose visceral canina, eco-epidemiologia, modelagem.

INTRODUCTION

The first case of human visceral leishmaniasis (hVL) reported in the South Cone of South America was also the first record in the Americas. Luis Migone diagnosed in Paraguay hVL in a migrant from Italy that had been working in the railway Sao Paulo-Corumba. Further, in Argentina Salvador Mazza in 1923 also reported an hVL case in a worker from Italy working in Salta, a high endemic area of tegumentary leishmaniasis (TL). However, the rural autochthonous transmission was confirmed in the three countries only after the study of VL in Pará and Ceará in the 30's by the Evandro Chagas team.

This rural-transmission scenario with sparse cases changed since the 70's-80's, when the 'VL great conquest of the American Southern frontier' started from NE Brazil, as epidemic urban outbreaks¹. This event of dispersion is as complex as any eco-epidemiological event, involving: a) Human migration of workers from endemic areas correlated with changes in local demography; so the human clustering made more probable the diagnosis, but also increased the transmission due to bad planned urbanizations with deficient socio-sanitary conditions. b) Translocation of the parasite with the dog, its main urban reservoir, who travel with the migrants and usually has uncontrolled reproduction in new peri-urban settlements, with conditions that favor the transmission. c) Modification of the environment with primary forest encroachment, microclimate changes, and spread of the vectors/hosts more adaptable to anthropogenic habitats, as it happened with the main vector of VL in the Americas *Lutzomyia longipalpis*², and even pushing new species as potential vectors/reservoirs (Stockholm Paradigm) so additional agents in vector/reservoir communities could appear. In the environmental issues again the un-planned urbanization, deficient socio-sanitary conditions and health accessibility increase vector breeding sites and risk of human.-dog exposure.

In Mato Grosso do Sul the sequence of dispersion of hVL-canine VL (cVL)-*Lu. longipalpis* was associated in time and space with the Federal highway/rail-road building from SP State (as it was mentioned above the eventual infection scenario of the first hVL case in the Americas), and the Bolivia-

Brazil gas pipeline since 1998. However, there were VL foci in Corumba reported in the 80's, with *Lu. cruzi* as the main vector, and with up to 8.7% cVL prevalence in urban areas³.

Since then, in Paraguay according to the Ministry of Health (Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, DGVS/SENEPA Paraguay) the cumulative hVL cases from 1995 (one case reported and the second one in 2000) up to 2017 were 1083 cases, distributed as 60 (2000-2005), 424 (2006-2010), 500 (2011-2015), 64 in 2016 and 35 in 2017. The reports of cases came mainly from the more populated jurisdictions (Distrito Asunción-Departamento Central) and surroundings, but also from the northern border with Brazil (Estado do Mato Grosso do Sul) and the eastern border with Argentina (Provincia de Misiones) and Brazil (Estado do Paraná), while the canine prevalence from 2005 to 2010 ranged between 20.9%-38.7%-69% in the foci.

In Argentina, the records since the first imported case mentioned above until 1989 showed only 16 cases with visceral symptoms, in places without vector captures, while *Lu. longipalpis* was found in forest locations close to the three-country border area in 1951 and again in 2000. However, as the urban VL was getting closer (Mato Grosso do Sul-Brazil and Asunción-Paraguay) the national program of leishmaniasis, focused up to then on TL, generated a yellow alert for VL since the year 2000. *Lutzomyia longipalpis* was found in urban environments on the border with Paraguay opposite to Lambaré (Departamento Central) in 2004 and then the alert was turned to orange. The first autochthonous hVL case was diagnosed in Posadas, city that also share a border with Paraguay, in 2006 and then the alert turned to red. The cumulative cases in Argentina from 2006 to 2017 were 182, more than 80% in the NE region of the country (Provincias Misiones and Corrientes), but during this period the vectors were reported in seven jurisdictions, including the border with Bolivia and Uruguay⁴. Two hVL-cVL foci away from the NE region were associated with *Migonemyia migonei*. Besides, cVL was reported thorough the country due to traffic and transit of dogs, and canine horizontal-vertical transmission. In urban *Lu. longipalpis*-related foci cVL reached a mean prevalence of 18.33% (8.5-26.2%).

Further, modeling the potential distribution of *Lu. longipalpis* in Argentina, the gallery forest of the river Uruguay could be a suitable environment for the vector, even close to the mouth in the Rio de la Plata, according to the annual rainfall, the rainfall during the drier quarter and the mean temperature during the coldest quarter.

Visceral leishmaniasis further reports in the southern latitudes were: Brazil: Paraná, autochthonous hVL in SE region 1973/1974 and 1980; *Lu. longipalpis* in Foz de Iguazu 2012 (after the alert about vectors in Puerto Iguazú in 2010 -AR)⁵. Santa Catarina without vector or cases in 2003, 29/2124 dogs with cVL in Florianópolis during 2011, 48/252 cVL 7:3 rural: urban 2014⁶. Rio Grande do Sul, Santa Maria 5 cVL in rural environments 1985, São Borja cVL, hVL 2008, *Lu. longipalpis* 2009; Uruguiana cVL, 1 hVL 2009; Porto Alegre 3 hVL deaths 2016-2017⁷. Uruguay: *Lu. longipalpis* in Salto and Bella Unión 2010 (after the alert about vectors in Monte Caseros 2008-AR); Arenitas Blancas- Salto 11/45 cVL, *Lu. longipalpis*, *L. infantum* 2017⁸. Bolivia no records of hVL, cVL or *Lu. longipalpis* up to 2016 (alert about vectors in Tartagal 2013-AR).

Therefore, with these antecedents, we developed the project: “Addressing the emergence and spread of leishmaniasis in the borders of Argentina, Brazil and Paraguay”, supported by IDRC-Canada with the collaboration of PAHO from 2014 to 2017. After the starting of the project, due to the dispersion of the VL risk, Uruguay joined us in the year 2015, and Bolivia in 2017, the last with a small grant from PAHO.

MATERIAL AND METHODS

The project conceptualizes the multi-country border area as a common territory with biological symmetries, and socio-cultural asymmetries. Thus, the eco-epidemiology was the multidisciplinary theoretical frame selected to approach the problem, and so a common design was discussed at focus (locality) level. We selected critical sites for sampling, each one within cells of an urban grid of 400 x 400 m (census or stratified according to the city size) + ecotone transects (\approx 750 sites). We recorded the environmental variables at three successive

progressive scales (spatial buffers): microscale-critical site, mesoscale-critical area around the site, and macroscale-landscape characteristics around the critical areas. At each critical site we performed vector captures (transversal sampling and seasonal sub-sampling) three-nights with mini light traps, we surveyed the five dogs closest to each vector-trap at least for VL and *L. infantum* infection (rapid test, ELISA, molecular biology of equivalent sensitivity between countries), and we evaluated synanthropic rodent presence with traps of activity. Simultaneously a medical anthropological study was performed developing a mapping of actors and then performed qualitative and quantitative surveys to collectives, key informants, and community.

RESULTS AND DISCUSSION

In Argentina, the study about the association between the spatial distribution of vector presence/abundance (proxy of human exposure) and environmental variables showed spatial clustering but segregated by species: *Nyssomyia whitmani*-vector of the agent of TL (45% of the sites) was close to forested areas and away of water bodies-more urbanized areas; *Lu. longipalpis* -vector of the agent of VL (47% of the sites) was close to water bodies-urban heterogeneous landscape areas (vegetal coverage and buildings intermingled). *Leishmania infantum* DNA was detected in 5 *Lu. longipalpis*, 1 *Ny. whitmani* and 1 *Micropygomyia quinquefer* (n:379). The spatial auto-correlation of *Lu. longipalpis* abundance had a range of 400m, and the abundance was better explained by land cover characteristics of 20.25ha (six classes evaluated for areas between 0.27 and 20.25 ha). The variables that better explained presence of this species were chicks (microscale) and NDWI (mesoscale), while for abundance the variables were the availability of different blood sources (hens, dogs or both) (microscale); and drinking water network, garbage collection, sewer (mesoscale). The abundance is higher in peridomestic than in indoor samplings, but inside the houses was higher in autumn (unpublished data). When *Lu. longipalpis* captures in Puerto Iguazu between 2011 (a year after the first record) and 2015 were compared, the VL vector kept 76.4% of its original distribution between dates. These data are consistent with studies

performed in other cities in Argentina, and with a 'hot spot'-source population hypothesis, as to an 80-20 relationship (20% of the sites are responsible for 80% of the abundance).

The canine infection prevalence at Puerto Iguazú according to rK39+ dogs was 21.2% (computed in dogs around the critical sites for vectors so it could be biased to higher values regarding the actual mean prevalence of the dog general population). The cVL abundance was spatially correlated negatively with the distance to vector traps and to human sleeping areas. However, the spatial distribution of abundance of cVL dogs are not consistent with the VL vector abundance distribution, probably due to the traffic and transit of puppies/dogs within the city and between cities and international borders, based on the social networks of dog owners and transit of stray dogs. The anthropological study revealed the dynamics in a border territory between three countries of high porosity but different environment/urbanization social history. Regarding leishmaniasis the approach on knowledge, attitudes, perception and practices (KAPP) showed that the topic was focused almost exclusively in cVL, the KAPPs were fragmented, disparate and even contradictory or actively opposed between actors, and it depends on the human-dog interspecific distance according to dog uses/stray dogs, but almost ever delegitimizing the actions of the public agents and state policy but assigning all health-related responsibility to it. There are also gender bias due to domestic chores issues and assigned responsibility as family health and domestic area 'cleanliness' (unpublished data).

The Brazilian team developed the project in Foz do Iguaçu (FI), Santa Terezinha de Itaipu (STI) townships and along two transects between them (526 sites sampled) *Lu. longipalpis* was also the prevalent species. *Leishmania infantum* was found in *Lu. longipalpis*, *Ny. whitmani*, and *Ny. neivai*. The results suggested that according to the Stockholm Paradigm a probable shifting of potential vectors could be happening, and so the public health policies in international border areas should be aware of these eventual change of species in the transmission cycle. The spatial distribution of *Lu. longipalpis* is clustered in rural-urban mixed landscape areas (remnants of vegetation, debris and presence of synanthropic rodents and domestic animals). *Leishmania*

braziliensis presence and abundance supports the need to develop public health policies to avoid TL outbreaks and TL urban spread in the area. Therefore, for an efficient control, it is essential to think in the aspects of urban planning and to coordinated it with the neighboring cities and countries⁹.

The canine prevalence rate of *L. infantum* in the Brazilian border was 23.8% in FI, 4.7% in STI and 9.1% in the transect areas. Among the variables analyzed, the number of vectors and the presence of surrounding infected dogs were positively correlated with the occurrence of infected dogs. Dog size, an intrinsic variable, was positively correlated also with cVL infection, while the quality of the dog's nutrition affected cVL negatively. Once dogs are associated with humans, it maximizes the probability of VL transmission. As for TL, the record of dogs with *L. braziliensis* shows that the transmission in peri-urban areas is possible, while cVL is widely spread in FI with high prevalence, so sensitive differential diagnosis are required. These results also supports the hypothesis that the parasites have been present in the region for longer than previously believed, despite of the fact that the presence of VL in the region has only been recognized recently. Therefore, the control of the population of dogs infected with *L. infantum* (parasite and non-antibodies) is required to prevent the spread of the disease to other dogs and humans in the region¹⁰.

The research in Paraguay to characterize knowledge, attitudes, and practices (KAP) regarding to leishmaniasis was performed in neighborhoods with infected dogs and phlebotomine as it were reported by the project, characterized as transmission foci. Thus, households of San Francisco and Santa Rosa neighborhoods were visited to perform the qualitative-quantitative survey. Seventy-one percent of respondents stated that they had heard about the disease, however they have little knowledge about the different leishmaniasis, the transmission cycle, or the symptoms. The attitudes and practices were associated and focused on dogs as pets, and so there were many topics of confusion between human and canine leishmaniasis. The results obtained by the team of Paraguay suggested the importance of educational interventions in populations at risk, to improve conditions for prevention and control of leishmaniasis in the triple border, taking into

account that the flux of people is very intense. One point that should be highlighted is that the people surveyed in Paraguay stated that animals (dogs) have rights (95.2%), feelings (98.4%), but interestingly also a human exclusive cultural construct as it is morality (74.2%)¹¹. This issue shifts the human-dog interspecific distance to an issue of distance between subjects of equal values, so a dog could be conceptualized as closer than a human neighbor, while the focus is again in cVL instead of on VL or leishmaniasis. Further, even scientific presentations on cVL have many pictures of babies and puppies playing together, as a subliminal reminder to the audience on the human character of the dogs. These results, consistent between countries could not be avoided or despised and less judged if we need to develop a strategy for cVL control that show efficacy but also effectiveness in the actual world.

When a similar study was performed as case-control study in and endemic focus of cVL in Argentina the knowledge resulted to be a risk factor, because a previous positive diagnosis of cVL in an current urban environment generated in the dog owner a surfing in internet about the disease, more than that generated by a general alert about VL transmission in the city among the general public¹². Therefore, the case-control studies designs should be interpreted with caution in times of internet, mainly when urban populations are involved. On the other hand, taking into account the community reception of controversial issues about cVL, despite any personal position a basic common discourse should be shared among the legitimate voices, so the risk to have a dog infected in an area with vectors should not be despised¹³. In this sense, in Argentina a workshop and agreement act was promoted by the project researchers between public and private practitioner health agents for cVL management.

Paraguay reported *Lu. longipalpis* for the first time in the three-country border with the methodology of the project, mainly in the shore opposite to Argentina also in rural-urban mixed landscapes, and together with Uruguay showed a very clustered and spatially consistent distribution of the vector and *L. infantum* infected dogs. In the Bolivian border with Argentina *Lu. longipalpis* was also reported for the first time. These results draw attention to the fact that TL-related surveillance

routines may overlook *Lu. longipalpis* unless the urbanized habitat of the vector of the VL agent is taken into account.

Regarding the dispersion in larger scales than a locality, although the parasite spread is fairly explained with the migration of infected hosts, the vector spread from NE Brazil to Uruguay and Argentina it is difficult to explain yet by the proposed passive and active mechanisms, and still require better hypothesis². On the other hand, not all the pheromone types of *Lu. longipalpis* has the same dispersive potential, landscape plasticity and vectorial capacity, as the (S)-9-methylgermacrene-B seems the spreader one responsible to colonize new environments¹⁴. This pheromone type is also the one present in three-country border area¹⁵, but preliminary results seems to indicate at least two ways of dispersion in the region, one from Mato Grosso- Paraguay- Argentina, and another one related to Rio Grande do Sul-Argentina shared VL foci (unpublished data).

CONCLUSION

Looking at the whole the results in the three countries and the preliminary results from Uruguay and Bolivia, allowed us to characterize different scenarios: A) VL settled: Urban distribution of *Lu. longipalpis* in 'hot spots', cVL prevalence rates 22%-26% increasing along time; Ar- Puerto Iguazú, Br- Foz do Iguazu. B) Visceral Leishmaniasis incipient: *Lu. longipalpis* and cVL restricted to small clusters, cVL general prevalence up to 4%, spatial consistency between cVL and vector distribution; Br- Santa Terezinha de Itaipu, Pr- Presidente Franco, Ur- Salto, Bo – Pocitos. C) Cutaneous Leishmaniasis steady: *Ny. whitmani* *Ny. neivai* in ecotones, without *Lu. longipalpis*, but it could be cVL imported cases; Ar – Puerto Iguazu urban periphery, Ar, Br, Py – transects. D) No risk up to now: Uy-Paysandú 32°19'S, 58°04'W.

Therefore, regarding the spatial clustering, time persistence and environmental variables associations with *Lu. longipalpis* presence-abundance at the different scales studied, we propose as a next step to build up a model of models to be validated in the field. This operational statistical model would identify in a given city potential

risk areas (microscale-macrohabitat) by satellite and census data. After this selection, weighting environmental, biological, and social risk drivers with secondary and primary data, probable risk areas (critical area) could be selected among the potential risk areas, and risk sites (microscale-macrohabitat) chosen inside the probable risk areas. These ‘hot spots’ identification will allow to focus the monitoring and interventions activities only in few small areas, where it is more probable the initial colonization or the reproduction of ‘source populations’, increasing both the effectiveness and the efficiency of the surveillance and control strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

The Project “Addressing the emergence and spread of leishmaniasis in the borders of Argentina, Brazil and Paraguay+Uruguay” was supported by IDRC-Canada (IDRC#107577-000), while the work in Bolivia was supported by a PAHO/WHO/TDR small grant. In each country additional support was provided by federal, state and local agencies and universities, the main ones: Argentina: Ministerio de Salud de la Nación. Instituto Nacional de Medicina Tropical. Brazil: Secretaria do Estado do Paraná, Universidade Federal do Paraná, CCZ Foz do Iguaçu. Paraguay: Universidad Nacional del Este, Centro para el Desarrollo de la Actividad Científica, SENEPA-Ministerio de Salud y Bienestar Social, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Uruguay: Ministerio de Salud Pública, Universidad de la República, Comisión de Zoonosis. Vanete Thomaz-Soccol, Nilsa González Britez, Gabriela Willat and Zaida Yadon shared with the author the international coordination of the project, while Gabriela Quintana and Soledad Santini the coordination of the project in the Argentinean node.

REFERENCES

1. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*. 2011;27(9):403-9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>
2. Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MM, Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(7):831-46. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150207>
3. Correa Antonialli SA, Torres TG, Paranhos Filho AC, Tolezano JE. Spatial analysis of American visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state, Central Brazil. *J Infect*. 2007;54(5):509–14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2006.08.004>
4. Salomón OD, Mastrángelo AV, Santini MS, Liotta DJ, Yadón ZE. La eco-epidemiología retrospectiva como herramienta aplicada a la vigilancia de la leishmaniasis en Misiones, Argentina, 1920-2014. *Rev Panam Salud Publica*. 2016;40(1):29-39. Disponible em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/28577>
5. Santos DR, Ferreira AC, Bisetto Junior A. The first record of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the State of Paraná, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(5):643-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000500019>
6. Maziero N, Thomaz-Soccol V, Steindel M, Link JS, Rossini D, Alban SM et al. Rural-urban focus of canine visceral leishmaniasis in the far western region of Santa Catarina State, Brazil. *Vet Parasitol*. 2014;205(1-2):92-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.005>
7. Escobar TA, Döwich G, Zuravski L, Cantele LC, Duarte CA, Lübeck I. Risk factors associated to canine visceral leishmaniasis in Uruguiana city, Brazil. *Semina: Ciênc Agrár*. 2018;39(1):211-20. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n1p211>
8. Satragno D, Faral-Tello P, Canneva B, Verger L, Lozano A, Vitale E et al. Autochthonous outbreak and expansion of canine visceral leishmaniasis, Uruguay. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(3):536-8. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2303.160377>

9. Thomaz-Soccol V, Gonçalves AL, Piechnik CA, Baggio RA, Boeger WA, Buchman TL et al. Hidden danger: unexpected scenario in the vector-parasite dynamics of leishmaniasis in the Brazil side of triple border (Argentina, Brazil and Paraguay). *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(4):e0006336. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006336>
10. Thomaz Soccol V, Pasquali AKS, Pozzolo EM, Leandro AS, Chiyo L, Baggio RA et al. More than the eyes can see: the worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189182. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0189182>
11. Giménez-Ayala A, González-Brítez N, Rojas-de-Arias A, Ruoti M. Knowledge, attitudes, and practices regarding the leishmaniasis among inhabitants from a Paraguayan district in the border area between Argentina, Brazil, and Paraguay. *J Public Health*. 2018;26(6): 639-48. <https://doi.org/10.1007/s10389-018-0908-6>
12. López K, Tartaglino LC, Steinhorst II, Santini MS, Salomon OD. Risk factors, representations and practices associated with emerging urban human visceral leishmaniasis in Posadas, Argentina. *Rev Biomed*. 2016;36:51-63. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2953>
13. Salomón OD, Mastrángelo AV, Santini MS, Ruvinsky S, Orduna T, Sinagra A, et al. Visceral leishmaniasis: paths that converge and divide. *Salud Colectiva*. 2012; 8(Suppl1):549-63. Disponible em: http://www.scielo.org.ar/pdf/sc/v8s1/en_v8s1a11.pdf
14. Galvis-Ovallos F, Casanova C, Sevá ADP, Galati EAB. Ecological parameters of the (S)-9-methylgermacrene-B population of the *Lutzomyia longipalpis* complex in a visceral leishmaniasis area in São Paulo state, Brazil. *Parasit Vectors*. 2017 10(1):269. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2211-8>
15. Salomón OD, Araki AS, Hamilton JG, Acardi SA, Peixoto AA. Sex pheromone and period gene characterization of *Lutzomyia longipalpis* sensu lato (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae) from Posadas, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(7):928-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000700016>



Vetor ou vetores? Capacidade vetorial e estratégias de controle

Vector or vectors? Vectorial capacity and control strategies

RIALA6/1757

Claudio CASANOVA*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Parasitoses por Flagelados, Superintendência de Controle de Endemias. Rua Afonso Pessini, 86, Bairro Pedregulhal, Mogi Guaçu, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 13845-206. Tel: 19 3861 1233. E-mail: casanovaclus@gmail.com

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

RESUMO

Variáveis relacionadas a fatores epidemiológicos, ao ambiente, ao agente etiológico, ao vetor e aos reservatórios parecem atuar na determinação dos diferentes cenários de transmissão da leishmaniose visceral no Brasil. No estado de São Paulo a leishmaniose visceral (LV) não apresenta um padrão epidemiológico homogêneo por todas suas regiões, parecendo refletir uma multitude de cenários propícios para a ocorrência da transmissão dentro do território Paulista. *Lutzomyia longipalpis* é composta por um complexo de espécies das quais duas são encontradas no Estado de São Paulo e parecem possuir diferença na capacidade vetorial. É provável que essa diferença seja o fator determinante na caracterização dos diferentes padrões epidemiológicos observados nas diferentes regiões do Estado. No presente estudo, procuramos determinar a distribuição temporal e geográfica das espécies do complexo *Lu. longipalpis*, dos casos caninos e dos casos humanos de LV como elementos chave para ajudar na caracterização de alguns cenários de transmissão da doença e apontar áreas de maior risco para a aquisição da doença. Por outro lado, a recente e inesperada ocorrência de transmissão da LV em localidades sem a presença da *Lu. longipalpis*, caracteriza mais um novo cenário, onde a transmissão da *Leishmania infantum* ao homem se mostrou possível, configurando um novo desafio para as autoridades da saúde pública.

Palavras-chave. *Lutzomyia longipalpis*, feromônio, leishmaniose visceral, cenários de transmissão.

ABSTRACT

Variables related to epidemiological factors, etiologic agent, environment, vector and reservoirs seem to act in determining the different scenarios of transmission of visceral leishmaniasis (VL) in Brazil. In the state of São Paulo, VL does not present a homogeneous epidemiological pattern across all its regions, seeming to reflect a multitude of scenarios conducive to the occurrence of transmission within Paulista territory. *Lutzomyia longipalpis* is composed of a complex of species of which two are found in the state of São Paulo and appear to have a difference in vector capacity. It is likely that this difference is the determining factor in the characterization of the different epidemiological patterns observed in the different regions of the State. In the present study, we sought to determine the temporal and geographic distribution of *Lu. longipalpis* species, canine cases and human cases of VL as key elements to help characterize some scenarios of transmission of the disease and to indicate areas of greater risk for disease acquisition. The recent and unexpected occurrence of VL transmission in localities without the presence of *Lu. longipalpis* characterizes another new scenario, where other species of sand flies can transmit *Leishmania infantum* to man and configuring a new challenge for public health authorities.

Keywords. *Lutzomyia longipalpis*, pheromone, visceral leishmaniasis, scenarios of transmission.

INTRODUÇÃO

Registrar a distribuição geográfica e identificar as possíveis rotas de expansão de doenças transmitidas por artrópodes e seus respectivos vetores é uma informação essencial para a vigilância, bem como para a execução e elaboração de estratégias de controle¹. A *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva), principal vetor da *Leishmania infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) nas Américas, é formada por um complexo de espécies, as quais podem ser distinguidas pelo feromônio sexual produzido pelos machos². A existência de um complexo de espécies sempre nos reporta para uma interessante questão epidemiológica: será que estas espécies tem a mesma capacidade vetorial? No Brasil, a expansão geográfica de *Lu. longipalpis* e sua adaptação aos habitats domiciliares nas áreas urbanas por todas as regiões geográficas resultou no aumento da incidência de leishmaniose visceral (LV) canina e humana nos últimos 25 anos³. Considerando as diferenças no padrão epidemiológico da LV - principalmente a incidência de casos humanos; a prevalência canina; a abundância de *Lu. longipalpis* nas áreas urbanas; e o feromônio apresentado pelas populações de *Lu. longipalpis* - entre diferentes regiões do Estado de São Paulo, Casanova et al⁴ sugeriram que os diferentes quimiotipos de *Lu. longipalpis* - representados pelas populações produtoras de (S)-9-metilgermacreno-B e cembreno-1 - possuem diferentes capacidade vetorial. Se esta afirmação é correta, então se reveste de grande interesse epidemiológico caracterizar estas regiões como representativas de diferentes cenários, dentro dos quais o risco para a ocorrência de casos humanos da doença é diferenciado. Este conhecimento poderia ajudar a direcionar as atividades de controle e torná-las mais efetivas.

A possível participação de outras espécies de flebotomíneos no ciclo de transmissão da *L. infantum*⁵ tem sido apontada em algumas poucas localidades do Brasil. Assim como *Lu. longipalpis*, estas espécies são denominadas “espécies permissíveis”, as quais suportam o desenvolvimento da infecção por mais de uma espécie de *Leishmania*⁵. Este critério e, ainda, o encontro repetitivo de fêmeas infectadas por *L. infantum*, permitiu, recentemente, apontar *Migonemyia migonei* (França 1920) como uma das espécies participantes do ciclo de transmissão da LV em um município do Estado de Pernambuco⁶.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estado de São Paulo está localizado na região Sudeste do Brasil, e faz divisa com os estados de Minas Gerais ao norte e nordeste, Paraná ao sul, Rio de Janeiro a leste, e Mato Grosso do Sul a oeste, e a sudeste com o Oceano Atlântico. Está dividido em 645 municípios totalizando 248.209 km². Seu clima pode ser dividido em sete tipos distintos, em sua maioria são considerados úmidos. De acordo com o sistema de classificação de Köppen, o tipo predominante de clima é o Cwa, que inclui as partes central e leste de São Paulo, definido como tropical de altitude, onde o verão é a estação chuvosa, o inverno é seco, e a temperatura média no verão é acima de 22 °C. Na região oeste (clima Aw), a estação chuvosa é atrasada até o outono, o inverno é seco (a precipitação para o mês mais seco não ultrapassa os 60mm) e a média da temperatura para o mês mais frio é acima de 18 °C.

Dados sobre os casos de leishmaniose

Os dados sobre os casos humanos foram obtidos junto ao Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde⁷ e os casos caninos foram coletados a partir de inquéritos realizados pelos municípios, Instituto Adolfo Lutz e pela Secretaria de Estado da Saúde.

Dados sobre *Lutzomyia longipalpis*

Os dados sobre a distribuição desta espécie foram obtidos por coletas entomológicas feitas durante o desenvolvimento de atividades de vigilância realizadas pela Superintendência de Controle de Endemias da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e durante estudos de campo realizados por diversos autores⁴.

Espécies do complexo *Lutzomyia longipalpis*

Machos de *Lu. longipalpis* de diferentes municípios foram coletados com aspirador manual e armadilhas luminosas elétricas, tipo CDC, em ambiente domiciliar e peridomiciliar dentro de áreas urbanas, periurbanas e rurais de diversos municípios do estado de São Paulo. As análises dos extratos de feromônio sexual foram realizadas conforme protocolo descrito por Hamilton et al².

RESULTADOS

Antes de 1997, *Lu. longipalpis* tinha sido encontrada apenas em áreas rurais de seis municípios do estado de São Paulo, todos localizados nas áreas leste e nordeste do estado. O primeiro registro do vetor em uma área urbana foi em 1997 no município de Araçatuba, situado na região oeste e próximo à fronteira com o estado Mato Grosso do Sul⁸. De 1998 a janeiro de 2018, *Lu. longipalpis* foi encontrado em outros 186 municípios, perfazendo um total de 193 municípios infestados (**Figura 1**).

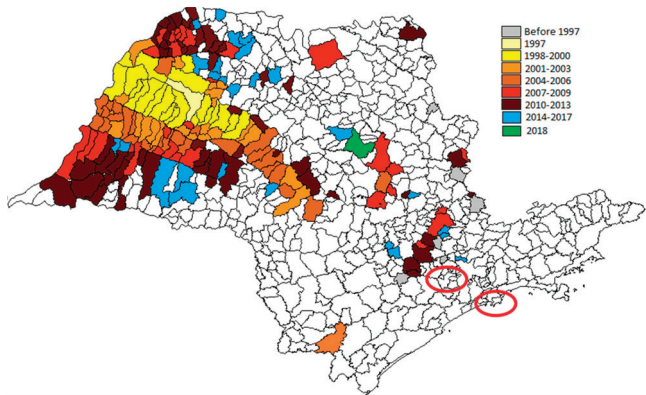


Figura 1. Rota de dispersão da *Lutzomyia longipalpis* no período anterior a 1997 até janeiro de 2018, Estado de São Paulo. Os círculos em vermelho chamam atenção da localização de alguns municípios sem a presença da *Lu. longipalpis*

A maior expansão da distribuição de *Lu. longipalpis* aconteceu na parte oeste do estado de São Paulo.

A distribuição temporal e espacial de *Lu. longipalpis* permite observar que a rota de dispersão ocorreu da região noroeste em direção a região sudeste do Estado de São Paulo e a partir desta linha, uma expansão nos sentidos norte e sul. De maneira geral pode-se observar que a presença do vetor precede os casos caninos, que por sua vez antecede os casos humanos (**Figuras 1,2,3**). Em sua maioria os municípios com transmissão de LV estão distribuídos pelo Planalto Ocidental na região oeste do estado de São Paulo, e os casos da doença apresentaram uma rota de expansão semelhante a aquela apresentada pelo vetor (**Figuras 2,3**).

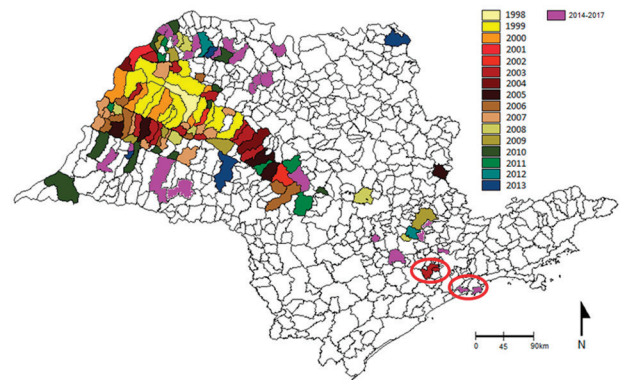


Figura 2. Distribuição da ocorrência de casos caninos de leishmaniose visceral no Estado de São Paulo, de acordo com o ano de primeira notificação, no período de 1998 até 2017. Os círculos em vermelho chamam atenção da localização de alguns municípios com ocorrência de casos caninos

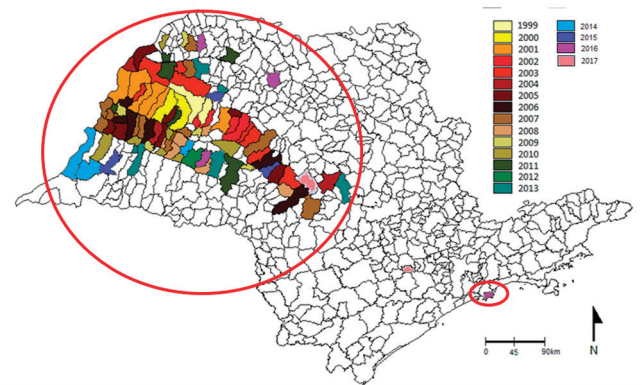


Figura 3. Distribuição da ocorrência de casos humanos de leishmaniose visceral no Estado de São Paulo, de acordo com o ano de primeira notificação, no período de 1998 até 2017. Os círculos em vermelho chamam atenção para indicar a localização de municípios com ocorrência de casos humanos

Em sua maioria os municípios com transmissão de LV estão distribuídos pelo Planalto Ocidental na região oeste do estado de São Paulo, e os casos da doença apresentaram uma rota de expansão semelhante a aquela apresentada pelo vetor (**Figuras 2,3**). Chama a atenção, localidades dos municípios de Cotia, Embú das Artes (situados na Grande São Paulo) e Guarujá (situado no litoral), as quais apresentaram casos caninos na ausência da *Lu. longipalpis*. É interessante notar que na região leste, *Lu. longipalpis* foi detectada em apenas 28 municípios, um número muito

menor de municípios quando comparado com a região oeste do Estado (**Figura 1**). Embora ocorra a transmissão canina em 14 municípios da região leste do Estado, apenas 2 apresentaram casos humanos da doença: Guarujá - 3 casos e Votorantim - apenas 1 caso. Chama a atenção o fato de *Lu. longipalpis* estar ausente nas localidades do município do Guarujá onde ocorreram casos humanos da doença. A análise química de todas as amostras de machos de *Lu. longipalpis* de 10 municípios na região oeste mostrou que todos produziram (S)-9-metilgermacreno-B (**Figura 4**).

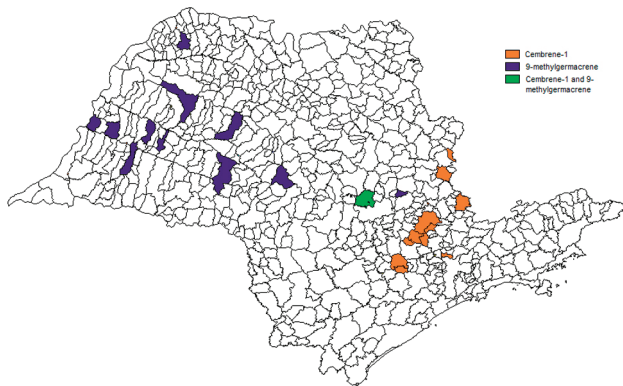


Figura 4. Distribuição espacial das duas espécies de *Lutzomyia longipalpis* identificadas pela produção dos feromônios: (S)-9-methylgermacrene-B e cembreno-1, no Estado de São Paulo

Por outro lado, as amostras dos machos de 11 municípios do leste do estado continham cembreno-1 (C-20) e em apenas 1 município foi detectado o (S)-9-metilgermacreno-B (**Figura 4**). No município de São Pedro, localizado na região central do Estado, foi encontrada uma população de (S)-9-metilgermacreno-B, e em adição, dois indivíduos que produziram (S)-9-metilgermacreno-B e cembreno-1 simultaneamente.

As localidades sem a presença da *Lu. longipalpis* e com casos caninos e/ou humanos de LV apresentaram predominância de espécies de reconhecida participação no ciclo de transmissão da *Leishmania braziliensis* Vianna, agente etiológico da leishmaniose cutânea. *Pintomyia fischeri* (Pinto 1926) e *Mi. Migonei* em localidades com apenas casos caninos da doença na região da Grande São Paulo (municípios de Cotia e Embú das Artes)

e *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva 1912) e *Mi. Migonei* na Baixada Santista (onde Santos apresenta apenas transmissão canina e Guarujá com casos caninos e humanos de LV).

DISCUSSÃO

É muito difícil apontar o ano exato em que *Lu. longipalpis* alcançou as áreas urbanas de municípios do Estado de São Paulo, entretanto é muito provável que quando a espécie foi detectada pela primeira vez em Araçatuba, em 1997⁸, ela já estivesse presente nos municípios ao redor, uma vez que estes apresentaram o vetor nas primeiras coletas do ano seguinte, 1998. A partir deste momento, a distribuição espacial e temporal do vetor evidencia uma expansão do oeste para o leste, mais precisamente do noroeste em direção ao sudeste (até a região central do estado). É possível que fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento econômico do Estado, tais como o aumento do transporte de bens e pessoas por rodovias e ferrovias, sejam responsáveis pela dispersão passiva do vetor por toda a região. O pouco tempo transcorrido para detecção, pela primeira vez, do vetor na área urbana de um grande número de municípios da região oeste do Estado a partir de 1997, indica uma dispersão intermunicipal rápida. O fato de que a expansão de casos caninos e humanos no oeste do estado tem seguido a mesma rota de dispersão do vetor, mas com um atraso temporal, não pode ser considerado como uma mera coincidência porque há muito tem sido observado na epidemiologia da LV que a presença do vetor precede os casos caninos e, estes, os casos humanos. O baixo número de municípios que notificaram a presença do vetor na região leste do estado, em contraste ao oeste, não permite apontar uma rota de dispersão nítida. Neste caso, a expansão da doença está, provavelmente, associada à expansão das áreas urbanas em direção às áreas rurais. É bem perceptível a existência de dois padrões epidemiológicos, bastante distintos, da LV nessas duas regiões do estado de São Paulo. Na região oeste, é definido pela ocorrência de casos humanos, alta prevalência de casos caninos, e um grande número de municípios onde a presença de *Lu. longipalpis* foi registrada. Nesta

região, todos os machos analisados mostraram ser da população produtora do feromônio (S)-9metilgermacreno-B. Em contraste, a região leste pode ser caracterizada pela ausência de casos humanos notificados - com exceção do município de Votorantim com apenas um caso da doença - mesmo naqueles municípios onde *Lu. longipalpis* e os casos caninos já estão presentes há mais de 17 anos, baixa prevalência canina e um pequeno número de municípios que registraram a presença do vetor. Todas as amostras de machos analisadas apresentaram o feromônio cembreno-1. Estas observações apoiam a hipótese, aventada por Casanova et al⁴, de que, no Estado de São Paulo, a espécie que produz (S)-9-metilgermacreno-B pode ter uma capacidade vetorial maior do que a espécie produtora de cembreno-1. Diferenças nos parâmetros ecológicos de capacidade vetorial, tais como: abundância, sobrevivência, padrões de alimentação nos hospedeiros e frequência de repasto sanguíneo, podem variar entre estas espécies e necessitam de urgente avaliação⁹. Além disso, a susceptibilidade e interações co-evolutivas com os genótipos de *Leishmania*, que podem influenciar na transmissão do parasito, são parâmetros envolvidos na competência vetorial e podem ser diferentes para as espécies do complexo *Lu. longipalpis*¹⁰. É interessante notar que os dois principais grupos de *L. infantum*, identificados por tipificação de microssatélites, isolados de cães das regiões noroeste e sudeste de São Paulo¹¹, apresentaram distribuição geográfica coincidente com uma das duas espécies *Lu. longipalpis* encontradas no Estado de São Paulo. O presente estudo indica que a composição de diferentes espécies de *Lu. longipalpis* pode ser incorporada na determinação de cenários ecoepidemiológicos de transmissão da LV no Estado de São Paulo. Os resultados sugerem que as populações de *Lu. longipalpis* que produzem cembreno-1 tem uma origem rural e já habitava áreas silvestres da região leste do Estado, enquanto que a população (S)-9-metilgermacreno-B seria a espécie introduzida. A expansão oeste-leste dos casos humanos de LV em Mato Grosso do Sul foi apropriadamente demonstrada por Correa-Antonialli et al¹², que apontaram, como uma possível causa para a expansão geográfica e

temporal da leishmaniose visceral, a construção do gasoduto Bolívia-Brasil. A mesma hipótese foi considerada para explicar a expansão dos casos humanos e caninos na região oeste do estado¹¹. O encontro do mesmo feromônio em machos em uma mesma rota de expansão temporal de oeste para leste no estado de São Paulo também fortalece a hipótese de que populações de (S)-9-metilgermacreno-B de *Lu. longipalpis* foram introduzidas no estado a partir do Mato Grosso do Sul. Informações sobre a rota de dispersão e distribuição das duas espécies de *Lu. longipalpis* são essenciais para o entendimento dos padrões epidemiológicos observados no Estado de São Paulo.

A possível participação de *Pi. fischeri*, *My. migonei* e de *Ny. intermedia* e *My migonei* no ciclo de transmissão da *Le. infantum* nos municípios de Cotia e Embú das Artes e no município do Guarujá, respectivamente, suscita estudos de capacidade vetorial e o aprimoramento das atividades de vigilância entomológica e epidemiológica¹³.

Muito provavelmente as diferenças do padrão epidemiológico da LV encontrado em diferentes regiões do Estado de São Paulo, caracterizam diferentes cenários de transmissão e podem ser creditadas à participação de diferentes espécies de flebotomíneos presentes nestas regiões. Dando-se ênfase aos parâmetros entomológicos, a distribuição geográfica destas espécies pode ser utilizada para identificar áreas de risco e consequentemente definir as prioridades de medidas de controle.

Parâmetros populacionais e a ecoepidemiologia da leishmaniose visceral

A capacidade vetorial (CV) é o número de novas infecções disseminadas por caso por dia realizada por uma população de vetores^{14,15}. Pela sua fórmula: $CV = m \cdot a^2 \cdot b \cdot S^n / -\ln(S)$, onde m = densidade de fêmeas em relação ao hospedeiro; a = nº médio de picadas/fêmea/dia por hospedeiro; b = nº de fêmeas infectivas; S = sobrevivência diária; pode-se perceber que, essencialmente, os parâmetros de “m” “a” “b” e “S” determinam o número de fêmeas potencialmente infectivas numa população e a frequência de contatos que elas tem com seus hospedeiros em

uma localidade^{14,15}.

A avaliação dos parâmetros da CV dentro de um modelo, permite teorizar sobre o efeito de cada estratégia que vem sendo aplicada ou sugerida como método de controle dos vetores da LV no Brasil.

Inseticida de efeito residual

Pequenas mudanças na taxa de sobrevivência diária (S) provocam substanciais mudanças na proporção de fêmeas que sobrevivem por tempo suficiente para se tornarem infectivas. Assim, uma mortalidade adicional, induzida pela aplicação de aduicida de efeito residual, reduzirá ainda mais a proporção de potenciais transmissores. Por exemplo, se 50% de redução pode ser alcançada em uma população de fêmeas de *Lu. longipalpis* com 80% de sobrevivência diária⁹ (S = 0,80), teremos uma taxa de sobrevivência diária de 40% (S = 0,40), ou seja, somente 1% da população sobreviverá até o quinto dia (duração do ciclo gonotrófico, i.e. o tempo, em dias, entre 2 repastos sanguíneos) para transmitir a *L. infantum*. Por exemplo, para uma população inicial de 10.000 fêmeas infectivas somente 100 fêmeas estarão vivas ao final de 5 dias para realizar um novo repasto sanguíneo e transmitir a *Leishmania*. A atuação desta medida de controle se faz sobre a taxa de sobrevivência diária “S”, e sem dúvida, tal redução teria um grande impacto na transmissão: $CV = ma^2 S^n / -\ln(S)$.

Zooprofilaxia

Seria possível usar aves para reduzir a proporção de fêmeas que se alimentam no homem e/ou cão¹⁶? As aves são refratárias a *Leishmania* e, portanto, um repasto sanguíneo em ave, retardará em pelo menos 5 dias (duração do ciclo gonotrófico) a ocorrência de um repasto infectivo. A atuação é sobre o “a” da fórmula: $CV = ma^2 S^n / -\ln(S)$.

A partir desta análise fica fácil perceber que uma primeira ou segunda alimentação em ave fará com que a transmissão só ocorra a partir do terceiro repasto sanguíneo. Em uma população de fêmeas com S = 0,80 somente 10% sobreviverá para realizar o terceiro repasto sanguíneo no décimo dia após o repasto sanguíneo infectante. É interessante, considerar a zooprofilaxia em conjunto com a

aplicação do inseticida de efeito residual, ou seja, uma alimentação em ave para uma população que teve a sobrevivência diária reduzida para 40%, somente 0,01% da população sobreviverá ao final de 10 dias, ou seja, 1 fêmea em 10.000 sobreviverá tempo suficiente para transmitir a *L. infantum*. Sem dúvida, tal redução poderia ser suficiente para interromper a transmissão. No entanto, a manutenção das aves como fonte disponível para a alimentação das fêmeas pode produzir um efeito adverso em termos de controle, pois pode aumentar a população do vetor¹⁶.

Feromônio

Machos de *Lu. longipalpis* produzem feromônios atrativos para as fêmeas co-específicas e normalmente, os machos se agrupam sobre os hospedeiros (formando “lek”) para atraírem as fêmeas. A aplicação de inseticida em galinheiros interromperia este “lek” e dispersaria os machos para outros ecótopos (incluindo o canil e o intradomicílio) e, conseqüentemente, também as fêmeas¹⁷. O objetivo da aplicação de feromônio sintético, em galinheiros, é manter a atração contínua de machos e fêmeas, mesmo quando os machos são mortos pela aplicação de inseticida residual. Na nossa equação de capacidade vetorial, esta intervenção com feromônio e inseticida numa estratégia de tornar os galinheiros como locais de atração e morte dos flebotomíneos, teria efeito sobre “a” aumentando a alimentação em aves (zooprofilaxia) e “S” diminuição da taxa de sobrevivência diária das fêmeas. $CV = ma^2 S^n / -\ln(S)$

Coleira impregnada com inseticida

Além de atuar como repelente também mata as fêmeas que conseguem se alimentar no cão. Pode ter um impacto grande na diminuição de fêmeas infectadas. Na “CV” ela tem efeito no “a” para cão e “S”. $CV = ma^2 S^n / -\ln(S)$

Manejo ambiental

O objetivo do manejo é tornar o ambiente inadequado para a criação das formas imaturas. Diminuir a densidade de adultos “m” via diminuição da sobrevivência das formas imaturas seria o ideal para o controle. Com certeza, qualquer ação de controle direcionada para as formas

imaturas (modificação ambiental ou inseticidas – biológicos e químicos) dependerá de um melhor conhecimento sobre os criadouros. Desta vez a atuação de controle recai sobre o “**m**” da fórmula: $CV = ma^2 S^n / -\ln(S)$. Sem dúvida a diminuição de adultos poderá facilitar o controle dos vetores e, conseqüentemente, da transmissão da *Leishmania*, pois de início, existirá um número menor de flebotomíneos adultos para realizar o contato com a população de hospedeiros.

CONCLUSÃO

O presente estudo indica que a composição das espécies de *Lu. longipalpis* e de outras espécies de flebotomíneos presentes em regiões com casos de LV canina e/ou humana pode ser incorporada na determinação dos cenários de transmissão da LV no Estado de São Paulo. Estudos de capacidade vetorial das duas espécies do complexo *Lu. longipalpis* e das outras espécies predominantes em áreas de transmissão sem a presença do principal vetor, são os mais indicados para avaliar a real importância epidemiológica destas espécies. A caracterização dos diferentes cenários de transmissão da LV, possibilitará o desenvolvimento de metodologias de controle específicas para cada um deles, focalizando, preferencialmente, aqueles de maior risco e/ou vulneráveis à disseminação e manutenção da doença.

As estimativas dos parâmetros populacionais da “CV” permitem avaliar e esclarecer as relações entre as variáveis entomológicas e destas com a dinâmica de transmissão das leishmanioses. Inseticidas de efeito residual, coleiras impregnadas com inseticida, o uso de feromônios sintéticos e a zooprofilaxia têm um embasamento teórico claro para atuarem na redução de contatos vetor-hospedeiro. No entanto, o controle das formas imaturas, por si só, poderia ter um efeito significativo na redução da densidade populacional das formas adultas “**m**” e, conseqüentemente, melhoraria a eficácia de todas aquelas outras intervenções (que atuam em “**a**” ou “**S**”). $CV = ma^2 S^n / -\ln(S)$.

A questão a ser colocada então é: onde estariam as formas imaturas de flebotomíneos?

Neste sentido, faz-se necessário um urgente investimento em estudos que procurem identificar os criadouros preferenciais da *Lu. longipalpis* e de outros vetores.

REFERÊNCIAS

1. Domanovic D, Giesecke J. How to define an area where transmission of arthropod-borne disease is occurring? *Euro Surveill*. 2012; 17(20):pii=20171. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20171>
2. Hamilton JGC, Maingon RDC, Alexander B, Ward RD, Brazil RP. Analysis of the sex pheromone extract of individual male *Lutzomyia longipalpis* sandflies from six regions in Brazil. *Med Vet Entomol*. 2005;19(4):480-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2005.00594.x>
3. Ministério da Saúde (BR). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília (DF): Editora do Ministério da Saúde; 2006. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerale.pdf
4. Casanova C, Colla-Jacques FE, Hamilton JG, Brazil RP, Shaw JJ. Distribution of *Lutzomyia longipalpis* chemotype populations in São Paulo state, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3):e0003620. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003620>
5. Dvorak V, Shaw J, Volf P. Parasite Biology: The Vectors. Chapter 3. In: *The Leishmaniasis: Old Neglected Tropical Diseases*. Brusck F, Gradoni L editors; 2017. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>
6. Guimarães VC, Pruzinova K, Sadlova J, Volfova V, Myskova J, Brandão Filho SP et al. *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors*. 2016;9:159. <https://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1444-2>

7. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Dados estatísticos da Leishmaniose Visceral de 1999 a 2017. [acesso 2018 Abr 18]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/leishv_dados.html
8. Costa AIP, Casanova C, Rodas LAC, Galati EAB. Atualização da distribuição geográfica e primeiro encontro de *Lutzomyia longipalpis* em área urbana no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1997;31(6):632-3.
9. Galvis-Ovallos F, Casanova C, Pimentel Bergamaschi D, Galati EAB. A field study of the survival and dispersal pattern of *Lutzomyia longipalpis* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(4):e0006333. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006333>
10. Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LG, Ferreira GE, Souza NA, Araújo IB et al. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(1):e365. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000365>
11. Motoie G, Ferreira GEM, Cupolillo E, Canavez F, Pereira-Chioccola VL. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. *Infect Genet Evol*. 2013;18:48-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.031>
12. Correa-Antonialli SA, Torres TG, Paranhos-Filho AC, Tolezano JE. Spatial analysis of American visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul state, Central Brazil. *J Infect*. 2007; 54(5): 509-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2006.08.004>
13. Galvis-Ovallos F, da Silva MD, Bispo GB, de Oliveira AG, Neto JR, Malafronte RD et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. *Parasite*. 2017;24:2. <https://dx.doi.org/10.1051/parasite/2017002://>
14. Reisen WK. Estimation of vectorial capacity: introduction. *Bull Soc Vector Ecol*. 1989; 14:39-40
15. Casanova C, Natal D, Santos FAM. Survival, population size and gonotrophic cycle duration of *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) at an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in southeastern Brazil. *J Med Entomol*. 2009;46(1):42-50. <https://dx.doi.org/10.1603/033.046.0106>
16. Alexander B, de Carvalho RL, MacCallum H, Pereira MH. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(12):1480-5. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0812.010485>
17. Kelly DW, Dye C. Pheromones, kairomones and the aggregation dynamics of the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Anim Behav*. 1997;53(4):721-31. <https://dx.doi.org/10.1006/anbe.1996.0309>

Simpósio Internacional
“Leishmaniose Visceral: Desafios para o Controle no Contexto da Diversidade dos Cenários”



Effectiveness of control strategies against visceral leishmaniasis in Brazil: there is no silver bullet

Efetividade das estratégias de controle da leishmaniose visceral no Brasil: não existe uma bala de prata

RIALA6/1758

Guilherme Loureiro WERNECK*

*Correspondence to: Departamento de Epidemiologia, Instituto de Medicina Social, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, Bloco D, 7º andar, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 20550-013. Tel: 21 2334 0235
E-mail: gwerneck@iesc.ufrj.br

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

ABSTRACT

Control of zoonotic visceral leishmaniasis has been a deceiving effort for Brazilian public health officers and researchers. Since the implementation of the Brazilian program for visceral leishmaniasis control (PVLC) in the beginning of the 1960s, the disease has undergone a notable process of urbanization and geographical dissemination and the epidemiological situation is far from showing any substantial progress. The main strategies to reduce transmission proposed by the current PVLC still are vector control with residual insecticides and culling of seropositive dogs. However, few well- designed epidemiological studies give support for their wide-scale use, most showing limited effectiveness and only in specific settings. Novel promising approaches have been advocated such as dog vaccines, insecticide-impregnated dog collars, treatment of infected dogs, and topical insecticides, but there are still many doubts about their effectiveness. The few available effectiveness estimates are not high, suggesting that no intervention would alone solve the problem. There is no simple solution but considering the heterogeneous spatial pattern of disease distribution and the lack of high levels of effectiveness for individual interventions, there is probably no means to reduce transmission without using a combination of interventions delivered according to the different transmission scenarios, preferably targeting areas at highest risk.

Keywords. visceral leishmaniasis, strategies for control, effectiveness of interventions.

RESUMO

O controle da leishmaniose visceral zoonótica tem sido um esforço desalentador para gestores da saúde pública e pesquisadores brasileiros. Desde a implantação do programa brasileiro de controle da leishmaniose visceral (PCLV) no início da década de 1960, a doença passou por um notável processo de urbanização e disseminação geográfica, e a situação epidemiológica está longe de mostrar algum progresso substancial. As principais estratégias para reduzir a transmissão propostas pelo atual PCLV ainda são o controle de vetores com inseticidas residuais e a eliminação de cães soropositivos. No entanto, poucos estudos epidemiológicos bem desenhados dão suporte para seu uso em larga escala, a maioria mostrando efetividade limitada e apenas em contextos específicos. Novas abordagens promissoras têm sido preconizadas, como vacinas para cães, coleiras impregnadas com inseticidas, tratamento de cães infectados e inseticidas tópicos, mas ainda há muitas dúvidas sobre sua efetividade. As poucas estimativas de efetividade disponíveis não são altas, sugerindo que nenhuma intervenção sozinha resolveria o problema. Não existe uma solução simples, mas considerando o padrão espacial heterogêneo de distribuição da doença e a ausência de altos níveis de efetividade para intervenções individuais, provavelmente não há meios de reduzir a transmissão sem usar uma combinação de intervenções dirigidas de acordo com os diferentes cenários de transmissão, preferencialmente visando áreas de maior risco.

Palavras-chave. leishmaniose visceral, estratégias para controle, efetividade de intervenções.

INTRODUCTION

Control of zoonotic visceral leishmaniasis has been a deceiving effort for Brazilian public health officers and researchers. In conjunction with dengue, the control of VL has been considered one of the major fiascos in the control of transmissible diseases in Brazil¹. Since the implementation of the Brazilian program for visceral leishmaniasis control (PVLC) in the beginning of the 1960s, the disease has undergone a notable process of urbanization and geographical dissemination².

At the time of the initiation of the PVLC, in 1963, the main proposed control strategies were obligatory notification of human cases, opportune diagnostic and treatment of human cases, vector control with insecticides and culling of seropositive dogs. Indeed, these strategies seemed to be appropriate for confronting a disease that was deemed as mainly rural, occurring in specific environments such as hollows and foothills.

The Brazilian society underwent huge changes from this time onward, with an inexorable process of urbanization. Massive population movements from rural areas affected by severe droughts in the Northeastern region of the country were reported. Initially, migrants towards the periphery of State capitals and large cities of this region, and subsequently to the other regions of the country. This intense, fast and excluding process of urbanization, led to social segregation, with the peripheries of the large metropolitan areas characterized by the lack of urban services, environmental destruction and poor living conditions. This was the ideal setting for the introduction and maintenance of the zoonotic visceral leishmaniasis cycle, with the domestic dog as the main reservoir of the infection and the main vector, the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, adapting well to the new peridomestic environment³.

However, all the transformations in the Brazilian society and in the epidemiology of visceral leishmaniasis have not been conveyed by substantial modifications of the control strategies preconized by the original PVLC. The main supports of the current PVLC to reduce transmission still are vector control with residual insecticides and culling of seropositive dogs,

although the first is underused². However, the visceral leishmaniasis epidemiological situation is far from showing any substantial progress.

Few well-designed epidemiological studies have been conducted to evaluate the effectiveness of vector control and culling of infected dogs against visceral leishmaniasis⁴. Those that exist do not give support for wide-scale use of such interventions, showing limited effectiveness and in specific settings. Many other approaches have been advocated by distinct groups, some of them might be questioned based on potential conflicts of interest. Among such novel approaches are dog vaccines, insecticide-impregnated dog collars, treatment of infected dogs, and topical insecticides⁵. Although some of them might be promising, there are still many doubts about their level of effectiveness at the population level. As a matter of fact, the available effectiveness estimates are not that high, suggesting that no single intervention would alone solve the problem^{4,7}.

One of the key characteristics of the epidemiology of zoonotic VL is its distinct spatial and temporal distribution, with different scenarios of transmission not only at the national level, but also at the regional and local levels^{8,9}. In view of this, some researchers may be tempted to adopt an approach to the epidemiology of VL assuming that there is not a single pattern of transmission but a singular transmission dynamic in each endemic area. This approach is appealing but is indeed a naïve and extreme viewpoint that misses some structural features that rules VL transmission in any place, such as the ubiquitous presence of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis* in most transmission areas. Opposed to this viewpoint is another innocent and yet rigid idea, that states that local variations are just random variations and there is just one single pattern of VL transmission, conditionally to basic facts such as *Lutzomyia longipalpis* as the principal vector and domestic dogs as reservoirs. Unfortunately, this approach has no solid support considering the current knowledge about VL transmission. In the field of cross-cultural adaptation of questionnaires, such approaches would be called “relativist” and “absolutist”, respectively¹⁰. The problem with the “relativist” concept is the assumption of no

regularity, in which each endemic area is so distinct from the others that no one could ever learn anything from a local experience to apply to any other place. On the other hand, the “absolutist” approach close its eyes to the difference and would assume that a unique general approach would be sufficient to deal with VL transmission in all endemic areas. Therefore, we need a different approach, an “universalist” approach assuming that there are peculiarities in the transmission patterns at the local level, but they are rarely unique in a sense that one would be able to devise general transmission patterns to guide interventions.

Bearing in mind these aspects, one would conclude that there is no simple solution but considering the heterogeneous spatial pattern of disease distribution and the lack of high levels of effectiveness for individual interventions, there is probably no means to reduce VL transmission without using a combination of interventions which should be delivered according to the different transmission scenarios, preferably targeting areas at highest risk⁵.

REFERENCES

1. Barreto ML, Teixeira MG, Bastos FI, Ximenes RA, Barata RB, Rodrigues LC. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. *Lancet*. 2011;377(9780):1877-89. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60202-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60202-X)
2. Werneck GL. The control of visceral leishmaniasis in Brazil: end of a cycle? *Cad Saude Publica*. 2016;32(6):eD010616. <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311X00ED010616>
3. Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2008;24(12):2948-52. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200025>
4. Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin America: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(1):e584. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>
5. Werneck GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Rev Saude Publica*. 2014;48(5):851-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-8910.2014048005615>
6. Costa DN, Codeço CT, Silva MA, Werneck GL. Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8):e2355. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002355>
7. Werneck GL, Costa CH, de Carvalho FA, Pires e Cruz Mdo S, Maguire JH, Castro MC. Effectiveness of insecticide spraying and culling of dogs on the incidence of *Leishmania infantum* infection in humans: a cluster randomized trial in Teresina, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Oct 30;8(10):e3172. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003172>
8. Woolhouse ME, Dye C, Etard JF, Smith T, Charlwood JD, Garnett GP et al. Heterogeneities in the transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(1):338-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.338>
9. de Almeida AS, Medronho Rde A, Werneck GL. Identification of risk areas for visceral leishmaniasis in Teresina, Piaui State, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 May;84(5):681-7. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0325>
10. Herdman M, Fox-Rushby J, Badia X. A model of equivalence in the cultural adaptation of HRQoL instruments: the universalist approach. *Qual Life Res*. 1998;7(4):323-35.

Simpósio Internacional
“Leishmaniose Visceral: Desafios para o Controle no Contexto da Diversidade dos Cenários”



Geospatial and modeling tools for leishmaniasis studies: a review of publication between 2008-2018

Ferramentas geoespaciais e de modelagem para estudos de leishmaniose: uma revisão de publicação entre 2008-2018

[RIALA6/1759](#)

Elivelton da Silva FONSECA^{1,2*}, Moara de Santana MARTINS², John B MALONE², Raul Borges GUIMARÃES³

*Correspondence to: ¹Environmental Sciences and Regional Development, University of Western São Paulo - Unoeste, Rodovia Raposo Tavares, Km 572, Limoeiro, Presidente Prudente, SP, Brazil, zipcode: 19067-175. Tel: +55 18 3229 3264. E-mail: elivelton@unoeste.br

²School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge LA, USA

³Health and Geography Laboratory, Faculty of Science and Technology, São Paulo State University, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

ABSTRACT

Aspects of how geospatial technologies can be used on visceral leishmaniasis (VL) control programs are discussed. We reviewed a number of papers discussing the usage of those technologies, through a PubMed literature review. Additionally, we provided conceptual elements for a development of a hierarchical scale framework on VL for decision making in São Paulo State, using Geographical Information Systems. Supported by Geospatial Techniques, we developed a view of some instruments for helping communities to better manage their risk areas. We used a classification called Strengths of GIS and Spatial Analysis in Epidemiology (SGISSAE). This review identified 50 papers published in the PubMed. With respect to developing the theoretical perspective, this paper can help to identify points of deficiency in shortage in discussions and leishmaniasis control programs, which led us to recommend future to delimitation studies to at community-based level and to define local actions to identify and manage the disease. In the conceptual framework data at community-based level will allow us to understand more broadly the changing spatial distribution of the disease.

Keywords. geospatial technologies, visceral leishmaniasis, review, geography, scale, landscape thresholds.

RESUMO

Aspectos sobre como as tecnologias geoespaciais podem ser usadas nos programas de controle da leishmaniose visceral (LV) são discutidos. Nós confrontamos uma série de artigos discutindo o uso dessas tecnologias, através de uma revisão da literatura no PudMed. Adicionalmente, fornecemos elementos conceituais para o desenvolvimento de uma estrutura hierárquica sobre a escala na tomada de decisão sobre a leishmaniose no Estado de São Paulo, utilizando Sistemas de Informação Geográfica. Com o apoio das técnicas geoespaciais, desenvolvemos alguns instrumentos para ajudar as comunidades a gerenciar melhor suas áreas de risco. Usamos uma classificação chamada Forças do SIG e da análise espacial em Epidemiologia (SGISSAE). A revisão nos permitiu selecionar 50 artigos publicados no PubMed. Com relação ao desenvolvimento da perspectiva teórica, este artigo pode ajudar a identificar pontos de deficiência em discussões e programas de controle da leishmaniose, o que nos levou a recomendar futuros estudos de delimitação a nível comunitário e a definir ações locais para identificar e gerenciar a doença. No quadro conceptual, os dados ao nível da comunidade permitirão compreender mais amplamente a evolução da distribuição espacial da doença.

Palavras-chave. tecnologias geoespaciais, leishmaniose visceral, revisão, geografia, escala, domínios de escala, limiares de paisagem.

INTRODUCTION

Visceral Leishmaniasis (VL) was considered endemic in 75 countries in 2015, with 23,804 new cases reported worldwide. Over 90% of cases of VL occur in three eco-epidemiological hotspots: the East Africa; the Indian Subcontinent (Bangladesh, India and Nepal) and Brazil¹. In Brazil, the most important eco-epidemiological hotspot is the region of MATOPIBA² composed of the states of Maranhão, Tocantins, Piauí and Bahia. Although the state of São Paulo is not located in the highly endemic area, authorities have reported 2,856 cases of VL in humans from 1999 to 2017. The municipalities of Araçatuba, Bauru and Dracena are well-known endemic foci of VL³.

Multiple factors can influence the dynamics of VL transmission, such as demographic, medical-social, biologic and environmental information. Environmental factors in particular, can affect the generation and permanence of leishmaniasis foci either promoting or blocking the life cycle of the sandfly vector⁴. VL is a focal disease and its epidemiology differs according to the nosogeographic regime, which means that certain communities are more vulnerable.

Control programs for many diseases have benefitted from recent advances in geospatial technologies, due to the improvements in identifying and measuring environmental factors and the potential to target interventions in space and time, globally, regionally and locally⁵. Geospatial technology have become much more than a new tool in public health applications. It has provided a great contribution to understanding how environmental factors affect human/animal health and well-being.

Nowadays, such technologies have increasingly been applied into public health research with the development of computer applications and the availability of geocoded information on disease occurrence. Still, little is known about the relationship between VL and the landscape scale process function. The role of the ecological niche and man-made changes to the landscape are essential for the support of the transmission cycle and disease spread⁶. Spatial analysis can help identify priority areas for effective surveillance and control. Predictive modeling of disease epidemiology based on its explanatory and causative variables may identify the origin and direction of expansion to predict new foci areas. This review aims

to provide conceptual elements for a hierarchical scale framework on VL risk for decision making in São Paulo State.

Geospatial technologies and disease programs

When dealing with environmental sensitive diseases, many authors have pointed out the usefulness of geospatial technologies, which have become increasingly popular on VL studies⁶. A key question for policy makers is to determine which method to use and what spatial question to ask when applying this resource. Geographic Information Systems (GIS) are not to be considered a way of solving problems, as it has advantages and disadvantages, but as an alternative to better understand scenarios with its associated factors in the heterogeneity of the landscape, considering scale dependency or scale sensitivity.

The role of geography is to unravel and interpret data from different scales. In other words, systematically assess the effect of scale in the models and analysis. It also aims to identify the spatial units that best capture the essential characteristics of the geographical phenomenon under investigation. Therefore, generalizations may lead to an inadequate interpretation of a phenomena. Studies that have analyzed different scales have shown that it is possible to identify idiosyncrasies present in the community-based context that can be invisible on a smaller scale, such as countries, for instance; and assign local phenomena to regional levels and subdivisions of the locale itself.

Another problem that is often discussed is the incorporation of the time variable into the models. It has been observed that the current techniques of spatial analysis have not been able to adequately capture the changes that epidemiological studies have demonstrated, suggesting that better methods for identification of risk factors are needed.

Multiscale Relationships Between VL and the Environment: A Review

This review identifies recent research reports that have negative and positive interfaces between geospatial methods and occurrence of VL. It summarizes the main international standards that the themes intersect, in order to understand the role of the use of these data, ranging from simple location of cases to complex models based on spatial statistics.

The database was constructed via access to the PubMed website (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) including papers that were published

between 2008 and 2018, by use of the two following descriptors: spatial analysis, visceral leishmaniasis.

The search results returned a total of 76 studies of VL using spatial analysis techniques. However, 26 of these studies were shown to be irrelevant after title and abstract screening (Figure 1).

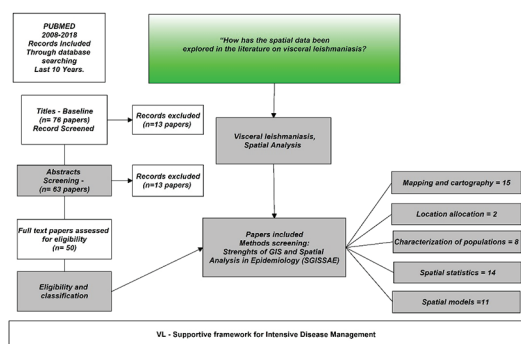


Figure 1. Selection criteria for a systematic review of Geospatial analysis on Visceral Leishmaniasis studies, 2008-2018

This review analyzed a selection of 50 published papers in the databases search (Table).

We used a classification called Strengths of GIS and Spatial Analysis in Epidemiology (SGISSAE)⁷, to identify the techniques applied in the articles analyzed, classifying the papers as follows:

- a) *Mapping and cartography* - the first step in the exploratory analysis of spatial data based on maps of morbidity and mortality;
- b) *Location allocation* - the study of optimal locations for health facilities and services;
- c) *Characterization of populations* - corresponding to identification of risk groups, by indicators like age and weight, for example, but including location of cases, such as in a GIS;
- d) *Spatial statistics* - the analysis of patterns in series of data and group according to similarities, probable combinations between input data (diseases, for example) and explanatory variables and;
- e) *Spatial models* - including techniques of Bayesian smoothing, surface interpolation and Monte Carlo.

RESULTS

Mapping and Cartography

Thirty percent (15/50) of the search results listed in this class are taking advantage of widely utilized of elements of cartography, such as proportional circles, colors ramps, point patterns, with the main purpose of location. It allows the reader a quick identification of the elements that make up the space in which the infection is located. Most are thematic maps, with GPS points of the houses, some are cartographic sketches. Most of the studies in this category were described areas in Brazil, India and Middle East. From the studies performed in Brazil, the highest number of studies using geospatial technologies was found in the states of Minas Gerais, São Paulo and Piauí.

Location allocation

There were a very few number of papers, two total (4%), that used elements of location allocation. It is not clear in the literature that this kind of analysis should be useful as a supportive tool for VL control, due to an also unclear origin of infection or foci. The classic studies of distribution of patients and health facilities identifies the distance of some facilities for the patients to have access, but this may not correspond to the place of infection, but the place used for healthcare. With support on these models of allocation, is possible to identify suitable locations, searching for areas that match the analyzed criteria. Other uses for this category is the possibility of point tracking data, through the analysis of triggered location. The most important tool of this group is to determine the least costly way to go from one location to another. In our case, from a household to a health facility or center for control of zoonosis. This analysis determine the shortest weighted distance between two cells in the raster format⁸.

Characterization of population

In the literature on leishmaniasis, this kind of analysis addresses elements

that enable, in the range of communities, understanding of vulnerabilities according to the characteristics of the community as a risk factor. In the specific case of VL, we can include either dog or human population as targets, with different approaches. Eight papers (16%) were reviewed in this group, and variables such as household size and yard, and breed of dogs and number of dogs in the household were often seeing.

Spatial Statistics

Fourteen papers (28%) used spatial statistics, the fastest increasing in number of publications on VL. Examples of analysis seeing in this group are: cluster and outliers, coincidence or overlapping of points of occurrence in a time series, autocorrelation and exploratory regression⁸.

Spatial Models

In the literature on VL, spatial models address elements that allow, in a range of communities, and understanding of vulnerabilities created by risk factors for the disease. There is a clear relationship between spatial models and cartography. This approach was found in 11 (24%) peer-reviewed papers. Some papers showed association between vector and climatic variables, through the Bayesian, linear or logistic regression, generalized additive mixed models (GAMM); monthly or seasonal trend series; and annual incidence rate. Other papers showed geographically weighted regression, focusing on distance between points or polygons, defined as the Euclidean distance. Examples of other analysis used in the 12 papers reviewed are: maximum likelihood classification, classification Bhattacharya, classification ISOSEG, ecological niche model, spatial overlays and concentration maps, interpolating surfaces, remote sensing indexes.

Table. Examples of published studies using Spatial analysis, showing type of research technique and objective

Research Technique	Objective	Citation
Bayesian Models	To correct underreporting of cases in small areas. Correction from the neighborhood areas.	(De Almeida. 2011; Martins-Melo. 2014; Rajabi. 2014; Silva. 2017)
Buffer	To build simulations around a circular area surrounding the vector collection places.	(Khanal. 2010; Santini. 2015; Berrozpe. 2017)
Climate variables	Visualize spatial distribution of rainfall, land surface temperature. To infer driven factors for infection rates.	(De Almeida. 2011; Rajabi. 2014; Yousuf. 2017)
Clusters	To detect unexpected events distributed in time and space.	(Santini. 2015)
Choropleth map	To represent incidences, mortality rates and to plot the autocorrelation.	(Cardim. 2013; Fu. 2013; Naufal-Spir, 2015)
Kernel density.	To explore areas of excessive risk for the disease.	(Khanal. 2010; De Almeida. 2011; Machado da Silva. 2011; Menezes. 2015; Ursine. 2016)
Moran index	To test whether geographically connected areas display greater similarity in terms of the target indicator than would be expected considering a random pattern. The	(Roma Sánchez De Toledo I; Bhunia. 2010; De Almeida. 2011; Barbosa. 2014; Martins-Melo. 2014; Berrozpe. 2017)
NDVI, Land Surface temperature, Land Use Land cover	Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) ranges, searching for suitable environmental conditions for reproductive success of the vector	(Aratjo. 2013; D.M. 2014; Yousuf. 2017; Santini. 2018)
Principal components analysis	To examine the correlation between the spatial distribution of sand-fly species and socioeconomic and environmental variables.	(Kahime. 2015)
Kriging	To create an estimated surface of the temperature and rainfall.	(Cardim. 2013)

Different models fit different problems – proposal of a community-based geospatial model for Visceral Leishmaniasis

It is an accepted aphorism that “all models are wrong but some models are useful”, because they represent assumptions of the real world that we know are partially false⁹. Models, as a generic term, are abstract solutions with computational support aimed at solving complex problems.

According to disease program specialists, the question that often arise is: “Do we pay too much attention to irrelevant precision of measurement in searches that don’t require highly distilled evidence of causality?”¹⁰. A modeling capability involves a separation of a set of meaningful characteristics of the environment, in the form of variables, aimed at solving a specific problem.

A mathematical model that quantitatively describes VL transmission at the community-scale needs to include the following components:

1) Serum Conversion of Dogs - Combination of diagnostic techniques, efficiency, efficacy, pairwise and specificity of different techniques. This component will impact directly on the time necessary for design of serum surveys, due to the infection rates/ related to the time of serum conversion¹¹.

2) Clinical cases in dogs - Analysis of the symptoms of dog, with serum surveys, promoting a critical approach of the laboratory-based surveillance.

3) Human Archival data - Infected person-years prevented places of residence and hot spot analysis. These components will show the background data necessary for models to define areas to start the serological survey in human or dogs. In Brazil, the individual records of epidemiological investigation for VL have a very detailed databases¹².

4) Sandfly - Analysis of population dynamics, number and seasonal collections; the infection rate and blood meal.

5) Community features - Evaluation of Knowledge-Attitude and Practice, review protocols of the control programs for human disease and discussion with policy makers.

In this paper, we presented a conceptual and analytical framework for models use at the community-based level. The basic idea is to provide instruments for detection at the microfoci level with all environmental variables related to VL propagation and transmission.

Figure 2 shows a framework of variables for a collaborative GIS analysis of VL programs at community scale studies. The framework for VL at community level was produced to identify uses of high resolution satellites (2 m² resolution).

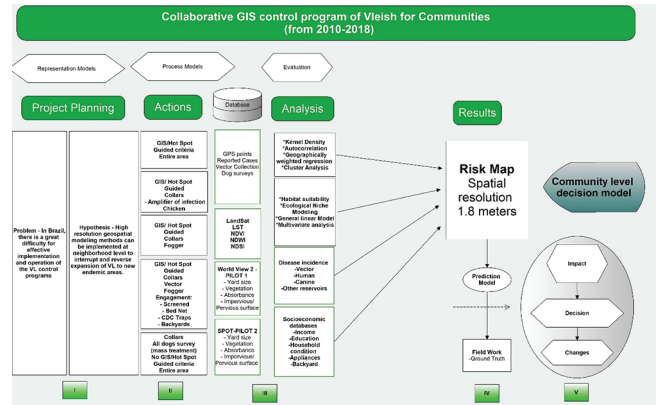


Figure 2. Framework for studies of Visceral Leishmaniasis across community scales. The framework show a project planning composed by the research problem and the hypothesis (I). The second section is composed by the actions, thinking on how technological innovation and new approaches can be incorporated to the current actions of the control programs of VL (II). The sections of the Databases and Analysis allow to use a very complex and diverse group of techniques in Geospatial Analysis to gather the landscape scale process function; additionally the management of databases from different sources and its interoperability (III). After the analysis the framework propose is to delimitate risk maps in high resolution for the disease spread and processes on the environment. The results will triggers different answers for research and assessment for decision makers to reduce the disease vulnerability (IV). As the last section of the framework the evaluation is part of the after elimination/block plan for the disease (V). Prediction could be included in the final model, such as climate suitability and disease spread. Also, the evaluation of the model itself, in which the researchers can include new variables or redesign strategies to access communities.

Final Comments

This paper aimed at identifying new approaches to VL control programs, led us to recommend limiting studies to the community level, an approach that has not yet been used for VL, although this has been shown to be promising in studies of schistosomiasis¹³. There is a number of reasons for the absence thus far of a community approach in studies on VL. The lack of financial support for innovative programs; as well as the lack of well-trained public health personnel and information on time series and post elimination strategies for VL are just a few of them.

Visceral leishmaniasis is a complex disease of multiple risk factors, and Geographic Information Systems offer new ways to approach control of the disease. In the conceptual framework, data from the state of São Paulo and study at community-based level will allow us to better understand more broadly the spatial distribution of the disease. In the long term, it will be feasible to incorporate protocols and standards based on mapping and remote sensing as facilitators for scanning foci and environments, providing new tools for surveillance and control programs dealing with VL.

Actions at community-level are important for redesigning the strategies and the generation of normative protocols of spatial analysis for control programs of VL. Near-real time analysis can lead to improved management, community services and research. In other words, contextual solutions for identifying “hotspots” of infection. When public health workers utilize landscape intervention, based on an accurate comprehension of the transmission cycle of VL it may be possible to develop plans that may lead to VL elimination.

This literature review highlights some emerging themes in modeling for public health. Globally, VL has been spreading and changing patterns because of environmental change. In order to promote mitigating actions based on changing climate and health, relevant data on land surface temperature, rain seasonality and dry season that affect propagation and transmission of the vector population, and consequently disease spread, are needed.

The massive increasing production of potentially useful databases from earth observing satellites allow research groups to have multidimensional information, but with all the problems coming from interoperability of data from different sources. The future of epidemiology may be called e-epidemiology. By the use of geospatial technologies, we can also include the term neo-cartography. A new field of cartography related to production and access to the knowledge and print-outs of digital media from internet browsers, by tablets, mobile phones and other devices.

ACKNOWLEDGMENTS

Research funding: Dissemination of geoepidemiological knowledge for the improvement

of public policies for surveillance and control of leishmaniasis in the Pontal do Paranapanema, São Paulo state, Brazil. Financial Support. Number: 2014/12494-0, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

REFERENCES

1. World Health Organization. Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. *Wkly Epidemiol Res*. 2017;92(38):557–65. Available in: <http://www.who.int/wer>
2. World Wide Fund for Nature (WWF). An Inside View of MATOPIBA. Switzerland: WWF Agric Progr; 2017. Available in: https://d3nehc6yl9qzo4.cloudfront.net/downloads/livreto_matopiba_engl_final.pdf
3. D’Andrea LAZ, da Silva Fonseca E, Prestes-Carneiro LE, Guimarães RB, Yamashita RC, Soares CN et al. The shadows of a ghost: a survey of canine leishmaniasis in Presidente Prudente and its spatial dispersion in the western region of São Paulo state, an emerging focus of visceral leishmaniasis in Brazil. *BMC Vet Res*. 2015;11:273. <https://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0583-6>
4. Menezes JA, De Castro Ferreira E, Andrade-Filho JD, De Sousa AM, Morais MHG, Rocha MAS et al. An Integrated Approach Using Spatial Analysis to Study the Risk Factors for Leishmaniasis in Area of Recent Transmission. *Biomed Res Int*. 2015;2015:621854. <https://dx.doi.org/10.1155/2015/621854>
5. Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ et al. Global distribution maps of the Leishmaniasis. *Elife*. 2014;3. <https://dx.doi.org/10.7554/eLife.02851>
6. Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. The Urban Spread of Visceral Leishmaniasis: Clues from Spatial Analysis. *Epidemiology*. 2011;13(3):364–7. Available in: <http://www.jstor.org/stable/3703410>
7. Jacquez GM. Spatial analysis in epidemiology: Nascent science or a failure of GIS? *J Geograph Syst*. 2000;2:91–7. Available in: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.468.1483&rep=rep1&type=pdf>

8. Environmental Systems Research Institute (ESRI). ArcMap. ArcGIS 10.2. Redlands, CA; 2013.
9. Box GEP. Science and statistics. *J Am Stat Assoc*. 1976;71(356):791-9. <https://dx.doi.org/10.2307/2286841>
10. Buchan I, Seminar HS. Aim & objectives of seminar; 2003.
11. da Silva AVM, de Paula AA, de Pita Pereira D, Brazil RP, Carreira JCA. Canine Leishmaniasis in Brazil: serological follow-Up of a dog population in an endemic area of american visceral leishmaniasis. *J Parasitol Res*. 2009;2009:680790. <https://dx.doi.org/10.1155/2009/680790>
12. Madalosso G, Fortaleza CM, Ribeiro AF, Cruz LL, Nogueira PA, Lindoso JAL. American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the state of São Paulo, Brazil. *J Trop Med*. 2012;2012:281572. <https://dx.doi.org/10.1155/2012/281572>
13. Koffi AJD, Doumbia M, Fokou G, Keita M, Koné B, Abé NN. Community knowledge, attitudes and practices related to schistosomiasis and associated healthcare-seeking behaviours in northern Côte d'Ivoire and southern Mauritania. *Infect Dis Poverty*. 2018;7(1):70. <https://dx.doi.org/10.1186/s40249-018-0453-0>



Geohealth: biology based mapping of vector borne disease in the Americas using NASA satellite data

Geosaúde: mapeamento da biologia das doenças vetoriais nas Américas utilizando dados de satélites da NASA

RIALA6/1760

John B MALONE^{1*}, PRIXIA del Mar NIETO¹, Jeffrey C LUVALL², Jennifer C McCARROLL¹,
Rebecca C CHRISTOFERRSON¹, Seung-Jong PARK³, Moara S MARTINS¹, Elivelton S
FONSECA⁴, Maria E BAVIA⁵, Ryan H AVERY¹, Cassan N PULASKI¹, Raul B GUIMARAES⁶

*Correspondence to: Louisiana State University, School of Veterinary Medicine, Skip Bertman Dr, Baton Rouge, Louisiana, 70803, United States. Tel: +1 225 578 9692, Fax: +1 225 578 9710.
Email: vtmalon@lsu.edu

¹Pathobiological Sciences, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge LA, USA

²NASA Marshall Space Flight Center, Huntsville, AL, USA, ³Computer Sciences and Engineering, Louisiana State University, Baton Rouge LA, USA, ⁴Health and Geography Laboratory, Faculty of Science and Technology, Universidade Estadual Paulista, Rua Roberto Simonsen, 305, Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

⁵LAMDOSIG Laboratory, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil

⁶Environmental Sciences and Regional Development, University of Western São Paulo - Unoeste, SP, Brazil

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

ABSTRACT

Implementation of a geospatial surveillance and response system data resource for vector borne disease in the Americas (GeoHealth) will be tested using NASA satellite data, geographic information systems and ecological niche modeling to characterize the environmental suitability and potential for spread of endemic and epizootic vector borne diseases. The initial focus is on developing prototype geospatial models for visceral leishmaniasis, an expanding endemic disease in Latin America, and geospatial models for dengue and other *Aedes aegypti* borne arboviruses (zika, chikungunya), emerging arboviruses with potential for epizootic spread from Latin America and the Caribbean and establishment in North America. Geospatial surveillance and response system open resource data bases and models will be made available, with training courses, to other investigators interested in mapping and modeling other vector borne diseases in the western hemisphere and contributing brokered data to an expanding GeoHealth data resource as part of the NASA AmeriGEOSS initiative.

Keywords. geospatial models, geohealth, AmeriGEOSS, visceral leishmaniasis, Aedes borne arboviruses, dengue, zika, chikungunya.

RESUMO

A implementação de uma fonte de dados de vigilância e um sistema de resposta geoespacial para doenças transmitidas por vetores nas Américas (GeoHealth) será testada utilizando dados provenientes de satélites da NASA, sistemas de informações geográficas e modelagem do nicho ecológico, para caracterizar a susceptibilidade ambiental e o potencial de dispersão de doenças endêmicas e epizooticas transmitidas por vetores. O foco inicial será o desenvolvimento de protótipos de modelos geoespaciais para a leishmaniose visceral, uma doença endêmica e em expansão na América Latina, e modelos geoespaciais para dengue e outros transmitidos pelo *Aedes aegypti* (zika, chikungunya), arbovírus emergentes com potencial para disseminação epizootica pela América Latina e Caribe e estabelecimento na América do Norte. Sistemas de vigilância e resposta geoespacial e modelos de recursos em bases de dados abertas serão disponibilizados, com cursos de treinamento, para outros pesquisadores interessados em mapear e modelar outras doenças transmitidas por vetores no hemisfério ocidental e contribuir intermediando dados para uma fonte de dados GeoHealth em expansão, como parte da Iniciativa AmeriGEOSS, da NASA.

Palavras-chave. modelos geoespaciais, geosaúde, AmeriGEOSS, leishmaniose visceral, doenças transmitidas pelo Aedes, zika, chikungunya.

INTRODUCTION

The growing availability of digital data for geospatial studies made possible by remote sensing and resources from influential national space agencies, such as the National Aeronautics Space Administration (NASA) (<http://www.nasa.gov/>) has led to the establishment of a number of multi-disciplinary scientific teams interested in geospatial health applications. This has resulted in a corresponding expanded number of publications in the geospatial health arena aimed at advancement of new knowledge on epidemiology, tele-epidemiology and geospatial modeling approaches to control of disease^{1,3}. Several new journals have emerged, e.g. *Geospatial Health* (<http://www.geospatialhealth.unina.it>), the *International Journal of Health Geographics* (<http://www.ij-healthgeographics.com>), *Spatial and Spatio-Temporal Epidemiology* (<http://www.journals.elsevier.com/spatial-and-spatiotemporal-epidemiology>). The net result is that geospatial mapping and multidisciplinary modeling are becoming mainstream science in the health community at large. Amid this growth in interest, however, there is a clear need to increase new lines of collaboration and communication between research groups that are developing health applications based on the geospatial sciences. This is especially true of groups whose members come from different orientations and training and whose work is on diverse health issues. In light of this convergence of interests, it is of great potential value to cross-fertilize and reinforce linkages of diverse interest groups on health applications of the geospatial sciences. An idea proposed during a recent symposium is to join the Group on Earth Observations (GEO) mission to build the Global Earth Observation System of Systems (GEOSS) (<https://www.earthobservations.org/geoss.php>), under the health societal benefit area^{4,5} in which health scientists working on seemingly very different health issues could work in a collaboration to further public health using a standardized, interoperable, open source global resource data portal within the concept of a 'GeoHealth' network (see box).

BOX:

MANDATE OF THE GROUP ON EARTH OBSERVATIONS HEALTH NETWORK

(GeoHealth) The proposed Group on Earth Observations Health Network (GeoHealth) will collaborate on activities relating to the GEO societal benefit area on Public Health and the Global Earth Observation System of Systems (GEOSS). GeoHealth will enable collaboration of governmental, inter-governmental and non-governmental organizations to organize and improve mapping and predictive modelling of the distribution of infectious, vector-borne and non contagious diseases globally and make this data, information and forecasts more readily accessible to policy and decision makers, managers, experts and other users. The GeoHealth network aims to progress from a Community of Practice to an Initiative and then a Flagship in the GEO Work Plan. It is a voluntary partnership that is guided by a steering committee comprising key stakeholders, initially the ISPRS VIII/2 Working Group, and the International Society of Geospatial Health-GnosisGIS (www.gnosisgis.org) and would actively recruit other organizations to join. GeoHealth draws on GEO's work on data-sharing principles to promote full and open exchange of data, and on the GEOSS common infrastructure to enable interoperability through adoption of consistent standards. To assist both holders and users of health information to engage with GeoHealth, an active website will contain links to information resources, activities, GeoHealth documents, meetings and other resources relevant to the GeoHealth mandate. We propose that GnosisGIS, ISPRS VIII/2, the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, and other groups interested in Geospatial Health will join and fully commit to the global vision of GEO.

Is it possible to develop a dynamical 3-dimensional (3-D) or even 4-D (adding the temporal dimension) models of disease, such as a bi-weekly global leishmaniasis or dengue report? We propose we are on the cusp of succeeding in this endeavor, facilitated by global earth observation satellite systems, big data, climatology advances, and new sensors such as the global precipitation model (GPM), soil moisture ocean salinity (SMOS), Landsat 8 data that continues

a record of 40 years of Landsat legacy data, and the new ESA Sentinel 1, 2 and 3 programs. Perhaps most crucially for community risk assessment is the sub-meter resolution environmental data now available from Worldview-2 and Worldview-3⁶. Add to this the elective value-added potential of low-altitude sensors on drone airborne vehicles as a source of very high resolution data collection within a user-set agenda⁷.

The public health community is behind on use of earlier EO systems, and will be even further behind with the emergence of currently planned systems. Future NASA satellite missions such as HypsIRI (<http://hyspiri.jpl.nasa.gov/>) will provide further enhanced capability to map vector-borne and other environmentally sensitive diseases based on global hyperspectral visible and multispectral thermal data products (60 m², 5 day thermal and 19-day, 30 m² hyperspectral repeat intervals) that will enable structural and functional classification of ecosystems and the measurement of key environmental parameters (temperature, soil moisture). The planned ECOSTRESS instrument (May 2018) on the International Space Station (ISS) (<http://www.nasa.gov/jpl/nasas-ecostress>) will monitor plant health using surface temperature measurements (and derived evapotranspiration values) with minimum 3-5 day diurnal pair coverage, 38 x 57m spatial resolution at varying times during the day due to the ISS processing orbit. Timely adoption of these data resources in health surveillance and response systems will require close cooperation of NASA earth system scientists and public health scientists. In addition, very high resolution satellite data from Digital Globe managed satellites (GeoEye-1, Worldview1-4, Quickbird-2) are available for both historical and current time periods. These advances finally allow seamless mapping and modeling of diseases, not only at continental scales (1 km²) and local community-agricultural field scales (30 m²), but for the first time also at the habitat-household scale (<1 m²) within individual communities.

What is now needed is an open source, interoperable platform that is freely accessible by the global health community to link public health workers with the most current potential earth observation resources from the geospatial sciences community. We propose that geospatial data resources from NASA, INPE, JAXA, ESA, USGS, and the Centers for Disease

Control in the USA, the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and other national agencies can be organized through GEOSS to make this possible. We anticipate that other organizations with an interest in geospatial health issues will join us in this commitment. The statement (box) describing the potential aims, organization and structure of GeoHealth is offered as a framework for initial effort as a vehicle for translational research, dissemination and implementation in national public health systems in collaboration with GEO.

MATERIAL AND METHODS

A geospatial surveillance and response system resource for vector borne disease in the Americas (GeoHealth) will be implemented using NASA satellite data, geographic information systems and ecological niche modeling to characterize the environmental and socioeconomic suitability and the potential for spread of selected endemic and epizootic vector borne diseases in the Americas. The initial focus will be on developing prototype geospatial models on visceral leishmaniasis, an expanding endemic disease in Latin America, and models for dengue and other emerging *Aedes aegypti* borne viruses (dengue, zika, chikungunya) that have potential for epizootic spread from Latin America and the Caribbean and establishment in North America. Use of the geospatial surveillance and response system open resource data bases and models will be made available, with training courses, to other investigators interested in mapping and modeling other vector borne diseases, leading to a continually growing archive of brokered data.

Specific Objectives

1. Construct a geospatial health resource data portal (GeoHealth) compatible with the interoperable, open access standards of the Global Earth Observation System of Systems (GEOSS);

2. Map and model the distribution and spatial variation in epidemiological risk of visceral leishmaniasis in Brazil using GeoHealth data portal resource data;

3. Develop geospatial models for mapping arbovirus transmission and emergence prediction in the Americas using GeoHealth data portal resource data;

4. Provide a platform for processing massive big data resources;

5. Implement dissemination and training programs to promote geospatial mapping and modeling for vector borne diseases as envisioned by GEOSS.

Objective 1 - Construction of the GeoHealth geospatial resource data portal

Implementation of GeoHealth will require initial effort to compile, design, and construct interoperable data structures anticipated to be useful for vector borne disease surveillance and response systems based on the project investigators' experience, literature reports and availability.

We propose GeoHealth common resource data for potential users will reduce redundancy of effort in developing surveillance and response systems and evolution of a GeoHealth data portal to incorporate new project resources and results as new data systems (eg. NASA HypsIRI, ECOSTRESS) become globally available. All data will be resampled and projected in geographic formats compatible with other GeoHealth project data parameters and available in ASCII form needed for use in Maxent⁸ or Bayesian (OpenBUGS) mapping and modeling software. Data portal construction methods will be similar to that reported for a prior PAHO funded project on mapping and modeling 6 neglected tropical diseases in Latin America and the Caribbean region⁹.

The architecture of the GeoHealth data portal will be designed in collaboration with LSU Electrical Engineering and Computer Science, to ensure interoperability and use of data formats needed for big data analysis.

The overall aim is to utilize available global data from advanced climate data monitoring systems, satellite remote sensing data, and data on natural or man-made environmental change (eg land use, deforestation, climate change) to evaluate their influences on disease occurrence and potential mitigation. Currently available global data are underutilized by medical researchers. This may be due to lack of ability to bridge barriers to awareness, prioritization, or training deficits needed for interdisciplinary interaction of medical scientists with environmental scientists. Development of GeoHealth

will facilitate and encourage research to utilize and implement currently available geospatial analysis tools and new global data systems in surveillance and response systems for vector-borne diseases. The GeoHealth portal will be constructed and made available for mapping and modeling vector borne diseases at three scales:

Regional Scale

Climate Data

Worldclim - Precipitation, Temperature maximum/minimum, Potential Evapotranspiration; monthly Bioclim (1km²) = 50 year long term normal climate data)

NCEP/NCAR CDAS Re Analysis data (50km²); daily Global Precipitation Measurement Mission (GPM) – 3 hour/daily

Earth Observing Satellite data

MODIS 8day-16day NDVI, LST, other products (1km²)
SRTM Shuttle Radar Topography Mission
SMOS ESA Soil Moisture Ocean Salinity (50km²); resample to 1km using MODIS

Feature data

DIVA Political boundaries, World Wildlife Fund Ecosystems
Hydrology – Rivers, streams, lakes; Watersheds
Landsat – global population data; Census tract population data

Community Scale

Landsat 8; Landsat Legacy data; ASTER (including Topography)
ESA Harmonized Landsat/Sentinel-2 (HLS) v. 1.2
Land Use, Soil Type

Habitat-Household Scale

Worldview 2, Worldview 3

To economize on the size of data storage requirements, data available for multiple years (eg. USGS Landsat Legacy data) will be acquired and archived in the data portal archive at only 5-year intervals (2005, 2010 and 2015). Products from more recently launched satellite data systems (eg., ESA SMOS

data) will be made available for only years available. A step-by-step tutorial on how investigators can download additional data in the same format from the entire observation period as needed for specific applications. Thus investigators will be able to examine data to evaluate usefulness using limited example data, with instructions on how to obtain similar additional complete data on specific time frames and scales as needed from open-source archives linked to specified internet sites (e.g., EROS Data Center).

Data from the GeoHealth common resource data portal will be used to demonstrate the feasibility of improved disease risk assessment models in prototype surveillance and response system models as compared to previously reported models for vector-borne diseases that have a fundamentally different epidemiology: 1) visceral leishmaniasis, an endemic, expanding sand fly transmitted zoonotic childhood disease in Brazil, and 2) Dengue and other *Aedes aegypti* transmitted arboviruses (chikungunya, zika) at reported epidemic outbreak sites in Latin America and the Caribbean region. These models will be developed as described for VL under Objective 2. Models for arboviruses are only briefly described under Objective

3. Health Data used will be existing data obtained from previous and current projects of Brazilian collaborators, including: Case report data; Vector-CDC Trap collection data; Surveys/Questionnaire data.

Laboratory and field data will be compiled to relate to thermal-moisture regimes that define the life cycle drivers and environmental preferences and limits of tolerance of the parasite-vector system in a given environment. Candidate GeoHealth environmental data sets will be selected for mapping and modeling analysis from the GeoHealth data portal that directly measure (eg., mean NCEP/NCAR CDAS Re-Analysis climate data) or indirectly measure (e.g., MODIS satellite LST and NDVI) thermal-hydrological, landform (e.g., topography) or landuse features of the environment that determine the distribution and abundance, temporal development rate and seasonality of pathogen-vector systems.

Objective 2 - Map and model the distribution and spatial variation in risk of visceral leishmaniasis (VL) in Brazil using GeoHealth data portal parameters

We hypothesize it is possible to develop geospatial development rate models that can simulate and display 'snapshot' temporal progression (eg. each

8-days) of vector-parasite life cycles and geospatial risk based on comprehensive daily climate re-analysis data, Global Precipitation Measurement Mission (GPM) data, SMOS soil moisture, and MODIS land surface temperature (LST) and vegetation indices (NDVI, NDMI, NDWI) in the context of topography, landuse and population patterns in Brazil. A major gap in past has been environmental moisture data. This can now be addressed using newly available sensor systems data.

Disease and vector occurrence data available at national, statewide and local community scale from earlier leishmaniasis studies in Brazil¹⁰ will serve as input for disease and vector data for re-analysis using comprehensive high temporal resolution GeoHealth climate and satellite-derived environmental data at regional scale (1 km² spatial resolution), statewide scale (15-30-60 m² spatial resolution) and individual community scales (sub-meter spatial resolution). High frequency climate and satellite sensor data can be made available in near real time by access to GeoHealth data archives or Internet linkages to active program data.

Selection of relevant environmental parameters to include in geospatial models will be based on results of regression analysis of disease and vector occurrence data, with variance inflation factor analysis to eliminate autocorrelation bias, according to the method of Mischler et al⁹ (Figure 1a, b, c).

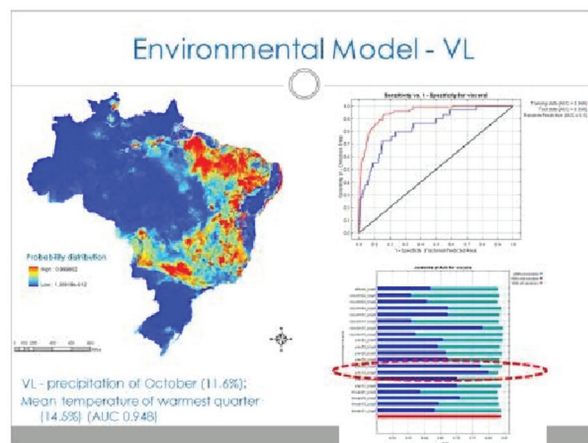


Figure 1a. Maxent risk surface and jackknife statistics output for VL in Brazil.

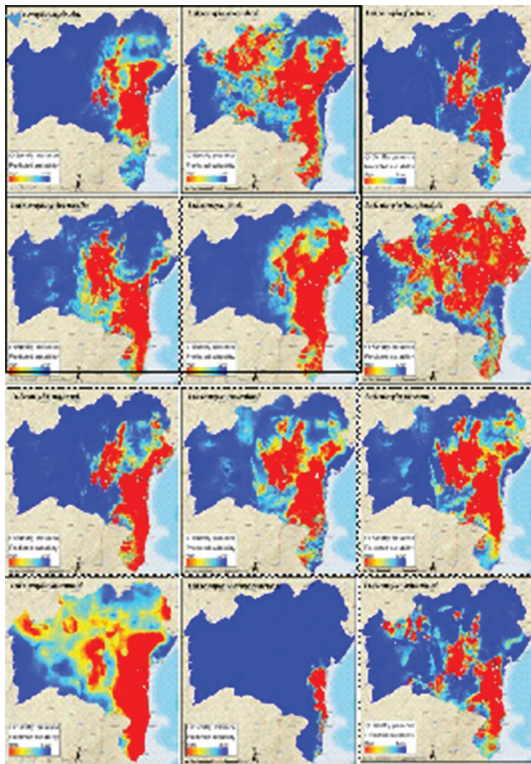


Figure 1b. Maxent predicted distribution based on MODIS variables and sand fly species collected in Bahia State. Red areas indicate higher distribution probability.

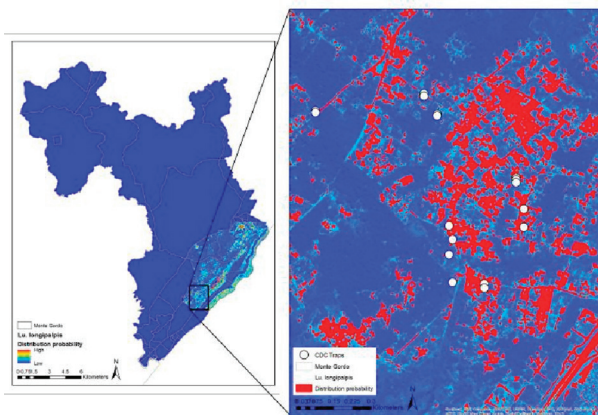


Figure 1c. Maxent predicted suitability for *Lutzomyia longipalpis* in the Monte Gordo community based on CDC trap data points and environmental variables from sub-meter spatial resolution Worldview 3 imagery using Maxent.

Significantly associated GeoHealth potential risk factors will be included in Maxent as variables and run with known vector and disease occurrence point data to develop probability risk surface maps

that can be generated and incorporated as data layers in ArcGIS 10.4 mapping and modeling software. The relative contribution of each environmental (or socioeconomic) variable in generating geospatial risk maps will be evaluated by jackknife statistics generated as part of the Maxent software package.

Despite the existence of sustained national ministry of health recommended control programs for VL in Brazil for decades, little progress has been made in reducing VL childhood disease and fatality rates due to gaps in understanding the complex spatial and temporal interactions of environmental factors, suitable conditions for sand fly vectors and the role of dogs as the primary reservoir host. The disease in fact is spreading to new foci in urbanizing environments and new approaches to develop effective control strategies are needed. We propose that high resolution, biology-based geospatial mapping and modeling methods can be developed and implemented by government agencies as the key to more rational, targeted control in surveillance and response systems that can interrupt and reverse expansion of VL to new endemic areas.

Objective 3 - Geospatial modeling for arbovirus transmission and emergence prediction

Within the last several decades, arboviruses have emerged as significant sources of human morbidity and mortality, and have created substantial stress on the public health infrastructure of both developed and developing nations¹¹. Of significance is the ongoing problem of dengue (DENV) transmission in Central and South America and repeated introductions into the southern United States¹², the emergence of both chikungunya (CHIKV) and zika (ZIKV) viruses in the Western hemisphere¹³. While many studies have investigated factors associated with transmission of these arboviruses, there are still gaps in the knowledge about what environmental and ecological factors alter transmission patterns and render conditions right for emergence of these arboviruses. Quantitative tools such as mathematical, statistical, and geospatial models have been developed to try to predict patterns of transmission as well as introduction and emergence. We will address the current need for broadly applicable models for

fast and generalizable predictions across large geographic areas for concerted and standardized methods for control and mitigations.

Objective 4 - Development of data storage and processing infrastructure

In collaboration with LSU Electrical Engineering and Computer Science, classical modeling with limited data content will be expanded to enable comparison of results to big data analysis using more comprehensive, multivariable environmental data covering longer time periods and to validate and extend mapping and modeling results generated by analysis of more limited data by classical statistics.

Objective 5 - Implement dissemination and training programs to promote geospatial mapping and modeling for vector borne diseases as envisioned in the GEOSS initiative

Short courses will be offered on-site and via the Internet to promote use of GeoHealth resources and recruit contributions of brokered new data. A course on eco-epidemiological aspects of GIS/RS and vector borne disease will be developed, including use of mathematical models, computer simulations and GIS tools. Project results will be shared with health agencies in endemic countries to promote use of geospatial surveillance and response systems.

ANTICIPATED RESULTS

The main achievement of the current project will be launch of GeoHealth in the health societal benefit area in keeping with the interoperable, open-source GEOSS program goals in Latin America, North America and the Caribbean. The project will not generate new field data. The aim is to further develop existing data and predictive models from earlier results by access to a comprehensive geospatial resource for data needed to map and model vector-borne diseases. Organizations interested in geospatial health will be enlisted to serve as contributors of new data and applications in a dynamic, expanding interoperable data GEOSS resource. Training

opportunities for health scientists in the public health community will be available on best use of earth observing satellite data through tutorials and short courses. GeoHealth data and models will be made available via the Internet for use by researchers and health agencies in the USA, Brazil and elsewhere in the Americas.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by the NASA ROSES 2016 Group on Earth Observations (GEO) Work Programme, Grant # 80 NSSC 18K0517

REFERENCES

1. Tourre YM, Lacaux JP, Vignolles C, Lafaye M. Climate impacts on environmental risks evaluated from space: a conceptual approach to the case of Rift Valley Fever in Senegal. *Glob Health Action*. 2009;2:2053. <http://dx.doi.org/10.3402/gha.v2i0.2053>
2. Utzinger J, Rinaldi L, Malone JB, Krauth SJ, Kristensen TK, Cringoli G et al. Geospatial Health: the first five years. *Geospat Health*. 2011;6(1):137–54. <http://dx.doi.org/10.4081/gh.2011.166>
3. Machault V, Yébakima A, Etienne M, Vignolles C, Palany P, Tourre Y. Mapping entomological dengue risk levels in Martinique using high-resolution remote-sensing environmental data. *ISPRS Int J Geo-Inf*. 2014;3(4):1352–71. <https://dx.doi.org/10.3390/ijgi3041352>
4. Malone JB, Tourre YM, Faruque F, Luvall JC, Bergquist R. Toward establishment of GeoHealth, an open data portal resource on health mapping and modelling based on Earth observations by remote sensing. *Geospat Health*. 2014;8(3):S599–602. <https://doi.org/10.4081/gh.2014.291>
5. Luvall JC. The power of the pixel - A thermodynamic paradigm for studying disease vector's habitats & life cycles using NASA's Remote sensing data: GNOSIS, the 8th International Symposium on Geospatial Health. New Orleans; 2014. 1–1.

6. De Roeck E, Van Coillie F, De Wulf R, Soenen K, Charlier J, Vercruyse J et al. Fine-scale mapping of vector habitats using very high resolution satellite imagery: A liver fluke case-study. *Geospat Health*. 2014;8(3):S671–83. <https://doi.org/10.4081/gh.2014.296>
7. Capolupo A, Pindozi S, Okello C, Boccia L. Indirect field technology for detecting areas object of illegal spills harmful to human health: application of drones, photogrammetry and hydrological models. *Geospat Health*. 2014;8(3):S699–707. <https://doi.org/10.4081/gh.2014.298>
8. Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol Modell*. 2006;190:231–59. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2005.03.026>
9. Mischler P, Kearney M, McCarroll JC, Scholte RGC, Vounatsou P, Malone JB. Environmental and socio-economic risk modelling for Chagas disease in Bolivia. *Geospat Health*. 2012;6(3):S59–66. <https://doi.org/10.4081/gh.2012.123>
10. Nieto P, Malone JB, Bavia ME. Ecological niche modeling for visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, using genetic algorithm for rule-set prediction and a growing degree day-water budget model analysis. *Geospat Health*. 2006;115–26. <https://doi.org/10.4081/gh.2006.286>
11. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S7–16. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2460>
12. Rey JR. Dengue in Florida (USA). *Insects*. 2014;5(4):991–1000. <https://doi.org/10.3390/insects5040991>
13. Christofferson RC, Mores CN, Wearing HJ. Characterizing the likelihood of dengue emergence and detection in naïve populations. *Parasit Vectors*. 2014;7:282. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-282>



A thermodynamic paradigm for using satellite based geophysical measurements in public health applications

Um paradigma termodinâmico para o uso de medidas geofísicas baseadas em satélites e suas aplicações em saúde pública

RIALA6/1761

Jeffrey C LUVALL*

*Correspondence to: ZP11 Earth Science Office, NASA, Marshall Space Flight Center, Huntsville, AL 35812. Tel: +1 256 961 7886, Fax: +1 256 961 7788. Email: jluvall@nasa.gov

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

ABSTRACT

A thermodynamic paradigm for studying disease vector's habitats & life cycles using NASA's remote sensing data is being proposed. NASA's current and planned satellite missions provide measurements of the critical environmental measures environmental state functions important to vector & disease life cycles such as precipitation, soil moisture, temperature, vapor pressure deficits, wet/dry edges, and solar radiation. Satellite data provide landscape scale process functions represented by land use/cover mapping and actual measurements of ecological functions/structure: canopy cover, species, phenology, and aquatic plant coverage. These measurements are taken in a spatial context and provide a time series of data to track changes in time. Global public health is entering a new informational age through the use of spatial models of disease vector/host ecologies driven by the use of remotely sensed data to measure environmental and structural factors critical in determining disease vector habitats, distributions, life cycles, and host interactions. The vector habitat microclimates can be quantified in terms of the surface energy budget measured by satellites. The epidemiological equations (processes) can be adapted and modified to explicitly incorporate environmental factors and interfaces required by a specific disease and its vector/host cycle. Remote sensing can be used to measure or evaluate or estimate both environment (*state functions*) and interface (*process functions*). It is critical that the products of remote sensing must be expressed in a way they can be integrated directly into the epidemiological equations.

Keywords. disease vectors, thermal remote sensing, habitat, life cycles, epidemiological equations.

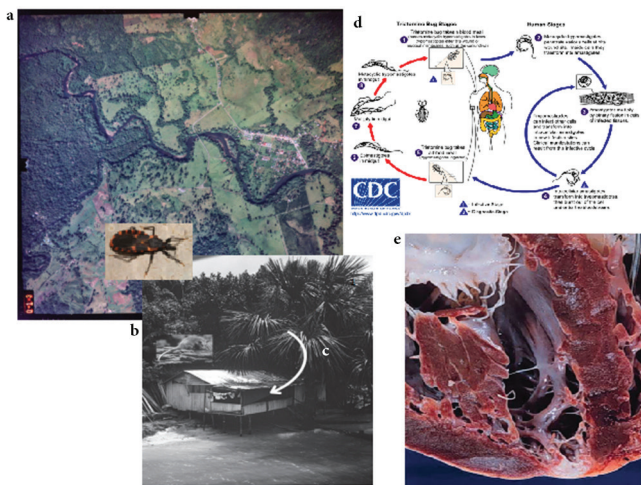
RESUMO

Um paradigma termodinâmico para estudar os habitats e ciclos de vida dos vetores de doenças utilizando dados de sensoriamento remoto da NASA está sendo proposto. As missões atuais e planejadas para os satélites da NASA fornecem medições das funções críticas ambientais e funções do estado ambiental, importantes para os ciclos de vida de vetores e doenças, como precipitação, umidade do solo, temperatura, déficits de pressão do vapor, bordas úmidas/secas e radiação solar. Os dados de satélite fornecem as funções dos processos na escala da paisagem, representada pelo mapeamento do uso/cobertura da terra e medições reais das funções/estruturas ecológicas: cobertura do dossel, espécies, fenologia e cobertura de plantas aquáticas. Essas medições são feitas em um contexto espacial e fornecem uma série temporal de dados para rastrear dinâmica das mudanças. A saúde pública global está entrando em uma nova era informacional através do uso de modelos espaciais para vetores/hospedeiros de doenças, impulsionados pelo uso de dados de sensoriamento remoto, para medir fatores ambientais e estruturais críticos na determinação de habitats de vetores de doenças, distribuições, ciclos de vida e interações com o hospedeiro. Os microclimas dos habitats vetoriais podem ser quantificados em termos do orçamento de energia superficial, medidos por satélites. As equações epidemiológicas (processos) podem ser adaptadas e modificadas para incorporar explicitamente fatores e interfaces ambientais requeridos por uma doença específica e o ciclo do seu vetor/hospedeiro. O sensoriamento remoto pode ser usado para medir ou avaliar, ou mesmo estimar tanto o ambiente (funções do seu estado) quanto a interface (funções de seus processos). É fundamental que os produtos de sensoriamento remoto sejam expressos de forma a integrá-los diretamente às equações epidemiológicas.

Palavras-chave. doenças vetoriais, sensoriamento remoto termal, hábitat, ciclos de vida, equações epidemiológicas.

INTRODUCTION

Vector borne diseases are emerging and re-emerging on a global scale¹. Vector-borne diseases were once a major public health concern only in tropical and subtropical areas, but today they are also an emerging threat for the continental and developed countries. Vector-borne diseases are among the most complex of all infectious diseases to prevent and control. Not only is it difficult to predict the habits of many of the vectors, but most vector-borne agents can infect animals as well. The globalization of many country's regional economies, climate variability, and civil unrest have spurred rapid movements of large human populations along with many of the disease vectors and reservoirs. Landscape scale alteration in ecosystems and land use impact the distribution of vector habitat and their interaction with human populations. *Aedes aegypti* mosquitoes, the "urbanized" vector of epidemic yellow fever, dengue, chikungunya, and Zika viruses are ideally adapted to the urban landscape². Extensive forest clearing for agriculture and livestock over the last 200 to 300 years allowed the adaptation of triatomines (blood sucking insects, ie Kissing Bugs), vectors of Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*) to domestic environments using humans and domestic animals as a food source (Figures 1a,b,c,d,e)³. Other significant environmental public health problems result from the alteration of the landscape include heat stress in urban areas.



Figures 1. a) Human alteration of the landscape impacts both the habitat and the natural life cycles of many important insect disease vectors. b) These changes in the landscape result in close human and domesticated animal contact with insects that normally feed on non-human hosts and

native wildlife species. c) Chagas is an example of a significant protozoan disease (*Trypanosoma cruzi*) that emerged over the last 200–300 years through deforestation through the adaptation of triatomines (Kissing bug) to domestic environments. d) An infected triatomine insect vector (or "kissing" bug) takes a blood meal and releases trypomastigotes in its feces near the site of the bite wound. Trypomastigotes enter the host through the wound or through intact mucosal membranes. The acute phase lasts for the first few weeks or months of infection and maybe symptom-free or exhibits only mild symptoms. The chronic stage develops over many years affects the nervous system, digestive system and heart. e) Cardiac damage is severe in later chronic stages. ¹NASA ²Coura JR, 2007. "Chagas disease: what is known and what is needed - A background article." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 113-122. ³Fauci et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine*.

There is a critical need to understand and quantify the environmental state and process functions that are significant in environmental public health issues and in vector borne disease life cycles (Figure 2).

Epidemiologic Triangle of Disease (Vector-borne Diseases)

A multi-factorial relationship between hosts, agents, vectors and environment

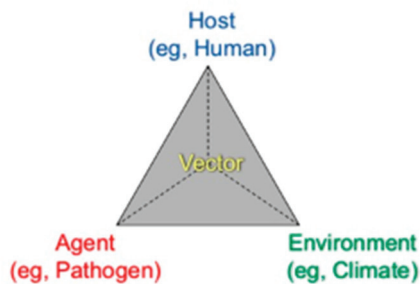


Figure 2. Satellite based geophysical measurements quantify environmental state and process functions important to understand vector and disease life cycles

The environmental state functions include precipitation, solar radiation, the surface energy budget which drives evapotranspiration, vapor pressure deficits, air, surface, and soil temperatures; and surface hydrology (flooding and water bodies). Process functions require the quantification of the thermodynamic and functional dynamics of ecosystems. These complex science questions require measurements of leaf level photosynthesis and biochemistry processes; CO₂ exchange; leaf nutrient content; temperature, and transpiration (energy budgets). At a larger scale the

determination of leaf area index; canopy structure and architecture; nutrient and water cycles; phenology; identification of key species; and landscape scale ecological functional types are critical.

MATERIAL AND METHODS

Surface temperature and albedo are major determinants of the surface energy budget which is critical in controlling the surface environment that significantly impacts both the rate at which vector borne disease life cycles progress and the extent of their habitat. Use of energy terms in modeling surface energy budgets allows the direct comparison of various land surfaces encountered in complex landscape from urban, vegetated (forest and herbaceous) to non-vegetated (bare soil, roads, and buildings). These terms are also easily measured using remote sensing from aircraft or satellite platforms allowing one to examine the spatial variability of the urban surface. The partitioning of energy budget terms depends on the surface type. In natural landscapes, the partitioning is dependent on canopy biomass, leaf area index, aerodynamic roughness, and soil moisture status, all of which are influenced by the regional climate. In urban landscapes, coverage by man-made materials substantially alters the surface energy budget^{4,6}.

The surface radiative budget Q^* (Wm^{-2}) can be measured directly using satellite data sets.

$$Q^* = K^* + L^* \quad (1)$$

Where K^* and L^* are the net shortwave and longwave radiation of the surface.

Net radiation is a particularly useful term because, under most conditions, it represents the total amount of energy available to the land surface for partitioning into non-radiative processes (mass heating, evapotranspiration, biological synthesis, etc.) at the surface. In vegetated areas the amount of net radiation is dependent upon vegetation type and varies with canopy leaf area and structure.

Net radiation may be expressed as the sum of these non-radiative fluxes (Wm^{-2}):

$$Q^* = LE + HG \quad (2)$$

Where:

LE = latent heat flux (both transpiration by plants & evaporation)

H = sensible heat flux

G = energy flux into or out of storage (both vegetation, urban materials, & soil)

The partitioning of LE, H, and G are dependent on the surface composition. Vegetation canopies (leaf stomata) can control transpiration rates over a wide range of soil moisture conditions and atmospheric vapor deficits. Both the physiological control of moisture loss (stomatal resistance) and leaf/canopy morphology for vegetation determines how Q^* is partitioned among LE, H, and G. In urban areas, the combination of both man-made materials and vegetation results in a spatially variable, heterogeneous mixture of surfaces that produce a complex, range of surface albedo values and significant differences in the partitioning of the surface energy budget.

Luvall and Holbo present a technique, Thermal Response Number (TRN) derived through remote sensing for describing the surface energy budget within a forested landscape⁷.

The ratio of net radiation to change in temperature can be used to define a surface property referred to as the Thermal Response Number (TRN).

$$TRN = \sum_{t_1}^{t_2} Rn \Delta t / \Delta T \text{ (in } kJm^{-2} K) \quad (3)$$

Where $\sum_{t_1}^{t_2} Rn \Delta t$ represents the total amount of

net radiation (Rn) for that surface over the time period between flights ($\Delta t = t_2 - t_1$) and ΔT is the change in mean temperature of that surface.

This procedure treats changes in surface temperature as an aggregate response of the dissipate thermal energy fluxes (latent heat and sensible heat exchange; and conduction heat exchange with biomass and soil). The TRN is therefore directly dependent on of surface properties (canopy structure, amount and condition of biomass, heat capacity, and

moisture). A time interval of 15-30 minutes between remote sensing over flights of the same area using the Thermal Infrared Multispectral Scanner (TIMS) for selected forested landscapes has revealed a measurable change in forest canopy temperature due to the change in incoming solar radiation. Surface net radiation integrates the effects of the non-radiative fluxes, and the rate of change in forest canopy temperature presents insight on how non-radiative fluxes are reacting to radiant energy inputs.

The TRN provides an analytical framework for studying the effects of surface thermal response for large spatial resolution map scales. The importance of TRN is that 1) it is a functional classifier of land cover types; 2) it provides an initial surface characterization for input to various climate models; 3) it is a remotely sensed geophysical measurement; 4) it can be determined completely from a pixel by pixel measurement or for a polygon from a landscape feature which represents a group of pixels. The TRN can be used as an aggregate expression of both surface properties (forest canopy structure and biomass, age, and physiological condition; urban structures and material types) and environmental energy fluxes.

RESULTS AND DISCUSSION

Satellite data products and biology-based data analysis can be integrated directly into epidemiological equations to map environmental suitability for a wide range of vector-borne diseases such as fascioliasis, schistosomiasis, leishmaniasis, dengue, malaria, and Chagas^{8,13}. Satellite based geophysical measurements quantify environmental state functions important to vector and disease life cycles (within vector) such as precipitation; soil moisture; surface radiant temperatures; vapor pressure deficits; solar radiation; leaf level photosynthesis and biochemistry processes; CO₂ exchange; and leaf nutrient content. Satellite data also provides the spatial context and measures the interfaces as process functions: land use/cover mapping; ecological functions/structure; canopy cover; species; phenology; and aquatic plant coverage. Lastly, but perhaps the greatest strength of satellite data sets and their derived products provide a global time series of measurements that can range from days to years. The epidemiological

equations (processes) can be adapted and modified to explicitly incorporate environmental factors and interfaces as illustrated below.

There is a need to understand how this dynamical shift in land use and other risk factors can change the transmission patterns of Chagas and the risk of human infection. Transmission of Chagas persists in much of the South American continent, particularly in the Orinoco Region in Colombia and Venezuela, where *Rhodnius prolixus* is the main insect vector¹⁴. Palm trees that occur naturally in this region, particularly *Attalea butyracea* are widely distributed and constitute a tremendously large faunistic reserve, including many mammalian species such as *Didelphis marsupialis*, bats, rats and other rodents that play a relevant role in the natural zoonotic transmission cycle of the parasite¹⁵.

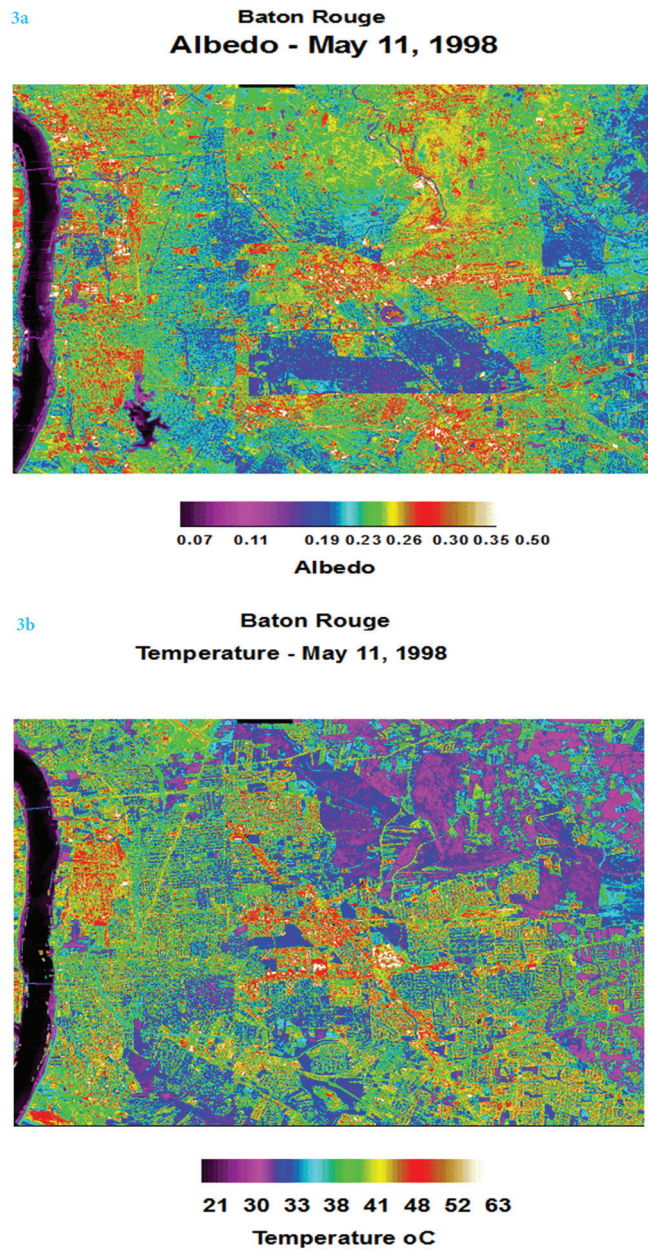
In the last 15 years, the conversion of natural ecosystems to African palm plantations (*Elaeis guineensis*) have undergone a tremendous increase in Colombia. Such large-scale ecosystem alteration can potentially change transmission cycles of tropical diseases including Chagas where insect vectors are known to colonize palm tree crops, but the long-term impact has not yet been evaluated. An epidemiological approach is to measure seasonal and annual variation of the transmission cycle of Chagas disease with the aid of fieldwork, geospatial and mathematical models. A time series data obtained from the field studies combined with satellite geophysical measurements can be used to investigate the potential effect of community variation in risk, potential influences of climate change and the value of ecological niche modeling in describing the epidemiological cycle. Its critical to understand the patchy community-to-community variation in transmission that varies locally among communities even in otherwise similar climate in endemic zones. Data generated in field studies provide the basis for development of dynamical biology-based mathematical models for measuring propagation and transmission of Chagas disease in individual communities within a highly endemic region. A previous Pan American Health Organization (PAHO) funded studies, national scale ecological niche models (ENM) were used to generate risk maps of Chagas disease and the two principle triatomine vectors in Colombia¹⁶.

The Urban Heat Island effect (UHI) results from

elevated temperature over urban areas due to thermal energy characteristics of urban surface materials that absorb incoming shortwave solar radiation and re-emit this energy as longwave radiation from surfaces common to the city landscape (e.g., pavement, rooftops)¹⁷. The UHI may increase heat-related impacts by raising air temperatures in cities approximately 1-6 °C in the surrounding suburban and rural areas due to absorption of heat by dark paved surfaces and buildings; lack of vegetation and trees; heat emitted from buildings, vehicles; and air conditioners; and reduced air flow around buildings¹⁸.

The increased air temperatures caused by the UHI effect can significantly impact potential disease transmission. Christofferson and Mores¹⁹ where a ~ 4 °C increase in temperature at 26 °C would result in significant differences in the dissemination of the dengue virus¹⁹. Morin et al²⁰ reviewed many studies demonstrating the importance of temperature in the ecology of dengue in both virus replication and the transmission of dengue. Morin et al²¹ presents a series of meteorologically driven simulations of dengue epidemics in San Juan, PR. They concluded that “the simulations further indicate that rainfall strongly modulates the timing of dengue (e.g., epidemics occurred earlier during rainy years) while temperature modulates the annual number of dengue fever cases. Our results suggest that meteorological factors have a time-variable influence on dengue transmission relative to other important environmental and human factors”.

The urban landscape represents a complex heterogeneous surface that strongly influences the development of the urban heat island. The urban landscape cannot be adequately characterized using traditional structural based remote sensing classification techniques (ie, land use/cover types) because these techniques are not directly related to the physical functioning of the surface energy budget (**Figures 3a, b**).



Figures 3 a, b. Aircraft measurements of Baton Rouge, LA using an airborne multispectral visible and thermal instrument at 10m resolution (ATLAS). These detailed measurements allow the characterization of various land surfaces based on the surface energy balance. (a. albedo, b. temperature).

Since albedo alone does not truly reflect how the urban surface partitions energy, one needs additional information to access the “urban fabric” of the city. Including surface temperature provides the needed additional information.

A city has a distinctive “energy print” that is characteristic of the surface composition and how its processing energy (Figure 4).

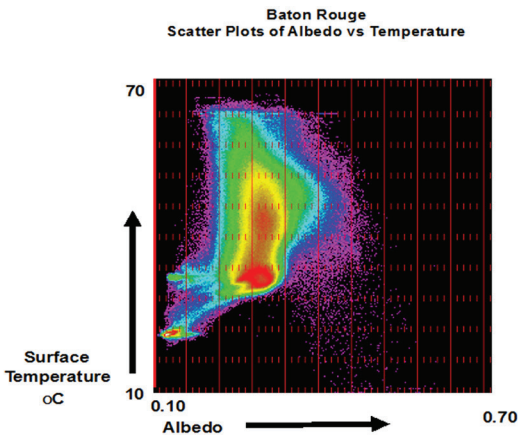


Figure 4. An “energy finger print” of urban surfaces in Baton Rouge. The unique “energy print” represent how the surface is processing energy and can be used to provide a functional classification of urban surfaces which drive the microclimate

These “scattergrams” or “energy finger prints” become a very powerful classification tool representing the functional classification of urban land surfaces. Within each city, each land use has a unique “energy print” that is directly physically related to how that surface is processing energy (Figure 5). These “energy prints” of the land use are unique for each city. These results again emphasize that classifications based on cover type/land use cannot be applied across a variety of cities, since they cannot represent the true energy partitioning of that surface⁶.

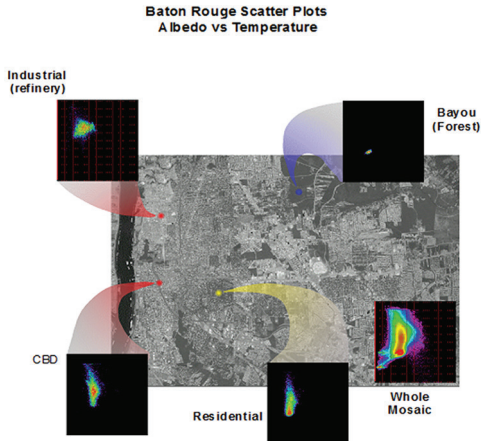


Figure 5. The Baton Rouge, LA energy finger print provides a functional classification of land use patterns within an urban area that is related to the microclimate and land use/cover of an urban area

CONCLUSION

A thermodynamic paradigm for studying disease vector’s habitats & life cycles using NASA’s remote sensing data is being proposed. NASA’s current and planned satellite missions provide measurements of the critical environmental measures environmental state functions important to vector & disease life cycles such as precipitation, soil moisture, temperature, vapor pressure deficits, wet/dry edges, and solar radiation. Future satellite missions need to provide hyperspectral visible and multispectral thermal data products to enable structural and functional classification of ecosystems and the measurement of key environmental parameters (temperature, soil moisture). A 60-meter spatial resolution and approximately 5-day repeat pattern greatly enhances the ability to obtain timely and adequate thermal data. A NEdT (Noise Equivalent delta Temperature) precision of < 0.2 Kelvin will produce would day-night pairs of calibrated surface temperatures for use in determining soil moisture, evaporation, and microclimate. The multispectral thermal bands will provide the capability of using wavelength dependent emissivity differences of minerals to map soil mineral composition, clay and organic matter content. The thermal measurements are particularly useful in providing approximately 5-day and day-night pairs of measurements of surface thermal environments. However, to obtain TRN from landscape scale ecosystems, repeated data collections ~ 1-2 hours apart would enhance our ability to characterize and monitor vector borne disease life cycles and habitats. Technology is available to do so through the use of constellations of cubesats.

Spectroscopy at a spectral accuracy of < 0.5nm and an absolute radiometric accuracy of > 95% from vegetation canopies for the determination of species, species functional type, biochemistry, and physiological condition along with additional characterization of surface mineralogy. Thus, the combination of hyperspectral visible-shortwave infrared and multi-spectral thermal data will significantly enhance our capability to map and monitor disease vector habitats²².

Research funding: Supported by the NASA ROSES 2016 Group on Earth Observations (GEO) Work Programme, 305 Grant # 80 NSSC 18K0517.

REFERENCES

1. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 2004;430(6996):242-9. Available in: <https://www.nature.com/articles/nature02759>
2. Rosenberg R. Threat from emerging vectorborne viruses. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(5):910-1. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2205.160284>
3. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:113-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007000900018>
4. Luvall JC, Holbo HR. Thermal Remote Sensing Methods in Landscape Ecology. In: Turner MG, Gardner RH, editors. *Quantitative Methods in Landscape Ecology*. Series: Ecological Studies. Springer; 1991. p.127-52.
5. Quattrochi DA, Luvall JC. *Thermal remote sensing in land surface processes*. 1. ed. CRC Press; 2004.
6. Luvall JC, Quattrochi DA, Rickman DL, Estes Jr MG. Boundary layer (atmospheric) and air pollution: urban heat islands. In: *Encyclopedia of Atmospheric Sciences*. Amsterdam: Elsevier; 2015. p. 310-8. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-382225-3.00442-4>
7. Luvall JC, Holbo RH. Measurements of short-term thermal responses of coniferous forest canopies using thermal scanner data. *Remote Sens Environ*. 1989;27:1-10. Available in: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.468.8438&rep=rep1&type=pdf>
8. Raso G, Vounatsou P, McManus DP, Utzinger J. Bayesian risk maps for *Schistosoma mansoni* and hookworm mono-infections in a setting where both parasites co-exist. *Geospat Health*. 2007;2(1):85-96. <http://dx.doi.org/10.4081/gh.2007.257>
9. Brooker S, Clements ACA, Bundy DAP. Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. *Adv Parasitol*. 2006;62:221-61. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)62007-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)62007-6)
10. Bavia ME, Hale LF, Malone JB, Braud DH, Shane SM. Geographic information systems and the environmental risk of schistosomiasis in Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60(4):566-72.
11. Nieto P, Malone JB, Bavia ME. Ecological niche modeling for visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil, using genetic algorithm for rule-set prediction and growing degree day-water budget analysis. *Geospat Health*. 2006;1(1):115-26. <https://doi.org/10.4081/gh.2006.286>
12. Ceccato P, Vancutsem C, Klaver R, Rowland J, Connor SJ. A vectorial capacity product to monitor changing malaria transmission potential in epidemic regions of Africa. *J Trop Med*. 2012;2012:595948. <https://doi.org/10.1155/2012/595948>
13. Yang GJ, Tanner M, Utzinger J, Malone JB, Bergquist R, Yy Chan E. Malaria surveillance-response strategies in different transmission zones of the People's Republic of China: Preparing for climate change. *Malar J*. 2012;11:426. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-426>
14. Guhl F. Chagas disease in Andean countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:29-37. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007005000099>
15. Gaunt M, Miles M. The ecotopes and evolution of triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(4):557-65. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000400019>
16. Malone JB. Biology-based mapping of vectorborne parasites by Geographic Information Systems and Remote Sensing. *Parassitologia*. 2005;47(1):27-50.
17. Dominguez A, Kleissl J, Luvall JC, Rickman DL. High-resolution urban thermal sharpener (HUTS). *Remote Sens Environ*. 2011;115(7):1772-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rse.2011.03.008>
18. Government US. United States Environmental Protection Agency. *Reducing Urban Heat Islands: Compendium of Strategies*; 2016.
19. Christofferson RC, Mores CN. Potential for extrinsic incubation temperature to alter interplay between transmission potential and mortality of

dengue-infected *Aedes aegypti*. *Environ Health Insights*. 2016;10:119-23. <http://dx.doi.org/10.4137/EHI.S38345>

20. Morin CW, Comrie AC. Regional and seasonal response of a West Nile virus vector to climate change. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(39):15629-5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1307135110>

21. Morin CW, Monaghan AJ, Hayden MH, Barrera R, Ernst K. Meteorologically driven simulations of

dengue epidemics in San Juan, PR. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(8):e0004002. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004002>

22. Lee CM, Cable ML, Hook SJ, Green RO, Ustin SL, Mandl DJ. An introduction to the NASA Hyperspectral InfraRed Imager (HyspIRI) mission and preparatory activities. *Remote Sens Environ*. 2015;167:6–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rse.2015.06.012>

Simpósio Internacional

“Leishmaniose Visceral: Desafios para o Controle no Contexto da Diversidade dos Cenários”



Patologia morfológica e molecular aplicadas à inovação diagnóstica e vigilância da leishmaniose visceral

Morphological and molecular pathology applied to diagnostic innovation and surveillance of visceral leishmaniasis

RIALA6/1762

Juliana Mariotti GUERRA^{1*}, Leonardo José Tadeu de ARAÚJO¹, Rodrigo Albergaria RESSIO², Natália Coelho Couto de Azevedo FERNANDES²

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Patologia Quantitativa, Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, 7º Andar, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: 11 3068 2874. E-mail: julianaguerra@ial.sp.gov.br, jumariotti.vet@gmail.com

²Núcleo de Anatomia Patológica, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

RESUMO

O conceito de Saúde Única surgiu para ressaltar a união indissociável entre a saúde animal, humana e ambiental. Nesse contexto, a leishmaniose visceral americana (LVA) é considerada uma importante doença de saúde pública no Brasil, devido a sua crescente expansão geográfica e aumento na incidência de casos humanos. A LVA é uma doença parasitária, zoonótica, causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *chagasi*) e transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. Os cães são considerados os principais reservatórios do parasito nas áreas urbanas. O diagnóstico da LVA é baseado em aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. A demonstração da presença do parasito através de exames diretos em tecidos biológicos do hospedeiro é o diagnóstico de escolha, principalmente, em municípios em que a transmissão de LVA ainda não tenha sido confirmada. Diversas metodologias podem ser aplicadas com essa finalidade. O objetivo desse trabalho é apresentar as técnicas citológicas, anatomo-patológicas e moleculares em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina para o diagnóstico da leishmaniose visceral em humanos e cães. Esses dados são complementares à apresentação realizada no I Simpósio Internacional de Leishmaniose Visceral, realizado nos dias 23 e 24 de Abril de 2018, e organizado pelo Instituto Adolfo Lutz em São Paulo-SP, Brasil.

Palavras-chave. citologia, imuno-histoquímica, imunocitoquímica, leishmania, cães.

ABSTRACT

The One Health concept emerged to highlight the inseparable link between animal, human and environmental health. In this context, American Visceral Leishmaniasis (AVL) is considered an important public health disease in Brazil, due to its increasing geographic expansion and in the incidence of human cases. AVL is a parasitic and zoonotic disease caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *chagasi*) and transmitted by sandflies of the genus *Lutzomyia*. Dogs are considered the main reservoirs of the parasite in urban areas. The diagnosis of AVL is based on epidemiological, clinical and laboratory aspects. The demonstration of the presence of the parasite through direct examinations in biological tissues of the host is the diagnosis of choice, mainly in municipalities where the transmission of AVL has not yet been confirmed. Several methodologies can be applied for this purpose. The objective of this work is to present the cytological, anatomopathological and molecular techniques in formalin fixed and paraffin embedded samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis in humans and dogs. These data are complementary to the present study at the First International Symposium on Visceral Leishmaniasis, held on April 23 and 24, 2018, and organized by Adolfo Lutz Institute in São Paulo, Brazil.

Keywords. cytology, immunohistochemistry, immunocytochemistry, leishmania, dogs.

INTRODUÇÃO

Patologia é o ramo da ciência médica responsável pelo estudo das alterações moleculares, funcionais e morfológicas das células, tecidos e órgãos que visa explicar os mecanismos de surgimento e desenvolvimento da doença, podendo ser aplicada na área de pesquisa e de rotina diagnóstica. Nesse último contexto, o profissional especializado analisa as alterações morfológicas celulares a fim de determinar diagnósticos diferenciais das lesões e agrega as informações adicionais obtidas por exames moleculares complementares para a conclusão do caso.

Diversas técnicas podem ser realizadas visando o diagnóstico morfológico e etiológico dos processos patológicos, incluindo a citologia convencional, a citologia em meio líquido e embocado celular, exame necrótico e histopatológico, colorações histoquímicas, imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e exames moleculares em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina. Nesse sentido, atualmente, o Ministério da Saúde¹ (Memorando 480/2013 CGDT/DEVIT/SVS-MS) recomenda o exame citológico convencional (exame parasitológico direto) e o exame imuno-histoquímico como testes de triagem para a confirmação do primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina, sendo parte de um fluxograma para desencadear ações de controle municipais. Portanto, o objetivo deste manuscrito é apresentar essas metodologias diagnósticas que podem ser aplicadas para o aprimoramento diagnóstico da leishmaniose visceral em humanos e em animais.

Citologia convencional

A citologia convencional permite a análise microscópica de células recolhidas de um determinado tecido ou órgão em uma lâmina de vidro. Em casos suspeitos para leishmaniose visceral, essa técnica também pode ser denominada de exame parasitológico direto e o objetivo é detectar estruturas compatíveis com amastigotas de *Leishmania* spp. em esfregaços celulares. Diversas técnicas de coleta e de matriz amostral estão disponíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina.

O método mais comum para coleta de amostras é através da utilização de uma agulha fina que é introduzida no tecido desejado, podendo ser acoplada ou não a uma seringa. As células ascendem pelo canhão

da agulha pela capilaridade ou pressão negativa gerada pela sucção do êmbolo da seringa. Essa técnica pode ser utilizada para aspiração de células representativas de linfonodo, medula óssea, baço, fígado e outros órgãos parenquimatosos, por vezes, com o auxílio de exames de imagem, como a ultrassonografia. As células aspiradas devem ser depositadas sobre uma lâmina de vidro e espalhadas sobre a mesma com o uso de uma outra lâmina de vidro, formando um esfregaço celular em monocamada.

Outras técnicas envolvem a coleta de células, principalmente de mucosas (oral e conjuntival), através do uso de zaragatoas descartáveis e estéreis. O material obtido deve ser depositado com movimentos de rolagem do *swab* sobre a lâmina de vidro. Além disso, técnicas de impressão direta da lâmina de vidro sobre lesões, especialmente ulcerações cutâneas, ou mucosas, podem ser empregadas para o diagnóstico. O raspado cutâneo ou escarificação e deposição do material do bisturi sobre a lâmina de vidro pode ser utilizada em caso de lesões descamativas ou esfoliativas.

As células depositadas sobre a lâmina de vidro, após secas ao ar, devem ser fixadas e coradas. As colorações mais comumente utilizadas são a do tipo *Romanovsky*, como a de panótico rápido. O diagnóstico positivo para leishmaniose ocorre pela identificação de estruturas arredondadas de cerca de 3-5 µm no interior de macrófagos contendo um cinetoplasto.

Entre as vantagens, a citologia convencional é segura e pouco invasiva, permitindo uma detecção rápida e eficaz do processo infeccioso, com baixo custo e de fácil execução. Sua especificidade é de 100%, no entanto, sua sensibilidade pode variar de 30 a 99%, dependendo do tipo de tecido amostrado, carga parasitária e fase clínica da doenças em humanos e animais². Outras desvantagens incluem o grande número de interferentes que podem dificultar a leitura da lâmina como o dessecação e sobreposição celular e contaminação exacerbada por hemácias.

Citologia em meio líquido e embocado celular

A citologia em meio líquido é um método de fixação imediata da amostra citológica em líquido preservativo, com transferência posterior para lâmina por método manual ou automatizado. Este método permite a conservação da morfologia celular por períodos longos (um mês para amostras à temperatura ambiente e três meses para amostras refrigeradas),

possibilitando o envio do material de locais remotos ao laboratório de referência. Outra vantagem da técnica inclui a confecção da lâmina no laboratório de modo padronizado, com distribuição celular uniforme e uma área padronizada da lâmina, além disso permite a utilização da amostra remanescente para execução de métodos complementares, como embocado celular.

Apesar dos bons resultados observados com o uso de citologia em meio líquido para o diagnóstico de linfoma canino, isoladamente, este método não apresentou boa sensibilidade para detecção de amastigotas em amostras nodais. Isto porque, a coloração empregada com este método, a de papanicolaou, não resalta as estruturas intracelulares sugestivas de amastigotas, às quais, podem ser confundidas com o citoplasma celular, além de ocorrer redução importante no tamanho das células e perda da coesão das células. Esses fatores dificultam a leitura da lâmina, principalmente por observadores não acostumados à técnica.

Já, o embocado celular é uma forma de preparação citológica na qual há a transferência de um agregado celular fixado, em um meio líquido, por exemplo, para um cassete histológico que é submetido ao processamento histológico e embocado em parafina. Entre suas vantagens estão a simplicidade e alta reprodutibilidade da técnica, a concentração e maior representatividade amostral, a visualização parcial da arquitetura tecidual, realização de múltiplos cortes histológicos e aplicação de metodologias complementares (coloração de hematoxilina e eosina, imuno-citoquímica e colorações específicas) e a possibilidade de armazenamento da amostra à temperatura ambiente. As desvantagens, em relação à citologia convencional, incluem o maior custo, maior tempo de preparo e redução do tamanho celular³.

Necropsia

A necropsia é um procedimento sistematizado, efêmero, que consiste na avaliação do paciente e de seus órgãos após o óbito. Inicia-se com a avaliação externa do cadáver e continua com a abertura do corpo e análise descritiva de todos os órgãos. Seu método bem estabelecido propicia a colheita adequada das amostras, sem esquecimentos, além de garantir uma descrição fidedigna.

Os achados macroscópicos podem ter papel definitivo na conclusão da causa de morte, muitas vezes sendo suficientes para a conclusão do caso. Entretanto, na leishmaniose visceral canina (LVC), o

amplo espectro de alterações apresentados pelos cães⁴, torna o diagnóstico complexo e desafiador para o médico veterinário, e exige a associação com achados microscópicos, exames sorológicos e moleculares para definição etiológica acurada.

Classicamente, a leishmaniose em cães apresenta sinais inespecíficos como apatia, hipertermia, perda de peso, alterações de apetite, astenia, linfadenomegalia localizada ou generalizada, lesões dermatológicas, diarreia, falência renal, ceratoconjuntivite, epistaxe, anemia e onicogrifose⁵. Histologicamente, os achados também são variáveis e afetam diversos órgãos, sendo que as principais lesões ocorrem nos órgãos mais ricamente parasitados como baço, fígado, linfonodos, medula óssea e a pele.

As lesões cutâneas são frequentemente relatadas e incluem, dermatite esfoliativa seca, alopecia, hipotricose, crosta, eritema, despigmentação, hiperpigmentação, hiperqueratose e úlceras, localizadas mais frequentemente ao nível das orelhas, focinho, cauda e articulações⁶. Em trabalhos realizados pelo nosso grupo, esplenomegalia foi o principal achado macroscópico, seguido pelas lesões cutâneas e onicogrifose, conforme ilustrado na **Figura**.

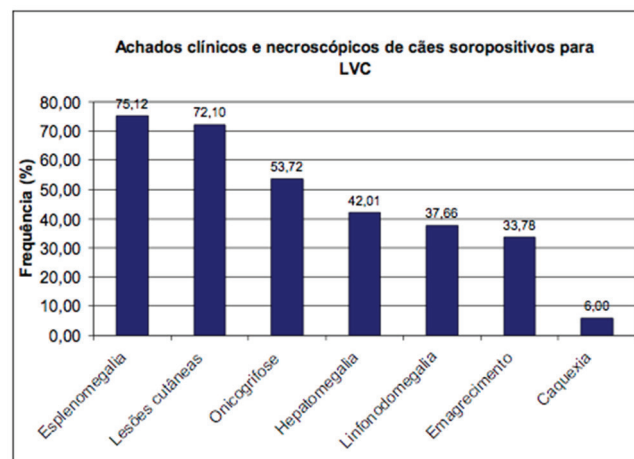


Figura. Frequência de achados clínicos e necroscópicos de cães soropositivos para Leishmaniose Visceral Canina. Votuporanga, 2018

Em humanos, a doença também apresenta variedade de sinais, os quais incluem hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, febre, inapetência, diarreia e vômito, tornando o diagnóstico desafiador e exigindo o emprego de métodos complementares para confirmação⁷.

Histopatologia e colorações histoquímicas

A LVA é caracterizada por alterações multissistêmicas em humanos e em cães, devido a um comprometimento progressivo do sistema mononuclear fagocitário, com hipertrofia e proliferação de macrófagos. Os órgãos mais severamente comprometidos como baço, linfonodos, medula óssea e fígado revelam um infiltrado inflamatório linfo-histiocitário e plasmocítico, muitas vezes, com a formação de esboços granulomatosos ou piogranulomatosos. Nesses casos, também se observa uma reatividade do interstício dos diferentes tecidos, com um aumento dos componentes fibrilares e da matriz extracelular. Estruturas redondas a ovaladas, com 2 a 4 µm de diâmetro com um cinetoplasto alongado, geralmente posicionado perpendicularmente ao núcleo, são compatíveis com amastigotas e podem ser observadas no interior de macrófagos (e ocasionalmente, em outros leucócitos, células endoteliais, fibroblastos e até algumas células neoplásicas).

Em estudo realizado por nosso grupo, de 14 cães diagnosticados com leishmaniose visceral, 85,71% dos casos apresentou o fígado com hepatite granulomatosa multifocal. Frequentemente, observou-se destrabeculação hepatocitária e aumento de neutrófilos circulantes nos sinusóides. O infiltrado inflamatório exibiu distribuição portal a médio-zonal, principalmente composto por macrófagos, linfócitos e neutrófilos, por vezes formando esboços granulomatosos. Em quatro casos, foi possível a distinção de amastigotas no interior de histiócitos. Outro achado, menos frequente, foi a degeneração macro e microgoticular de hepatócitos.

Todos os cães apresentaram pelo menos uma alteração microscópica em baço, sem incluir congestão, a qual foi desconsiderada devido ao método empregado de eutanásia. Os achados incluíram histiocitose em 71,43% dos animais avaliados, hiperplasia de polpa branca (35,71%), hematopoiese extramedular esplênica, caracterizada predominantemente por trombopoiese (25,7%) e esplenite aguda, com infiltrado neutrofilico (21,43%). A intensidade dos achados era variável, com cães exibindo discreta expansão de polpa branca a outros em que a expansão era tão intensa, que havia uma coalescência de células linfóides.

Doze (85,71%) cães apresentaram infiltrado inflamatório dermal, composto por celularidade mista de macrófagos, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. Este infiltrado localizava-se principalmente ao redor

de anexos cutâneos, com aumento de marginação leucocitária em vasos. Observou-se também hiperqueratose em parte das peles avaliadas e distinção dos amastigotas em 50% dos casos.

O rim foi importante sítio de lesões, com presença de nefrite intersticial crônica multifocal com intensidade variável, composta por infiltrado linfo-plasmocítico, predominantemente, em 78,57% dos casos. Ainda, 50% dos cães exibiram glomerulonefrite membrano-proliferativa, com espessamento segmentar a global de cápsula de Bowmann, afetando principalmente folheto parietal.

Os linfonodos apresentaram hiperplasia linfóide pronunciada, principalmente de região paracortical (71,43%). Frequentemente, os seios medulares estavam repletos por infiltrado de plasmócitos, com muitas células de Mott em alguns casos, e histiócitos, por vezes repletos de hemossiderina. A cápsula do linfonodo apresentava-se espessa, com infiltração de linfócitos dispersa.

Nove casos (64,29%) apresentaram pneumonia intersticial septal, com infiltrado de linfócitos, plasmócitos e neutrófilos, com reatividade e hiperplasia de BALT. Ainda, observou-se miocardite crônica, rendilhamento de cardiomiócitos e aumento da circulação de neutrófilos. Lesões musculares como miosites mononucleares, mionecrose e fibroses também são descritas. Alterações oftalmológicas com infiltrado inflamatório em conjuntiva, limbo, corpo ciliar, íris, córnea e esclera também são bastante frequentes. Ao contrário dos relatos de meningoencefalite, vasculites e mielites no sistema nervoso central, que são raros.

Os cães apresentam frequentemente lesões cutâneas associadas a LVA. Essas lesões são caracterizadas por dermatite granulomatosa, piogranulomatosa ou plasmocítica com padrão perivascular, perifolicular ou intersticial, superficial ou profunda, nodular a difusa. Úlceras, hiperqueratose ortoqueratótica, queratose folicular, hiperplasia e acantose epidérmica com exocitose leucocitária também podem ser observadas.

Alterações em medula óssea são frequentes em humanos e cães, sendo caracterizadas por aumento na quantidade de macrófagos, com frequente parasitismo. Hipocelularidade granulocítica, com bloqueio de promielócitos, e eritrocítica relativa são frequentes².

As colorações histoquímicas de Giemsa (mistura de azul de metileno, eosina e Azur B) e de Leishman (que emprega metanol, azul de metileno e

eosina) podem evidenciar os parasitas no interior dos macrófagos e facilitar o diagnóstico microscópico.

Imunocitoquímica e imuno-histoquímica

A imunocitoquímica e a imuno-histoquímica consistem em reações específicas de pesquisa de antígenos teciduais ou celulares através de anticorpos conjugados com substâncias que permitam reação cromogênica e avaliação por microscopia óptica. Ambos os métodos são semelhantes tecnicamente, diferindo apenas na amostra em que a técnica será aplicada: a primeira em amostras citológicas e a segunda em histológicas.

Para leishmaniose, ambas são utilizadas em conjunto com a avaliação histológica ou do esfregaço, permitindo a confirmação etiológica de amastigotas suspeitas na avaliação por HE, além de evidenciar a presença dos mesmos quando são escassos.

Trata-se de método gênero específico, ou seja, não permite a distinção da espécie de *Leishmania* envolvida e permite a detecção das amastigotas com sensibilidade e especificidade de 60 a 70%⁸. A imuno-histoquímica oferece um aumento quantitativo na detecção da forma amastigota da *Leishmania* sp em diversos órgãos, bem como aumento de 50% de positividade na pele, quando comparada aos testes histopatológicos de rotina⁸, além de diminuir as reações cruzadas com outros tripanossomídeos.

Em estudo realizado por nosso grupo⁹, com avaliação necroscópica, histológica e imuno-histoquímica de 134 cães com LVC diagnosticada por métodos sorológicos, em Votuporanga, São Paulo, ficou demonstrado que a imuno-histoquímica dos órgãos obteve sensibilidade de 98,51% e especificidade de 100%. O principal órgão com positividade foi o baço, com detecção de amastigotas em 78,79% dos casos, seguido pelo linfonodo poplíteo⁹.

Ressaltamos a importância da avaliação conjunta de mais de um órgão, com especial atenção ao baço, linfonodo, fígado e pele com lesão, visto que a sensibilidade alta foi alcançada com a análise de múltiplas vísceras simultâneas. Também observamos que mesmo em tecidos sem alterações notáveis na macroscopia e sem distinção de amastigotas na avaliação do HE, a *Leishmania* pode ser detectada pela imuno-histoquímica. Isto, muitas vezes mostra, que as estruturas parasitárias podem ser obscurecidas pelo processo inflamatório ou a densidade parasitária sr

baixa, o que dificulta sua observação.

Em decorrência dos resultados positivos obtidos por este método, a imuno-histoquímica foi incluída no fluxograma ministerial¹ (Memorando 480/2013 CGDT/DEVIT/SVS-MS), para determinação do primeiro caso canino autóctone para leishmaniose visceral do município e desencadeamento de medidas de vigilância e controle.

Hibridização *in situ*

A Hibridização *in situ* (ISH) é uma técnica pela qual se identificam sequências específicas de nucleotídeos em células ou cortes histológicos. Devido à sua alta especificidade, a hibridização *in situ* também tem sido utilizada para o diagnóstico da LVC em tecidos de biópsia fixados em formalina e emblocados em parafina^{10,11}. Já foi descrito na literatura que a ISH apresenta desempenho comparável¹⁰ ou superior¹² ao da IHQ no diagnóstico da LVC. Além disso, ao contrário do que ocorre na histopatologia e na IHQ, a ISH permite discriminar a *Leishmania* (*L.*) *infantum* (syn. *chagasi*) das outras espécies de *Leishmania*¹⁰.

Essa metodologia também pode ser utilizada em alternativa aos métodos de referência para a identificação das espécies de *Leishmania*, como a cultura parasitológica, seguida por eletroforese de enzima multilocus - MLEE, e reação em cadeia da polimerase - PCR). No entanto, a ISH é menos sensível apenas quando comparada com a essas técnicas aplicadas à amostras de pele congeladas e com alguns ensaios sorológicos. Estas metodologias também apresentam desvantagens em seu uso para o diagnóstico da LVC. A cultura parasitológica leva de 5 a 30 dias (em média 15 dias) para ser realizada e o número de centros de referência que utilizam a MLEE é restrito, sem levar em consideração a probabilidade de contaminação microbiológica, quando as amostras são coletadas em campo, sem condições adequadas de esterilidade. As desvantagens da PCR estão na falta de padronização entre os diferentes protocolos utilizados entre os laboratórios, a possibilidade de contaminação e no fato de que um resultado positivo não necessariamente indica infecção com *Leishmania* viva¹⁰. Por último, os ensaios sorológicos podem resultar em falsos-positivos devido à reações cruzadas com o soro de cães infectados com *L. brasiliensis*, *T. cruzi*, *T. caninum* e *Ehrlichia canis*¹³. De forma semelhante à PCR, um resultado positivo não necessariamente indica infecção

atual e não diferencia resultados positivos devido à reação vacinal¹⁰. Neste contexto, as principais vantagens da ISH sobre a cultura parasitológica, PCR, métodos sorológicos, no diagnóstico LVC está no fato de que ela possibilita a visualização simultânea dos amastigotas intactas no tecido preservado. A observação dos amastigotas possibilita correlacionar os parasitas com as lesões associadas e, também, semi-quantificar a carga parasitária^{10,11}.

Outras técnicas moleculares

Diversas outras técnicas moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou em tempo real, MLEE, nested-PCR, amplificação aleatória do ácido desoxirribonucleico (DNA) polimórfico, sequenciamento convencional ou em larga escala, entre outras, podem ser aplicadas em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina para o diagnóstico e tipificação de casos suspeitos para infecção por *Leishmania* spp.

A etapa crucial para a aplicação de tais técnicas é a extração do material genético. Nesse sentido, a utilização de tecidos parafinados para as análises moleculares possui alguns pontos críticos que podem influenciar no sucesso das amplificações posteriores, devido ao processamento histológico do material. Dentre essas etapas podemos citar o tempo de pré-fixação (tempo decorrido entre a coleta do tecido e o início da fixação), tempo e tipo de fixador utilizado, necessidade de descalcificação, tempo e temperatura do processamento histológico. Por isso, é necessário um protocolo de extração específico de macromoléculas de amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, visando um melhor aproveitamento do processo para obtenção de material genético em boa quantidade e de boa qualidade¹⁴.

Dessa forma, as inovações tecnológicas e metodológicas dos últimos tempos criaram novas possibilidades de uso para os tecidos parafinados; além dos estudos histomorfológicos, histoquímicos e imuno-histoquímicos, essas amostras passaram a ser também fonte de material para a pesquisa e rotina diagnóstica através dos métodos em biologia molecular.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância e Saúde, Coordenação Geral de Doenças transmissíveis, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Memorando nº 480/2013 – CGDT/Devit/ SVS-MS. Algoritmo para confirmação de primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral canina. Brasília (DF): MS; 2013.
2. Laurenti, MD. Patologia e patogenia das Leishmanioses. [tese de livre-docência]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/livredocencia/10/tde-26112010-105228/es.php>
3. Fernandes NC, Guerra JM, Réssio RA, Wasques DG, Etlinger-Colonelli D, Lorente S et al. Liquid-based cytology and cell block immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples. *Vet Comp Oncol*. 2016; 14 Suppl 1:107-16. <http://dx.doi.org/10.1111/vco.12137>
4. Esteve LO, Saz SV, Hosein S, Solano-Gallego L. Histopathological findings and detection of Toll-like recepto 2 in cutaneous lesions of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2015;209(3-4):157-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.004>
5. Ikeda-Garcia FA, Marcondes M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. *Clin Vet*. 2007;12(71):34-42. Disponível em: <https://issuu.com/clinicavet/docs/clinica-veterinaria-n71>
6. Ciaramella P, Olivia G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*. 1997;141(21):539-43.
7. Oliveira J M, Fernandes AC, Dorval ME, Alves TP, Fernandes TD, Oshiro ET et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(2), 188-93. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000200016>

8. Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, de Melo MN, Michalik MS. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*;292(1-2):17-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2004.05.009>
9. Guerra JM, Fernandes NCC, Kimura LM, Shirata NK, Magno JA, Abrantes MF et al. Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2016;75:1686. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/rial/10/rial75_completa/artigos-separados/1686.pdf
10. Menezes RC, Figueiredo FB, Wise AG, Madeira MF, Oliveira RV, Schubach TM et al. Sensitivity and specificity of in situ hybridization for diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. *J Clin Microbiol*. 2013;51(1):206-11. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02123-12>
11. Dinhopf N, Mostegl MM, Richter B, Nedorost N, Maderner A, Fagner K et al. In situ hybridisation for the detection of *Leishmania* species in paraffin wax-embedded canine tissues using a digoxigenin-labelled oligonucleotide probe. *Vet. Rec*. 2011;169(20):525. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.d5462>
12. Furtado MC, Menezes RC, Kiupel M, Madeira MF, Oliveira RV, Langohr IM et al. Comparative study of in situ hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2015 Dec;8(1):620. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1224-4>
13. Barros JH, Almeida AB, Figueiredo FB, Sousa VR, Fagundes A, Pinto AG et al. Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(7):419-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.03.014>
14. Scorsato AP, Telles JEQ. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. *J Bras Patol Med Lab*. 2011;47(5):541-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442011000500008>



Leishmaniose canina: diagnóstico e manejo do reservatório urbano

Canine leishmaniasis: diagnosis and management of the urban reservoir

RIALA6/1763

Filipe DANTAS-TORRES^{1,2*}

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Avenida Professor Moraes Rego s/n, Recife, Brasil, CEP: 50740-465. Tel: +55 81 2123 7826. E-mail: filipe.dantas@cpqam.fiocruz.br

²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Bari, Valenzano, Itália

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

RESUMO

A leishmaniose canina é uma doença multifacetada, causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos por várias espécies de flebotomíneos, em diferentes tipos de ambiente. A leishmaniose tem um impacto psicossocial e socioeconômico considerável em áreas endêmicas no Brasil, onde as populações mais afetadas já são historicamente castigadas por outros males e condicionantes do processo saúde-doença, como a própria pobreza e má-nutrição. Diante desse contexto, a leishmaniose canina deixou, há muito tempo, de ser um “problema veterinário” e passou a ser uma questão de saúde pública. Nos últimos anos, vários avanços foram alcançados no que diz respeito a leishmaniose canina. No presente artigo, alguns aspectos relacionados ao diagnóstico e manejo de cães infectados por *Leishmania infantum*, sejam esses sadios ou doentes, são discutidos. É preciso utilizar de forma correta os testes diagnósticos disponíveis e interpretar os resultados à luz dos achados clínicos. Uma vez que o diagnóstico de leishmaniose canina for confirmado, veterinários e profissionais da saúde pública devem considerar todas as opções disponíveis antes de decidir qual a melhor estratégia a ser adotada em cada caso individual. Por fim, o uso de produtos à base de piretróides permanece como a principal medida de prevenção a ser adotada em cães em áreas endêmicas.

Palavras-chave. leishmaniose, cães, diagnóstico, tratamento, prevenção.

ABSTRACT

Canine leishmaniasis is a multifaceted disease, caused by several species of *Leishmania*, transmitted by several species of sand flies, in different types of environment. Leishmaniasis has a considerable psychosocial and socioeconomic impact in endemic areas in Brazil, where the most affected populations are historically punished by other ills and conditioners of the health-disease process, such as poverty and malnutrition. In this context, canine leishmaniasis has long been a “veterinary problem” and has become a public health issue. In recent years, several advances have been achieved with regard to canine leishmaniasis. In this article, some aspects related to the diagnosis and management of dogs infected with *Leishmania infantum*, whether healthy or sick, are discussed. It is important to use available diagnostic tests in a correct way and to interpret results in light of clinical findings. Once the diagnosis of canine leishmaniasis is confirmed, veterinarians and public health professionals should consider all the options available before deciding on the best strategy to adopt in each individual case. Finally, prevention of infection through the use of pyrethroid-based products remains the main measure to be adopted in uninfected dogs in endemic areas.

Keywords. leishmaniasis, dogs, diagnosis, treatment, prevention.

INTRODUÇÃO

Há muito tempo, antes mesmo de o cão se tornar o melhor amigo do homem (ou, atualmente, um membro da família), vivíamos em ambientes naturais, nas florestas tropicais que cobriam o Brasil, de norte a sul, de leste a oeste. Nessa época, não existiam áreas rurais, não existiam cidades. Os ciclos enzoóticos de protozoários do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) ocorriam exclusivamente nesses ambientes naturais, com a participação de mamíferos silvestres como hospedeiros, incluindo pequenos roedores, marsupiais, quatis, tatus, bichos-preguiça, primatas não humanos, entre outros¹.

Com a chegada dos colonizadores europeus e, de forma mais intensa, após a revolução industrial, o território brasileiro foi completamente transformado. Por exemplo, a floresta atlântica brasileira foi praticamente dizimada, restando atualmente menos de 10% da sua cobertura original². Os ambientes naturais foram transformados em áreas rurais, caracterizadas por habitações humanas esparsas, áreas de plantações e pastagens. Posteriormente, com o progresso, algumas dessas áreas foram transformadas em urbanas. De fato, muitas das grandes cidades brasileiras (por exemplo, Rio de Janeiro, São Paulo e Recife) foram construídas em áreas de influência da mata atlântica.

Em ambientes modificados pelo homem, insetos vetores de agentes infecciosos encontram abrigo e alimento. Por exemplo, várias espécies de flebotômíneos vetores de *Leishmania* spp. se adaptaram a viver ao redor ou mesmo dentro de habitações humanas. Nesses ambientes, os animais domésticos podem servir como fonte alimentar e eventualmente como fonte dos parasitos para os flebotômíneos vetores. Em particular, o cão doméstico é um animal bastante susceptível a várias espécies de *Leishmania*, incluindo *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*³.

Na América do Sul, a leishmaniose canina é uma doença multifacetada, causada por várias espécies de *Leishmania* e, conseqüentemente, com aspectos clínico-epidemiológicos variados³. Por exemplo, os aspectos clínicos da leishmaniose canina nessa região também podem variar desde pequenas úlceras cutâneas localizadas (como é o caso das lesões causadas por *L. braziliensis* e *Leishmania panamensis*), até quadros mais graves, sistêmicos que podem levar o animal a óbito como é o caso da leishmaniose visceral por *L. infantum*.

A leishmaniose tem um impacto psicossocial e socioeconômico considerável em áreas endêmicas no Brasil, onde as populações mais afetadas já são historicamente castigadas por outros males e condicionantes do processo saúde-doença, como a própria pobreza e má-nutrição. Diante desse contexto, a leishmaniose canina deixou, há muito tempo, de ser um “problema veterinário” e passou a ser uma questão de saúde pública. Nos últimos anos, vários avanços foram alcançados no que diz respeito a leishmaniose canina. No presente artigo, alguns aspectos relacionados ao diagnóstico e manejo de cães infectados por *L. infantum*, sejam esses sadios ou doentes, são discutidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse artigo foi elaborado a partir da transcrição da palestra “Diagnóstico e manejo do reservatório vivendo entre nós” proferida por mim, no simpósio internacional “Leishmaniose visceral: desafios para o controle no contexto da diversidade de cenários”, realizado nos dias 23 e 24 de abril de 2018, no Teatro da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Essa palestra foi baseada no artigo “*Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us*”⁴. O artigo de revisão em questão foi elaborado após consultas em diferentes bases de dados (*PubMed*, *Library of Congress*, *Web of Science*, *Scielo* e *Google Scholar*), sem critério de data. A pesquisa foi realizada com a utilização dos seguintes termos e suas associações: “*canine visceral leishmaniasis*”, “*leishmaniasis*”, “*diagnosis*”, “*molecular diagnostic methods*”, “*serology*”, “*treatment*”, “*xenodiagnosis*”, “*infectivity*”, “*prevention*”, “*control*”, “*dog culling*” e “*vaccination*”. A seleção dos artigos foi baseada na informação específica fornecida em cada artigo que seria relevante para os temas abordados na revisão: diagnóstico e manejo da leishmaniose canina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diagnóstico da leishmaniose canina

Diretrizes para o diagnóstico da leishmaniose canina estão disponíveis na literatura internacional⁵. Contudo, um dos principais problemas relacionados ao manejo de um cão infectado por *L. infantum* é exatamente como comprovar que se trata de uma infecção ativa (exposição versus infecção) e se se trata de uma infecção “assintomática” ou “sintomática”

(infectado sadio versus infectado doente). Muitos cães soropositivos, na verdade, foram expostos ao parasito, mas não apresentam infecção ativa. Similarmente, cães aparentemente “assintomáticos” podem apresentar alterações laboratoriais que, muitas vezes, não são investigadas durante a rotina diagnóstica, seja no âmbito privado ou da saúde pública.

No Brasil, o diagnóstico oficial preconizado pelo Ministério da Saúde inclui dois testes sorológicos. Os cães são triados pelo teste rápido DPP LVC (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) e, se positivos, pelo ensaio imunoenzimático EIE LVC (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), teste confirmatório. Porém, o diagnóstico sorológico apresenta várias limitações. De fato, resultados negativos não excluem a infecção (alguns animais são soronegativos, mas PCR positivos) e resultados positivos não confirmam infecção ativa (apenas exposição ao parasito). Um dos problemas relacionados aos testes sorológicos é a janela imunológica, ou seja, o tempo decorrido da infecção até a produção de anticorpos detectáveis, que pode durar de poucas a várias semanas. Testes sorológicos quantitativos e semi-quantitativos são mais informativos que testes qualitativos (isto é, positivo versus negativo). Títulos altos de anticorpos geralmente indicam infecção ativa e estão associados a presença de sinais clínicos, alterações hematológicas e/ou bioquímicas.

Existem vários testes sorológicos atualmente disponíveis (por exemplo, reação de imunofluorescência indireta, ensaio de imunoabsorção enzimática, teste de aglutinação direta, teste de aglutinação rápida e citometria de fluxo), utilizando diversos antígenos com sensibilidade e especificidade diferentes. Alguns desses testes foram padronizados para uso em campo, com amostras de soro ou sangue total⁴.

De fato, tem-se defendido o uso de testes rápidos que possam ser realizados no campo. Esses testes apresentam as vantagens de serem de fácil execução, rápidos e não necessitam de aparelhos sofisticados. Desvantagens incluem a baixa sensibilidade e especificidade, sobretudo em cães com baixos títulos de anticorpos. Um estudo recente comparou o teste oficial DPP LVC com dois testes comercialmente disponíveis no Brasil⁶. Um dos testes comerciais apresentou uma concordância de apenas 74% com o DPP LVC. Isso significa que mais de 25% dos animais testados por esse teste comercial podem apresentar resultados falso-

negativos. Resultados falsos negativos ou positivos são um problema grave em se tratando de leishmaniose canina, uma vez que o erro diagnóstico pode levar a sérias consequências, desde a permanência de um animal infectado sem manejo, até eutanásia indevida de um animal não infectado.

O diagnóstico molecular da infecção por *Leishmania* spp. em animais e humanos tem evoluído consideravelmente. Existem vários protocolos disponíveis na literatura com sensibilidade analítica elevada, ou seja, capazes de detectar quantidades de DNA equivalentes a menos de um parasito por reação. Diversos alvos genéticos têm sido utilizados, sendo o DNA do cinetoplasto (kDNA) um dos alvos mais usados, especialmente os minicírculos que estão presentes em grande quantidade (10 mil cópias por parasito), favorecendo a sensibilidade do teste em vários tipos de amostras.

Vários tipos de amostras têm sido empregadas para o diagnóstico molecular da infecção por *Leishmania* spp. em cães. Amostras como medula óssea, baço e linfonodos geralmente contêm uma quantidade maior de parasitos. O sangue não é a amostra mais indicada, porém é a mais acessível, sobretudo em condições de campo e em estudos epidemiológicos. Logo, é importante o desenvolvimento de testes moleculares mais sensíveis, capazes de detectar pequenas quantidades de DNA de *Leishmania* spp. nesse tipo de amostra. Testes moleculares com DNA extraído de amostras de pele podem apresentar resultados variados, mas muitas vezes satisfatórios pois muitos animais com infecção ativa apresentam parasitismo cutâneo elevado⁷. Outras amostras não invasivas incluem *swab* conjuntival e urina.

Um das questões presentes atualmente na literatura e entre pesquisadores é o desenvolvimento de testes moleculares mais econômicos e que possam ser utilizados em condições ambulatoriais ou de campo. Recentemente, otimizamos um protocolo de PCR em tempo real para detecção de *Leishmania* em aproximadamente 34 minutos, utilizando um baixo volume final de reação⁸. Com isso, reduzimos os custos e o tempo necessário para obtenção dos resultados. Contudo, testes como esse ainda requerem a utilização de aparelhos sofisticados e condições de laboratório adequadas. Testes moleculares de uso remoto têm sido propostos, mais ainda apresentam uma baixa sensibilidade em comparação com os testes moleculares utilizados em condições de laboratório⁹.

Manejo do reservatório urbano

A eutanásia de cães infectados tem sido empregada como medida de controle para leishmaniose visceral no Brasil, sendo uma das principais estratégias recomendadas pelo Ministério da Saúde. Atualmente, existe muita resistência contra essa medida, não apenas por razões éticas, mas principalmente por questões científicas¹⁰. Revisões sistemáticas de estudos avaliando o efeito da eutanásia na incidência da leishmaniose visceral humana concluíram que não existem estudos, com desenho experimental adequado, livres de vieses, que comprovem a eficácia de tal medida^{11,12}. Ademais, atualmente existe uma miríade de estratégias alternativas de controle e prevenção como, por exemplo, o uso de repelentes a base de piretróides, imunomoduladores, vacinas e até mesmo o tratamento de animais doentes^{5,13,14}.

Estudos demonstraram que o tratamento de animais com leishmaniose visceral reduz a infecciosidade, ou seja, a capacidade desse animal servir como fonte de infecção para os flebotomíneos vetores⁴. Em um trabalho apresentado recentemente no Congresso Mundial de Leishmaniose em Toledo, na Espanha, demonstrou-se uma redução de 74,2% na infecciosidade de cães tratados com miltefosina¹⁵, droga atualmente licenciada para o tratamento da leishmaniose visceral canina no Brasil. Porém, é imperativo enfatizar que esse não é o objetivo do tratamento. O tratamento tem por objetivo curar clinicamente o animal enfermo, ou seja, não é uma medida de saúde pública, mas sim uma medida individual. Todos os animais em tratamento precisam estar protegidos com repelentes à base de piretróides, a fim de reduzir o risco de reinfecção e o risco para outros animais e pessoas.

CONCLUSÃO

Muitos avanços foram obtidos nos últimos anos no que se refere ao diagnóstico e manejo de cães infectados por *Leishmania* spp., inclusive no tratamento da leishmaniose canina. Contudo, a prevenção continua sendo, sem dúvidas, a melhor opção. Estudos de laboratório e de campo comprovam que o uso de repelentes à base de piretróides constitui a medida mais eficaz na prevenção da infecção por *L. infantum* em cães^{4,5,13}.

A eutanásia em massa tem sido paulatinamente abandonada como medida de controle e substituída

por estratégias mais eficazes e éticas. Contudo, a eutanásia permanecerá como uma opção individual, em casos específicos. Por exemplo, em cães com doença terminal, prognóstico desfavorável, em sofrimento, sem possibilidades de tratamento, a eutanásia pode ser uma opção a ser considerada. Certamente, a eutanásia deve seguir rigorosamente as normas vigentes e ser executada ou supervisionada por um médico veterinário.

Por fim, é importante salientar que o impacto negativo de doenças negligenciadas como as leishmanioses só será efetivamente reduzido quando essas deixarem de ser negligenciadas. Essas doenças deixarão de constituir um grave problema de saúde pública quando as populações sob risco tiverem acesso à melhores condições de moradia, em um ambiente menos degradado e com saneamento básico, melhor nutrição, educação de qualidade e amplo acesso aos serviços básicos de saúde. Sem isso, essas populações estarão destinadas a conviverem com parasitos letais e seus vetores.

AGRADECIMENTOS

Obrigado a Kamila Gaudêncio da Silva Sales (Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE, Brasil) por ajudar na transcrição da palestra “Diagnóstico e manejo do reservatório vivendo entre nós” proferida no simpósio internacional “Leishmaniose visceral: desafios para o controle no contexto da diversidade de cenários”, realizado nos dias 23 e 24 de abril de 2018, no Teatro da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

REFERENCIAS

1. Maia C, Dantas-Torres F, Campino L. Parasite biology: The reservoir hosts. In: Bruschi F, Gradoni L. (editors) *The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases*. Springer, Cham; 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_4
2. Haddad NM, Brudvig LA, Clobert J, Davies KF, Gonzalez A, Holt RD et al. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Sci Adv*. 2015;1(2):e1500052. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.1500052>

3. Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors*. 2009;2 Suppl 1:S1. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S1>
4. Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(1):e0006082. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>
5. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*. 2011;4:86. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
6. Dantas-Torres F, Sales KGS, da Silva LG, Otranto D, Figueredo LA. Level of agreement between two commercially available rapid serological tests and the official screening test used to detect *Leishmania* seropositive dogs in Brazil. *Vet J*. 2018;234:102-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.02.007>
7. Courtenay O, Carson C, Calvo-Bado L, Garcez LM, Quinnell RJ. Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):e2583. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002583>
8. Dantas-Torres F, da Silva Sales KG, Gomes da Silva L, Otranto D, Figueredo LA. *Leishmania*-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. *Mol Cell Probes*. 2017;31:65-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2016.08.006>
9. Selder R, Weber K, Bergmann M, Geisweid K, Hartmann K. Sensitivity and specificity of an in-clinic point-of-care PCR test for the diagnosis of canine leishmaniasis. *Vet J*. 2018;232:46-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.12.006>
10. Dantas-Torres F, Miró G, Bowman DD, Gradoni L, Otranto D. Culling dogs for zoonotic visceral leishmaniasis control: the wind of change. *Trends Parasitol*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.005>
11. Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(1):e584. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>
12. González U, Pinart M, Sinclair D, Firooz A, Enk C, Vélez ID et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(8):CD008736. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD008736.pub2>
13. Wylie CE, Carbonell-Antonanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally occurring canine leishmaniosis. Part II: topically applied insecticide treatments and prophylactic medications. *Prev Vet Med*. 2014a;117(1):19-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.06.016>
14. Wylie CE, Carbonell-Antonanzas M, Aiassa E, Dhollander S, Zagmutt FJ, Brodbelt DC et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: vaccinations. *Prev Vet Med*. 2014b;117(1):7-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.06.015>
15. De Mari K AV, Nogueira FS, Menz I, Moreira MABM, Chioccola VLP, Hiramoto R et al. Evaluation of the potential of infectivity of dogs with visceral leishmaniasis and treated with miltefosine by using a xenodiagnosis. 6th World Congress on Leishmaniasis (2017), Toledo, Spain 16–19th May.



Avaliação da efetividade do uso de coleiras impregnadas com deltametrina no controle da leishmaniose visceral no município de Votuporanga, Estado de São Paulo, Brasil, 2014 – 2016

Evaluation of the effectiveness of using deltamethrin-impregnated collars to control visceral leishmaniasis in the municipality of Votuporanga, State of São Paulo, Brazil, 2014 – 2016

RIALA6/1764

José Eduardo TOLEZANO^{1*}, Patrícia Sayuri Silvestre MATSUMOTO^{1,2}, Helena Hilomi TANIGUCHI¹, Denise Maria Bussoni BERTOLLO³, Marcella Kelvya PIERRE³, José Eduardo de Raefray BARBOSA⁴, Juliana Mariotti GUERRA¹, Natália Coelho Couto de Azevedo FERNANDES¹, Ernesto Machado de FIGUEIREDO⁵, Élcio Sanchez ESTEVES JUNIOR⁶, Samara Del Pino FERNANDES⁶, Roberto Carlos Grassi MALTA⁷, Raul Borges GUIMARÃES², Roberto Mitsuyoshi HIRAMOTO¹

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz. Avenida Doutor Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP:01246-000. Tel: +55 11 3068 2889. E-mail: jetolezano@gmail.com. ²Departamento de Geografia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista – Presidente Prudente, SP. ³Centro de Laboratório Regional do Instituto Adolfo Lutz – São José do Rio Preto, SP. ⁴Centro de Procedimentos Interdisciplinares do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, SP. ⁵Centro de Vigilância Epidemiológica “Alexandre Vranjac” – São Paulo, SP. ⁶Setor de Controle de Endemias e Zoonoses, Secretaria Municipal de Saúde – Votuporanga, SP. ⁷Centro Universitário de Votuporanga – Votuporanga, SP

Recebido: 17.09.2018 - Aceito para publicação: 28.12.2018

RESUMO

O objetivo deste artigo é apresentar os principais resultados do Projeto de Inovação Tecnológica em Saúde realizado entre 2014 e 2015, destacando-se o uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% em cães em uma região endêmica para leishmaniose visceral (LV), o município de Votuporanga, São Paulo, Brasil. Neste município, anterior à realização do projeto, eram registrados muitos casos caninos e humanos da doença, com elevada taxa de letalidade. Durante o projeto, foram monitorados cerca de 16,5 mil cães, examinadas 25.700 amostras de sangue, considerando-se as perdas e as entradas de novos animais durante os quatro inquéritos sorológicos. Após sua finalização, verificou-se uma diminuição da prevalência e incidência de LV canina, assim como do número de casos humanos. A diminuição dos casos caninos foi correlacionada positivamente aos casos humanos no período de 2011 a 2016 (Correlação de Pearson de 0.914, p -valor<0.05). Além disso, a análise espacial dos resultados corrobora a diminuição ou desaparecimento da concentração de casos caninos e, conseqüentemente, de fontes e de infecção nas áreas endêmicas à medida que avançaram no tempo e espaço as diferentes etapas de desenvolvimento do projeto. Apesar da drástica redução na incidência da LV canina, ainda permaneceram algumas áreas críticas. Os resultados delineados sugerem a revisão de protocolos e manuais demonstrando a efetividade do uso das coleiras como medida preventiva e potencial no controle da LV.

Palavras-chave. encoleiramento, leishmaniose visceral (LV), cães, análise espacial.

ABSTRACT

This paper aims to present the main results of the Health Technology Innovation Project carried out between 2014 and 2015, which evaluates the use of 4% deltamethrin-impregnated collars in dogs, in an endemic region for visceral leishmaniasis (VL), the municipality of Votuporanga, São Paulo, Brazil. Before this project, Votuporanga had notified canine and human cases of the disease, with a high case fatality rate. We monitored approximately 16.5 thousand dogs, 25,700 blood samples analyzed, considering losses and entrances of new animals during the four serological surveys. After the project, the prevalence and incidence of canine VL decreased as well as the number of human cases. We found a positive correlation between the decrease of infected dogs and human cases from 2011 to 2016 (Pearson correlation of 0.914, p -value <0.05). Furthermore, the spatial analysis of the results indicated areas with canine cases concentration that decreased its intensity or disappeared concomitantly to the project levels in the space-time. Despite the drastic reduction in the incidence of canine VL, some critical areas remain. The current results suggest the review of protocols and manuals demonstrating the effectiveness of the use of collars as a preventive measure and potential in the control of VL.

Keywords. collars, visceral leishmaniasis (VL), dogs, spatial analysis.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa grave e fatal quando não detectada e tratada em tempo oportuno. Nas Américas, a LV está presente em 12 países desde o sul da América do Norte até o Sul da América do Sul. No período de 2001 a 2018 foram registrados 63.331 casos novos, com média anual de 3.518 casos. No período de 2012 a 2018 o Brasil contribuiu com a produção de 23.545 (96,0%) dos casos de LV das Américas e uma incidência entre 4,09 e 5,23 por 100.000 habitantes¹.

No Brasil, o perfil epidemiológico da LV modificou-se de uma endemia tipicamente rural de algumas regiões do Nordeste para uma doença de áreas urbanas e periurbanas, endêmica em 23 estados do País². No Estado de São Paulo, a autoctonia da LV humana foi registrada pela primeira vez em 1999 no município de Araçatuba³. Desde então, a doença está confirmada como de transmissão autóctone em 103 (16,0%) dos 645 municípios paulistas. A LV canina é autóctone em 175 (27,1%) municípios, havendo outros 23 (3,6%) em processo de investigação. O vetor *Lutzomyia longipalpis* está presente em 202 municípios (31,3%)⁴.

O município de Votuporanga está localizado na região de São José do Rio Preto, a Noroeste do estado de São Paulo, endêmico para LV. Casos da doença são relativamente recentes, tendo sido notificados na região pela primeira vez em 2007, no município de Jales. Em Votuporanga, tanto a LV canina quanto a humana são reconhecidas como de transmissão autóctone desde 2010 e 2011, respectivamente. Desde então, o município destacou-se pelas elevadas taxas de prevalência canina e incidência humana, com altas taxas de letalidade. Em 2013 o município foi classificado como de transmissão intensa no triênio de 2011 a 2013, com notificação de 56 casos humanos, aproximadamente 9,9% de todos os casos de LV notificados no Estado de São Paulo. Foram registrados dez óbitos, equivalente a 22,2% do total de óbitos no Estado para esse triênio⁵.

Em relação à LV canina, para uma população estimada de aproximadamente 16.000 cães, considerando-se o inquérito sorológico realizado em 2011⁶, foi identificada prevalência de 20,6% (613 cães/2.981 examinados). Cabe destacar que ao final desse inquérito o Setor de Controle de Endemias e

Zoonoses – SECEZ da Secretaria Municipal de Saúde de Votuporanga - alcançou mais de 96% (591/613) de taxa de recolhimento e eutanásia entre os animais soropositivos. Nada obstante, em 2012, num inquérito de maior abrangência, a prevalência canina alcançou 19,6% (1.793/9152), o que confirmou a elevada incidência tanto para a LV canina quanto para a LV humana.

Diante deste cenário, Votuporanga tornou-se objeto de estudo para avaliar a efetividade do uso de coleiras impregnadas com deltametrina a 4% no controle da LV canina, a evolução da prevalência e da incidência da infecção natural por *Leishmania* entre os animais, bem como as repercussões na LV humana no município de Votuporanga, na região de São José do Rio Preto, Estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Votuporanga está localizado a Noroeste do Estado de São Paulo, a 20° 25' 22" de latitude Sul e 49° 58' 22" de longitude Oeste (**Figura 1**). O município possui altitude média de 525 m e uma área de 422.9 km², distando 525 km da capital do Estado, São Paulo. Em 2018 a população foi estimada em 93.736 habitantes⁷.

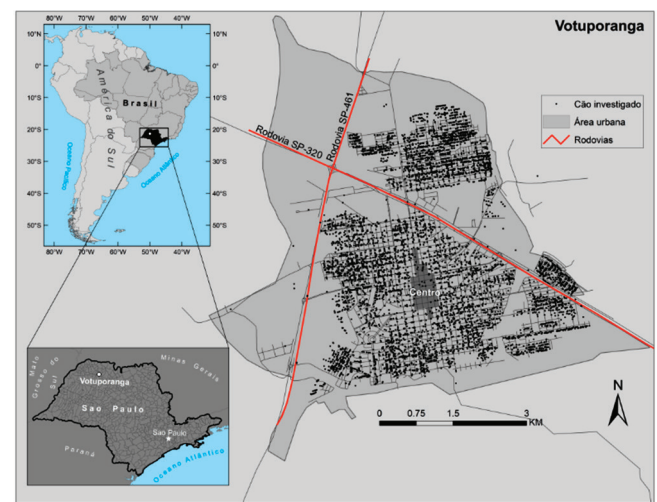


Figura 1. Localização da área de estudo

O projeto foi financiado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) a partir da aprovação no Edital Chamamento

de Pesquisa 20/2013 na Linha Temática Estudos e Pesquisas Aplicadas à Vigilância em Saúde, coordenado pelo Instituto Adolfo Lutz; contou ainda com fomento da FAPESP processo 2014/27070-1, sendo realizado em parceria com a Secretaria Municipal de Saúde de Votuporanga (SECEZ), da Universidade Estadual Paulista (FTC/UNESP), campus de Presidente Prudente e do Centro Universitário de Votuporanga (UNIFEV). Desde a construção do projeto houve suporte dos gestores municipais que disponibilizaram os serviços de comunicação da Prefeitura Municipal para ampla divulgação entre as diferentes mídias locais e regionais.

Anteriormente ao início deste projeto e, considerando as elevadas taxas das incidências canina e humana, foram definidas três premissas: **a)** A necessidade de oferecimento de participação no estudo para todos os cães de todas as regiões do município; **b)** Todos os trabalhos em campo para os ensaios de proteção com as coleiras com deltametrina e as coletas de sangue dos cães para os inquéritos sorológicos seriam realizados semestralmente e, em períodos de, no máximo, oito semanas; **c)** Adoção da estratégia de postos fixos localizados em diferentes bairros que seriam alternados cada semana.

Para a avaliação da efetividade do uso das coleiras impregnadas com deltametrina (4%) no controle da LV foram realizados quatro ensaios de colocação ou troca das coleiras, que ocorreram simultaneamente aos inquéritos sorológicos e abrangeram toda a extensão territorial da cidade. O estudo incluiu cerca de 16,5 mil cães que foram encoleirados e examinados etapa a etapa. Foram utilizadas coleiras Scalibor® MSD, todas adquiridas e fornecidas pela SVS/MS.

Durante a execução do encoleiramento ou da troca das coleiras, os cães foram examinados segundo o mesmo protocolo e algoritmo definido pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV)⁸, preconizado pelo MS.

O sangue de todos os cães incluídos em cada ensaio experimental foi examinado por dois testes diagnósticos. O primeiro exame laboratorial consistiu de um teste imunocromatográfico com antígeno recombinante rK28 - denominado DPP (Dual Path Platform) BioManguinhos®, com vistas à identificação dos animais não reagentes, considerados nos termos do PVCLV, não infectados.

Portanto, frente a um resultado não reagente no teste DPP, o exame foi considerado concluído.

Para os cães com resultado reagente no DPP, foi realizado o exame confirmatório, um teste de Ensaio imunoenzimático (ELISA/EIE) leishmaniose visceral canina BioManguinhos®. O animal com resultado reagente nos dois testes foi considerado infectado. Casos de discordância entre o teste de triagem e o confirmatório indicaram necessidade de repetição na coleta de amostra de sangue e novos exames.

A primeira etapa foi realizada entre fevereiro e março de 2014, a segunda entre setembro e outubro de 2014, a terceira entre março e maio de 2015 e a quarta entre julho e agosto de 2015. Cada etapa consistiu em registro de dados cadastrais, inquérito sorológico e o encoleiramento dos cães participantes. Os dados foram armazenados em uma plataforma digital nomeada “SAMUEL PESSOA”, em que contém os dados do animal, espécie, dados do proprietário do animal, data da coleta, exames diagnósticos, entre outros.

Análise estatística e espacial

Partiu-se do pressuposto segundo o qual os casos humanos de LV (y) variam em função dos casos caninos (x) no município de Votuporanga, São Paulo, Brasil. Dessa forma, a correlação entre essas variáveis foi testada pela técnica de Correlação de Pearson. Os casos foram testados no período de 2011 a 2016, considerando-se um valor de significância de p -valor < 0,05. Os dados foram analisados no Minitab 16.1.0.

Para a análise espacial⁹ dos casos de LV canina, foram utilizadas metodologias de geoprocessamento, baseadas nos Sistemas de Informação Geográfica (SIG) e na modelagem espacial, com técnicas de estatística espacial, geoestatística e simulação gaussiana sequencial^{9,10}.

Foram mapeados os endereços dos cães que participaram do projeto em quaisquer das etapas, destacando-se os casos caninos e sua concentração no espaço. Os dados foram espacialmente referenciados pela técnica de geocodificação de endereços do Google Fusion Tables <www.google.com>. Os dados mapeados foram transformados para estruturas kml e então para shp para serem manipulados no ArcGIS10.3 <www.img.com.br>.

A modelagem espacial 3D foi realizada utilizando técnicas de estatística espacial (Estimador de Kernel⁹), de geoestatística e de simulação gaussiana sequencial¹⁰, de acordo com a abordagem em que se considera a concentração dos casos e os transforma em uma matriz que, neste caso, teve quatro tempos distintos (ensaios), apresentados em um *grid continuum*¹¹. Essa metodologia parte de Mapas de Kernel que possibilitam identificar a densidade de casos por área¹². Os valores de concentração foram exportados de acordo com cada coordenada interpolada e, então, aplicou-se a krigagem, método da geoestatística¹⁰. Os dados foram ajustados em um semi-variograma utilizando um modelo teórico gaussiano. O mesmo modelo teórico criado também foi utilizado para gerar uma simulação gaussiana sequencial para prever os intervalos temporais antes, entre e após os ensaios. A modelagem foi elaborada no ArcGIS 10.3 e no software SGeMS < <http://sgems.sourceforge.net/> >.

RESULTADOS

De acordo com os inquéritos realizados foram examinados 16.373 cães, sendo que na primeira etapa foram 9.762 cães-amostras (59%) e nas demais 5.725, 5.757 e 4.459 amostras na segunda, terceira e quarta etapas, respectivamente. O total de amostras foi de 25.703, sendo que um mesmo cão pode ter participado das quatro etapas subsequencialmente, ou apenas de alguma(s) delas.

De 9.762 cães que participaram da primeira etapa, 3.294 (33,7%) permaneceram na segunda, denotando uma perda de 6.468 (66,2%) e uma entrada de 2.431 novos cães (42,4%). Da segunda para a terceira etapa, 2.457 (42,9%) cães permaneceram, houve uma perda de 3.268 (57%) e a entrada de 3.300 (57,3%) novos animais, e da terceira para a quarta etapa 1.957 (33,9%) cães continuaram, a perda foi de 3.800 (66%) e a entrada de 2502 (56,1%).

Considerando o total de amostras caninas ($n=25.703$, 100%), 2.432 (9,4%) foram reagentes para LV (triagem e confirmatória) e 23.271 (90,5%) foram não reagentes (triagem). Na primeira etapa, 1.259 foram reagentes (12,8%) e 8.442 não reagentes (86,4%), na segunda 549 reagentes (9,5%) e 4.923 não reagentes (85,9%), na terceira 378 reagentes (6,5%) e 5.101 não reagentes (88,6%) e; na quarta etapa 246 reagentes

(5,5%) e 4.031 não reagentes (90,4%) (**Gráfico**).

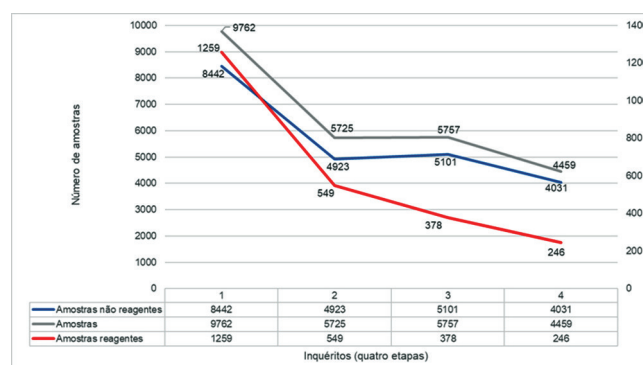


Gráfico. Número de amostras por etapas do projeto realizado em Votuporanga, São Paulo

Em termos de análise das taxas de prevalência e incidência da LV canina ao longo da realização do projeto, identifica-se uma situação anterior à realização do mesmo, outra quando o projeto estava sendo realizado e, ainda, outra após sua finalização, conforme o **Quadro**.

Quadro. Acompanhamento do projeto realizado no município de Votuporanga-SP, Brasil por etapas

Prevalência (%) Anterior ao Projeto	Incidência (%) Durante o projeto						Prevalência (%) Posterior ao Projeto
	1ª para 2ª (6 meses)	2ª para 3ª (6 meses)	3ª para 4ª (6 meses)	1ª para 3ª (12 meses)	2ª para 4ª (6 meses)	1ª para 4ª (12 meses)	
12.68	6.28	3.67	1.57	7.07	2.97	8.83	16.94

Não foi ambicionado neste projeto a redução da prevalência humana, contudo, verificou-se uma correlação positiva extremamente forte entre as variáveis *casos caninos* e *casos humanos* pela Correlação de Pearson (0,914, p -valor = 0,011), considerando uma significância estatística de 95%.

Para realização da análise espacial, foram mapeados 21.097 dados das amostras, ou seja, 82% do total investigado. A principal razão para a não localização foi a diferença entre a base coletada localmente e a base cartográfica de referência, devido a criação de novos loteamentos municipais que não tiveram suas bases atualizadas.

A análise espacial da modelagem desenvolvida nesta pesquisa é ilustrada na (**Figura 2**), em que se verifica a evolução espaço-temporal da concentração dos casos de LV canina como consequência das ações

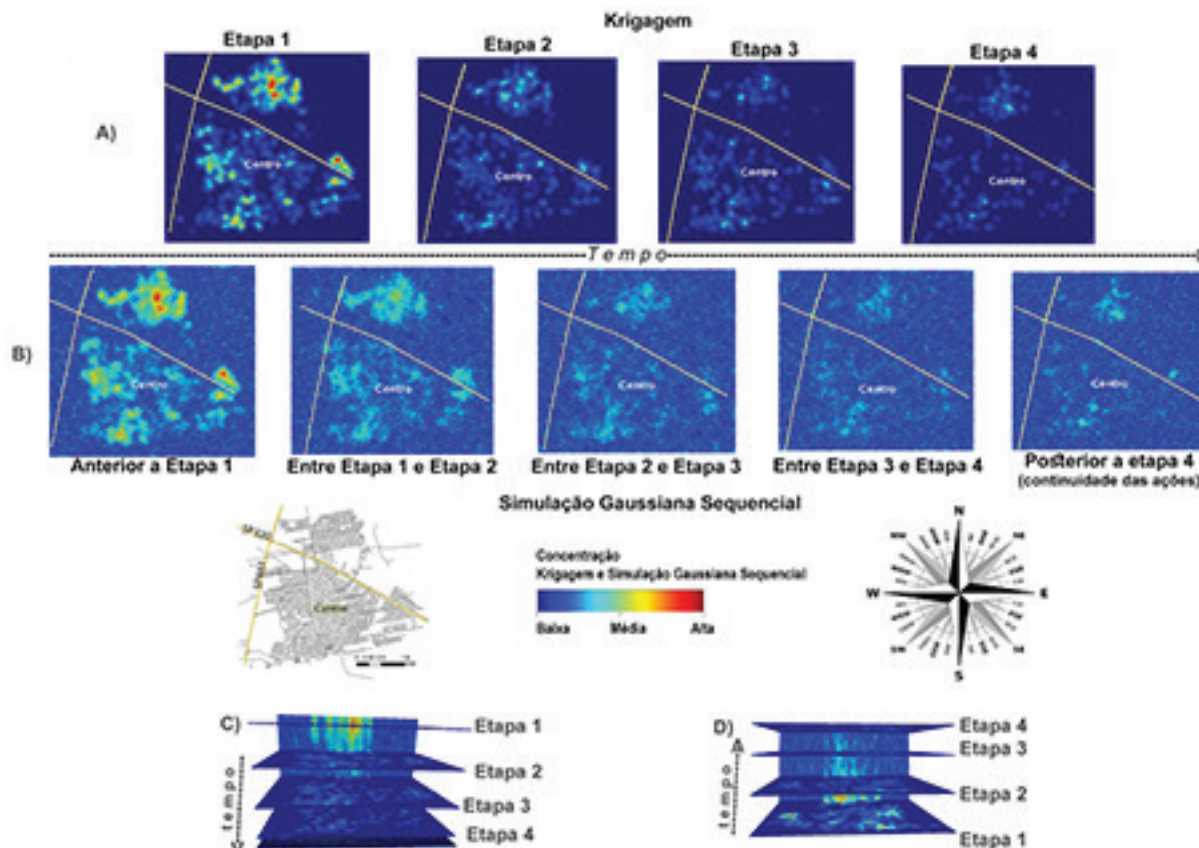


Figura 2. Modelagem espacial da concentração dos casos de LV canina no município de Votuporanga-SP, Brasil por etapas: **A)** Krigagem, **B)** Simulação gaussiana sequencial, **C)** Temporal da 1ª para a 4ª etapa e **D)** Temporal da 4ª para a 1ª etapa

realizadas no município de Votuporanga.

De acordo com a **Figura 2**, em **(A)**, na primeira etapa, identifica-se duas áreas quentes ao norte da rodovia e duas áreas médias ao sul. Da mesma forma, nas simulações anteriores ao projeto **(B)**, identifica-se essas quatro áreas de alta concentração e média que vão diminuindo suas intensidades, sendo suavizadas na quarta etapa. Em **(C)**, da primeira para a quarta etapa ou, visto de outro ângulo em **(D)**, da quarta para a primeira, verifica-se uma redução significativa das áreas de alta concentração (temporalmente) das primeiras etapas as últimas. As áreas de alta concentração desaparecem ao longo das etapas, enquanto que as de baixa permanecem sendo importantes áreas críticas a LV, necessitando de investigação contínua.

DISCUSSÃO

O PVCLV está centrado em algumas premissas que devem merecer prioritária atenção dos gestores

públicos nos três níveis de governo: federal, estadual e municipal. A correta implementação do PVCLV exige um esforço operacional de equipes técnicas de diferentes serviços, contemplando as áreas da saúde, educação, meio ambiente, planejamento, obras e do próprio gestor municipal, entendendo que as ações de vigilância e controle da LV necessitam de enfrentamento como uma verdadeira ação de Estado.

Nas últimas três décadas, de maneira crescente, essas estratégias têm sido questionadas e enfrentadas no âmbito das políticas públicas de defesa e proteção animal e na judicialização, especialmente para a ação relacionada ao controle dos reservatórios caninos, reconhecidos como a principal fonte de infecção no ambiente urbano^{13, 15}.

Dessa maneira, urge uma revisão das ações realizadas pelos programas de saúde pública, principalmente aquelas voltadas para os caninos, em que as coleiras impregnadas com inseticida têm representado uma alternativa adicional para o controle das leishmanioses. Em diferentes regiões

do mundo, essa medida tem demonstrado sua efetividade sobre os vetores e também tem indicado uma redução na incidência e nos riscos para cães¹⁵⁻²¹.

Especialmente no Brasil, diferentes pesquisadores têm apontado para a efetividade do uso de coleiras com deltametrina a 4% na redução da prevalência e incidência da LV canina. Brazuna²², em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, referiu a redução da ordem de 50% na prevalência. Kazimoto et al²³, em Mossoró, Rio Grande do Norte, associaram a redução entre 53 e 59% da incidência ao uso de coleiras com deltametrina. Ainda, Sevá et al²⁴, a partir de modelagem matemática, apontaram que o uso de coleiras com inseticida em 90% da população canina poderia reduzir a prevalência canina e reduzir também, a praticamente zero, a incidência de casos humanos.

No presente estudo, avaliou-se a efetividade da utilização de coleiras inseticidas no município de Votuporanga, São Paulo, Brasil. Possivelmente, tratou-se do primeiro estudo realizado no Brasil que incluiu uma quantidade de cães superior a 15 mil animais e mais de 25 mil amostras de sangue examinadas ao longo dos dois anos, acompanhando o cão a cada novo ensaio após seis meses.

Na mesma época da realização deste estudo, Alves et al²⁵ avaliaram as dificuldades no uso das coleiras com deltametrina em Montes Claros, Minas Gerais, onde foram incluídos um total de 4.388 cães identificados inicialmente como reagentes. Coura-Vital et al¹⁴, em Governador Valadares, Minas Gerais, avaliaram 3.796 cães de um total de 5.850 animais triados, os quais foram incluídos no estudo sobre a efetividade do encoleiramento na redução da incidência da infecção canina por *Leishmania infantum*. Silva et al¹⁵, em estudos sobre a efetividade das coleiras com deltametrina no controle de *Lutzomyia longipalpis* referem áreas dos municípios de Fortaleza, Ceará, e Montes Claros, Minas Gerais, onde, encontravam-se 5.000 cães encoleirados em cada município.

Em Votuporanga, também foi a primeira vez em que foi adotada a estratégia de prévia sensibilização dos tutores de cães através de diferentes tipos de mídias locais e regionais para adesão aos estudos propostos. A população deslocou-se semestralmente com seu animal até um dos postos fixos para a colocação ou troca da coleira e coleta de sangue para a realização do inquérito sorológico para diagnóstico

da LV canina, ao invés do inquérito realizado domicílio a domicílio, em que se deslocam as equipes de saúde. A opção pelo trabalho com postos fixos se justificou pela facilidade na operacionalização das coletas. Houve um trabalho de mídia e divulgação local que favoreceu a adesão da população para participar das ações realizadas no projeto.

Apesar do *n* considerável de animais que permaneceram em todas as etapas, identificou-se uma entrada significativa de novos animais a cada nova etapa, bem como a não continuidade de animais nas etapas subsequentes. Nesse sentido, é importante destacar a dificuldade operacional de se avaliar o uso de coleiras, visto que há perdas tanto da redução de animais que participam dos estudos, como das coleiras dos animais que continuam nos ensaios.

Alves et al²⁵ observaram perda de 36,7% dos animais que só participaram da primeira etapa do encoleiramento, 27% foram perdidos por sumiço, doação ou venda, e aproximadamente 23% foram perdidos no retorno da investigação (domicílio fechado)²⁵. Segundo estes autores, em um ano, a perda foi de 56,1%, aproximando-se dos resultados encontrados em Votuporanga, em que as perdas foram de 66%, 57% e 66% na primeira, segunda e terceira etapa, nesta ordem.

Assim como a perda dos animais ao longo das etapas analisadas, a entrada de novos animais nos domicílios tem sido referenciada como entraves às medidas de controle do reservatório da LV. A literatura tem apontado um aumento da população canina pela entrada de novos cães²⁶ e pela reposição canina²⁷, sendo estes últimos os animais que entraram no domicílio após a retirada de animais reagentes para LV. No estudo em Votuporanga, houve a inclusão de 2.431 novos cães (42,4%) na segunda etapa, 3.300 (57,3%) na terceira e 2.502 (56,1%) na quarta, corroborando os achados de Alves et al²⁵ e Wilke²⁶, próximos a 50%. Esses resultados demonstram a expressiva reposição e movimentação da população canina no município de Votuporanga, em que a cada seis meses, modificava-se quase que pela metade.

Entre perdas e entrada de novos animais a cada novo ensaio realizado em Votuporanga, destaca-se o quantitativo de cães que participaram da pesquisa. Neste estudo, as condições favoráveis para a inclusão uma grande quantidade de amostras realizadas em um curto período de tempo entre cada um dos

ensaios (n elevado), recobrando toda a extensão territorial da cidade, demonstram valores amostrais importantes para análises de significância estatística e mais fidedignos a realidade. A organização dos serviços locais, a disponibilidade de recursos materiais e financeiros e a escolha de se trabalhar com postos fixos foram fatores fundamentais para o êxito das coletas.

O **Gráfico 1** demonstra que o número de amostras, entre as reagentes e não reagentes, tiveram um padrão semelhante de crescimento e decréscimo ao longo das etapas. As amostras reagentes decresceram de 12%, para 9%, para 6% e, finalmente, para 5%, o que remete a compreensão de que se houvesse uma sustentabilidade das ações, poderia haver um decréscimo maior, aproximando-se de seu controle. De outro modo, as amostras soronegativas tiveram um aumento ao longo das etapas, exceto na primeira e segunda que mantiveram seus valores próximos a 86%, mas que nas demais aumentaram para 88% e 90% no terceiro e quarto ensaio, respectivamente.

Nesse sentido, verificou-se uma redução significativa das taxas de incidência da LV canina ao longo dos ensaios. Havia um cenário anterior à realização do projeto, outro durante e outro posterior (**Quadro**). No primeiro e terceiro cenário, considerou-se taxas de prevalência, uma vez que os mesmos cães não seguiram sendo monitorados. Anterior ao projeto, havia uma prevalência aproximada de 12,5% e, após a realização do mesmo, verifica-se taxa de cerca de 17%. Contudo, salienta-se que neste último cenário, os cães doentes (sintomáticos) foram advindos de demandas espontâneas, provavelmente cães oriundos do projeto, ou até de períodos anteriores, não eutanasiados, o que pode ter colaborado para a elevação das taxas de incidência.

No segundo cenário (**Quadro**), analisou-se quando o cão ficou com a coleira, sendo o recomendado pelo fabricante seis meses. Em cada um desses períodos, cronologicamente, destaca-se uma diminuição significativa das taxas de incidência, ou seja, os cães que participaram concomitantemente como não reagentes em uma etapa e que se soroconverteram em outra. No primeiro grupo de análise, nestas condições, de 3.132 cães considerados

soronegativos, 6,28% deles se soroconverteram em positivos; no segundo grupo, de 2.338 cães soronegativos, 3,67% soroconverteram; e no terceiro grupo, de 1.845 cães soronegativos, apenas 1,57% soroconverteram.

Além disso, houve outras condições que foram avaliadas, tais como cães que permaneceram 12 ou 18 meses ininterruptamente com a mesma coleira, por exemplo, quando os cães participaram do primeiro inquérito, não participaram do segundo e retornaram no terceiro (incidência de 7,07%); ou quando participaram do segundo, não participaram do terceiro, mas participaram do quarto (incidência de 2,97%). Nesta análise é preciso considerar que no primeiro inquérito houve uma retirada expressiva de cães notificados como reagentes (eutanásia em 63,7% ainda durante a primeira etapa), o que pode ter diminuído a força de infecção nessas áreas. Também houve aqueles que permaneceram 18 meses com as coleiras (incidência de 8,8%).

Dessa maneira, quando os cães seguiram o projeto no período recomendado para a troca de coleiras a cada seis meses, as taxas de incidência reduziram aproximadamente 42% e 57%, respectivamente, e que, quando os cães permaneceram mais tempo com as coleiras, as taxas se elevam substancialmente - para um período de 12 meses a taxa é de 12,58% e de 18 meses 40%, valores que se aproximam dos encontrados por Brazuna²² e Kazimoto et al²³.

Salienta-se que da primeira para a segunda etapa na investigação conduzida em Votuporanga, houve uma diminuição das equipes de coleta. Inicialmente eram quatro postos fixos e nas demais etapas dois. Houve uma redução das equipes de serviço, inquérito e eutanásia, mas ainda assim houve uma redução das amostras reagentes e aumento das não reagentes. Foi criado um conjunto de dados, com muitas variáveis que podem ser correlacionadas no tempo e no espaço, possibilitando muitas interpretações acerca dos processos de saúde e doença.

Por meio da análise espacial, percebeu-se que o projeto abrangeu todos os bairros da cidade de Votuporanga, incluindo alguns endereços rurais. A metodologia aqui aplicada permitiu uma análise espaço-temporal (x,y,z) dos casos caninos da doença (**Figura 2**), em que durante as quatro etapas

(cronologicamente), apontam áreas críticas que permaneceram sendo pontos expressivos a serem investigados, bem como algumas áreas que durante as etapas do projeto diminuíram sua intensidade e até mesmo desapareceram. Essa análise ofereceu subsídios para avaliar a efetividade do uso das coleiras segundo a diminuição das áreas críticas e também permitiu planejar as rotinas de serviços visando o controle da doença.

Além do uso da coleira, outras ações importantes foram realizadas em Votuporanga, tais como educação ambiental (nas escolas, mídia TV e rádio, etc.), tratamento químico nos locais onde houve casos humanos, eutanásia de cães identificados reagentes e o manejo ambiental, ações já executadas anteriormente ao projeto conforme recomenda o manual e o PVCLV.

Dessa forma, avalia-se que o uso das coleiras inseticidas foi importante não somente para a redução de casos caninos, mas também para redução dos casos humanos, como apresentado pela correlação extremamente forte (0.914, p -valor<0.01) entre eles, demonstrando um decréscimo cronológico. Margonari et al²⁸, em estudo em Belo Horizonte, Minas Gerais, descrevem que os casos humanos foram correlacionados aos casos caninos (significante), resultados corroborados em Votuporanga.

Nesse sentido, anterior a realização do projeto, Votuporanga era classificado pelo MS como de Transmissão Intensa (triênios com casos humanos >4,4)²⁹. Todavia, após o projeto, identificou-se uma redução expressiva desses valores: no triênio de 2013-2015 eram 14 casos, estes decaíram para 7,3 no triênio de 2014-2016 e para 4,3 no triênio de 2015-2017, possivelmente incluindo Votuporanga como município de Transmissão Moderada.

Enfim, os ensaios experimentais de proteção canina com as coleiras impregnadas com deltametrina a 4% apontam para a redução das taxas de incidência, prevalência e número de casos humanos (indiretamente) na realidade da cidade de Votuporanga, assim como os estudos de Mazloumi et al²¹ relativos à redução na incidência da LV em crianças no Irã, bem como os estudos de Sevá et al²⁴ que se utilizam de modelagem que prevê a redução dos casos humanos. Em Votuporanga, anterior a realização do projeto, havia muitos casos caninos, humanos e óbitos e, seguia-se apenas as recomendações do PVCLV, que

não foram suficientes para reduzir suas taxas. Por isso, foi importante o desenvolvimento deste projeto com vistas ao controle da LV na região.

CONCLUSÃO

Este estudo adicionou subsídios para se repensar o controle da LV baseando-se na incorporação das coleiras impregnadas com deltametrina a 4% como uma medida efetiva para reduzir as incidências caninas e, indiretamente, a incidência da LV humana. Os resultados aqui apresentados são importantes para a revisão de manuais, protocolos e ações recomendados pelas políticas públicas de vigilância e controle da LV.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos que contribuíram para a realização deste projeto: Carlos Roberto Elias, Elaine Barbosa Oliveira, Cilene Dias, Edson Bueno dos Anjos, Bruna Cristine Rodrigues, Viviane Aliena Grygonis Ferrarezi, Márcio Keith Inumarú, Nilton Santiago e equipe do Secez, Votuporanga; parceiros Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, São José do Rio Preto, Bauru; UNESP de Presidente Prudente; CVE/SES/SP e UNIFEV.

Financiamento: SVS-MS Chamamento de Pesquisa 20/2013. FAPESP proc. 2014/27070-1.

REFERÊNCIAS

1. WHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas; 2019. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>
2. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Apresentação Oficial do Ministério da Saúde: Leishmaniose Visceral 2017. Outubro de 2017. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/leishvisceral-17-novo-layout.pdf>

3. Camargo-Neves VL, Katz G, Rodas LA, Poletto DW, Lage LC, Spínola RM et al. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998 - 1999. *Cad Saude Publica*. 2001;17(5):1263–7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2001000500026>
4. Oliveira SS, Hiramoto RM, Rangel O, Henriques LF, Viviani-Junior A, Taniguchi HH et al. Classificação epidemiológica dos municípios do Estado de São Paulo segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, 2018. *BEPA, Bol Epidemiol Paul*. 2019;16(192):29–46. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicao-2019/edicao_192_-_dezembro_2.pdf
5. Rangel O, Oliveira SS, França AC, Ciaravolo RM, Henriques LF. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo: tendência geral da letalidade entre 1999 a 2013 e o risco de óbitos por estratificação epidemiológica dos municípios e regionais de Vigilância Epidemiológica entre 2011 a 2013. *BEPA, Bol Epidemiol Paul*. 2015;12(143): 1-8. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicao-2015/edicao_143_-_novembro_3.pdf.
6. Prefeitura de Votuporanga. Secretaria da Saúde; 2014. [acesso 2018 Jan 28] Disponível em: <http://votuporanga.sp.gov.br/n/noticia/?x=saude&n=2014117202822-secretaria-de-saude-inicia-o-censo-de-caes-e-gatos-em-votuporanga>
7. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE; 2010 [acesso 2018 Oct 14]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. Disponível em: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
9. Bailey TC, Gatrell AC. Interactive spatial data analysis. New York: Longman; 1995. 413 p.
10. Yamamoto JK, Landim PMB. Geostatística: conceitos e aplicações. 1. ed. São Paulo: Oficina de textos; 2013. 215 p.
11. Matsumoto PSS. A geografia é uma forma de pensar: Padrões espaciais e epidemiológicos da leishmaniose visceral em Araçatuba, Presidente Prudente e Votuporanga - SP, Brasil [tese de doutorado]. Presidente Prudente (SP): Universidade Estadual Paulista; 2019. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/182323>
12. Gatrell AC, Bailey TC, Diggle PJ, Rowlingson BS. Spatial point pattern analysis and its application in geographical epidemiology. *Trans Inst Br Geogr*. 1996;21(1):256.
13. Donato LE, de Lima Júnior FEF, Albuquerque R, Gomes MLS. Vigilância e controle de reservatórios da leishmaniose visceral no Brasil: aspectos técnicos e jurídicos. *Rev Educ Cont Med Vet Zootec*. 2013;11(2):18–23. <https://doi.org/10.36440/recmvz.v11i2.16219>
14. Coura-Vital W, Leal GGA, Marques LA, Pinheiro ADC, Carneiro M, Reis AB. Effectiveness of deltamethrin-impregnated dog collars on the incidence of canine infection by *Leishmania infantum*: A large scale intervention study in an endemic area in Brazil. *PLoS One*. 2018;13(12):1–17. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0208613>
15. Silva RA, Andrade AJ, Quint BB, Raffoul GES, Werneck GL, Rangel EF et al. Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(5):1–9. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760170377>
16. Brianti E, Gaglio G, Napoli E, Falsone L, Prudente C, Solari Basano F et al. Efficacy of a slow-release imidacloprid (10%)/flumethrin (4.5%) collar for the prevention of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*. 2014;7:327. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-327>

17. Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. 1997;11(2):105–11. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.1997.tb00298.x>
18. Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Pauliquévis-Junior C. Avaliação da efetividade da utilização de coleiras impregnadas com Deltametrina a 4% para o controle da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo: resultados preliminares. *BEPA, Bol Epidemiol Paul*. 2004;1(12):1–13. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/2004/12_dezembro_2004.pdf
19. Reithinger R, Teodoro U, Davies CR. Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(5):872–6. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0705.017516>
20. Maroli M, Mizzoni V, Siragusa C, D’Orazi A, Gradoni L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med Vet Entomol*. 2001;15(4):358–63. <http://dx.doi.org/10.1046/j.0269-283x.2001.00321.x>
21. Mazloumi Gavvani AS, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: A matched-cluster randomised trial. *Lancet*. 2002;360(9330):374–9. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)09609-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(02)09609-5)
22. Brazuna JCM. Estudos sobre leishmaniose visceral humana e canina no município de Campo Grande, MS, Brasil. [tese de doutorado]. Campo Grande(MS): Universidade Federal de Mato grosso do Sul; 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufms.br:8443/jspui/bitstream/123456789/1865/1/JÚLIA CRISTINA MAKSOUD BRAZUNA.pdf>
23. Kazimoto TA, Amora SSA, Figueiredo FB, Magalhães JM e, Freitas YBN, Sousa MLR et al. Impact of 4% deltamethrin-impregnated dog collars on the prevalence and incidence of canine visceral leishmaniasis. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2018;18(7):356–63. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2017.2166>
24. Sevá AP, Ovallos FG, Amaku M, Carrillo E, Moreno J, Galati EAB et al. Canine-based strategies for prevention and control of visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS One*. 2016;11(7):e0160058. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0160058>
25. Alves EB, Figueiredo FB, Rocha MF, Werneck GL. Operational difficulties in the use of insecticidal dog collars for the control of visceral leishmaniasis, municipality of Montes Claros, MG, Brazil, 2012. *Epidemiol Serv Saude*. 2018;27(4):e2017469. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742018000400001>
26. Wilke VML. Avaliação das atividades de controle da Leishmaniose visceral canina no município de Sabará, Minas Gerais, 1995 a 2000 [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte(BH): Universidade Federal de Minas Gerais; 2005. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-8CBFGW>
27. Andrade AM, Queiroz LH, Nunes GR, Perri SHV, Nunes CM. Dog replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(5):594–5. <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822007000500021>
28. Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(1):31–8. <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762006000100007>
29. Ciaravolo RM, Oliveira SS, Hiramoto RM, Henriques LF, Taniguchi HH, Viviani-Jr A et al. Classificação Epidemiológica dos Municípios Segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral no Estado de São Paulo, dezembro de 2014. *BEPA, Bol Epidemiol Paul*. 2015;12(143):9–22. Disponível em: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/10/1022458/121439-22.pdf>

AGRADECIMENTOS

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2018, contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista

- **Adriane Alexandre Machado de Melo** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, SP
- **Aldo Aparecido Proietti Júnior** Universidade Federal do Amapá, Laboratório Especial de Microbiologia Aplicada, Campus Marco Zero. Macapá, AP
- **Andrea Troller Pinto** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Porto Alegre, RS
- **Ana Carolina de Mello Santos Gheller** Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia, Disciplina de Microbiologia. São Paulo, SP
- **André Gustavo Tempone Cardoso** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia. São Paulo, SP
- **Augusta Mendes da Silva** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Morfologia e Microscopia. São Paulo, SP
- **Benício Alves de Abreu Filho** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências de Saúde. Maringá, PR
- **Bernardo Elias Correa Soares** Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Núcleo de Biossegurança. Rio de Janeiro, RJ
- **Camila Malta Romano** Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Virologia. São Paulo, SP
- **Cecilia Cristina Marques dos Santos** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais de São José do Rio Preto, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. São José do Rio Preto, SP
- **Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior** Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Niterói, RJ
- **Clícia Maria de Jesus Benevides** Universidade do Estado da Bahia, Centro de Ciências da Saúde e dos Alimentos, Departamento de Ciências da Vida. Salvador, BA
- **Danillo Lucas Alves Espósito** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Centro de Pesquisa em Virologia, Departamento de Clínica Médica. Ribeirão Preto, SP
- **Deborah Ines Teixeira Favaro** Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica. São Paulo, SP
- **Dennis Armando Bertolini** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Maringá, PR
- **Elisa Yoko Hirooka** Universidade Estadual de Londrina. Londrina, PR
- **Elisângela Valevein Rodrigues** Instituto Federal do Paraná, Curso Técnico em Massoterapia. Curitiba, PR
- **Eloá Angélica Koehnlein** Universidade Federal da Fronteira Sul. Realeza, PR
- **Erilane de Castro Lima Machado** Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Núcleo de Nutrição. Vitória de Santo Antão, PE



- **Felipe Rebello Lourenço** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. São Paulo, SP
- **Francisco Paulo Chaimsohn** Instituto Agrônomo do Paraná, Estação Experimental de Morretes. Morretes, PR
- **Hans Fröder** Centro Universitário Univates. Lageado, RS
- **Heitor Daguer** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário, Serviço Laboratorial Avançado. São José, SC
- **Helena Hilomi Taniguchi** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Parasitoses Sistêmicas. São Paulo, SP
- **Hermínia Yoko Kanamura** Universidade Federal de Alfenas, Departamento Patologia e Parasitologia, Pesquisadora Visitante Senior. Alfenas, MG
- **Irene Satiko Kikuchi** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos. São Paulo, SP
- **Isabel Cristina Ferreira Damin** Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS
- **Jacinto da Costa Silva Neto** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Histologia e Embriologia. Recife, PE
- **Jane Martha Graton Mikcha** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Maringá, PR
- **José Eduardo Tolezano** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia. São Paulo, SP
- **Josefa Bezerra da Silva** Instituto Butantan, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biotecnologia Molecular. São Paulo, SP
- **Joseli Maria Piranha** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Química e Ciências Ambientais. São José do Rio Preto, SP
- **Josué Moraes** Universidade de Guarulhos. Guarulhos, SP
- **Juliana Mariotti Guerra** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Patologia Quantitativa. São Paulo, SP
- **Jussara Carvalho de Moura Della Torre** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial. São Paulo, SP
- **Kathryna Fontana Rodrigues** Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Superintendência de Assistência Farmacêutica, Diretoria de Medicamentos de Alto Custo. Belo Horizonte, MG
- **Kélin Schwarz** Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Departamento de Nutrição. Uberaba, MG
- **Leonardo José Tadeu de Araújo** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Patologia Quantitativa. São Paulo, SP
- **Luis Fernando dos Santos** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Bacteriologia, Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções. São Paulo, SP
- **Luzia Shundo** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Contaminantes, Núcleo de Contaminantes Orgânicos. São Paulo, SP
- **Marcelo Elias Fraga** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária. Seropédica, RJ
- **Márcia Dimov Nogueira** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Morfologia e Microscopia. São

Paulo, SP

- **Maria Cristina de Cunto Brandileone** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Bacteriologia, Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas. São Paulo, SP
- **Maria da P Spinola Miranda** Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas. Salvador, BA
- **Maria Nogueira Marques** Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Aracaju, SE
- **Miguel Angel Chávez-Fumagalli** Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. Belo Horizonte, MG
- **Patrícia Sayuri Silvestre Matsumoto** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Parasitoses Sistêmicas. São Paulo, SP
- **Paula Araujo Opromolla** Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, Centro de Vigilância Sanitária. São Paulo, SP
- **Raimundo Antonio Gomes de Oliveira** Universidade Federal do Maranhão, Hospital Universitário, Centro de Pesquisa Clínica, Laboratório de Pesquisa Clínica. São Luís, MA
- **Rute Dal Col** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais de Santo André, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. Santo André, SP
- **Wanda Moscalewski Abrahao** Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde. Curitiba, PR
- **Wemerson Castro Oliveira** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sul-rio-grandense. Lajeado, RS
-
- **Agradecimento especial pela revisão do inglês**
- Mirthes Ueda

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

Serão aceitos manuscritos nos idiomas: português ou inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail), aos cuidados do editor-chefe da RIAL, pelo endereço eletrônico rial@saude.sp.gov.br.

Os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir:

1. Categoria De Artigos

1.1 Artigos Originais: incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em dados originais e perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

Informações Complementares:

- ◆ Devem conter no máximo 6000 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ Tabelas, figuras, gráficos e fotos, serão limitados a 5 (cinco) no conjunto, e devem incluir apenas os dados imprescindíveis em arquivos separados. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

1.2 Artigos de Revisão: dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva.

Informações complementares:

- ◆ Devem conter no máximo 7500 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ Tabelas, figuras, gráficos e fotos, serão limitados a 3 (três) no conjunto, e devem incluir apenas os dados imprescindíveis em arquivos separados. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 80, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

1.3 Comunicações Breves: são contribuições de importância no campo da pesquisa de interesse em saúde pública, mas que não comportam pela sua complexidade e extensão uma análise mais abrangente. Serão consideradas, também, nesta categoria descrições de novos métodos ou técnicas que tragam avanços para a área de conhecimento.

Informações complementares:

- ◆ Devem conter no máximo 3000 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ Tabelas, figuras, gráficos e fotos, serão limitados a 2 (dois) no conjunto, e devem incluir apenas os dados imprescindíveis em arquivos separados. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.

- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

1.4 Notas Científicas: são relatos sucintos destinados à rápida divulgação de resultados relevantes, com reconhecido impacto para a comunidade científica, que justifique a publicação de resultados parciais a critério do corpo editorial.

Informações complementares:

- ◆ Devem conter no máximo 1800 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ Tabelas, figuras, gráficos e fotos, serão limitados a 2 (dois) no conjunto, e devem incluir apenas os dados imprescindíveis em arquivos separados. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 1800 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

1.5 Comentários Técnico-Científicos: contribuições de interesse em saúde pública destinadas a veiculação de informações científicas e tecnológicas comentadas e discutidas sob o ponto de vista dos seus autores, podendo ser de natureza individual ou institucional.

Informações complementares:

- ◆ Devem conter no máximo 1800 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 30, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 100 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- ◆ Sua apresentação deve ser na forma de texto único.

1.6 Relatos de Caso: são textos que contemplam principalmente as áreas médica e veterinária, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Informações complementares:

- ◆ Devem conter no máximo 1000 palavras, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- ◆ Tabelas, figuras, gráficos e fotos, serão limitados a 2 (dois) no conjunto, e devem incluir apenas os dados imprescindíveis em arquivos separados. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas.
- ◆ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- ◆ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 100 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- ◆ Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

1.7 Resumos de Teses e Dissertações: são aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

Informações complementares:

- ◆ Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- ◆ Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração, ano da defesa e endereço eletrônico onde a tese/dissertação está disponível.

2. Apresentação do manuscrito:

Os textos devem ser redigidos em processador de texto *Word* ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte *Times New Roman*, tamanho 12. As tabelas e legendas devem utilizar fonte *Times New Roman*, tamanho 10, e as notas e figuras a fonte *Times New Roman*, tamanho 9. Devem ser evitados arquivos compactados (zip). A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

2.1 Página de Identificação:

Devem constar:

Título em português e em inglês: o título, limitado a 180 caracteres com espaço, deve ser conciso e conter informações que expresse o conteúdo do manuscrito; se o mesmo for submetido em inglês, deve ser informada a tradução do título em português.

Autores: são considerados autores, aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo, de acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors*– ICMJE – (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com o último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável pela troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço institucional completo.

Afiliação: deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade. Não incluir cargos e funções dos autores.

Financiamento da pesquisa: se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo no final do artigo.

Nota de apresentação: quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização. Nas duas situações indicar a informação no final do artigo.

2.2 Preparo do manuscrito:

Resumo/Abstract: todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados conforme a categoria do artigo. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

Palavras-chave/keywords: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no *Medical Subject Headings* (MeSH).

Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados, limitados a um terço do total dos descritores.

Estrutura do texto:

A) Introdução: Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações.

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

C) Resultados: Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

D) Discussão: A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

E) Agradecimentos: Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

2.3 Citação no texto: A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de expoente, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

Exemplos:

- ◆ Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.061, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)^{2,3}.
- ◆ Segundo Chang et al³¹, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

2.4 Referências:

Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o *Medline*, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente. Quando existente, incluir o endereço eletrônico contendo o (doi) na citação do artigo para a recuperação do documento.

Exemplos:

Artigos de periódicos:

- ◆ Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.
- ◆ Conde MB, Melo FAF, Marques AMC, Cardoso NC, Pinheiro VGF, Dalcin PTR et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *J Bras Pneumol*. 2009;35(10):1018-48. <https://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132009001000011>.
- ◆ Lindsay RP, Shin SS, Garfein RS, Rusch MLA, Novotny TE. The association between active and passive smoking and latent tuberculosis infection in adults and children in the United States: results from NHANES. *PLoS One*. 2014;9(3):e93137. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093137>.
- ◆ Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>.

Livros:

- ◆ Ringsven MK, Bond D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. 2.ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.
- ◆ Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.
- ◆ Institute of Medicine (US). *Looking at the future of the Medicaid program*. Washington (DC): The Institute; 1992.
- ◆ Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer*. Washington: National Academy Press; 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149.

Capítulos de livro:

- ◆ Wirdh L. História da Epidemiologia. *In*: Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

- ◆ Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.
- ◆ Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

- ◆ Colombo FA, Vidal JE, Oliveira ACP, Focaccia R, Pereira-Chioccola VL. O uso de métodos moleculares na avaliação do diagnóstico da toxoplasmose cerebral em pacientes com AIDS. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: *Rev Inst Adolfo Lutz*. p. 30 [resumo 28-PLSP].

Dados eletrônicos:

- ◆ Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: <http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doci>.

Legislação:

- ♦ Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010. Dispõe sobre alimentos para atletas. Aprova o Regulamento Técnico sobre Alimentos para Atletas. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 28 abr 2010. Seção 1(79):211-2.

Autoria institucional:

- ♦ Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4. ed. [1. ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf.
- ♦ Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

Patente:

- ♦ Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação em: Patrias K, Wendling D, Technical Editor. The NLM Style Guide for Authors, Editors, and Publishers. Citing Medicine. 2.ed. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

2.5 Números de figuras e tabelas: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como figura ou tabela, e não como quadros, gráficos etc. Figuras e tabelas serão numeradas separadamente, na sequência, a partir de um.

A) Tabelas: Devem ser redigidas em processador de texto *Word* ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas, e redigidas com a fonte *Times New Roman* tamanho 9. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

B) Figuras: As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação as figuras suficientemente claras e com qualidade digital, no formato jpeg ou tif, com resolução mínima de 300 dpi. Figuras em pdf só serão aceitas em alta resolução (300 dpi). Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

3. Declarações e documentos solicitados: Em conformidade com as diretrizes do *International Committee of Medical Journal Editors*, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade pelos Agradecimentos	Autor responsável	Aprovação
Transferência de Direitos Autorais	Todos	Aprovação

A carta de Apresentação do manuscrito deve conter:

- ◆ A indicação da categoria do artigo em submissão.
- ◆ Assinatura de todos os autores e os respectivos endereços eletrônicos.
- ◆ Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para mais informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).
- ◆ Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.
- ◆ Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico e que não se trata de plágio ou autoplágio. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver em posse da RIAL.
- ◆ Indicação de até três revisores, com afiliação e endereço eletrônico para contato.

4. Verificação dos itens exigidos na submissão:

- a) Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo endereço eletrônico e telefone do autor responsável.
- b) Título do manuscrito, em português e inglês.
- c) Texto apresentado em fonte *Times New Roman*, tamanho 12, em formato *Word* ou similar (doc, txt, rtf).
- d) Resumos em português e em inglês.
- e) Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
- f) Nome da agência financiadora e número(s) do(s) processo(s).
- g) No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
- h) Referências normalizadas segundo estilo *Vancouver*, ordenadas pela citação no texto e numeradas; verificar se todas estão citadas no texto.
- i) Tabelas numeradas sequencialmente, com título em fonte *Times New Roman*, tamanho 10 e notas em fonte *Times New Roman*, tamanho 9, e no máximo com 12 colunas, em formato *Word* ou similar (doc, txt, rtf).
- j) Figura nos formatos (tif, jpeg ou pdf), com resolução mínima 300 dpi.

5. Avaliação preliminar: Os manuscritos submetidos serão analisados inicialmente pelos editores quanto ao escopo, à redação científica, gramatical e ao atendimento às normas da RIAL. A baixa qualidade da redação acarretará na devolução do trabalho para revisão da linguagem pelo(s) autor(es) antes de iniciar o processo de submissão.

6. Avaliação por pares: Os manuscritos selecionados serão encaminhados para avaliação por relatores da área pertinente. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a sua aceitação sem modificações, a recusa ou a devolução ao(s) autor(es) com as sugestões apontadas pelos relatores. Caso sejam solicitadas modificações, o(s) autor(es) tem o prazo de até três semanas para reenviar o trabalho, para continuidade da avaliação.

7. Revisão de estilo: Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será submetido à revisão de estilo em língua portuguesa e/ou inglesa. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores.

8. Provas: O manuscrito, revisado e aprovado, será encaminhado para diagramação. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão, em formato pdf (*portable document format*), por correio eletrônico. O Corpo Editorial poderá solicitar figuras com melhor resolução, caso seja necessário. Nesta fase, não serão aceitas mudanças no conteúdo do trabalho. O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para evitar atrasos e garantir a publicação na sequência programada do volume.

9. Publicação: A partir de 2016 a RIAL adotou o sistema de publicação continuada em volume único. Os artigos serão publicados *online* no Portal do Instituto Adolfo Lutz <http://www.ial.sp.gov.br> em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente na publicação. Textos completos com acesso livre serão disponibilizados no Portal de Revistas em Veterinária e Zootecnia <http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz>, Portal LILACS <http://lilacs.bvsalud.org/>, BVS Rede de Informação e Conhecimento <http://ses.sp.bvs.br/>.

É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na RIAL, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, em conformidade com a legislação sobre os direitos autorais.