

**Yan Corrêa Rodrigues e
Karla Valéria Batista Lima**

(Organizadores)

AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS DE IMPORTÂNCIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA:

**ASPECTOS CLÍNICOS,
EPIDEMIOLÓGICOS E
MOLECULARES**



RODRIGUES, Y. C.; LIMA, K. V. B. (Orgs). Agentes infecciosos e parasitários de importância na Amazônia brasileira: atualizações em aspectos clínicos, epidemiológicos e moleculares. 1ª Ed: Gradus Editora. Bauru, São Paulo. 2021.

FICHA TÉCNICA

Editor-chefe

Lucas Almeida Dias

Projeto gráfico

Paulo Ricardo Cavalcante da Silva

Diagramação

Tatiane Santos Galheiro

Revisão

Ana Karolina de Melo Pessoa Oliveira

Jancen Sérgio Lima de Oliveira

Comitê Editorial Científico – Gradus Editora 2020/2021

Dr. Douglas Manoel Antonio de Abreu Pestana Dos Santos

Dra. Cintya de Oliveira Souza

Dra. Ana Cláudia Bortolozzi

Dra. Andreia de Bem Machado

Dra. Manuela Costa Melo

Dr. Carlos Gomes de Castro

Dra. Ana Beatriz Duarte Vieira

Dra. Janaína Muniz Picolo

Dr. Yan Corrêa Rodrigues

Dr. Thiago Henrique Omena

Dr. Luís Rafael Araújo Corrêa

Dr. Fábio Roger Vasconcelos

Dr. Leandro Antônio dos Santos

Dr. Gustavo Schmitt

Dra. Renata Cristina Lopes Andrade

Dra. Daniela Marques Saccaro

Dra. Gladys del Carmen Medina Morales

Dra. Márcia Lopes Reis

**Yan Corrêa Rodrigues e
Karla Valéria Batista Lima**

(Organizadores)

AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS DE IMPORTÂNCIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA:

ASPECTOS CLÍNICOS,
EPIDEMIOLÓGICOS E
MOLECULARES



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Agentes infecciosos e parasitários de importância na Amazônia brasileira:
atualizações em aspectos clínicos, epidemiológicos e moleculares / organizadores,
RODRIGUES, Y. C.; LIMA, K. V. B. - Bauru, SP: Gradus Editora, 2021.

403p.. : il. (algumas color.) ; PDF.

Inclui bibliografias.

975-65-88496-44-2

1. Agentes infecciosos 2. Parasitários 3. Epidemias

CDD

613.00

614.00

SUMÁRIO

PREFÁCIO	7
Eliseth Costa Oliveira de Matos	
INFECÇÃO PULMONAR POR MEMBROS DO COMPLEXO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
Tirça Naiara da Silva Iudice, Cristal Ribeiro Mesquita, Marília Lima da Conceição, Letícia Vitória Carvalho Oliveira, Maria Luiza Lopes, Ana Roberta Fusco da Costa, Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima, Emilyn Costa Conceição, Karla Valéria Batista Lima	
A INFECÇÃO PULMONAR POR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ASSOCIADA A FIBROSE CÍSTICA: Da aquisição ao tratamento	29
Edilene do Socorro Nascimento Falcão Sarges, Yan Corrêa Rodrigues, Marcos Vinicius Hino de Melo, Karla Valéria Batista Lima	
CAMPILOBACTERIOSE HUMANA: Relevância clínica e epidemiológica	55
Márcia de Nazaré Miranda Bahia, Cintya de Oliveira Souza, Tuane Carolina Ferreira Moura	
INFECÇÃO POR <i>Salmonella Typhi</i> – FEBRE TIFÓIDE: Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnósticos	73
Francisco Luzio de Paula Ramos	
INFECÇÕES POR <i>Chlamydia trachomatis</i>	83
Leonardo Miranda dos Santos, Wanderson Santiago de Azevedo Junior, Josele de Jesus Quaresma Trindade, Ingrid Christiane Silva, Cassia Cristine Costa Pereira, Macy Kamila Queiroz Rolim, Debora Glenda Lima de La-Roque, Valéria Gabriele Caldas Nascimento, Louise de Souza Canto Covre, Taylana Formigosa Cabral, Dânia Cardoso Paysan, Lyzandra Patrícia Maria dos Santos, Rosilma dos Santos Albuquerque, Luana Maria de Oliveira Lima, Ericka Bechara Ferreira, Izabela Mendonça Assis, Maísa Silva de Sousa	
INFECÇÃO POR <i>Treponema pallidum</i>	107
Thalyta Mariany Rêgo Lopes Ueno, Luciano Chaves Franco Filho, Eliete da Cunha Araújo, Vera Regina da Cunha Menezes Palácios, Joana da Felicidade Ribeiro Favacho, Ana Maria Revorêdo da Silva Ventura, Karla Valéria Batista Lima	
LEPTOSPIROSE: Desafios para o diagnóstico e saúde pública	125
Ana Roberta Fusco da Costa, Maria Luiza Lopes, Alex Brito Souza, Tuane Carolina Ferreira Moura, Leni Célia Reis Monteiro, Cintya de Oliveira Souza	
DOENÇA DE LYME E DOENÇA DE LYME-SÍMILE BRASILEIRA	149
Cintya de Oliveira Souza, Leni Célia Reis Monteiro, Marcia de Nazaré Miranda Bahia	
ASPECTOS CLÍNICOS, MICROBIOLÓGICOS E MOLECULARES ASSOCIADOS À INFECÇÕES POR <i>Klebsiella pneumoniae</i>	177
Pablo Antony Silva dos Santos, Karla Valéria Batista Lima, Yan Corrêa Rodrigues	

<i>Acinetobacter spp</i>: Aspectos clínicos, epidemiológicos e moleculares	201
Danielle Murici Brasileira, Ana Judith Pires Garcia Quaresma, Crislaine Seabra Leal	
<i>Escherichia coli</i> COMO RESERVATORIO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM AMBIENTES AQUÁTICOS	217
Luciana Sampaio Lima, Aldo Aparecido Proietti-Junior, Yan Corrêa Rodrigues, Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima, Cintya de Oliveira Souza, Verônica Dias Gonçalves, Dália dos Prazeres Rodrigues, Karla Valéria Batista Lima	
RESPOSTAS CELULARES NA INFECÇÃO POR <i>Mycobacterium leprae</i>.....	247
Ainoã Lira de Sousa Gonçalves , Marcos Jessé Abrahão Silva, Letícia Siqueira Moura, Mídiã Ester Santos de Carvalho, Karla Valéria Batista Lima, Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima	
O VÍRUS T-LINFOTRÓPICO HUMANO (HTLV): Um inimigo silencioso	265
Cássia Cristine Costa Pereira, Macy Kamila Queiroz Rolim, Debora Glenda Lima de La-Roque, Ingrid Christiane Silva, Valéria Gabriele Caldas Nascimento, Louise de Souza Canto Covre, Taylana Formigosa Cabral, Dânia Cardoso Paysan, Lyzandra Patrícia Maria dos Santos, Rosilma dos Santos Albuquerque, Luana Maria de Oliveira Lima, Ericka Bechara Ferreira, Izabela Mendonça de Assis, Wanderson Santiago de Azevedo Junior, Josele de Jesus Quaresma Trindade, Leonardo Miranda dos Santos, Maísa Silva de Sousa	
INFECÇÃO POR SARS-COV-2.....	285
Marcelo Cleyton da Silva Vieira, Daniele Melo Sardinha, Marcos Jessé Abrahão Silva, Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima, Karla Valéria Batista Lima	
HANTAVIROSE	305
Renato Lemos Pereira, Otávio Augusto Brioschi Soares, Fernanda Vieira Costa Orlandini, Bárbara Batista Salgado, Pritesh Jaychand Lalwani	
INFECÇÃO POR <i>Trypanosoma cruzi</i> - DOENÇA DE CHAGAS	329
Andreza Ozela de Vilhena, Milene Silveira Ferreira, Paulo Fernando Lauria Fonseca, Waltair Maria Martins Pereira	
INFECÇÕES POR <i>Plasmodium spp.</i> - MALÁRIA	353
Thalyta Mariany Rêgo Lopes Ueno, Karla Valéria Batista Lima, Ana Maria Revorêdo da Silva Ventura	
<i>Schistosoma mansoni</i>: ASPECTOS GERAIS, EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO	373
Isabelle Helena Lima Dias, Álvaro Luan Santana Fonseca, Sergei Rodrigo Magalhães de Sousa, Martin Johannes Enk	
POSFÁCIO	403
Otávio Augusto B. Soares	

PREFÁCIO

O livro “AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS DE IMPORTÂNCIA NA AMAZÔNIA BRASILEIRA: ATUALIZAÇÕES EM ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLOGICOS E MOLECULARES” apresenta em uma sequência de capítulos com atualizações em agravos de fundamental importância em saúde pública, incluindo estudos sobre doenças tropicais virais, bacterianas, protozooses e parasitoses.

A obra traz novas perspectivas sobre as complexas relações entre os aspectos clínicos, epidemiológicos, moleculares e de saúde na Amazônia brasileira, apresentando pontos fascinantes e necessários para novas discussões nas evidências científicas da área, considerando que as doenças infectoparasitárias apresentam um papel fundamental para a saúde pública da população, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais da Amazônia. Além disso, destaca-se a importância da relação destes agravos às precárias condições socioeconômicas e acesso a boas condições higienicossanitárias pela população.

O livro apresenta um formato científico com novos enfoques preparados por especialistas na área de epidemiologia clínica e molecular, diagnóstico em biologia molecular, investigações dos fatores relacionados a virulência e patogenicidade destes agentes, assim como resistência microbiana aos antibióticos, diagnóstico laboratorial e tratamento. Esta obra é fruto do grande esforço e dedicação das pesquisas desenvolvidas pelos autores e colaboradores de cada capítulo em elaborar este projeto de disseminação de conhecimento e da pesquisa brasileira. O presente livro busca somar conhecimentos e permitir uma visão crítica e contextualizada; além de inspirar os leitores a contribuírem com pesquisas para a promoção de saúde e bem estar social.

Prof. Dra. Eliseth Costa Oliveira de Matos

**Profa. Adjunto I. Departamento de Patologia. Escola de Enfermagem.
Universidade do Estado do Pará (UEPA), Belém, Pará, Brasil.**

INFECÇÃO PULMONAR POR MEMBROS DO COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis*

Tirça Naiara da Silva Iudice

Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará (UEPA).
Belém, Pará, Brasil.

E-mail: tircaiidice@gmail.com

Cristal Ribeiro Mesquita

Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará (UEPA).
Belém, Pará, Brasil.

E-mail: cristalmesquita@yahoo.com.br

Marília Lima da Conceição

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: mariliamadc@msn.com

Letícia Vitória Carvalho Oliveira

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: leticia.voliveira@aluno.uepa.br

Maria Luiza Lopes

Laboratório de Tuberculose e outras Micobactérias. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: marialopes@iec.gov.br

Ana Roberta Fusco da Costa

Laboratório de Tuberculose e outras Micobactérias. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: anacosta@iec.gov.br

Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI),
Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: luanalima@iec.gov.br

Emilyn Costa Conceição

Programa de Pós-graduação em Pesquisa Clínica e Doenças Infecciosas, Instituto
Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,
RJ, Brasil.

E-mail: emilyncosta@gmail.com

Karla Valéria Batista Lima

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI),
Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: karlalima@iec.gov.br

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por patógenos obrigatórios pertencentes ao clássico grupo Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) que compreende nove linhagens (L1 – L9) filogenéticas adaptadas aos seres humanos (*Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium africanum*) (NGABONZIZA et al., 2020) e membros adaptados aos animais selvagens e domésticos (BRITES et al., 2018).

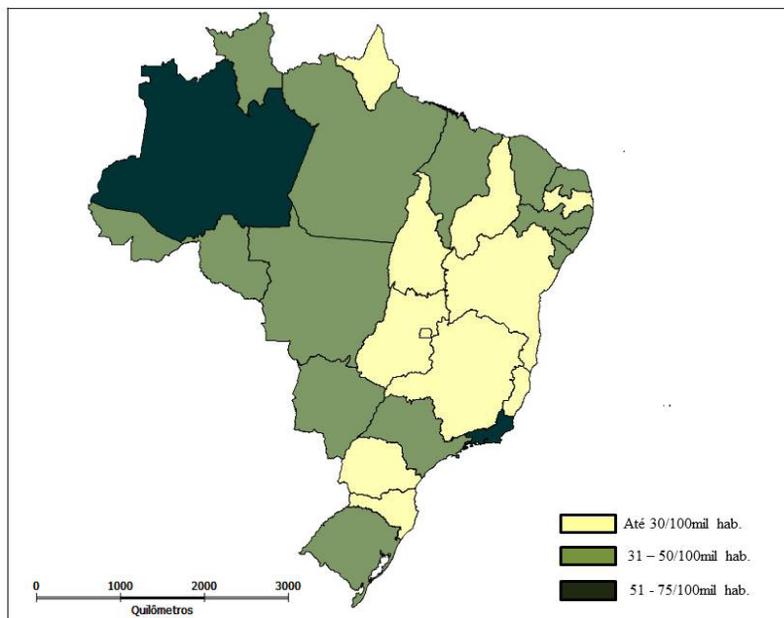
Os dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam a TB como uma das dez principais causas de óbito no mundo e a principal causa de óbito por um único agente infeccioso, ultrapassando a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana/Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (HIV/AIDS). Neste cenário mundial, os países do grupo BRICS (Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul) são responsáveis por 47% de todos os casos de TB no mundo em 2020. Além do que, o Brasil faz parte dos 30 países com maior carga de TB no mundo, responsáveis por 86% dos casos de TB global (WHO, 2020).

No Brasil, em 2019, foram diagnosticados 73.864 casos novos de TB, correspondendo a 35,0/100mil habitantes como taxa de incidência. Ao comparar a incidência de 2019 com a de 2010, observa-se uma queda de 2,5, porém nos anos anteriores (2017 e 2018 houve um leve aumento de incidência) (Brasil, 2020).

Dentre os estados brasileiros, Pará, Amazonas, Roraima, Acre e Rio de Janeiro tiveram as maiores incidências de TB, com taxa acima de 51 casos/100 mil habitantes,

maior que a média nacional (Brasil, 2020). A figura 1 ilustra a média de incidência da TB entre os anos de 2015 e 2019 nos estados brasileiros por 100 mil habitantes, em que o Pará apresenta a quinta maior média de incidência (46,28), atrás dos estados do Amazonas (74,62), Rio de Janeiro (66,38), Pernambuco (48,84) e Acre (47,4) (Brasil, 2020; SINAN/SVS/MS, 2020).

Figura 1 - Incidência média de Tuberculose nos estados brasileiros, entre 2015 e 2019.



Fonte: Elaborado pelos autores, a partir de dados SINAN/SVS/MS, 2020.

Quanto ao número de óbitos, refletindo a gravidade da doença, em 2018, a taxa no Brasil foi 2,2 óbitos/100 mil habitantes, com queda de 0,36 comparada ao ano de 2009. Amazonas, Rio de Janeiro, Pernambuco, Rio Grande do Sul, Pará, Maranhão, Rio Grande do Norte, Ceará e Acre apresentaram coeficiente de mortalidade por TB próximo ou superior ao coeficiente do país. O estado do Pará apresentou o coeficiente de mortalidade de 2,5/100mil habitante, acima da média nacional (Brasil, 2020).

Em relação ao desfecho dos tratamentos de TB, predomina a cura (71,9%) entre os casos novos com confirmação laboratorial no Brasil, seguido de abandono (11,6%), óbitos (5,6%) e transferência (5,3%) (Brasil, 2020).

Com o propósito de eliminar a TB até 2030, a OMS lançou o programa *The End TB Strategy* (A Estratégia Para o Fim da TB) que possui metas sustentadas em três pilares: cuidados e prevenção integrados e centrados no paciente; políticas ousadas e sistemas de apoio e suporte aos afetados pela TB; intensificação da inovação e da pesquisa. Estes reúnem intervenções favoráveis para garantir que todas as pessoas com TB tenham acesso equânime ao diagnóstico, tratamento e à prevenção, sem gastos excessivos ou declínio da situação social (WHO, 2013a; Barreira, 2018).

A OMS, em dezembro de 2010, recomendou o Teste Rápido Molecular (TRM) Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, EUA), automatizado, baseado na amplificação de ácido nucleico, na plataforma GeneXpert para detecção simultânea de TB e resistência à rifampicina (RIF) (WHO, 2013a, 2014a), para o cumprimento da meta de detecção rápida e precoce da TB estabelecida no primeiro pilar do programa. No entanto, somente em maio de 2014, o Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, EUA) foi incorporado pelo Ministério da Saúde (MS) no Sistema Único de Saúde (SUS) para diagnóstico de TB (Brasil, 2015), o qual foi substituído pelo atual Xpert-Ultra® MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, EUA) em 2019 por possuir maior sensibilidade na detecção da TB sendo comparável à cultura líquida, considerada padrão ouro na detecção do bacilo da TB (Brasil, 2019)

O AGENTE ETIOLÓGICO

Segundo a classificação taxonômica tradicional o gênero *Mycobacterium* divide-se em três grupos: o Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), causador da TB; Micobactérias não associadas à tuberculose (MNT), causador das micobacterioses; e o grupo do *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium lepromatosis* causadores da hanseníase (Tortoli et al., 2019).

Recentemente, utilizando a filogenômica, Gupta et al. (2018) reclassificaram o gênero *Mycobacterium* dividindo-o em cinco novos gêneros. Devido à premissa taxonômica reivindicada por Tortoli et al. (2019), neste capítulo utilizaremos a classificação tradicional considerando todos os grupos como micobactérias.

Os membros do CMTB, outrora espécies diferentes, atualmente foram também reclassificados como sendo apenas uma única espécie com variedades diferentes (ecotipos) que possuem padrões de adaptação quanto ao hospedeiro (Riojas et al., 2018).

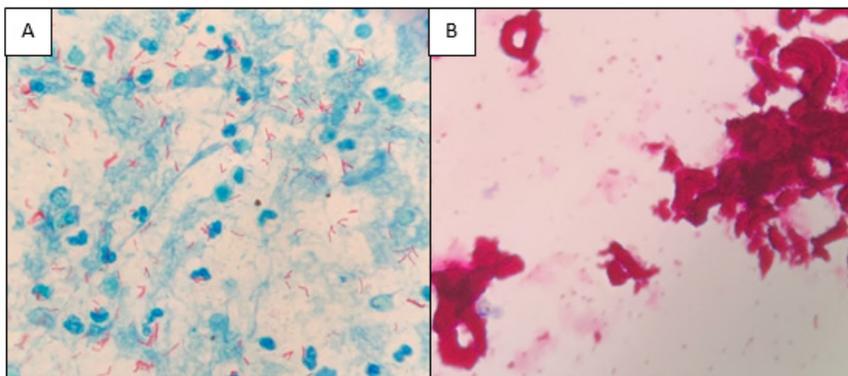
Tanto o *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto* (MTB) quanto o *Mycobacterium africanum* são adaptados aos seres humanos e juntos podem ainda ser classificados em nove linhagens (L1-L9) filogenéticas (Coscolla & Gagneux, 2014; Brites & Gagneux,

2015; Coscolla et al., 2020; Ngabonziza et al., 2020). Os demais membros são adaptados aos animais, podendo causar TB zoonótica no homem: *Mycobacterium bovis* (Karlson & Lessel, 1970), *Mycobacterium caprae* (Aranaz et al, 2003), *Mycobacterium microti* (Reed, 1957), *Mycobacterium mungi* (Alexander et al., 2010), *Mycobacterium pinnipedii* (Cousins et al., 2003), *Mycobacterium orygis* (van Ingen et al., 2012) e *Mycobacterium suricattae* (Parsons et al., 2013). Dentre os membros do CMTB, o MTB é o responsável pela maior carga da TB humana, distribuído globalmente.

O bacilo MTB é morfológicamente fino, reto, ligeiramente curvo (Figura 1A) ou em forma de clavas com dimensões de 0,2 μ m a 0,6 μ m de largura e 1 μ m a 10 μ m de comprimento (Wildner et al., 2011; Santos, 2015). É um bacilo imóvel, não esporulado, sem cápsula, aeróbio com parede rica em lipídios (ácidos micólicos e arabinogalactano) o que lhe caracteriza como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) com baixa permeabilidade para efetividade da maioria dos antibióticos facilitando a sua sobrevivência nos macrófagos. (Oliveira et al., 2016; Brasil, 2020).

Especula-se que a patogenicidade bacilar do agente da TB está relacionada à composição química de sua parede celular, um desses componentes é o dimicolato de trealose, um lipídio tóxico, responsável pelo efeito “fator corda” característico de membros do CMTB (Figura 1B), porém não há evidências definitivas, encontrado também em algumas outras espécies micobacterianas patogênicas e não patogênicas (Opromolla & Baptista, 2000; Coelho & Marques, 2006; Yun et al., 2009).

Figura 2 - Morfologia dos bacilos-álcool-ácidos resistentes e fator corda.



Morfologia do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*: (A) bacilos álcool-ácidos-resistentes; (B) fator corda.

Fonte: Laboratório de Tuberculose e outras Micobacterioses do Instituto Evandro Chagas, 2021.

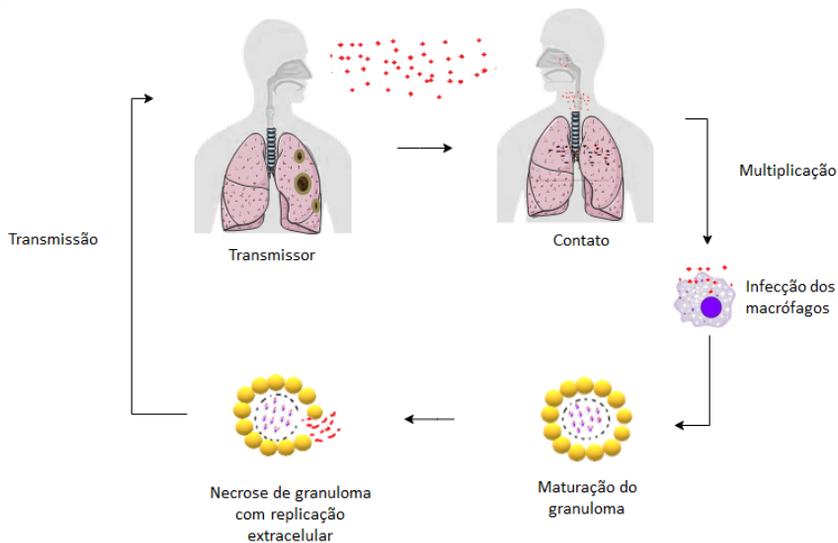
Outro componente indicativo de patogenicidade são os sulfolipídeos, que em culturas de macrófagos foram encontrados inibindo a função microbicida normal pela inibição da fusão do fagossoma-lisossoma. E, finalmente, os micosídeos que seriam responsáveis pela formação da “zona elétron transparentes” (ETZ) ou cápsula que protegeria a bactéria contra propriedades microbicidas dos macrófagos dos hospedeiros (Opromolla & Baptista, 2000).

O MTB é um patógeno obrigatório, sem reservatório ambiental, que se propaga essencialmente pelo ar quando uma pessoa infectada tosse, espirra, fala ou cospe, exalando gotículas contendo os bacilos e projetando-os no ar, podendo ser inalados por outro indivíduo (Brasil, 2020).

Dessa forma é dado o início do ciclo infeccioso que poderá, ou não, evoluir para a doença (TB ativa) dependendo da resposta imunológica do hospedeiro. Após a inalação, os bacilos migram para os alvéolos pulmonares, e fagocitados pelos macrófagos, de forma geral, são contidos pela resposta imune do hospedeiro. Isso leva à formação de granuloma e, eventualmente, a lesões calcificadas causando a TB latente (Figura 1). (Bañuls et al., 2015; Donoghue, 2016; Koch & Mizrahi, 2018).

Após a infecção e a evolução para a forma de TB ativa, quer seja na forma pulmonar ou na forma extrapulmonar (quando acomete outros órgãos), o indivíduo inicia o tratamento baseado no perfil de susceptibilidade antimicrobiana da cepa infectante. Quando o desfecho é favorável (cura), porém ocorre um novo episódio de TB no futuro, há duas possibilidades: recidiva/recorrência ou reinfeção. Tal diferenciação somente é possível por meio de testes de genotipagem ao comparar regiões do genoma bacteriano obtidos a partir da primeira amostra, confrontando com a segunda.

Figura 3 - Ciclo patogênico da infecção por membros do Complexo MTB.

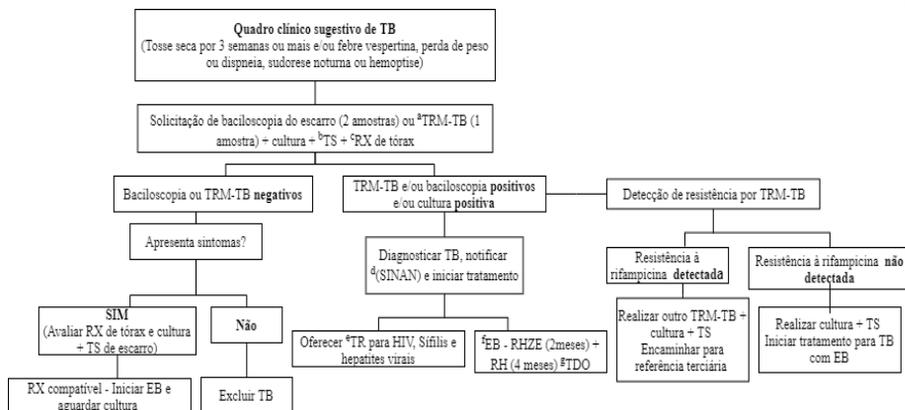


Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE

A busca ativa de sintomático respiratório é uma excelente estratégia para o controle da TB, pois permite que as formas pulmonares sejam detectadas precocemente (Brasil, 2020). Para que seja feito um diagnóstico precoce, o manejo de paciente sugestivo de TB é realizado conforme descrito na Figura 4.

Figura 4 - Manejo clínico para o diagnóstico de TB na atenção primária.



^aTRM-TB: teste rápido molecular para tuberculose; ^bTS: teste de sensibilidade; ^cRx: raio-x; ^dSINAN: sistema de informações de agravos de notificações; ^eTR: teste rápido; ^fEB -

Esquema básico: R- rifampicina; H - isoniazida; P - pirazinamida; E - etambutol; ^gTDO: tratamento diretamente observado.

Fonte: adaptado de Brasil, 2011; 2019; Dive, 2019.

O diagnóstico da TB é baseado na clínica, sendo os sintomas mais comuns a identificação de tosse seca prolongada, febre, emagrecimento (Brasil, 2020). Os métodos mais utilizados no diagnóstico laboratorial da TB, são: o exame microscópico direto (baciloscopia), cultura, teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e TRM.

Baciloscopia

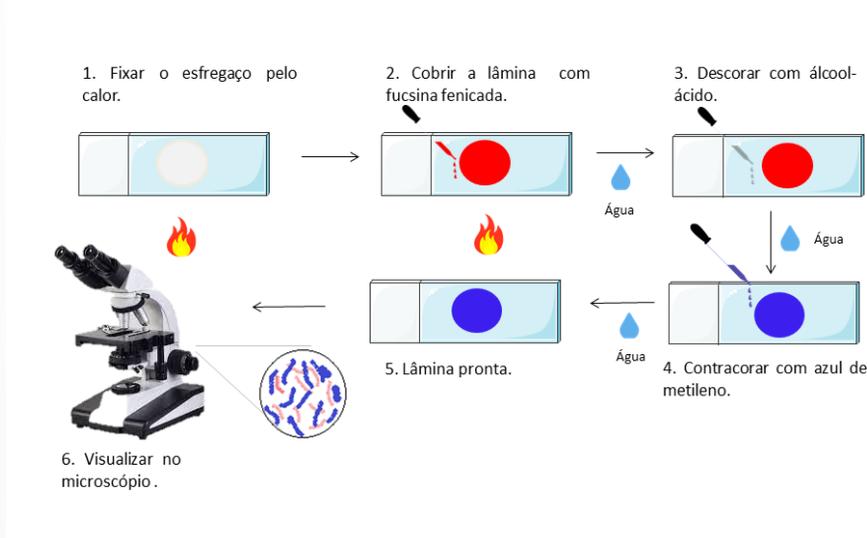
Técnica para a pesquisa direta de BAAR que permite descobrir as fontes mais importantes de infecção - pacientes bacilíferos. A técnica é de execução rápida, fácil, de baixo custo, geralmente utiliza a coloração de Ziehl Neelsen (ZN) e permite estimar o número de bacilos presentes na amostra clínica, favorecendo a alta cobertura diagnóstica (Wildner et al., 2011).

Por se tratar de um método simples e assegurado, pode ser feito por todo laboratório público de saúde e pelos laboratórios privados tecnicamente habilitados. Deve-se solicitar sempre a baciloscopia para: (a) pacientes adultos que procurem o serviço de saúde apresentando tosse e expectoração por três semanas ou mais; (b)

pacientes que apresentem alterações pulmonares na radiografia de tórax; (c) contatos de casos de tuberculose pulmonar bacilíferos que apresentem queixas respiratórias (Brasil, 2002).

Na baciloscopia direta a amostra é fixada em uma lâmina e submetida à ação da fucsina a quente, todas as estruturas absorvem o corante nessa etapa. Na sequência, a lâmina é submetida à ação do álcool-ácido, que descora todas as estruturas celulares, exceto os BAAR. Para facilitar a visualização microscópica, faz-se uma coloração de fundo com azul de metileno (Figura 5) (Brasil, 2008).

Figura 5 - Etapas da coloração de Ziehl-Neelsen



Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

Além da baixa sensibilidade ser a desvantagem, sendo necessário pelo menos 5.000 bacilos por mL de amostra para obter o resultado positivo, diversos fatores como tipo de amostra, espessura do esfregaço, extensão da descoloração, treinamento e experiência técnica do examinador podem influenciar no resultado da baciloscopia direta (Ramachandran & Paramasivan, 2003). A baciloscopia direta é utilizada também na supervisão auxiliar do tratamento (Ganguly et al., 2002).

Cultura

A cultura permite a multiplicação e o isolamento dos bacilos a partir da semente da amostra clínica, mesmo de pacientes paucibacilares (os que não apresentam expectoração e/ou que têm baciloscopia negativa), em meios de culturas específicos para micobactérias e é considerado método de diagnóstico padrão de referência pelo MS para confirmação de casos suspeitos de TB (ANVISA, 2011).

A cultura exige até oito semanas para o diagnóstico definitivo, devido ao lento crescimento do MTB (Brasil, 2020). Quando realizada no escarro, pode aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico de TB pulmonar em pacientes que apresentaram baciloscopia negativa (Brasil, 2020).

Além de indicada aos suspeitos de TB que apresentaram baciloscopia direta negativa, também é indicada nos casos suspeitos de resistência bacteriana às drogas como RIF, isoniazida (INH), estreptomina (SM), etambutol (EMB) e pirazinamida (PZA), seguida do teste de susceptibilidade antimicrobiana (TSA) (Brasil, 2017).

Os meios de cultura podem ser sólidos e/ou líquidos, como mostra o quadro 2. Os mais utilizados são os meios sólidos a base de ovo, Löwenstein-Jensen (LJ) e Ogawa-Kudoh (OK), que têm a vantagem de serem de baixo custo e índice de contaminação (Brasil, 2020). A morfologia das colônias varia nos meios sólidos, podendo ser lisa ou rugosa, pigmentada ou não pigmentada (Wildner et al., 2011).

Quadro 1 - Meios de culturas utilizados para diagnóstico de TB e o tempo de crescimento de cada meio.

Tipos de Meio de cultura	Tempo de crescimento
Meio líquido	
Mycobacteria Growth Indicator Tube – MGIT	5 a 42 dias
Caldo middlebrook 7H9	2 a 3 semanas
Meio sólido	
Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh	14 a 60 dias
Agar middlebrook 7H10	2 a 3 semanas

Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana

É utilizado na verificação de resistência às drogas do esquema de tratamento da TB. Os fármacos testados no TSA são as drogas de primeira linha: RIF, INH, SM, EMB e PZA. No Brasil para os casos de TB-MDR ou monorresistência à INH são testados fármacos de segunda linha: fluoroquinolonas (levofloxacina e moxifloxacina) e as injetáveis (amicacina e capreomicina) (Brasil, 2019). Veja abaixo no quadro 3 os métodos disponíveis para o TSA:

Quadro 2 - Métodos para testes de susceptibilidade antimicrobiana.

Métodos/Fármacos	Meio de cultura	Tempo de incubação
Método das Proporções/1ª linha	sólido	até 42 dias
Método da Nitratase/1ª linha	sólido	7 a 14 dias
Concentração Inibitória Mínima/1ª e 2ª linhas	líquido	7 a 14 dias
Método Automatizado MGIT/1ª e 2ª linhas	líquido	5 a 13 dias

Teste Rápido Molecular (TRM)

A partir de 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) endossou formalmente o uso de TRM para detecção de mutações associadas à resistência, estes representam um diagnóstico rápido e econômico para detecção de casos, podendo ser ensaios de sonda em linha (sigla do inglês *Line Probe Assay* - LPA) ou o ensaio Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, EUA) (Cirillo et al., 2017).

O Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, EUA), é um teste de amplificação de ácidos nucleicos por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, que pode fornecer resultados em menos de 2 horas, sem necessidade de tratamento da amostra (WHO, 2014a) tanto para RIF e INH GenoType®MTBDRplus (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) quanto para as drogas de segunda linha GenoType®MTBDRsl (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany). Os ensaios LPA são baseados na amplificação de alvos de região específica do genoma do MTB seguida da hibridização destes produtos amplificados na fita (Cirillo et al., 2017).

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A epidemiologia molecular é uma importante abordagem para monitorar doenças infecciosas, a partir da associação entre a epidemiologia clássica e biologia

molecular, facilitando a detecção da distribuição da doença a partir da informação genética do parasita e das informações demográficas, clínicas e epidemiológicas do hospedeiro (Oudghiri et al., 2018).

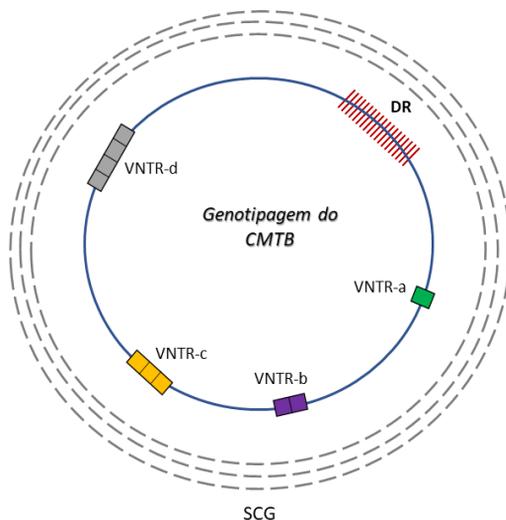
No Brasil a epidemiologia molecular da TB é realizada em instituições para fins de pesquisa. Embora tais técnicas estejam presentes em Laboratórios de Referência Regional para Micobactérias e no Laboratório de Referência Nacional, ainda não são utilizadas como medidas para auxílio na vigilância da TB (droga susceptível, droga resistente ou multidroga-resistente), devido ao grau de complexidade associado ao elevado custo.

Neste contexto, a vigilância molecular da TB utiliza os seguintes métodos: (i) sequenciamento completo do genoma (SCG) em países como a Inglaterra e Espanha - técnica de referência que auxilia na investigação de surtos e na determinação de variantes de sequência conhecidas envolvidas na resistência antimicrobiana (Cabibbe et al., 2018; Oudghiri et al., 2018; Nikolayevskyy et al., 2019); (ii) *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable Number of Tandem Repeats* (MIRU-VNTR) - padrão de referência dentre as técnicas de genotipagem e sua associação ao (iii) *Spoligotyping* que diferencia os membros do CMTB por perfis genéticos específicos (espologitipos).

Spoligotyping e MIRU-VNTR

A genotipagem por *Spoligotyping* e (MIRU-VNTR), revolucionaram a compreensão da epidemiologia da TB (Mendes, 2010; De Miranda et al., 2011). A figura 6 mostra essas duas técnicas moleculares utilizadas para identificação de espécies do CMTB. Em combinação, *Spoligotyping* e MIRU-VNTR, consiste em uma abordagem adequada para estudar epidemiologia, filogenia e adaptabilidade do CMTB de acordo com cada genótipo (Franco, 2016). Dessa forma, mostraram-se em diversos países um excelente instrumento no estudo das relações de clonalidade e dispersão entre cepas de uma determinada população e os grupos populacionais sob maior risco, principalmente onde a ligação epidemiológica não é identificada com o traçado convencional de contatos (Furlaneto et al., 2007).

Figura 6 -Métodos de genotipagem *spoligotyping* e MIRU-VNTR utilizados na epidemiologia molecular da tuberculose.



Métodos de genotipagem do Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), o círculo azul representa o genoma de uma espécie do CMTB; a região de ranhuras vermelhas representa o *locus* DR, alvo da amplificação de até 43 espaçadores na técnica de *Spoligotyping*; os retângulos verde, roxo, amarelo e cinza representam algumas regiões de repetição em *tandem* do genoma (VNTRs), alvos da amplificação na técnica MIRU-VNTR, os círculos pontilhados em cinza representam a amplificação pelo sequenciamento completo do genoma (SCG).

Fonte: Elaborado pelos autores, 2021.

O *Spoligotyping* baseia-se no polimorfismo de DNA do *locus* de repetição direta (*direct repeat* - DR) do CMTB, determina a presença ou ausência dos espaçadores específicos entre as sequências DR (figura 6) (Mendes, 2010; De Miranda et al., 2011). O *Spoligotyping* é uma “técnica de hibridização da linha reversa em blot” que envolve duas etapas. A primeira etapa é a amplificação *in vitro* do DNA na região DR e a segunda é a hibridização dos produtos da amplificação para saber o(s) espaçador (es) amplificado(s) e assim fazer a diferenciação das cepas do CMTB pela visualização da presença das sequências espaçadoras ou pelo número e identidade do(s) espaçador (es) (Takiff et al., 2017).

O MIRU-VNTR foi proposto por Supply et al. (1997), e poucos anos depois, Supply et al. (2000), ao usar o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para mapear

MIRU- 41 *loci* no genoma de 31 cepas diferentes do MTB H37RV identificaram que desses, 12 são polimórficos e, portanto, se qualificam como VNTRs *loci*.

Baseado em estudos anteriores, Mazars et al. (2001), propuseram o método de genotipagem de alta resolução por amplificação de DNA e análise dos 12 VNTR *loci* de Supply et al. (2000). Utilizada por Mazars et al. (2001) para estabelecer os perfis de 72 isolados diferentes de MTB, o método foi considerado excelente, fornecendo resultados compatíveis à técnica “padrão de referência” na época, *IS6110-RFLP*, para eventos epidemiológicos chave como transmissão ou recidiva, permitindo uma comparação confiável de resultados entre os laboratórios, resultando na construção e análise de bancos de dados globais via internet para estudos epidemiológicos e genético populacional em larga escala.

O sistema MIRU-VNTR 12 *loci* apresentou um poder discriminatório limitado, sendo melhor que o *IS6110-RFLP* quando as cepas do CMTB tinham números de cópias de *IS6110* baixo, para as quais o *IS6110-RFLP* é pouco eficaz. Observação feita durante a discriminação de cepas da família Beijing do *M. tuberculosis* (Mazars et al., 2001; Ei et al., 2016).

Por conta das limitações do MIRU-VNTR 12 *loci*, criou-se um subconjunto discriminatório de 15 *loci* para estudos epidemiológicos que servem como ferramentas de tipagem molecular de primeira linha, melhorando de forma significativa e confiável os resultados de estudos epidemiológicos, e o conjunto MIRU-VNTR 24 *loci* voltado para estudos filogenéticos (Supply et al., 2006).

Sequenciamento Genômico

Desde o sucesso do SCG na identificação do genoma inteiro do MTB em 1998 é crescente a busca por essa técnica. A OMS e a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) chegaram a emitir padrões técnicos para patógenos indicando abordagens baseadas em SCG em diagnósticos, orientação de tratamento e estudos epidemiológicos (Woodman et al., 2019; Guimaraes & Zimpel, 2020).

O SCG usa o sequenciamento em larga escala na montagem de genomas de isolados clínicos e por vezes fornecer informações epidemiológicas completas (Galagan, 2014), principalmente em grandes surtos de TB. É uma ferramenta eficiente no rastreamento da dinâmica da transmissão da TB em populações humanas sem recurso prévio a dados epidemiológicos (Oudghiri et al., 2018).

Em determinadas populações, o SCG está sendo utilizado na vigilância da transmissão da TB, assim como na previsão de resistência às drogas anti-TB de primeira e segunda linha (Cabibbe et al., 2018).

Novas técnicas e tecnologia baseadas em SCG levaram a notáveis melhorias na precisão, velocidade de processamento e análise de amostras, juntamente com reduções significativas de custo. Consequentemente, estudos filogenéticos revelaram que a diversidade do MTB, parte do CMTB, é muito maior do que originalmente se entendia (Woodman et al., 2019).

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, K.A.; LAVER, P.N.; MICHEL, A.L.; WILLIAMS, M.; VAN HELDEN, P.D.; WARREN, R.M.; GEY VAN PITTIUS, N.C. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. **Emerg Infect Dis**; 16:1296-1299. 2010.

ANVISA. BRATS - Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. 2011.

ARANAZ, A.; COUSINS, D.; MATEOS, A.; DOMINGUEZ, L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**; 53:1785-1789. 2003.

BAÑULS, A. L. et al. *Mycobacterium tuberculosis*: Ecology and evolution of a human bacterium. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1261–1269, 2015.

BARREIRA, D. Os desafios para a eliminação da tuberculose no Brasil. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, v. 27, n. 1, p. e00100009, 2018.

BRASIL, M. DA S. **A Rede de Teste Rápido para Tuberculose no Brasil- Primeiro ano de implantação**. 2015. v. I

BRASIL, M. DA S. **Boletim Epidemiológico: Tuberculose** 2020.

BRASIL, M. DA S. **Guia de Vigilância em saúde**. 2017. v. 2

BRASIL, M. DA S. Manual Nacional de VIGILÂNCIA LABORATORIAL da TUBERCULOSE e outras MICOBACTÉRIAS. In: MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, **Departamento de Vigilância Epidemiológica**. **Brasília: \ministério da Saúde**, 2008. p. 265–285.

BRASIL, M. DA S. Manual Técnico para o Controle da Tuberculose. **Cadernos de Atenção Básica** n. 6, p. 62, 2002.

BRASIL, M. DA S. **Tratamento diretamente observado (TDO) da tuberculose na atenção básica.** 2011.

BRASIL. Manual de Recomendações para controle da tuberculose no Brasil. 2020. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/manual-de-recomendacoes-para-o-controle-da-tuberculose-no-brasil>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. OFÍCIO CIRCULAR No.7/2019/CGDR/ DCCI/ SVS/MS - Atualização das recomendações sobre o diagnóstico laboratorial da tuberculose. [Internet]. Brasília; 2019 (cited 2021 Jan 06). Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/16/nota-2---Atualizacao-das-recomendacoes-sobre-o-diagnostico-laboratorial-da-tuberculose.pdf>>. 2019.

BRITES, D. et al. A new phylogenetic framework for the animal-adapted *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Front Microbiol**, v. 9, n. 2820, 2018.

BRITES, D.; GAGNEUX, S. **Co-evolution of *Mycobacterium tuberculosis* and *Homo sapiens*.** v. 264, p. 6–24, 2015.

CABIBBE, A. M. et al. **Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*** **European Respiratory Journal**, v. 52, n. 5, 2018.

CIRILLO, D. M.; MIOTTO, P.; TORTOLI, E. **Evolution of Phenotypic Testing.** p. 79–93, 2017.

COELHO, F. S.; MARQUES, E. DE A. Etiologia. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, v. 5, n. 2, 2006.

COSCOLLA, M. et al. Phylogenomics of *Mycobacterium africanum* reveals a new lineage and a complex evolutionary history. *bioRxiv*, 2020.

COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. **Consequences of genomic diversity in *mycobacterium tuberculosis*.** **Seminars in Immunology**, v. 26, p. 431–444, 1 dez. 2014.

COSTA, R. R.; SILVA, M. R.; GONÇALVES, I. C. **Diagnóstico laboratorial da tuberculose : Revisão de literatura.** **Rev Med Minas Gerais**, v. 28, n. Supl 5, p. 197–206, 2018.

COUSINS, D.V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, 53:1305-1314. 2003.

DE MIRANDA, S. S. et al. Spoligotyping of clinical mycobacterium tuberculosis isolates from the state of minas gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 267–273, 2011.

DIVE. Diagnóstico de tuberculose: manejo clínico em adultos e adolescentes ≥ 10 anos. Santa Catarina: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/agrivos/publicacoes/Fluxograma - Diagnóstico de Tuberculose Manejo Clínico em adultos e crianças.PDF>>. Acesso em: 9 out. 2020.

DONOGHUE, H. D. Paleomicrobiology of Human Tuberculosis. **Microbiology Spectrum**, p. 1–14, 2016.

EI, P. W. et al. Molecular strain typing of Mycobacterium tuberculosis: A review of frequently used methods. **Journal of Korean Medical Science**, v. 31, n. 11, p. 1673–1683, 2016.

FRANCO, M. M. J. **Genotipagem E Pesquisa De Resistência Fenotípica E Genética À Rifampicina E Isoniazida Em Linhagens De Mycobacterium Bovis Isoladas De Linfonodos De Bovinos De Abatedouro Na Região Centro-Oeste Do Estado De São Paulo**. p. 103, 2016.

FURLANETO, I. P. et al. Avaliação de diferentes procedimentos para extração de DNA a partir de esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen. **Cad.Saúde Colet.**, Rio de Janeiro, 15 (3): 401 - 414, 2007, v. 15, n. 3, p. 401–414, 2007.

GALAGAN, J. E. **Genomic insights into tuberculosis**. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 5, p. 307–320, 2014.

GANGULY, N. et al. What is new in the diagnosis of tuberculosis? **ICMR BULLETIM**, v. 32, n. 8, 2002.

GUIMARAES, A. M. S.; ZIMPEL, C. K. Mycobacterium bovis: From genotyping to genome sequencing. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 1–37, 2020.

GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus Mycobacterium into an emended genus Mycobacterium and four novel genera. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–41, 2018.

KARLSON, A.G.; LESSEL, E.F. *Mycobacterium bovis* nom. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 20:273-282. 1970.

KOCH, A.; MIZRAHI, V. *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 6, p. 555–556, 2018.

MAZARS, E. et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 4, p. 1901–1906, 2001.

MENDES, N. Genotipagem por Spoligotyping e MIRU de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar. [s.l.: s.n.].

NGABONZIZA, J. C. S. et al. A sister lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex discovered in the African Great Lakes region. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2020.

NIKOLAYEVSKYY, V. et al. Role and value of whole genome sequencing in studying tuberculosis transmission. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 11, p. 1377–1382, 2019.

OLIVEIRA, S. et al. Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF). 2016.

OPROMOLLA, D. V. A.; BAPTISTA, I. M. F. D. **Micobactérias**. In: **Noções de Hansenologia**. [s.l.: s.n.]. p. 7–11.

OUDEGHIRI, A.; CHAOUI, I.; ELMZIBRI, M. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: A Review of Tools and Applications. **Journal of Infectious Diseases & Therapy**, v. 06, n. 06, 2018.

PARSONS, S.D.; DREWE, J.A.; GEY VAN PITTIUS, N.C.; WARREN, R.M.; VAN HELDEN, P.D. Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. **Emerg Infect Dis**, 19:2004-2007. 2013.

RAMACHANDRAN, R.; PARAMASIVAN, C.. What is new in the diagnosis of tumors of the testis? **Indian Journal of Tuberculosis**, v. 50, n. 133–142, 2003.

REED, G.B. Genus *Mycobacterium* (species affecting warm-blooded animals except those causing leprosy). In: Breed RS, Murray EGD, Smith NR (eds), **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 7th edition, The Williams & Wilkins Co, Baltimore, p. 703-704. 1957.

RIOJAS, M. A. et al. Phylogenomic analysis of the species of the mycobacterium tuberculosis complex demonstrates that mycobacterium africanum, mycobacterium bovis, mycobacterium caprae, mycobacterium microti and mycobacterium pinnipedii are later heterotypic synonyms of mycob. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 324–332, 2018.

SANTOS, M. O. **Micobactérias: Identificação E e Perfil De Sensibilidade A Tuberculostáticos Em Amostras Isoladas No Laboratório Central De Saúde Pública Do Estado Do Piauí**, Janeiro 2014 A Março De 2015. [s.l: s.n.].

SUPPLY, P. et al. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. **Molecular Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 991–1003, 31 dez. 1997.

SUPPLY, P. et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4498–4510, 2006.

SUPPLY, P. et al. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 762–771, 2000.

TAKIFF, H. et al. **Tuberculosis**.2017. p. 1-19

TORTOLI, E. et al. Genome-based taxonomic revision detects a number of synonymous taxa in the genus *Mycobacterium*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 75, n. July, p. 103983, 2019.

VAN INGEN, J.; RAHIM Z.; MULDER, A.; BOEREE, M.J.; SIMEONE, R.; BROSCHE R.; VAN SOOLINGEN, D. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. **Emerg Infect Dis**, 18:653-655. 2012.

WHO. Global Tuberculosis Report 2020.

WHO. **The End TB Strategy**. v. 53, n.9, p.1-20, 2013b.

WHO. **The End TB Strategy**.v. 53, n.9, p. 1-26, 2013a.

WHO. **Xpert MTB/RIF implementation manual: Technical and operational 'how - to' practical considerations**. 2014, p. 1-52.

WILDNER, L. M.; NOGUEIRA, C. L.; SOUZA, S. **MICOBACTÉRIAS : EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO**. v. 40, n. 3, p. 207–229, 2011.

WOODMAN, M.; HAEUSLER, I. L.; GRANDJEAN, L. Tuberculosis genetic epidemiology: A latin american perspective. **Genes**, v. 10, n. 1, 2019.

YUN, K. W. et al. Strain typing of mycobacterium tuberculosis isolates from korea by mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats. **Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 29, n. 4, p. 314–319, 2009.

A INFECÇÃO PULMONAR POR *Pseudomonas aeruginosa* ASSOCIADA A FIBROSE CÍSTICA:

Da aquisição ao tratamento

Edilene do Socorro Nascimento Falcão Sarges

Ambulatório de Fibrose Cística, Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brasil.

E-mail: edifalcao@ufpa.br

Yan Corrêa Rodrigues

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará (UEPA), Belém, Pará, Brasil.

E-mail: yan.13@hotmail.com

Marcos Vinicius Hino de Melo

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará (UEPA), Belém, Pará, Brasil.

E-mail: hinomarcos6@gmail.com

Karla Valéria Batista Lima

Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

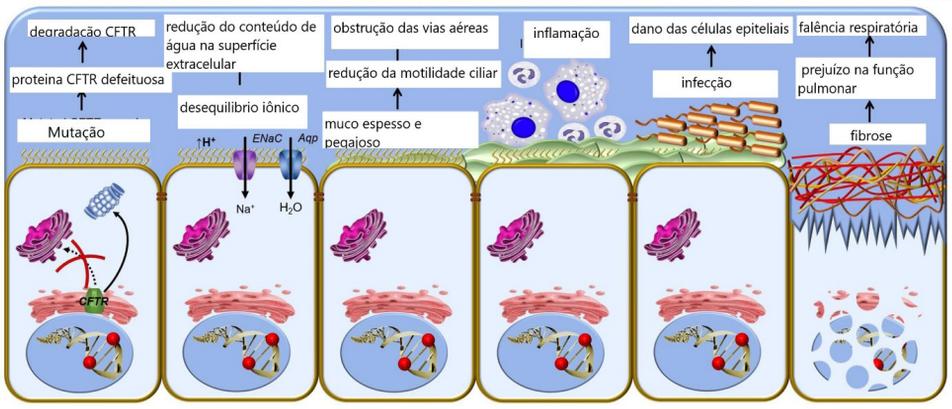
E-mail: karlalima@iec.gov.br

FIBROSE CÍSTICA

Conceito

A fibrose cística (FC) é uma doença genética autossômica recessiva, decorrente da mutação no gene da região 7q31, constituído de 27 exons, que codifica um canal transmembrana que conduz cloro, chamado de CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), que regula o transporte do ânion na superfície celular das glândulas exócrinas. A ausência ou disfunção, quantitativa e/ou qualitativa, desta proteína, causa um influxo compensatório do sódio para o meio intracelular para manter a eletro neutralidade e consequente, influxo de água, desidratação extracelular e produção de muco espesso, podendo levar a quadro de obstrução nas vias aéreas, pâncreas, ductos biliares, canais deferentes e alterações de eletrólitos no suor (Figura 1) (ELBORN, 2016; MARSON et al., 2015; MOCELIN et al., 2017).

Figura 1: Fisiopatologia da doença pulmonar



Fonte: Adaptado de LOPES-PACHECO (2016).

Histórico

A referência mais antiga da existência da FC está no folclore alemão, com relatos datados da Idade Média, que diziam “que aquela criança, que quando beijada na testa tiver gosto salgado, ela é enfeitada, e logo morrerá”. No século XVI, houve o primeiro texto médico que relacionava a pele salgada e lesão no pâncreas com morte

precoce em bebês “enfeitiçados”. Em 1595, foi realizada a primeira autópsia detalhada de uma criança de 11 anos, por Pieter Pauw, na qual descreveu que o pâncreas estava estranhamente inchado. Outras descrições de achados clínicos característicos de FC foram surgindo, como o sabor salgado de bebês, por Alonso e Ruyzes de Fonseca (1606) e a esteatorreia, em meados do século XVI. Em 1838, Nils Von Rosenstein, realizou autópsia em um feto de 7 meses de gestação e descreveu o primeiro caso de íleo meconial. Em 1888, Samuel Gee, relatou alterações digestivas, como baixa estatura, distensão abdominal e episódios de diarreia com fezes fedorentas e volumosas. Landsteiner, em 1905, associou íleo meconial com alterações pancreáticas (NAVARRO, 2015; FARROW, 2015; MIRTAJANI et al., 2017).

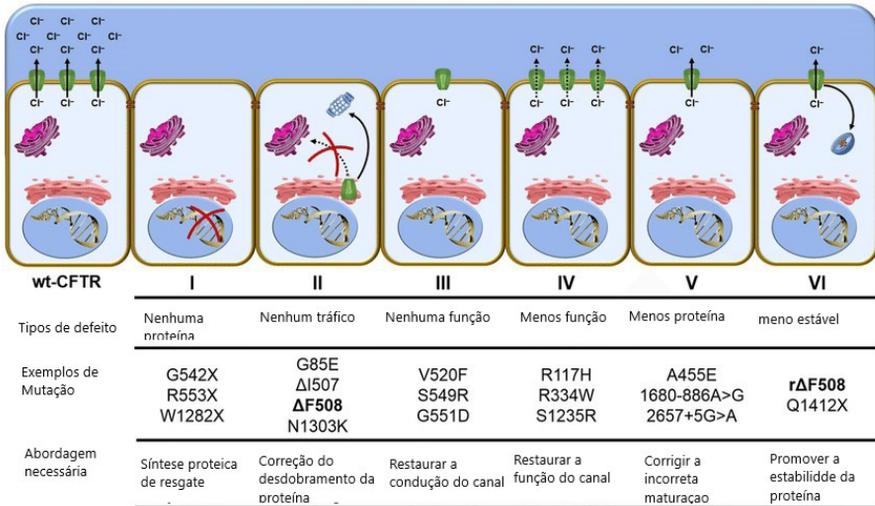
No século XX, surgiram as associações da doença pulmonar com a diarreia e esteatorreia. Em 1936, Guido Fanconi dissociou da doença celíaca e denominou como fibrose cística com bronquiectasias, a associação da insuficiência pancreática e a doença pulmonar crônica em crianças. O termo “fibrose cística do pâncreas” surgiu em 1938, usado por Dorothy Andersen. Já Sydney Farber, em 1945, introduziu o termo “mucoviscidose”, frente a produção do muco espesso. Em 1946, Andersen e Hodges relataram a origem genética da doença como uma mutação autossômica recessiva. Neste mesmo ano, Andersen e Sant’Agnese empregaram pela primeira vez penicilina, como terapia inalatória para tratar as infecções respiratórias. Este último, em seguida descreveu as anormalidades no suor dos pacientes e que era um marcador da doença. Mais tarde sua técnica de análise do suor foi aprimorada por Gibson e Cooke, tornando-se o teste padrão ouro para o diagnóstico da fibrose cística (NAVARRO, 2015; FARROW, 2015; MIRTAJANI et al., 2017).

O tratamento multidisciplinar iniciou em 1957, quando a pediatra LeRoy Matthews instituiu um programa de prevenção de infecções pulmonares e a fisioterapeuta Barbara Doyle começou a aplicar a fisioterapia respiratória para mobilizar as secreções brônquicas. Em seguida os cuidados nutricionais foram implantados por Douglas Crozyer, com dietas ricas em gorduras saturadas e suplementos de enzimas pancreáticas orais. Estas terapias levaram ao ganho de peso, crescimento na estatura e maior sobrevivência. Na década de 80 houve grandes avanços no diagnóstico com a possibilidade da dosagem da tripsina através da triagem neonatal, publicado por Jeannette Crossley, e a introdução do protocolo de tratamento e erradicação da infecção por *Pseudomonas aeruginosa* com uso de nebulizações com antibióticos e administração intravenosa. Com o avanço no conhecimento genético, em 1989, Collins, Tsui e Riordan descobriram a primeira e mais frequente mutação da fibrose cística, a ‘F508del’. Na década de 90, a terapia inalatória se expandiu com a introdução da tobramicina e DNase humana recombinante (alfadornase) e o uso de azitromicina oral. Posteriormente, foi introduzida a solução salina hipertônica nas nebulizações (NAVARRO, 2015).

Atualmente, com a aprovação e ampliação do uso dos medicamentos moduladores da CFTR, é necessário conhecer o perfil genético dos pacientes para adequada eleição da terapia. Aproximadamente 2000 mutações já foram identificadas, muitas ocasionam sintomas pulmonares e gastrointestinais no primeiro ano de vida, mas as manifestações clínicas são variáveis até mesmo na presença da mesma mutação. As mutações que ganham mais atenção são N1303K, G542X, 1717-G>A, R553X, W1282X, G551D, 621+IG>T, A1507, R560 e F508del (deleção de um resíduo de fenilalanina na posição 508), esta última é a de maior prevalência mundial e a maior parte das mutações tem prevalência muito baixa (Figura 2) (SILVA FILHO et al., 2013; MARSON et al., 2015; MIRTAJANI et al., 2017).

Aproximadamente 15% das alterações genéticas não estão relacionadas com doença. As mutações da CFTR estão divididas em seis classes, conforme seu prejuízo na função da proteína, o que facilita a abordagem, pois aponta os processos moleculares e celulares da tradução gênica e o processamento de proteínas e tem relação com a clínica. As mutações de classe I, II e III são relacionadas a perda da função residual da CFTR, o que acarreta, em média, um fenótipo grave. Já os pacientes com mutações da classe IV, V e VI apresentam função residual e um quadro pulmonar leve e são suficientes pancreáticos (ELBORN, 2016).

Figura 2: Classes de mutação da CFTR



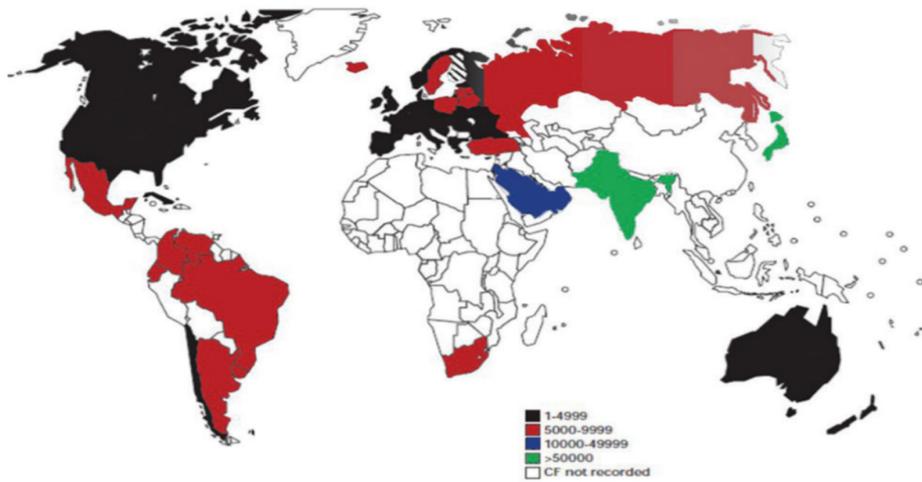
Fonte: Adaptado de LOPES-PACHECO (2016).

A classe I engloba as mutações que afetam a biossíntese da proteína CFTR e acarreta produção de uma proteína pouco estável ou truncada decorrente de um códon de terminação prematura e são degradadas pelo retículo endoplasmático (RE). Na classe II há o processamento anormal da CFTR a qual fica retida no RE, sem serem glicosiladas no Complexo de Golgi, que leva a degradação antes de alcançar seu sítio funcional na membrana celular. A classe III é caracterizada pela proteína alcançar a membrana, mas não há a ativação adequada do canal de Cl⁻. Na classe IV há a redução da condutância do Cl⁻, apesar de haver correta tradução, processamento, transporte e inserção da proteína na membrana apical. Na classe V há produção de proteínas normais, mas em níveis reduzidos em consequência a uma desregulação da transcrição, com maturação ineficiente da proteína. A classe VI apresenta mutações que reduzem a estabilidade da CFTR. A severidade da doença resulta do genótipo da CFTR e de outros fatores genéticos e ambientais, que resultam num quadro clínico heterogêneo e multisistêmico (LOPES-PACHECO, 2016; BURGNER; MOSS, 2018).

Epidemiologia

A FC afeta cerca de 70.000 pessoas em todo o mundo, principalmente a população branca descendente de caucasianos europeus (1:2.000 a 1:3.000), caindo a relação em afrodescendentes 1: 17.000. Na América do Norte, nos Estados Unidos, são cerca de 30.000 casos, e devido seu grande predomínio populacional ser branca, ocorre 1:2.900 nascidos vivos. Na América Latina, varia de 1:3.500 – 8.500, visto que a população é bastante heterogênea. Países como Uruguai e Argentina, cerca de 90% tem origem Caucasoíde, enquanto países como o México, Colômbia e Chile apresentam entre 57% a 87% de sua população mestiça (mistura de Caucasoíde com Ameríndios). No Brasil a incidência de FC em Santa Catarina é 1:6.000, no Paraná 1: 8.000 e em Minas Gerais de 1: 10.000 nascidos vivos, porém, com estimativas variáveis entre estudos (NEBES et al., 2016; MIRTAJANI et al., 2017; MALHOTRA; HAYES JR; WOZNIK, 2019).

Figura 3: Incidência da Fibrose Cística no mundo, WHO



Fonte: Adaptado de MIRTAJANI *et al.* (2017).

A FC era inicialmente considerada uma doença fatal na infância, mas com o diagnóstico precoce, pela triagem neonatal e a confirmação pelo teste do suor, o reconhecimento de formas brandas e os avanços no seu manejo, com a introdução de centros de referência para tratamento especializado com equipe multidisciplinar, e o acesso a terapias diárias com mucolíticos e fisioterapia, antibioticoterapia e vigilância nutricional, a sobrevivência tem aumentado (MACKENZIE *et al.*, 2014; CASTELLANI & ASSAEL, 2016).

Segundo estudos baseados no Registro de Pacientes da Fundação Americana de FC, a mortalidade diminuiu 1,8% ao ano entre 2000 e 2012 e caso esta taxa se mantenha, os nascidos com FC em 2010, tem expectativa de vida de 50 anos. Nos Estados Unidos, em 2018, havia 30.775 pacientes diagnosticados, dos quais 54,8% desta população tinham 18 anos ou mais, e a média de idade era de 19,8 anos (CRULL *et al.*, 2016; CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION, 2018).

Na Europa, conforme dados do Registro de Pacientes da Sociedade Europeia de FC (2017), existia 48.204 casos, com 51,3% de pacientes com idade de 18 anos ou mais, e idade média de 20,8 anos (EUROPEAN CYSTIC FIBROSIS SOCIETY, 2017). No Brasil, os dados do relatório do Registro Brasileiro de Estudos em FC (2017), mostram que de um total de 5.128 pacientes registrados, 28,9% estavam com 18 anos ou mais. A média de idade era de 14,58 ($\pm 11,94$) e vem crescendo a cada ano. Destes, 3,4% dos pacientes foram atendidos no Centro de FC do estado do Pará, desde 2009, incluindo óbitos, abandonos e transferências (REBRAFC, 2017).

Vale ressaltar que o aumento da expectativa de vida propicia a ocorrência da colonização pulmonar por uma larga variedade de patógenos, necessitando de múltiplos tratamentos com antibióticos, podendo surgir cepas resistentes (SCHAFFER, 2015). Os registros de pacientes, nos diversos países, são importantes por mostrar dados de aspectos demográficos, de diagnóstico e tratamento, direcionando ações de políticas de saúde conforme as realidades e necessidades nacionais e regionais. Além de propiciar aos profissionais de saúde dos centros de referência um melhor acompanhamento clínico de seus pacientes.

Alterações pulmonares

Apesar dos pulmões ao nascimento serem normais em sua estrutura, os pacientes desenvolvem, na sua maioria, uma doença respiratória progressiva, com infecções de repetição e crônicas, resultando em retenção de muco, inflamação local, bronquiectasia, obstrução das pequenas vias aéreas, com progressivo prejuízo respiratório e funcional e, posterior, insuficiência respiratória. Portanto, a doença pulmonar crônica continua sendo a principal responsável pela alta morbidade e mortalidade na FC (CRULL et al., 2016; ELBORN, 2016; SILVA FILHO et al., 2013).

As alterações pulmonares se iniciam pela própria mutação genética da proteína CFTR, que resulta num volume líquido aumentado, desidratado e espesso na superfície das vias aéreas (ASL), o que prejudica a depuração mucociliar do trato respiratório. Este mecanismo facilita que as bactérias inaladas residam na ASL alterada e causem a infecção aguda com resposta inflamatória vigorosa, com acúmulo de citocinas inflamatórias e prejuízo na resposta do sistema imune do hospedeiro. A estimulação imunológica contínua e/ou a incapacidade do hospedeiro de controlar a inflamação leva a inflamação crônica pulmonar (GELLATLY & HANCOCK, 2013; BLOHMKE et al., 2012).

Há evidências que a própria mutação da CFTR influencia a capacidade do hospedeiro de regulação da função de defesa com menor eficiência no reconhecimento, internalização (endocitose) e morte bacteriana, além de menor expressão de citocinas que promovem a resposta imune inata e da produção de proteínas endógenas anti-inflamatórias. Pacientes assintomáticos e com boa função pulmonar já apresentam concentrações elevadas de citocinas pro-inflamatórias, neutrófilos, peroxidases e oxidantes livres no lavado brônquico. Tais achados sugerem que a desregulação inflamatória é inerente a CFTR (ROSSI et al., 2019).

A doença pulmonar tem distribuição regional heterogênea de bronquiectasia, dano tecidual e inflamação. Imagens radiológicas e estudos histopatológicos mostram

predomínio de dilatações brônquicas e enfisema nos lobos superiores dos pulmões, comparado aos lobos inferiores. Os fatores anatômicos, imunes e do microrganismo para que isso ocorra são pobremente conhecidos (MALHOTRA; HAYES JR; WOZNIAK, 2019).

A infecção e colonização do trato respiratório por patógenos, como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa*, Complexo *Burkholderia cepacia* e *Stenotrophomonas maltophilia*, dentre outros, são frequentes nesta população. A prevalência desses patógenos varia com a idade, em que as infecções por *S. aureus* em geral ocorrem nos primeiros meses de vida, enquanto as infecções por *P. aeruginosa* tendem a aparecer mais tardiamente. O espectro de patógenos isolados do pulmão de pacientes com FC tem aumentado com a inclusão de bactérias Gram-negativas, micobactérias atípicas, fungos e vírus (SILVA FILHO et al., 2013; SCHAFFER, 2015).

Desta forma, o exame bacteriológico para germes inespecíficos deve ser realizado no mínimo de 3 em 3 meses, e pesquisa anual de micobactérias e fungos, o que é de grande importância no seguimento destes pacientes, pois auxilia no diagnóstico e manejo precoces das infecções respiratórias, determinando os microrganismos que infectam e colonizam os pulmões e seu tratamento adequado. Tal controle gera impacto na qualidade de vida, sobrevida e mantém as perspectivas para o transplante pulmonar. Além de direcionar medidas de controle de infecção entre pacientes e entre eles e o meio ambiente ou aparelhos de terapia respiratória (LUTZ et al., 2011; ATHANAZIO et al., 2017).

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa aeróbica, não fermentadora, não esporulada, pertencente à família *Pseudomonadaceae*, observada como bacilos isolados, aos pares ou em curtas cadeias e é móvel devido a presença de flagelo polar. É encontrada frequentemente no solo e na água, pode persistir em baixas densidades, em 4° a 42°C e infectar plantas e mamíferos. Isolados de *P. aeruginosa* podem ser identificados em meios de cultura pela morfologia de suas colônias e produção de pigmentos, principalmente a pioverdina e piocianina, e menos frequente a piorrubina e piomelanina. Nas reações bioquímicas pode ser observado resposta positiva para arginina hidrolase, indofenoloxidação da glicose e utilização de citrato (MANDELL, 2009; TÜMMLER et al., 2014; RODRIGUES et al., 2018).

O genoma de referência de *P. aeruginosa* é da cepa PA01, isolada há 50 anos, constituído por 6,3 mega pares de base (Mb), com grande diversidade genética e funcional. Cerca de 150 genes codificam proteínas da membrana externa capazes de

exportar fatores de adesão, motilidade, antibióticos e virulência e outros 300 genes envolvidos na absorção de nutrientes. A capacidade de sobreviver em vários nichos é decorrente ao tamanho do genoma, o alto percentual de genes reguladores e a capacidade de expansão em ambientes nutricionalmente restritos. O pangenoma desta bactéria é constituído por 3 tipos de genes: núcleo do genoma, que compreende os genes identificados em todos os isolados; flexíveis, estão presente em mais de uma cepa, mas não em todas, em geral inseridos em bloco e agrupados em loci e codificam propriedades de adaptação ao ambiente; e genes únicos, presente em uma única cepa (FRESCHI et al., 2018b; BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019).

É um microrganismo de grande relevância clínica e epidemiológica, visto que é comumente encontrada nas infecções relacionadas aos cuidados de saúde do trato urinário, respiratório e sítios cirúrgicos, principalmente de pacientes hospitalizados ou imunocomprometidos. Esta bactéria apresenta grande capacidade de adaptação, resistência a antimicrobianos e secreção de fatores virulência que favorecem a sua persistência e sobrevivência no meio natural e artificial de alta pressão seletiva, como os hospitais. As infecções com *P. aeruginosa* multidroga resistente (MDR) são associadas com hospitalizações mais longas, maiores custos hospitalares e aumento das taxas de morbidade e mortalidade (MADIGAN et al., 2016; MARTINS et al., 2013; GELLATLY & HANCOCK, 2013; HASSUNA, MANDOUR, MOHAMED, 2020).

Estudos moleculares das cepas das infecções iniciais apontam que os pacientes com FC, são portadores de cepas não clonais, ou seja, isolados únicos. O compartilhamento de cepas entre pacientes é significativamente mais observado em pessoas de maior idade, provavelmente decorrente de repetidas exposições. A ocorrência de transmissão ocorre, a partir do contato íntimo, prolongado e fechado (PARKINS; SOMAYAJI; WATERS, 2018; OKUR et al., 2019). O modo de transmissão se dá pela exposição direta e indireta a secreções respiratórias e gotícula de transmissão. *P. aeruginosa* coloniza a orofaringe do indivíduo e atinge o trato respiratório inferior por microaspiração. Sua persistência neste habitat atípico, é um paradigma como uma bactéria ambiental consegue conquistar, adaptar-se e persistir no ambiente pulmonar e ainda evadir-se dos mecanismos de defesa e quimioterápicos em um hospedeiro suscetível. A colonização das vias aéreas do paciente com FC, o hospedeiro é imunocompetente em termos de resposta humoral e celular, mas apresenta *clearance* das vias aéreas prejudicada, o que favorece a microevolução genética e fenotípica da bactéria (CRAMER; WIEHLMANN; TÜMMLER, 2010; MARQUES, 2011; SCHAFFER, 2015)

No entanto, no curso natural da doença pulmonar há o aparecimento de infecções intermitentes por *P. aeruginosa* com diferentes cepas com fenótipos não mucóides, e se não houver a erradicação na fase aguda, ocorre a infecção crônica ou a colonização

por *P. aeruginosa* mucóide, consequente a hiperprodução do polissacarídeo alginato. Mais de 50% dos pacientes portarão clones de cepas adquiridas inicialmente, mesmo após 20 anos de colonizados. A infecção crônica é uma forma rara de persistência de um microrganismo por décadas no hospedeiro, sem disseminar para outro órgão. Sua permanência é produto da multidroga resistência e da patogenicidade multifatorial de *P. aeruginosa*, que depende da regulação de genes de virulência e expressão de fatores, como: adesinas, exotoxinas, proteases e pigmentos (JABALAMELI et al., 2012; SENTURK et al., 2012; TÜMMLER et al., 2014).

Pacientes cronicamente infectados por *P. aeruginosa* podem apresentar população mista de forma mucóide e não mucóide, sem diferenças na sua distribuição regional nos pulmões. No entanto, as colônias com morfologia mucóide ou mista, demonstram maiores concentrações de citocinas pro-inflamatórias como a IL-1 β , TNF- α e IL-8, quando comparados a culturas negativas para *P. aeruginosa* de LBA ou contendo a forma não mucóide. Estudos publicados demonstram que os danos pulmonares na FC estão relacionados a maiores concentrações de neutrófilos e seus derivados (MALHOTRA et al., 2018; MALHOTRA; HAYES JR; WOZNIAK, 2019).

Uma vez estabelecida nas vias aéreas do paciente, a bactéria sofre mudanças adaptativas como perda da motilidade pela desregulação da expressão do flagelo, de outros fatores de virulência e super-produção de exopolissacarídeo, como o alginato, o qual confere o *status* mucóide e maior resistência a terapia antibiótica. A infecção crônica, inicialmente é monoclonal antes de sofrer mudanças adaptativas, a qual acelera o declínio da função pulmonar e pior prognóstico (BLANCHARD; WATERS, 2019).

Resistência antimicrobiana

Na infecção por cepas não mucóide o sucesso da terapia antimicrobiana precoce é bem relatado. Com a instalação de cepas mucóides ou na infecção crônica, o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* tem se tornado mais difícil devido ao avanço da resistência a múltiplas classes de antibióticos, incluindo β -lactâmicos, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e polimixinas (FERREIRA et al., 2015; JACOME et al., 2012). Devido sua capacidade de inibição da ação de drogas antibacterianas através de mecanismos de resistência intrínseca, adaptativa e adquirida, esta espécie compõe a lista de prioridade crítica da Organização Mundial de Saúde (OMS) como um patógeno crítico para estudos e desenvolvimento de novos antibióticos, principalmente, devido sua resistência a carbapenêmicos (TACCONELLI et al., 2017).

P. aeruginosa é intrinsecamente resistente a vários antibióticos como penicilina, ampicilina, cefalosporinas de 1^a e 2^a geração, sulfametoxazol- trimetropima e

clorafenicol. Seu tratamento é composto por drogas que é usualmente sensível como aminoglicosídeos, penicilinas semi-sintéticas como piperacilina e ticarcilina, cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações, ceftazidima, cefepime, carbapenênicos e fluorquinolonas. Nas exacerbações pulmonares dos pacientes com FC a farmacocinética dos antibióticos é alterada e as doses são ajustadas, sendo indicado dois ou mais antibióticos, em geral um β -lactâmico e um aminoglicosídeo (LUTZ, 2010; ATHANAZIO et al., 2017).

A resistência intrínseca é constituída pela baixa permeabilidade da membrana externa, expressão de bombas de efluxo, que expulsam o antibiótico para fora da célula e produção de enzimas que inativam antibióticos, como β -lactamases. São características inatas que reduzem a eficácia do antibiótico através de propriedades estruturais e funcionais (BLAIR et al., 2015).

Os antibióticos devem ser capazes de penetrar na membrana celular de *P. aeruginosa* para atingir alvos intracelulares. A baixa permeabilidade da membrana externa da bactéria é devida sua membrana citoplasmática ser constituída de bicamada fosfolipídica simétrica e uma membrana externa assimétrica com uma face interna fosfolipídica e uma camada externa lipopolissacarídeo, incorporada com porinas que formam canais de proteínas para captação de diferentes nutrientes e para a estabilidade do envelope. Fármacos hidrofílicos (β -lactâmicos) utilizam as porinas para entrar na célula, já os hidrofóbicos (macrolídeos) se difundem através da bicamada lipídica (CHEVALIER et al., 2017).

Em *P. aeruginosa* a proteína OprF é a porina não-específica predominante, responsável pela captação não específica de íons e nutrientes, incluindo sacarídeos, mas possui baixa eficiência para difusão de antibióticos. A ausência desta proteína leva ao aumento da formação de biofilme. A porina específica OprD contém sítios de ligação a antibióticos carbapenênicos e sua ausência aumenta a resistência a esta classe. A superexpressão da porina OprH tem sido associada a aumento da resistência a polimixina B e gentamicina (CHEVALIER et al., 2017; PANG et al., 2019).

O mecanismo de hiper-expressão de bomba de efluxo está presente na bactéria antes da era de antibióticos e é responsável pela extrusão de compostos tóxicos do meio intracelular, através de bombeamento ativo dependente de energia. O sistema de efluxo da família de Resistência Nodulação Divisão (RND) é predominante e 4 deles desempenham papel chave na resistência da *P. aeruginosa*. A expressão de MexAB-OprM confere uma suscetibilidade basal baixa a quase todos β -lactâmicos (exceto imipenem) e fluorquinolonas; MexCD-OprJ é capaz de bombear β -lactâmicos. MexEF-OprN bombeia quinolonas, e MexXY-OprM expelle aminoglicosídeos (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019; PANG et al., 2019).

A expressão de enzimas que inativam os antibióticos é um dos principais mecanismos intrínsecos de resistência. A produção de β -lactamases é codificada nos cromossomos ou plasmídeos e o gene induzível AmpC, codifica uma β -lactamase enzima hidrolítica que age catalisando a hidrólise do anel β -lactâmico, formando um derivado sem ação terapêutica, como penicilinas e cefalosporinas. Algumas cepas de *P. aeruginosa* produzem β -lactamases das classes A, C e D que hidrolisam β -lactâmico através serina sitio ativa e da classe B que são metaloenzimas (M β L) que requerem íons zinco para hidrolisar. Algumas cepas podem produzir β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) que conferem alto grau de resistência a maioria dos β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e aztreonam) (SILVA, 2015; PANG et al., 2019)

Em relação a resistência a aminoglicosídeos, em *P. aeruginosa* é multifatorial, na qual a modificação enzimática de grupos de amino e glicosídeo na estrutura molecular do aminoglicosídeo tem papel predominante. Três tipos de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos foram descritas, as quais são responsáveis pela inativação de diversos antibióticos que compõem esta classe: a fosfotransferase (ex: neomicina), acetiltransferase (ex: gentamicina, tobramicina) nucleotidotransferase (gentamicina, ampicacina e tobramicina) (PANG et al., 2019).

A resistência adquirida é responsável pela maioria das cepas MDR. Fenômenos de transferência horizontal de genes de resistência transportados em plasmídios, transposons, profagos ou integrons, via conjugação ou transformação e transdução podem reforçar a resistência intrínseca em *P. aeruginosa*. As mutações em diferentes *loci* cromossômicos também podem ocorrer e levar a desregulação de um mecanismo de resistência preexistente, como mutações que alteram o alvo do antibiótico, como mutação na girase DNA que reduz a afinidade de ligação desta enzima a fluoroquinolonas, conferindo resistência, ou a mutação em genes, como *mexZ*, responsáveis em suprimir a expressão de *mexXY*, que leve a superexpressão da bomba de efluxo MexXY, acarretando resistência a aminoglicosídeos e outros antibióticos que miram ribossomos. Mutações espontâneas podem afetar a expressão e função de porinas específicas, reduzindo a permeabilidade da membrana bacteriana e aumentando a resistência (FERNANDEZ; HANCOCK, 2012; GELLATLY; HANCOCK, 2013; OLIVER et al., 2015).

O mecanismo adaptativo aumenta a capacidade da bactéria de resistir ao ataque do antibiótico por alteração transitória no gene e/ou expressão de proteínas em resposta aos estímulos do ambiente e pode ser reversível quando não houver mais estímulo. Um bom exemplo inclui a formação de biofilme na superfície das células epiteliais do pulmão, pela produção de DNA, proteínas e exopolissacarídeos. O biofilme limita o acesso de antibióticos às bactérias, protege da resposta imune do hospedeiro e há a geração de células menos sensíveis, o que resulta na persistência da infecção, como

ocorre na FC (TAYLOR et al., 2014; SANDOVAL-MOTTA; ALDANA, 2016).

Além disso, pode ocorrer a combinação dos mecanismos de resistência intrínsecos (bomba de efluxo, impermeabilidade da membrana externa, β -lactamases), adquiridos (mutação, transferência horizontal) ou adaptativos (alterações de membrana), acarretando a somente algumas classes de antibióticos mostrarem-se efetivos para o manejo dessas infecções, com destaque para os carbapenêmicos e polimixinas (GELLATLY & HANCOCK, 2013; HONG et al., 2015; CASELLAS, 2011).

Fatores associados à virulência

Além dos mecanismos de resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa*, existem os fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade multifatorial, que estão relacionados às suas aderências, como flagelo e pili tipo 4, e toxinas secretada pelos 2 principais sistemas de secreção da bactéria. O Sistema de Secreção do Tipo 2 (SST2) secreta a exotoxina A (exoA), protease alcalina (AprA), protease tipo IV, elastase A e B (LasA e LasB), fosfolipase H. As exoenzimas S, T, Y e U (ExoS, ExoT, ExoY e ExoU) são secretadas pelo Sistema de Secreção do tipo III (SST3). A superexpressão do exopolissacarídeo alginato favorece a habilidade de formação da forma mucóide e a formação do biofilme, conferindo mais resistência antimicrobiana (FAZELI & MOMTAZ, 2014; LEE & JONES, 2018; HASSUNA, MANDOUR, MOHAMED, 2020).

O SST3 é um sistema utilizado por muitas bactérias Gram-negativas que injeta toxinas diretamente na célula do hospedeiro. O ExsA é o maior regulador da expressão gênica do SST3, o qual possui regulon com cerca de 40 genes codificadores de funções regulatórias, o maquinário de translocação e secreção, efetores e chaperonas efetoras específicas. Os genes estão organizados em 5 operons e agrupados no genoma. Os genes codificam efetores e as respectivas chaperonas estão dispersos ao longo do cromossoma (McMACKIN et al., 2019).

A presença de genótipos e expressão no SST3 está associada com o aumento da mortalidade em pacientes não fibrose cística infectados em sítios diversos, quando há mais de uma das proteínas secretadas, com destaque a ExoS, ExoU e PcrV. A translocação das proteínas efetoras da bactéria (ExoY, ExoT, ExoS e ExoU) para a célula do hospedeiro ocorre por um apêndice tipo agulha através de um poro na membrana da célula hospedeira. Estas exotoxinas são codificadas pelos genes, *exoY*, *exoT*, *exoS* e *exoU*, respectivamente, e suas toxinas são expressas de forma variável nas diferentes cepas e isolados de *P. aeruginosa* (RODRIGUES et al., 2018).

A maioria das cepas de *P. aeruginosa* apresenta o virulotipo invasivo – *exoS⁺/exoU⁺*, enquanto, o virulotipo citotóxico – *exoS⁻/exoU⁻* é de menor prevalência.

A presença concomitante de ambos os genes *exoS* e *exoU* ainda é considerado um fenômeno raro (RODRIGUES et al., 2020; HORNA et al., 2019; SAWA et al., 2020). Os genes *exoT* e *exoY* estão presentes em quase todas as cepas, e suas toxinas têm menor papel na virulência, pois ensaios *in vivo* e *in vitro* demonstraram pouca toxicidade, por isso seus efeitos na patogênese precisam ser melhor investigados (GELLATLY & HANCOCK, 2013; HORNA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2018).

ExoS é uma enzima bifuncional e possui dois domínios terminais ativos, a porção N-terminal ativadora de GTPase (GAP) e uma porção C-terminal com atividade de ADP-ribosiltransferase (ADPRT), as quais destroem a organização do citoesqueleto de actina. A última tem maior papel patogênico, pois sua atividade induz o aumento da permeabilidade através da junção célula-célula facilitando a invasão bacteriana, e é ativada pela proteína eucariótica fator de ativação de ExoS (FAS), além de possuir propriedades anti-fagocíticas necessárias para o estabelecimento da infecção aguda pulmonar em pacientes com pneumonia por *P. aeruginosa* (HARMER et al., 2012; SAWA et al., 2014). ExoT tem função semelhante, mas com atividade de ADPRT deficiente comparado com ExoS, e possuem proteínas alvos diferentes, mas também evita a internalização da *P. aeruginosa* por células imunológicas e impede o processo de cicatrização (CHATTERJEE et al., 2016).

O ExoU é uma fosfolipase, marcadora de virulência em infecção aguda e é associada ao fenótipo citotóxico, 100 vezes mais potente que o ExoS, podendo causar a morte celular de forma rápida, em células hospedeiras eucariotas, com perda da integridade da membrana plasmática, levando a necrose, em sítios não FC. (GELLATLY & HANCOCK, 2013; KIPNIS et al., 2006; RODRIGUES et al., 2018). O gene *exoU* foi observado, primeiramente, na cepa PA103, diante da presença da secreção da proteína 74-kDa, regulada por *exsA*, um ativador transcripcional do SST3 em *P. aeruginosa*, denominada como ExoU. Posteriormente, foi identificado na cepa PA14 duas ilhas de patogenicidade de *P. aeruginosa*, PAPI-1 e PAPI-2, neste último, se encontra o *exoU*, provavelmente, devido a uma transferência de gene via horizontal. Análises sugerem que houve a transposição em um plasmídeo transmissível seguido de transferência para outras cepas e posterior integração dentro do gene RNAt, no qual adquiriu sequências de inserção, sofreu supressões e rearranjos (ENGEL; BALACHANDRAN, 2009; HARMER et al., 2012; SAWA et al., 2014; SAWA et al., 2020).

ExoY é uma adenilato ciclase dependente do fator do hospedeiro, que aumenta a concentração do mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPc) no citosol celular. O aumento dessa concentração causa formação de fendas entre microvasos do endotélio pulmonar, e conseqüentemente, maior permeabilidade tecidual, podendo acarretar complicações clínicas. A atividade adenil-ciclase do ExoY requer um fator

celular eucariótico desconhecido para a sua ativação (KIPNIS et al., 2006; SAWA, et al., 2014; RODRIGUES et al., 2018).

Outro fator de virulência que tem papel relevante em pacientes com fibrose cística está a capacidade de adesão de *P. aeruginosa* ao tecido pulmonar. Algumas cepas de *P. aeruginosa* podem sofrer uma transformação de uma forma não mucóide, na infecção inicial, para a forma mucóide com o avanço da doença. Na forma mucóide, as cepas sofrem uma mudança fenotípica, caracterizada pela superprodução de um exopolissacarídeo, denominado alginato, com codificação relacionada aos genes *algU* e *algD* (CHEN et al., 2005; RODRIGUES et al., 2018; LLOYD et al., 2019).

O alginato é responsável pela aderência à superfície epitelial do pulmão, protege a bactéria contra a resposta imune do hospedeiro, liberação de espécies reativas de oxigênio, redução da quimiotaxia polimorfonuclear e inibição de fatores do sistema complemento. Além disso, permite o desenvolvimento de biofilmes que reduzem a ação de antibióticos, com a formação de micro colônias, associada a maior dificuldade ou quase impossibilidade de erradicação do patógeno, desencadeando uma grande resposta inflamatória (MARTINS et al., 2013; SILVA FILHO et al., 2013; CHATTERJEE et al., 2016). Esta superprodução de alginato está frequentemente associada a um pior prognóstico do paciente. A forma mucóide resulta da perda da regulação do fator AlgU, pela mutação no fator anti-sigma *muca*. A proteína MucA junto com MucB da *P. aeruginosa*, sequestram o AlgU para a membrana citoplasmática. A perda da função *muca* resulta em AlgU livre para interagir com o núcleo de RNA polimerase e transcrição direta de seus genes alvo, entre eles os genes de biossíntese de alginato localizados no operon *algD* e o próprio operon *algU*, acarretando níveis elevados de AlgU e produção de alginato. Em isolados clínicos de FC, a mutação mais frequente, é a mutação *mucaA22*, que altera o MucA. Estudos anteriores mostraram um aumento no SST3, diminuição na produção de flagelos e desregulação no *quorum sensing* dependente de C4-HSL em biofilmes associados a mutação *muca* (RYALL et al., 2014).

A forma mucóide favorece a permanência da bactéria no pulmão e a infecção crônica está relacionada com a deterioração acelerada da função pulmonar, do estado nutricional e até a desnutrição, com aumento da mortalidade. Logo, o cuidado padrão é tentar erradicar precocemente as aquisições desta bactéria, com uso de antibioticoterapia agressiva, para prevenir a deterioração a longo prazo. No entanto, em 10-40% dos pacientes se observa falha no tratamento (DASSIOS et al., 2014; WATERS, 2014).

Assim, a persistência de *P. aeruginosa* no pulmão do fibrocístico ocorre em decorrência da: (I) liberação de exoprodutos que protegem a bactéria da resposta imune do hospedeiro; (II) resistência antibiótica devido a pobre permeabilidade da membrana

externa, deficiência da eficácia de múltiplas drogas e a liberação de β lactamases; (III) mudança fenotípica, frente a sua grande flexibilidade genética e metabólica, apresentando um grande número de eventos de mutação dentro do genoma, como a conversão para o fenótipo mucóide e formação de biofilme; 4) repressão da expressão de flagelos (imunoestimuladores) evitando o reconhecimento imune. Esta repressão genética deve ser em resposta as mutações ocorridas e que resultam em permanente adaptação (DAVIES, 2002; GÓMEZ & PRINCE, 2007; RODRIGUES et al., 2018).

Tratamento

A adoção de um tratamento antimicrobiano agressivo na primeira detecção de infecção por *P. aeruginosa* é primordial para melhora dos resultados clínicos e deve estar associado com medidas de controle de infecção. No caso da FC, inclui os equipamentos de terapia respiratória e o meio ambiente, para redução dos riscos de reinfecção, morbidade, mortalidade e custos do tratamento. Além disso o padrão de resistência antimicrobiana hospitalar e nos Centros de Referência deve ser avaliado continuamente para ajustes quando necessário (MATOS et al., 2016; CONCEIÇÃO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2020; SILVA FILHO et al., 2013).

Segundo as Diretrizes Brasileiras de Diagnóstico e Tratamento da Fibrose cística (2017), o tratamento da erradicação de *P. aeruginosa* na infecção respiratória inicial tem por finalidade eliminar o agente e postergar a infecção crônica. A terapêutica mais utilizada pelos centros de referência é o uso de tobramicina inalatória, 300mg, duas vezes ao dia, por 28 dias. O uso de coletismetato de sódio (1.000.000 a 2.000.000 UI) duas vezes ao dia, associado a ciprofloxacina oral por 2-3 semanas é uma alternativa, com resultados consistentes. A terapia inalatória pode se estender por 2-3 meses. Em alguns casos pode ser indicado a via endovenosa por 2 semanas, sempre seguida da antibioticoterapia inalatória. O sucesso da erradicação é quando as culturas subsequentes são negativas por 1 ano ao término do tratamento, além da melhora clínica significativa (ATHANAZIO et al., 2017; CASTELLANI, C. et al., 2018).

Na infecção crônica uma das estratégias principais de supressão de *P. aeruginosa* é a terapia com antibióticos inalatórios que promovem uma melhora da função pulmonar, reduzem a frequência das exacerbações respiratórias e melhoram a qualidade de vida dos pacientes cronicamente infectados por este microrganismo (SILVA FILHO et al., 2013).

A tobramicina, coletismetato de sódio e aztreonam inalatórios se destacam, com uso em meses alternados por 28 dias, para evitar a resistência bacteriana. A tobramicina é o mais empregado e estudado, sendo indicado em pacientes a partir dos 6 anos. Em casos graves pode ser indicado uso contínuo ou alternar antimicrobianos.

É recomendado a desobstrução brônquica por fisioterapia prévia à inalação com antibióticos para maior deposição do mesmo (ATHANAZIO et al., 2017).

A infecção crônica é seguida de exacerbações pulmonares agudas que levam a maior dano e perda progressiva da função pulmonar e que exigem terapia antibiótica adicional, a nível hospitalar ou em domicílio. É caracterizada por uma mudança em 2 dos seguintes 7 itens: mudança no volume do escarro; aumento da tosse; aumento do mal-estar, fadiga ou letargia; anorexia ou perda de peso; diminuição do VEF₁ em 10% ou mais; alterações radiológicas novas; aumento da dispneia. Outros escores utilizados são Cystic Fibrosis Clinical Score ou de Ramsey, com 11 sinais e sintomas (SILVA FILHO et al., 2013; ASSOBRAFIR, 2019).

A terapia utilizada para o tratamento das exacerbações é a administração intravenosa da combinação de drogas com mecanismos de ação distintos, a fim de minimizar o risco de resistência aos antimicrobianos. Assim, o recomendado é a associação de um aminoglicosídeo e um beta-lactâmico, em geral por 10 dias (SILVA FILHO et al., 2013).

A azitromicina é recomendada para a melhora da função pulmonar e redução das exacerbações pulmonares em pacientes acima de 5 anos de idade, colonizados por *P. aeruginosa* ou nos não colonizados, mas com exacerbações frequentes. Com posologia de 3x/semana, por 6 meses e avaliar a resposta. A ação do macrolídeo na FC é a redução da virulência da *P. aeruginosa*, diminuição da aderência bacteriana ao epitélio respiratório, redução da motilidade bacteriana e interferência na produção de biofilme. Já no hospedeiro, tem ação imunomoduladora com a interferência na produção da elastase por neutrófilos, inibição da produção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos alveolares e diminuição na formação de muco (SILVA FILHO et al., 2013; ATHANAZIO et al., 2017; CASTELLANI et al., 2018).

Os avanços no tratamento nos últimos anos minimizam os efeitos deletérios nos pulmões e aumentam a sobrevida e qualidade de vida destes pacientes. As terapias diárias, incluindo a fisioterapia respiratória, numerosas medicações orais e inalatórias (mucolíticos, broncodilatadores e/ou antibióticos), suplemento nutricional e vitaminas determinam um gasto de tempo complexo, que pode dificultar a aderência e negligenciar o seguimento das medidas de limpeza de nebulizadores, que podem ser fonte de reinfecções por microrganismos. Em média são gastos 108 min/dia nestas terapias, onde as nebulizações correspondem a 41 min deste total (SILVA FILHO et al., 2013; BODNÁR et al., 2016; HOHENWATER, 2016).

O desenvolvimento das terapias inalatórias é uma conquista no tratamento desses pacientes, e novas terapias inalatórias vêm sendo desenvolvidas. Assim, o risco de contaminação dos nebulizadores e equipamentos de terapia respiratória

mais indicados pelos centros brasileiros (oscilador oral de alta frequência [OOAF] e terapia por pressão positiva expiratória [EPAP]), para uso diário, em pacientes com FC colonizados por bactérias transmissíveis, são maiores. Desta forma, a resistência a desinfecção e sua persistência nos equipamentos em forma de biofilme é problema no controle das infecções (BRZEZINSKI et al., 2011; DONADIO et al, 2020).

Neste contexto, a adesão ao tratamento medicamentoso e na desinfecção dos equipamentos é primordial no controle das infecções. Porém, as taxas de adesão baixas nos centros de referências são comuns e estão associadas ao pior prognóstico, reduzido controle da doença, absenteísmo escolar ou ocupacional e aumento das exacerbações. É citado que a adesão é inversamente proporcional à idade dos pacientes, principalmente na adolescência, quando em geral a doença pulmonar se acentua (SILVA FILHO et al., 2013).

Outra preocupação são as infecções cruzadas nos programas de FC e que requerem atenção especial. Elas podem ocorrer do ambiente para o indivíduo ou de indivíduo para indivíduo durante programas educacionais, programas de reabilitação pulmonar, nos Centros de FC e na convivência familiar ou social com outros pacientes com FC, apesar de vários estudos terem demonstrado que na FC *P. aeruginosa* é procedente, em geral, do meio ambiente (RIDDERBERG et al., 2016). No estudo de Van Daele et al. (2005), com 76 pacientes que frequentavam um programa de reabilitação pulmonar, foi observado 8 casos prováveis de transmissão de paciente para paciente. Entretanto, na pesquisa de Ridderberg et al. (2016), de 170 isolados de *P. aeruginosa* de 24 pacientes, os dados sugerem que não houve nenhuma transmissão cruzada entre os pacientes que participaram de um programa educacional. Dados que sofrem interferência da realidade individual dos serviços e suas medidas de controle de infecção e adesão pelos pacientes e equipe.

Frente a sua diversidade genética, também tem tido evidências de transmissão de paciente para paciente de clones de alto risco, com grande morbidade e resistência antimicrobiana. Em 1986, foi relatado o primeiro surto causado por *P. aeruginosa* resistente a vários antibióticos, no Centro de Referência de FC, na Dinamarca (FERREIRA et al., 2015; OLIVER et al., 2015).

Outro fator especial em estudo que pode influenciar na ocorrência de infecção é o clima e características ambientais na aquisição de patógenos por pacientes com FC. *P. aeruginosa*, em particular, requer nutrição mínima e é capaz de sobreviver com baixa oferta de oxigênio e temperaturas aumentadas, numa diversidade de nichos ecológicos, como ambientes úmidos, piscinas, banheiros e soluções à base de água. Elementos que podem contribuir na epidemiologia e prevalência da bactéria no hospedeiro suscetível. A exposição a atividades externas na água, durante o verão e em regiões tropicais,

também pode ser um fator para a maior ocorrência de infecções não-FC e na FC. As infecções hospitalares também estão mais presentes nos climas quentes. Algumas evidências apontam maior carga bacteriana e capacidade de adesão com o aumento da temperatura, outras divergem que não há aumento da biomassa e capacidade de adesão sob alta temperatura (PSOTER et al., 2016; RAMSAY et al., 2016). No ambiente de saúde, a presença de *P. aeruginosa* no escarro pode contaminar a mão de pacientes e profissionais de saúde e ser veiculado para outras pessoas por aperto de mão, por mais de 180 minutos. Assim como, objetos inanimados ou substâncias capazes de absorver, reter ou transportar microrganismos também são capazes de transmitir para outras pessoas (ROWBOTHAM et al., 2019).

Os guias de prevenção e controle de infecções de centros de FC recomendam a implementação de estratégias combinadas de segregação de coorte e/ou individual de pacientes conforme resultado de cultura, métodos de higiene pessoal (como lavagem das mãos), uso de equipamentos de proteção individual para pacientes e profissionais de saúde (máscaras, luvas) e limpeza e desinfecção de áreas e equipamentos, nas áreas ambulatoriais e de internação. Tais medidas reduzem a incidência de nova aquisição de *P. aeruginosa* por não colonizados e superinfecção em pacientes que possuem colonização por cepa única. Além de evitar a disseminação de cepas epidêmicas e MDR (ROWBOTHAM et al., 2019).

Tais dados despertam a busca por evidências epidemiológicas clínicas e do perfil de resistência e virulência da infecção por *P. aeruginosa*, que norteiem as práticas terapêuticas e o monitoramento de medidas de prevenção e controle de infecção no Centro de Referência de assistência a esta população, para que equipamentos de terapia respiratória e ambiente ambulatorial e hospitalar (ambientes de saúde de maior circulação de pacientes com fibrose cística durante o tratamento deles) não representem fontes de contaminação.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FISIOTERAPIA CARDIORESPIRATÓRIA E FISIOTERAPIA EM TERAPIA INTENSIVA (ASSOBRAFIR). **Recomendação Brasileira de Fisioterapia na Fibrose Cística: um guia das boas práticas clínicas.** São Paulo: ASSOBRAFIR Ciência, v.10, supl. 1, maio, 2019.

ATHANAZIO, R.A. et al. Diretrizes brasileiras de diagnóstico e tratamento da fibrose cística. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.43, n.3, p.219-245, 2017.

BLANCHARD, A.C.; WATERS, V.J. Microbiology of cystic fibrosis airway disease. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v.40, n.6, p.727-736, 2019.

BLOHMKE, C.J. et al. Atypical activation of the unfolded protein response in cystic fibrosis airway cells contributes to p38 MAPK-mediated innate immune responses. **Journal of Immunology**, v.189, p.5467-5475, 2012

BODNÀR, R. et al. Inhaled antibiotics for the treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients: challenges to treatment adherence and strategies to improve outcomes. **Patient Preference and Adherence**, v. 10, p. 183–193, 2016.

BOTELHO, J. GROSSO, F. PEIXE, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – mechanisms, epidemiology and evolution. **Drug Resist Updat**. v.44, p.26-47, 2019.

BRZEZINSKI, L.X.C. et al. Nebulizadores: fonte de contaminação bacteriana em pacientes com fibrose cística? **J Bras Pneumol**, v.37, n.3, p.341-347, 2011.

BURGENER, E.B; MOSS, R.B. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators: precision medicine in cystic fibrosis. **Curro Pin Pediatr**, v.30, n.3, p.372-377, 2018.

CASELLAS, J.M. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología . **Rev Panam Salud Publica**, vol.30, n.6, p. 519-528, 2011.

CASTELLANI, C.; ASSAEL, B.M. Cystic fibrosis: a clinical view. **Cellular e Molecular Life Sciences**, v.74, n.1, p.129-140, 2016.

CASTELLANI, C. et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. **Journal of Fibrosis Cystic**, v.17, n.2, p.153-178, 2018.

CHATTERJEE, M. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. **International Journal of Medical Microbiology**, n.306, p. 48-58, 2016.

CHEN, L. et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic acids research**, v. 33, suppl 1, p. D325-D328, 2005.

CONCEIÇÃO, Marília Lima. **Epidemiologia Molecular de *Pseudomonas aeruginosa* Proveniente de Hospital Sentinela em Belém, Pará**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitaria na Amazônia) – Belém, Universidade do Estado do Pará, 2014.

CRAMER, N. WIEHLMANN, L. TÜMMLER, B. Clonal epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.526-533, 2010.

CRULL, M.T. et al. Change in *Pseudomonas aeruginosa* prevalence in cystic fibrosis adults over time. **BMC Pulmonary Medicine**, v.16, p-176-182, 2016.

CYSTIC FIBROSIS FOUNDATION. Cystic fibrosis foundation patient registry. **Annual data report, 2018**. Disponível em: <https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Patient-Registry/2018-Patient-Registry-Annual-Data-Report.pdf>

DASSIOS, T.G. et al. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection and Respiratory Muscle Impairment in Cystic Fibrosis. **Respir Care**, v.59, n.3, p. 363-370,2014.

DAVIES, J.C. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. **Paediatric Respiratory Reviews**, v.3, p.128-134,2002.

DONADIO, M. V. F. et al. Respiratory physical therapy techniques recommended for patients with cystic fibrosis treated in specialized centers. **Brazilian Journal Physical Therapy**, v.24, n.6, p.532-538, 2020.

ELBORN, J.S. Cystic fibrosis. **Lancet**, v.388, p.2519-2531, 2016.

ENGEL, J. BALACHANDRAN, P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. **Current Opinion in Microbiology**, n.12, p.61-66, 2009.

EUROPEAN CYSTIC FIBROSIS SOCIETY. European cystic fibrosis society patient registry: annual data report 2017. Zolin A, Orenti A, Naehrlich L, van Rens J et al., 2019. Disponível em: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-content-images/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Report2017_v1.3.pdf

FARROW, N.R. **Cystic fibrosis: the role of airway stem cells in sustained gene expression. By lentiviral directed gene therapy.** Tese (Doutorado em Filosofia - PhD) – University of Adelaide, South Australia. 2015

FAZELI, N.; MOMTAZ, H. Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 16, n. 10, 2014.

FERNANDEZ, L. HANCOCK, R.E. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical Microbiology Revist**, n.25, p. 661-681, 2012.

FERREIRA, A.G et al. Low-level resistance and clonal diversity of *Pseudomonas aeruginosa* among chronically colonized cystic fibrosis patients. **APMIS**, v.123, p. 1061-1068, 2015.

FRESCHI, L. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genoma provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer and pathogenicity. **Genome Biol Evol**, v.11, p.109-120, 2018b.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and disease**, v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013

GÓMEZ, M.I. & PRINCE, A. A opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. **Curr Opin Pediatr**, v.7, n.3, p.244-251, 2007.

GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS EM FIBROSE CÍSTICA. **Registro brasileiro de fibrose cística**. Desenvolvido por Núcleo saúde digital LSI USP. 2017. Disponível em: <<http://registro.gbefc.org.br/selecionaDominio.action?dominioId=2> > acesso em: 04/06/2020

HARMER, C. J. TRICCAS, J.A. HU, H. ROSE, B. BYE, P. ELKINS, M. MANOS, J. *Pseudomonas aeruginosa* strains from the chronically infected cystic fibrosis lung display increased invasiveness of A549 epithelial cells over time. **Microbial Pathogenesis**, v.53, p.37-43, 2012.

HASSUNA, N.A. MANDOUR, S.A. MOHAMED, E.S. Virulence constitution of multi-drug- resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Upper Egypt. **Infection and Drug Resistance**. v.13, p.587-595, 2020.

HOHENWATER, K. et al. An evaluation of diferent steam disinfection protocols for cystic fibrosis nebulizers. **Journal Cystic Fibrosis**, v.15, p.78-84,2016.

HONG, D.J. et al. Epidemiology and characteristics of Metallo- β -Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection & chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 81-97, 2015.

HORNA, G. et al. High frequency of the exoU+/exoS+ genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. **Nature**.v.9,10874,2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47303-4>

JABALAMELI, F. et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. **Burns**, v. 38, n. 8, p. 1192-1197, 2012.

JÁCOME, P.R.L.A. et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 6, p. 707-712, 2012.

JARVIS, S.; IND, P.W.; GOONESEKERA, S. et al. Microbial contamination of domiciliary nebulisers and clinical implications in chronic obstructive pulmonary disease. **BMJ Open Resp Res.** 1:e000018. February 2014.

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 36, n. 2, p. 78-91, 2006

LEE, A.C. & JONES, A.L. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235 in cystic fibrosis. **Paediatric Respiratory Reviews**, v.27, p.18-20,2018. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2018.05.009>

LLOYD, M.G. et al. Blocking RpoN reduces virulence of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients and increases antibiotic sensitivity in a laboratory strain. **Scientific Reports**, n.9, p.6677, 2019.

LOPES-PACHECO, M. CFTR modulators: shedding light on precision medicine for cystic fibrosis. **Frontiers in Pharmacology**.v.7, p.275, 2016.

LUTZ, L.et al. Bacteriologia da fibrose cística. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v.31, n.2, p.168-184, 2011.

MACKENZIE, T. et al. Longevity of patients with cystic fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: survival analysis of the Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. **Annals of Internal Medicine**, v.161, n.4, p.233-241, 2014.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., BENDER, K.S., BUCKLEY, G.H., STAHL, D.A. Diversidade das bactérias. In: **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. p.479-516

MALHOTRA, S. et al. Mixed communities of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* exhibit enhanced resistance to host antimicrobials. **MBio**, v.9, n.2, p. 275-18, 2018.

MALHOTRA, S. HAYES JR, D. WOZNIAK, D.J. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and regional inflammation in the cystic fibrosis lung. **Journal of Cystic Fibrosis**, v.18, n.6, p.796-803, 2019.

MANDELL, G.L. **Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases** [s.1] Churchill Livingstone;7edition,2009, p.4320.

MARQUES, E. A. Perfil microbiológico na fibrose cística. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**. UERJ, Out-dez,2011

MARSON, F.A.L. et al. Demographic, clinical, and laboratory parameters of cystic fibrosis during the last two decades: a comparative analysis. **BMC Pulmonary Medicine**, v.15, n.3, 2015.

MARTINS, V.V et al. Pathogenic potential and genetic diversity of environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **APMIS**, v. 122, p. 92-100, 2013.

MATOS, E.C.O. et al. Clinical and microbiological features of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.v.49, n.3, p.305-311,2016.

MCMACKIN, E.A.W. et al. Fitting pieces into the puzzle of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system gene expression. **Journal Bacteriology**, v.201, n.13 p.9-19, 2019.

MIRTAJANI SB, FARNIA P, HASSANZAD M, GHANAVI J, FARNIA P, VELAYATI AA. Geographical distribution of cystic fibrosis; The past 70 years of data analysis. **Biomed Biotechnol Res J**. v.1, p.105-12, 2017.

NAVARRO, S. Recopilación histórica de la fibrosis quística. **Gastroenterología y Hepatología**, v.39, n.1, p.36-42, 2016.

NEBES, A. et al. Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* na fibrose cística e caracterização de cepas mucóides. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba, v.1, n.15, p.96-109, 2016.

OKUR, D.S. et al. Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Turkish children with cystic fibrosis. **Infection and Drug Resistance**, v.12, p.675-685, 2019.

OLIVER, A. et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. **Drug Resistance Updates**, v.21-22, p.41-59,2015.

PANG, Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v.37, p.177-192, 2019.

PARKINS, M. D. SOMAYAJI, R. WATERS, V.J. Epidemiology, biology, and impact of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n.4, e00019-18, october 2018.

PSOTER, K.J. et al. Association of meteorological and geographical factors and risk of initial *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in young children with cystic fibrosis. **Epidemiology & Infection**, v.144, n.5, p.1075-1083, 2016.

RAMSAY, K., STOCKWELL, R., BELL, S., & KIDD, T. Infection in cystic fibrosis: impact of the environment and climate. **Expert Review of Respiratory Medicine**, 10(5), 505-519. doi:10.1586/17476348.2016.1162715. 2016.

RIDDERBERG, W. et al. Lack of evidence of increased risk of bacterial transmission during cystic fibrosis educational programmes. **Journal of Cystic Fibrosis**, v.15, p. 109-115, 2016.

RODRIGUES, Y.C. SARGES, E.S.N.F. CONCEIÇÃO, M.L. MATOS, E.C.O. GOMES, N.J.P. QUARESMA, A.J.G. LIMA, K.V.B. Infecções por *Pseudomonas aeruginosa*: aspectos clínicos, microbiológicos e moleculares. In: SALGADO, Y.C.S, organizer. **Patologia das doenças**. 4ed. Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018. p.53-69.

RODRIGUES, Y. et al. High prevalence of atypical virulotype and genetically diverse background among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a referral hospital in the Brazilian Amazon. **Plos One**, v.15, n.9, e0238741, 2020.

ROSSI, G.A. et al. Airway microenvironment alterations and pathogen growth in cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, n.54, v.4, p.497-506, 2019.

ROWBOTHAM, N.J. PALSER, S.C. SMITH, S.J. SMITH, A.R. Infection prevention and control in cystic fibrosis: a systematic review of interventions. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v.5, n.13, p. 425-434, 2019.

RYALL, B. et al. The mucoid switch in *Pseudomonas aeruginosa* represses quorum sensing systems and leads to complex changes to stationary phase virulence factor regulation. **Plos One**, v.9, n.5, may, 2014

SANDOVAL-MOTTA, S. ALDANA, M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, n.8, p. 253-267, 2016.

SAWA, T. SHIMIZU, M. MORIYAMA, K. WIENER-KRONISH, J.P. Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. **Critical Care**, v.18:668, 2014.

SAWA, T. MOMIYAMA, K. MILHARA, T. KAINUMA, A. KINOSHITA, M. MORIYAMA, K. Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: practical overview. **Microbiol Immunol**, v.64, n.5, p.331-344, 2020.

SCHAFFER, K. Epidemiology of infection and current guidelines for infection prevention in cystic fibrosis patients. **Journal of hospital Infection**, v.89, p.309-313, 2015.

SENTURK, S. et al. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infections. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 6, n. 06, p. 501-507, 2012.

SILVA FILHO, L.V.R.F. et al. Infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística: evidências científicas sobre o impacto clínico, diagnóstico e tratamento. **Journal Brazilian Pneumology**, v.39, n.4, p.495-512, 2013.

SILVA, T. L. **Atividade sinérgica do timol e agentes antimicrobianos frente à *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente e seus efeitos sobre a biosíntese de biofilme e piocianina**. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) – Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 2015. 67p.

TACCONELLI, E. et al. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, p.1-7, 2017 disponível em: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf

TAYLOR, P. K. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. **Journal Biotechnology**, n.191, p.121-130, 2014.

TÜMMLER, B. et al. Advances in understanding *Pseudomonas*. **F1000Prime Reports**. V.6, n.9, 2014.

VAN DAELE, S.G. et al. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis rehabilitation centre. **Eur Respir J**, v.25, n.3, p.474-481, 2005.

WATERS, V. How can understanding the phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* lead to more successful eradication strategies in cystic fibrosis?. **Clinical Infections Diseases**, v. 59, n. 5, p. 632-634, 2014.

CAMPILOBACTERIOSE HUMANA: Relevância clínica e epidemiológica

Márcia de Nazaré Miranda Bahia

Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas II. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail:marciabahia@iec.gov.br

Cintya de Oliveira Souza

Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas II. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

Laboratório de Leptospiriose e outras Zoonoses. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail:cintyaoliveira@iec.gov.br

Tuane Carolina Ferreira Moura

Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas II. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

Laboratório de Leptospiriose e outras Zoonoses. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail:tuane Moura@iec.gov.br; tuaneCFMoura@gmail.com

INTRODUÇÃO

A campilobacteriose é a principal causa mundial de gastroenterite humana, aponta o relatório sobre uma visão global da doença publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e a mesma afirmativa assinala o Centro de Controle de Doenças (CDC).

A Família *Campylobacteraceae* pertence à classe *Epsilonproteobacteria* e incluem os gêneros *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Sulfurospirillum*. As espécies do gênero *Campylobacter* são bastonetes Gram-Negativos, delgados que medem 0,2 µm a 0,8 µm por 0,5µm a 5 µm. Caracterizam-se por possuírem morfologia curva típica, em forma

de “S” ou em espiral, serem oxidase positivas e incapazes de fermentar ou oxidar os hidratos de carbono (Figura 01). (BLACKWELL, 2010/ FERNANDEZ, 2008). São termófilas com crescimento ideal entre 37 a 42°C (SILVA *et al.*, 2011) e microaerófilas com metabolismo respiratório complexo, necessitando de uma atmosfera com baixas concentrações de oxigênio para o seu desenvolvimento (ideal 5%). Além disso, são também capnofílicos, ou seja, requerem cerca de 10% de CO₂ para sua multiplicação (BRASIL, 2011). O pH ótimo para crescimento situa-se entre 5,8 e 8,0, ficando inativo em pH inferior a 4,9 (GUNTHER; CHEN, 2009).

A maioria das espécies de *Campylobacter* faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal de bovinos, suínos, ovinos, felinos, cães, roedores silvestres e domésticos, aves domésticas e pássaros, sendo que algumas espécies são patógenos zoonóticos. As aves, os bovinos e os suínos são reconhecidos como os principais reservatórios da doença. Das 33 espécies identificadas atualmente, várias são conhecidas por serem patogênicas para o ser humano, destacando-se as que pertencem ao grupo das termófilas, principalmente o *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*, sendo a infecção por *C. jejuni* responsável pela maior parte das gastroenterites agudas nos humanos e o *C. coli* responsável por uma percentagem significativamente menor de casos (MAN *et al.*, 2011; SOROKIN *et al.*; 2007). A via de transmissão da campilobacteriose humana ocorre através do contato com animais contaminados, consumo de derivado animal ou água contaminada e de pessoa para pessoa pela rota fecal-oral (YOUNG, DAVIS, DIRITA, 2007). E como o *C. jejuni* e o *C. coli* são comensais de diversos animais, particularmente aqueles envolvidos na cadeia alimentar humana (galináceos, suínos e bovinos) também é conhecida como uma doença de transmissão alimentar- DTA (BRASIL, 2011).



Figura 01: Microscopia Eletrônica do *Campylobacter jejuni*. Centers for Disease Control and Prevention – CDC. Fonte: <https://www.cdc.gov/campylobacter/index.html>.

Para estabelecer uma infecção suficiente para causar a doença, o microrganismo precisa sobreviver ao estresse fisiológico associado aos ambientes externos e internos, tais como flutuações de temperatura, variações de pH, diferentes tipos de hospedeiro, imunidade do hospedeiro, estresse oxidativo e fornecimento de nutrientes limitado. Como todas as bactérias enteropatógenicas, as espécies do gênero *Campylobacter* evoluíram suas características, muitas das quais são determinantes de virulência que têm ajudado a contornar as defesas do hospedeiro humano e de outros hospedeiros mamíferos e aves (GUERRY, 2007).

No homem, a campilobacteriose é caracterizada por uma gastroenterite, autolimitada, com presença de diarreia, febre e cólicas abdominais entre 12 e 72 horas após a infecção e de severidade variável. No entanto, a maioria das pessoas apresenta recuperação em um período de dois a cinco dias, embora esta fase possa perdurar por até 10 dias. Outros sintomas incluem febre, dores de cabeça e abdominal, indisposição, náuseas, vômitos, perda de peso e câibras. A gastroenterite induzida por *C. coli* é clinicamente indistinguível daquela ocasionada por *C. jejuni*. Um agravante é a baixa dose infectante de *Campylobacter* (AMRI *et al.*, 2007). Trabalhos com infecção em humanos mostraram que a dose de 360 a 800 UFC (Unidades Formadoras de colônias) são suficientes para o início do desenvolvimento da doença (HARA-KUDO; TAKATORI, 2011; KIRKPATRICK *et al.*, 2013).

A recuperação é rápida, geralmente uma semana. O tratamento com antimicrobianos só é recomendado em casos graves da doença. Repouso e fluidoterapia são indicados para reverter a maior parte da sintomatologia desta doença, já que a maioria dos casos é auto-limitada. O paciente pode continuar excretando o microrganismo durante uma média de duas a três semanas após a recuperação clínica, a não ser que tenha feito uso de antimicrobianos (SALLAM, 2007).

Apesar da gastroenterite ser uma condição clínica importante resultante da infecção por *Campylobacter*, estes microrganismos também foram associados com uma série de outras condições graves no trato gastrointestinal, incluindo doenças inflamatórias no intestino (DII), doenças esofágicas, periodontite, distúrbios gastrintestinais funcionais, doença celíaca, colicistite e câncer no cólon (KAAKOUSH *et al.*, 2015).

Além do acometimento do trato gastrointestinal, as espécies de *Campylobacter* podem causar uma série de manifestações clínicas em outras partes do corpo, como uma infecção local isolada, uma manifestação sistêmica após um episódio de enterite ou um distúrbio imunológico pós-infeccioso. Essas manifestações incluem a síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Miller Fisher, abscessos cerebrais e meningite, bacteremia, sepse, endocardite e miocardite, artrite reativa e clínica e manifestações que resultam em complicações no trato reprodutivo (KAAKOUSH *et al.*, 2015).

A Síndrome de Guillain-Barré (SGB) é uma condição neurológica caracterizada por um estado progressivo simétrico de fraqueza nos membros, com ou sem hiporreflexia, que pode também afetar os músculos do trato respiratório e do crânio. Os dois principais subtipos de SGB são a neuropatia axonal motora aguda (NAMA) e a polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda (PDIA), com cada subtipo exibindo uma imunopatogenia distinta e resposta ao tratamento. A NAMA tem a característica de progressão rápida e acentuada. A SGB se destaca por ser a causa mais comum de paralisia neuromuscular aguda no mundo (VUCIC *et al.*, 2009).

A SGB é uma doença auto-imune pós-infecciosa, que provoca paralisia flácida generalizada e anualmente pode acometer até quatro pessoas para cada 100.000 habitantes, de maneira progressiva com o aumento da idade e para o sexo masculino. O ônus da doença devido à infecção por *Campylobacter* é considerável, com graves repercussões em saúde pública e com impacto sócio-econômico significativo. Aproximadamente 60% a 70% dos pacientes com SGB apresentam alguma doença aguda de uma a três semanas antes dos sintomas aparecerem, sendo a infecção por *Campylobacter jejuni* a mais frequente. A correlação entre infecção por *Campylobacter* seguida da ocorrência de SGB foi comprovada em diversos estudos (JASTI *et al.*; 2016). Além disso, surtos de SGB têm sido associados a surtos de infecção por *C. jejuni* em diversos outros países (KEITHLIN *et al.*, 2014; SIVADON-TARDY *et al.*, 2014).

O controle e vigilância ativa nos países de alta renda permitem a estimativa de incidência anual de campilobacterioses entre 4,4 e 9,3 por 1.000 habitantes (WHO, 2012). Nesses países, os adultos jovens representam a população mais acometida. Tal fato pode ser explicado pelas vias principais de transmissão nos países desenvolvidos, que são consumo de frango mal cozido e viagens turísticas, visto que *C. jejuni* é uma das bactérias mais isoladas em casos de diarreia do viajante (ADACHI *et al.*; 2000). De acordo com estudo realizado por Kookoush e colaboradores (2015), nos EUA a incidência anual de infecção por *Campylobacter* é 14,3 casos por 100.000 habitantes, no Canadá a incidência é de 35,2 casos por 100.000 habitantes em Quebec e 38 casos por 100.000 habitantes na Província Britânica de Columbia. Os membros da União Europeia indicam que a incidência está entre 13,5 a 29,9 por 100.000 habitantes, conforme Figura 02.

No entanto, a verdadeira incidência de gastroenterite por *Campylobacter* spp. é pouco conhecida nos países de baixa e média renda, principalmente porque nestes o diagnóstico e o sistema de vigilância são deficientes, acarretando subnotificações, falta de padronização e baixa sensibilidade das metodologias de detecção. Sabe-se que nesses países a faixa etária mais acometida pelas doenças diarreicas por *Campylobacter* spp. são crianças de até 3 anos (Dallal *et al.*, 2006).

No Brasil, o Ministério da Saúde, reconhece o *Campylobacter* como um dos principais agentes etiológicos que podem desencadear outras complicações, além daquelas que caracterizam um quadro de gastroenterite. Por se tratar de evento que podem constituir potencial ameaça a saúde pública, as Doenças Diarreicas Agudas (DDA) são de notificação compulsória imediata, porém os casos de DDA não são elucidados de acordo com o agente etiológico. A ausência de uma notificação específica para *Campylobacter* contribuem para o não conhecimento da frequência deste patógeno, do seu potencial de virulência e resistência aos antimicrobianos em nosso contexto. Dados epidemiológicos provenientes de estudos realizados no Brasil revelaram uma prevalência de 7,5 a 13,3 % em humanos e 11,3 a 38% em carcaças de frangos. Além disso, não se sabe, no contexto brasileiro o percentual de casos com complicações neurológicas, como a SGB, ocasionados pela infecção por *Campylobacter*.

Souza, *et al.* (2018) analisaram 63 amostras de soro oriundas de pacientes com SGB que eram atendidos em um programa hospitalar para vigilância ativa de infecções, parainfecções e pós-infecções de casos de síndromes neurológicas no Estado do Piauí, e revelaram que em 17% (11/63) foram detectados anticorpos IgM para *Campylobacter jejuni*. O estudo foi o primeiro a investigar a presença de marcadores sorológicos (anticorpos IgM) de infecção recente por *C. jejuni* em pacientes hospitalizados com SGB no Brasil e os autores apontam que são necessários estudos adicionais para avaliar o papel da gastroenterite por *C. jejuni* nas doenças diarreicas no Brasil e a associação desses casos com a SGB em outros estados brasileiros.

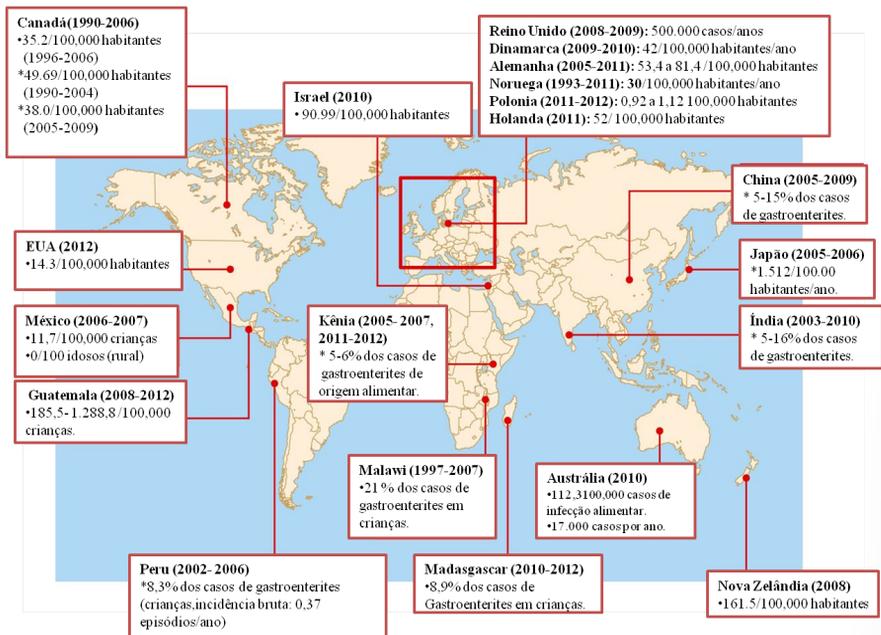


Figura 02: Incidência e Prevalência global de campylobacteriose (*C. jejuni/C. coli*). Adaptado de Kaakoush *et al.*; 2015.

FATORES ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA

O mecanismo pelo qual o *Campylobacter* spp. causa doença em humanos ainda não está totalmente esclarecido e muito do que se sabe está relacionado especificamente à espécie de *C. jejuni* (GOMES, 2015). Sabe-se que estão relacionados aos processos de adesão e invasão celular do epitélio intestinal. E neste contexto, alguns fatores são reconhecidos como importantes no que se refere à virulência desse gênero e estão associados aos genes plasmidiais e cromossômicos. Esses fatores incluem: motilidade, quimiotaxia, capacidade de colonização, adesão as células intestinais, invasão e translocação epitelial, sobrevivência intracelular e produção de toxinas (KETLEY, 1997, MULLER *et al.*; 2006, OSEK, 2008, FIELDS e THOMPSON, 2008). O quadro abaixo apresenta os principais genes envolvidos na virulência do *Campylobacter* spp, bem como as proteínas que codificam e o mecanismo de ação.

Quadro 01: Principais genes envolvidos na virulência do *Campylobacter*.

Genes	Proteína codificada	Mecanismo	Referência
<i>flaA</i>	Flagelo	Motilidade/Colonização do intestino	KETLEY, 1997; OSEK, 2008; BOLTON, 2015.
<i>flhA</i>			MULLER <i>et al.</i> ; 2006
<i>ciaB</i>	Proteína cia	Invasão e sobrevivência na célula.	DATTA <i>et al.</i> , 2003; DASTI <i>et al.</i> , 2010; WIECZOREK <i>et al.</i> , 2013.
<i>iamA</i>	Proteína relacionada à invasão		DATTA <i>et al.</i> , 2003; DASTI <i>et al.</i> , 2010; WIECZOREK <i>et al.</i> , 2013.
<i>pldA</i>	Fosfolipase A		DATTA <i>et al.</i> , 2003; DASTI <i>et al.</i> , 2010; WIECZOREK <i>et al.</i> , 2013.
<i>cdtA</i>	Toxina Distensora Citoletal	Bloqueio da fase G2 do ciclo celular na célula hospedeira causando morte celular.	DAST <i>et al.</i> , 2010; SILVA <i>et al.</i> , 2011; BOLTON, 2015.
<i>cdtB</i>			
<i>cdtC</i>			
<i>cadF</i>	Adesinas	Adesão às células do epitélio	MULLER <i>et al.</i> , 2006, POLY e GUERRY, 2008; MONTEVELLY <i>et al.</i> , 2003.
<i>docA</i>			
<i>racR</i>			
<i>wlaN</i>	B-1,3 galactosiltransferase	Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), considerado importante para o desenvolvimento de neuropatias pós-infecção, como a SGB.	LINTON <i>et al.</i> ; 2000
<i>virB11</i>	Sistema de secreção do tipo IV (T4SS)	Localizado no plasmídeo pVir/introdução de proteínas efetoras nas células do hospedeiro.	BACON <i>et al.</i> , 2000
<i>dnaJ</i>	Proteína do chock térmico (<i>heat shock</i>)	Adesão às células do epitélio	MULLER <i>et al.</i> , 2006, POLY e GUERRY, 2008; MONTEVELLY <i>et al.</i> , 2003.
<i>sodB</i>	Superóxido desmutase	Sobrevivência da bactéria em condições adversas, como no estresse oxidativo.	BOLTON, 2015
<i>csrA</i>	Proteína regulatória CsrA		FIELDS E THOMPSON, 2008

RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência antimicrobiana é um desafio complexo de saúde pública global e, durante várias décadas, tem sido uma ameaça crescente para o tratamento eficaz de uma gama cada vez maior de infecções causadas por diversos microrganismos (WHO, 2014). Os impactos causados pela resistência tornam os tratamentos difíceis, prolongados e onerosos, podendo resultar em óbito. Além dos efeitos negativos no tratamento, os gastos impostos pela resistência antimicrobiana também resultam em um efeito econômico preocupante (WHO, 2014).

Em 2017, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou sua primeira lista de agentes patogênicos prioritários resistentes aos antimicrobianos, dividida em três prioridades: crítica, alta ou média. *Campylobacter* spp. resistentes a fluoroquinolonas encontram-se listados como prioridade alta, junto com outras bactérias que são cada vez mais resistentes aos fármacos e provocam doenças comuns (OMS, 2017).

Em 2019, a Organização das Nações Unidas (ONU) publicou um relatório sobre resistência antimicrobiana e faz o alerta que se ações imediatas, coordenadas e ambiciosas não forem tomadas, o mundo irá enfrentar uma crise potencialmente desastrosa de resistência a medicamentos.

O uso indiscriminado destes medicamentos na população humana, na agricultura e na medicina veterinária, como promotores de crescimento animal e no controle de doenças de animais destinados a alimentação, favorece a seleção de cepas de *Campylobacter* spp. resistentes, especialmente às fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina e norfloxacina, antimicrobianos antes considerados de eleição para o tratamento de campilobacteriose. Atualmente os macrolídeos, como a eritromicina, são os fármacos de eleição para tratamento de casos mais graves (IOVINE, 2013; FDA, 2014).

As taxas de resistência aos antimicrobianos em bactérias isoladas de humanos, especialmente às fluoroquinolonas, subiram acentuadamente nos últimos 20 anos, e estas elevadas taxas de resistência são hoje vistas em muitas regiões do mundo (Quadro 02). Portanto, a exposição a estas bactérias através da cadeia alimentar é considerada um risco potencial para a saúde humana, por contribuir com a resistência aos antimicrobianos (OKAMOTO *et al.*, 2009; BAKHSHI *et al.*, 2014).

Quadro 02: Estudos que demonstram as taxas de resistência aos antimicrobianos de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>.		
Autor/ano	Objetivo	Principal resultado
FITCH <i>et al.</i> (2005)	Comparação de isolados de <i>Campylobacter</i> spp. de frango no varejo e humanos com gastroenterite.	Alta taxa de resistência às quinolonas em isolados de produtos de frango no varejo.
TAMBUR <i>et al.</i> (2009)	Investigação <i>Campylobacter</i> spp. a partir de fezes humanas para determinar a sensibilidade aos antimicrobianos mais utilizados no tratamento de campilobacteriose.	25% das cepas de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> foram resistentes para ampicilina, 29,2% para tetraciclina e 50% para ciprofloxacino. 23,5% de <i>C. jejuni</i> foram resistentes a eritromicina e 11,7% ao cloranfenicol. Nenhum <i>C. coli</i> foi resistente à cloranfenicol e eritromicina.
OLAGUIBEL, (2009)	Análise de 44 cepas de <i>Campylobacter</i> em hospitais da Bolívia, das quais 28 foram <i>C. jejuni</i> , 13 <i>C. coli</i> e 3 <i>C. lari</i>	70% foram resistentes para ciprofloxacino, 61% para eritromicina, 66% para tetraciclina, e 77% para clindamicina.
LOPES (2009)	A pesquisa foi realizada em cortes resfriados de bovinos e frangos comercializados no Município de São Paulo.	72,2% resistentes ao ácido nalidíxico e 50% resistentes ao ciprofloxacino.
MELO (2012)	Análise de <i>Campylobacter</i> spp. isolados de carcaça de frangos resfriadas e congeladas provenientes dos Estados de Minas Gerais, Distrito Federal e Goiás (Brasil)	Encontrou 43,6% de resistência à norfloxacina, 36,2% à eritromicina e tetraciclina (34,0%). Determinou também que a resistência conjunta ao macrolídeos e à fluoroquinolonas, foi uma característica partilhada por 19,1% (18/94) das cepas, sendo seis <i>C. jejuni</i> , seis <i>C. coli</i> e seis <i>Campylobacter</i> spp.
MELO (2017)	Análise de 1070 carcaças de frangos provenientes de uma mesma empresa exportadora, coletadas em diferentes regiões do Brasil.	47,5% apresentaram resistência à amoxicilina associada ao clavulanato, 4,0% à gentamicina, 18,2% à eritromicina e 41,4% à tetraciclina.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da infecção por *Campylobacter* é realizado pelos métodos clássicos, baseados em características fenotípicas como cultivo, morfologia, reações bioquímicas,

temperatura de crescimento e testes de tolerância, pelos métodos imunoenzimáticos (ELISA) para pesquisa de anticorpos e antígenos, e pelos métodos moleculares para detecção de sequências conservadas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). A coleta da amostra pode ser realizada utilizando *swab* retal ou por evacuação espontânea, devendo ser processada o mais rápido possível. Caso ocorra intervalo entre a coleta e a análise laboratorial superior a 2 horas é necessária a utilização de meios de transporte, como meio de Stuart modificado e o meio de Cary & Blair. O cultivo e isolamento a partir de material fecal continuam sendo o padrão-ouro no diagnóstico de *Campylobacter* spp. em laboratórios clínicos (SING *et al.*, 2011).

Cultivo e Identificação Bioquímica

A detecção de *Campylobacter* spp. em amostras alimentares e de fezes, pelo método clássico, preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), consiste no cultivo a partir do material para análise, em meio ágar seletivo (meio de Skirrow; Agar modificado de carvão, cefoperazona e desoxicolato-mCCDA, Agar Karmali) acrescido de peptonas e antimicrobianos, e incubado a temperaturas de 42°C a 43°C para seleção das espécies termotolerantes e atmosfera adequada para crescimento com 5%-6% de oxigênio e 10% de dióxido de carbono e 84% a 85% de nitrogênio. Muitos meios utilizados para o isolamento de *Campylobacter* contém sangue (5% a 7%) para capturar os componentes tóxicos do oxigênio que podem ser formados quando o meio é exposto à luz, seguida de posterior confirmação pelo método de Gram e provas bioquímicas.

A identificação presuntiva de *Campylobacter* spp termofílico pode ser feita de acordo com a morfologia da colônia (varia de acordo com o meio de isolamento utilizado), formas celulares típicas ou bacilos curvos espiralados e característica de mobilidade rápida observada em microscopia de contraste de fase. Os testes fenotípicos mais comumente utilizados para a identificação de *Campylobacter* spp ao nível de gênero ou espécie incluem testes bioquímicos (catalase, oxidase, redução de nitrato, a hidrólise hipurato, a hidrólise de acetato indoxil, fermentação da glicose, produção de H₂S), padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos (ácido nalidíxico, cefalotina, e características do crescimento em diferentes temperaturas (25 °C, 37 °C e 42 °C) (GHOSH *et al.*, 2014). Neste processo há inúmeras limitações, principalmente a necessidade de 4 a 5 dias para o crescimento e identificação para caracterização de algumas espécies, todavia é o método onde se observa melhor especificidade.

Teste imunoenzimático (ELISA)

A literatura demonstra que várias proteínas de *Campylobacter* possuem ação imunogênica, principalmente a proteína de membrana externa (*Outer membrane proteins*-(OMPs) e a flagelina, o que favorece a produção de ensaios para o diagnóstico de agentes causadores da doença (RADOMSKA *et al.*, 2016). Os imunoenaios, baseada na interação antígeno-anticorpo, podem tornar mais rápida a detecção da infecção, devido à redução do tempo de execução do teste imunoenzimático em relação à cultura, além de diminuir o custo e simplificar a técnica quando comparado aos métodos moleculares. O uso desse método tem grande valor para a investigação epidemiológica (ZHANG, 2008).

Já existem inúmeros kits comerciais, que utilizam anticorpos ou antígenos, porém esses kits possuem problemas de acurácia por apresentar resultados falsos positivos e negativos. Um resultado negativo não descarta a possibilidade de infecção por *C. jejuni* ou *C. coli*, pois pode ocorrer devido à excreção intermitente do patógeno, à quantidade muito pequena de antígeno na amostra ou pode ser causado pela distribuição não homogênea dos antígenos na amostra de fezes. Nesse caso, o exame deve ser repetido com uma segunda suspensão da mesma amostra. É necessário avaliar o histórico do paciente e se a suspeita de infecção por *C. jejuni* ou *C. coli* persistir, deve-se repetir o exame com solicitando outra amostra de fezes. Os resultados obtidos sempre devem ser interpretados em conjunto com o quadro clínico. (OYARZABAL; BATTIE, 2012)

Métodos Moleculares

Métodos moleculares como o da reação em cadeia da polimerase (PCR), uniplex ou multiplex, subsidiam algumas limitações que a coprocultura apresenta e proporcionam resultados mais precisos e rápidos do que os de cultivo padrão, principalmente em casos duvidosos (SOLIS *et al.*, 2009). DENIS *et al.* (2001) ressaltam ainda que o uso da técnica da PCR auxilia na análise de diferentes tipos de amostras (humanas, animais ou ambiente), contando ainda com a vantagem da rapidez do teste para a diferenciação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* (CORTEZ, 2006).

O uso da PCR multiplex, aplicada para a diferenciação das duas espécies de *Campylobacter*, mais comumente implicadas em gastroenterites de origem alimentar no homem, é realizado segundo o protocolo estabelecido pelo Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial de *Campylobacter* (BRASIL, 2011), sendo a extração do DNA de *Campylobacter* feita por meio da técnica de fervura e congelamento. Cada reação de amplificação deve ter um volume final de 25µl, contendo 5 µl de DNA, 1,5

µl de tampão de PCR, 2 µl de dNTP, 0,25 µl de taq DNA polimerase, 5,25 µl de água deionizada e 2,5 µl de cada *primer* (descritos no quadro 03), de acordo com a ciclagem a seguir: 10 ciclos por 94°C/1min, 64°C/1min e 72°C/1min e 30 ciclos por 94°C/1min; 54°C/1min; 72°C/1min, com etapa de extensão final: 72°C/10min. Os tamanhos dos fragmentos amplificados são: 773 pb para *C. jejuni* e 364 pb para *C. coli* (Quadro 3).

Quadro 03: Iniciadores específicos para cada espécie de <i>Campylobacter</i>.	
Espécie	Sequência (5'-3')
<i>Campylobacter coli</i>	Primer Col 1: AGG CAA GGG AGC CTT TAA TC
	Primer Col 2: TAT CCC TAT CTA CAA ATT CGC
<i>Campylobacter jejuni</i>	Primer Jun 3: CAT CTT CCC TAG TCA AGC CT
	Primer Jun 4: AAG ATA TGG CAC TAG CAA GAC

Os genes envolvidos com a confirmação de gênero e identificação das espécies de *Campylobacter* estão descritos no quadro 04.

Quadro 04: Iniciadores utilizados nos protocolos do PCR uniplex para o diagnóstico do gênero e espécies de <i>Campylobacter</i>.		
Genes alvo	Sequência dos iniciadores (5'- 3')	Referência
<i>gyrA</i> – detecção de <i>Campylobacter</i> spp.	GAGTGTATTATAGGTCGTGCTTTG CTATAACAGCACCCACTATACGG	SOLIS <i>et al.</i> , 2009
<i>hipO</i> - gene para hipuricase de <i>C. jejuni</i> .	ATGATGGCTTCTTCGGATAG GCTCCTATGCTTACAACACTGC	BRANDAL <i>et al.</i> , 2007
<i>Ask</i> - gene para aspartato quinase de <i>C. coli</i> .	GGTATGATTTCTACAAGCGAC ATAAAAGACTATCGTCGCGTG	QUETZ <i>et al.</i> , 2013

A limitada sensibilidade da cultura de fezes, considerada “padrão ouro” para pesquisa de *C. jejuni* e *C. coli*, é um dos fatores pelo qual as diretrizes para o diagnóstico das campilobacterioses humanas deveriam ser reavaliadas, considerando a combinação dos métodos atualmente disponíveis (microbiológico, imunoenzimático e molecular). Uma sugestão seria considerar como positivo os testes imunoenzimáticos e/ou moleculares nos casos em que a cultura de fezes fosse negativa (BESSEDE *et al.*, 2011).

Erros na medição da sensibilidade (probabilidade de um indivíduo verdadeiramente infectado testar positivo) e especificidade (probabilidade de um indivíduo verdadeiramente não infectado testar negativo) da cultura microbiológica podem subestimar a prevalência de infecções por *Campylobacter* spp e isto impacta na compreensão dos aspectos clínicos, epidemiológicos e de prevenção das campilobacterioses humanas tanto em nosso contexto, quanto no mundo (QUETZ, 2013).

REFERÊNCIAS

ADACHI et al., Empirical Antimicrobial Therapy for Traveler's Diarrhea. **Clinical Infectious Diseases** v. 31p 1079-1083. 2000.

AMRI, A. et al. Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 1350-1355, 2007.

BACON, D.J.; ALM, R.A.; BURR, D.H.; H.U, L.; KOPECKO, D.J.; EWING, C.P.; TRUST, T.J.; GUERRY, P. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, v. 68, p 4384-4390, 2000.

BAKSHI, B.; EFTEKHARI, E.; POURSHAFIE, M. R. Genetic elements associated with antimicrobial resistance among intestinal bacteria. Jundishapur **Journal Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 1-5, 2014.

BLACKWELL, G. Regulation of flagellin glycosylation genes in *Campylobacter jejuni*: influence of NssR, the nitrosative stress response regulator. Dissertation from University of Birmingham. p. 278, 2010.

BESSED, E.; DELCAMP, A. SIFRE, E.; BUISSONNIERE, A.; MEGRAUND, F. New methods for detection of *Campylobacters* in stool samples in comparasin to culture. **Jornal Clinical Microbiology**. v.49, n.3, p. 941-944, 2011.

BOLTON, D.J. *Campylobacter* virulence and survival factors. **Food Microbiology**. v. 48 p. 99-108, 2015.

BRASIL, Ministério da saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Manual Técnico de Diagnostico Laboratorial de *Campylobacter*. 2011.

BRANDAL, L.T.; LINDSTEDT, B.A.; AAS, L.; STAVNES, T.L.; LASSEN, J.; KAPPERRUD, G. Octaplex PCR and fluorescence-based capillary electrophoresis for identification of human diarrheagenic *E. coli* and *Shigella* spp. **Journal of Microbiology Meth.** v.68, p.331-341, 2007.

CORTEZ, A. L. L. Disseminação de bactérias dos gêneros *Campylobacter* e *Salmonella* em linhas de abate de aves. 2006. 80f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.

DALLAL, M.M.S.; KHORRAMIZADEH, M.R.; MOEZARDALAN, K. Occurrence of enteropathogenic bacterial in children South Tehran. **Eastern Mediterranean Health Journal.**, v 12, n.6, p. 792-797, 2006.

DASTI, J.L.; TAREEN, A.M.; LUGERT, R.; ZAUTNER, A.E.; GROB, U. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity- associated factors and disease-mediating mechanism. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 205-211. 2010.

DATTA, S.; NIWA, H.; ITOH, K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faces. **Journal of Medical Microbiology**. n. 2, p. 345-348, 2003.

FERNANDEZ, H. Família *Campylobacteriaceae*. In Trabulsi, L. D.; Microbiologia, 5 ed. São Paulo: Atheneu, p.357-362. 2008.

FIELDS, J.A.; THOMPSON, S.A. *Campylobacter jejuni* CsrA mediates oxidative stress responses, biofilm formation, and host cell invasion. **Journal of Bacteriology**. V. 190, n.9. p 3411-3416. 2008.

FITCH, B. R.; SACHEN, K. L.; WILDER, S. R.; BURG, M. A.; LACHER, D. W.; KHALIFE, W. T.; THOMAS, M.; YOUNG, S. W.; YOUNG, B.V. Genetic diversity of campylobacter sp. isolates from retail chicken products and humans with gastroenteritis in central. **Jounal Clinical Microbiology.**, v. 43, n. 8, p. 4221-4224, 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION.U.S. Salmonella. In: Bacteriological Analytical Manual (BAM). Silver Spring: FDA, 2014. Disponível em:<<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm2006949.htm>>. Acesso em: 4 maio 2020.

GHOSH, R.; Uppal, B; Aggarwal, P; Chakravarti, A; Jha, A.K.; Dubey A.P. A comparative study of conventional and molecular techniques in diagnosis of *Campylobacter* gastroenteritis in children. *Ann Clin Lab Sci*. v. 44, n.1 p.42-48. 2014.

GOMES, C.N., Dissertação, caracterização molecular de linhagens de *Campylobacter coli* isoladas de origens diversas. Universidade de São Paulo- Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto. 2015.

GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. **Trends in Microbiology**, vol. 15, n.10, p. 456-461, 2007.

GUNTHER, N.; CHEN, C. The biofilm forming potencial of bacterial species in the genus *Campylobacter*. **Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 44-51, 2009.

HARA-KUDO, Y.; TAKATORI, K. Contamination level and ingestion dose of foodborne pathogens associated with infections. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 10, p. 1505-1510, 2011.

JASTI, A.K et al. Guillain-Barré syndrome: causes, immunopathogenic mechanisms and treatment. v.12. n. 11. p.1175-1189. **Expert Review of Clinical Immunology**. 2016.

IOVINE, N. M. Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 230-240, 2013.

KAAKOUSH, N.O.; CASTANÕ-RODRÍGUES, N.; MITCHELL, M.H.; MAN, S.M. Global Epidemiology of *Campylobacter* **Infection.Clinical Microbiology Reviews** Volume 28 Number 3. 2015.

KEITHLIN, J. et al. Systematic review and meta-analysis of the proportion of *Campylobacter* cases that develop chronic sequelae. **BMC Public Health**, v. 14, n. 1, p. 1203, 2014.

KETLEY. J.M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiology*. v.143. p.5-21. 1997.

KIRKPATRICK, B. D. et al. Lack of homologous protection against *Campylobacter jejuni* CG8421 in a human challenge model. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 8, p. 1106-1113, 2013.

LINTON, D.; GILBERT, M.; HITCHEN, P.G.; DELL, A.; MORRIS, H.R.; WAKARCHUK, W.W.; GREGSON, N.A.; WREN, B.W. Phase variation of a β -1,3 galactosyltransferase involved in generation of the ganglioside GM1-like lipooligosaccharide of *Campylobacter jejuni*. **Molecular Microbiology**, v. 3. P. 501-514, 2000.

LOPES, G. V. *Campylobacter* spp. no abate e varejo: ocorrência em carcaças de bovinopara exportação e em cortes refrigerados de aves e bovino. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MAN, S. M.; KAAKOUSH, N. O.; MITCHELL, H. M. The role of bacteria and patternrecognition receptors in Crohn's disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 1, p. 152-168, 2011.

MELO, R. T. Fatores de patogenicidade e potencial risco à saúde em *Campylobacter* spp. isolados de carcaças de frangos. 2012. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MELO, R.T.; Emergência de *Campylobacter jejuni* no setor avícola e na saúde pública do Brasil. Tese de doutorado da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Uberlândia, 2017.

MONTEVILLE, M.R.; YOON, J.E.; KONKEL, M.E. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer- membrane protein and microfilament reorganization. **Microbiology**, v. 149, p. 153-165, 2003.

MULLER, J.; SCHULZE, F; MULLER, W.; HANEL, I., PCR detection of virulence-associated genes in *Campylobacter jejuni* strains with differential ability to invade Caco-2 cells and to colonize the chick gut. **Veterinary Microbiology**. n. 113, p.123-129, 2006.

OKAMOTO, A. S.; ANDREATTI- FILHO, R. L.; ROCHA, T. S.; MENCONI, A.; MARIETTO-GONÇALVES, G. A. Detection and transfer of antimicrobial resistance gene integron in Salmonella Enteritidis derived from avian material. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 11, n. 3, p. 195-201, 2009.

OLAGUIBEL, O. L. Monitoreo de la resistência antimicrobiana de *Campylobacter* spp. em cuatro hospitales de laciudad de la Paz-Bolivia 2005-2006. Trabajo de fin de Titulación (Licenciado en Bioquímica) - Universidad San Andres, Bolivia, 2009.

OMS, OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antimicrobianos urgentemente. **Organização Mundial de Saúde**. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357%3Aoms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=816>. Acesso em: 05 set. 2020.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU), No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections, Report to the Secretary-General of the United Nations, 2019.

OSEK J. & WIECZOREK K. Identification of virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolates by PCR. Bull. **Vet. Inst. Pulawy**, v. 52, p 211-216. 2008.

OYARZABAL, O. A.; BATTIE, C. Immunological Methods for the Detection of *Campylobacter* spp. - Current Applications and Potential Use in Biosensors. In: ABUELZEIN E. Immunolabelled and Related Techniques. InTech, 2012. Trends in Immunolabelled and Related Techniques. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/trends-in-immunolabelled-and-related-techniques/immunological-methods-for-the-rapid-detection-of-campylobacter-spp-current-applications-and-potent> (Acesso em 24 Jul. 2020).

POLY, F.; GUERRY, P. Pathogenesis of *Campylobacter*. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, p. 27-31, 2008.

QUETZ, J.S. Diagnóstico microbiológico, imunoenzimático e molecular e perfil de genes associados à virulência de *Campylobacter*. 166 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

RADOMSKA, K.A.; VAEZIRAD, M.M.; VERSTAPPEN, K.M.; WÖSTEN, M.M.; WAGENAAR, J.A.; VAN PUTTEN, J.P. Chicken Immune Response after In Ovo Immunization with Chimeric TLR5 Activating Flagellin of *Campylobacter jejuni*. *PloS One*, v. 11, n. 10, p. e0164837, 2016.

SALLAM, K. I. Prevalence of *Campylobacter* in chicken and chicken by-products retailed in Sapporo area, Hokkaido, Japan. **Food Control**, v. 18, n. 9, p. 1113-1120, 2007.

SILVA, J. *et al.* *Campylobacter* spp. as a food born pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, 2011.

SINGH, H.; RATHORE, R.; SINGH, S.; CHEEMA, P.S. Comparative analysis of cultural isolation and PCR based assay for detection of *Campylobacter jejuni* in food and faecal samples. **Braz. J. Microbiol.**, v. 42, p. 181-186, 2011.

SIVADON-TARDY, V. *et al.* Increased incidence of *Campylobacter jejuni* associated Guillain-Barre syndromes in the Greater Paris area. *Epidemiology and Infection*, v. 142, n. 8, p. 1609-1613, 2014.

SOLIS DE LOS SANTOS, F. et al. The natural feed additive caprylic acid decreases *Campylobacter jejuni* colonization in market-aged broiler chickens. **Poult. Sci.** v.88 p.61-64, 2009.

SOROKIN, M.; USEIN, C.R.; IRIMIA, M., DAMIAN, M.A.; A laboratory-based survey of *Campylobacter* infections in Prahova Coutry. Roum. Arch. **Microbiology Immunology**, v.66, n p. 85-89, 2007.

SOUZA, C.O. et al. Serological Marker of Recent *Campylobacter jejuni* infection in patients with Guillain- Barré Syndrome in the State of Piauí, Brazil, 2014-2016. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 98, p. 586-588. 2018.

TAMBUR, Z.; MILIKOVIC-SELIMOVIC, B.; BOKONJIC, D. Determination of sensitivity to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. **Vojnosanit. Pregled.**, v. 66, n. 1, p. 49-52, 2009.

VUCIC, S.; KIERNAN, M C.; CORNBLATH, D. R. Guillain-Barré syndrome: an update. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 733-741, 2009.

WIECZOREK, K.; DENIS, E.; LYNCH, O.; OSEK, J. Molecular characterization and antibiotic resistance profiling of *Campylobacter* isolated from cattle in Polish slaughterhouses. **Food Microbiology**, v. 34, p. 130-136, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **World Health Organization**, Geneva, 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en> > Acesso em: 14 jan. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Prevention of foodborne disease: Five keys to safer food. World Health Organization. Available from: <http://www.who.int/foodsafety/consumer/5keys/en/>. Accessed 01 November 2020. 2012.

YOUNG, K. T.; DAVIS, L.M.; DIRITA, V.J. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**; v.5, n.9. p 665-679, 2007.

ZHANG, Q. Campylobacteriosis. In: SAIF, Y. M. Diseases of poultry. **Oxford: Blackwell Publishing Ltda.**p. 137-146. 2008.

INFECÇÃO POR *Salmonella Typhi* – FEBRE TIFÓIDE: Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnósticos

Francisco Luzio de Paula Ramos

Setor de Atendimento Médico Unificado (SOAMU), Instituto Evandro Chagas (IEC).
Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: franciscoluzio@iec.gov.br

PANORAMA MUNDIAL, BRASILEIRO E REGIONAL.

A febre tifoide é uma doença bacteriana aguda, distribuída mundialmente, e está associada a baixos níveis socioeconômicos. É transmitida por água e alimentos contaminados com o agente causal: a *Salmonella Typhi*. Tem uma larga distribuição mundial e elevada incidência em várias partes do mundo, sobretudo nos países subdesenvolvidos, onde constitui sério problema de saúde pública (MARCHELLO, HONG & CRUMP, 2019), permanecendo como a doença predominante entre as febres entéricas em todo o mundo (WAIN, 2015). A estimativa da incidência anual em todo o globo está entre 19,1 e 20,6 milhões de casos (GBD 2017a), ocasionando entre 200.000 e 600.000 óbitos a cada ano (GBD, 2017b).

No Brasil, mesmo havendo escassez de dados de morbimortalidade, que se deve em parte à subnotificação, ainda assim a *Salmonella Typhi* pode representar 37% dos casos de doença diarreica (PAGANO & CAETANO, 2019). Numa série histórica de 2010 a 2019, em âmbito nacional, tivemos o registro de quase 5.000 casos suspeitos, dos quais foram confirmados apenas 22,74%, sendo 70,28% deles oriundos da região Norte, seguida pela região Nordeste com 18,28%; essas são as regiões com o maior número de casos (BRASIL, 2021).

Em série histórica anterior, entre os anos 1991 e 2008, decorrente de estudo feito no Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil, a *S. Typhi* foi a mais prevalente entre todas as *Salmonellas* isoladas na instituição, representando 55,3% de todas as *Salmonellas* isoladas no período (LOUREIRO, 2010).

Em outra série histórica construída com dados de todo o país, de 2007 a 2018 se registrou apenas 2090 casos da doença, dos quais, 50,72% ocorreram na região Norte, e destes, 28,80% ocorreram no Estado do Pará, denotando-se um reflexo da subnotificação desse agravo no Brasil (SILVA, 2020).

CONHECENDO A *Salmonella* Typhi

A *Salmonella* Typhi é uma bactéria em forma de bastão (bacilo), que rejeita o corante principal de Gram, corando-se em vermelho pela fuccina (o corante secundário), daí ser classificada tintorialmente como bacilo Gram negativo. Pertence à família Enterobacteriaceae, que é a maior família bacteriana conhecida na qual está inserida dentro do gênero *Salmonella*. O gênero *Salmonella* está dividido em duas espécies: *Salmonella bongore* e *Salmonella entérica*. A primeira não possui subdivisão e não tem interesse médico. A *S. entérica*, porém, é dividida em 6 subespécies: *S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* e *S. indica*. A subespécie *enterica* é a de maior interesse médico uma vez que comporta mais de 2.500 sorotpos ou sorovares, os quais são designados pelas letras do nosso alfabeto, indo de A até Z, segundo o esquema de Kauffman e White, baseado na constituição antigênica do seu corpo e do seu flagelo. O sorotipo *Salmonella* Typhi está situado dentro do grupo D, do qual fazem parte outros 201 sorotipos que guardam estreita identidade antigênica com a *Salmonella* Typhi, sendo 140 por intermédio dos antígenos flagelares e com 61 por meio de antígenos somáticos. Sendo essas bactérias de ocorrência muito comum na espécie humana, um teste sorológico para diagnóstico da febre tifoide sofre intensamente a interferência de reações cruzadas, causando muitas dúvidas na interpretação do exame. Foi por esse motivo que a velha reação de Widal, muito usada no passado na abordagem laboratorial à febre tifoide, foi descontinuada, pois ela trazia mais dúvidas do que certezas na sua interpretação (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2006).

Esse sorotipo, ao contrário da maioria dos demais, tem o homem como único hospedeiro. A maioria dos outros sorotipos, com exceção das *S. Paratyphi* A, da *Salmonella schottmuelleri* (antigamente denominada *Paratyphi* B) e *Salmonella hirschfeldii* (antigamente conhecida como *Paratyphi* C), representa bactérias de animais, mas acabam acometendo o homem por que este se infiltra em sua cadeia epidemiológica (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2006)).

A *S. Typhi* pode ser encontrada em alimentos e no meio ambiente e pode sobreviver por tempo variado nesses meios, dependendo das variáveis físicas como umidade e temperatura. Ela resiste ao congelamento, podendo ser encontrada viável após meses em um sorvete, por exemplo. Ela não resiste, no entanto, à fervura; assim, a ingestão de alimentos cozidos e quentes dificulta a contaminação (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2006).

A *S. Typhi* bem que poderia constituir uma espécie distinta dentro do gênero, pois ela é bem diferente de todos os demais sorovares em vários aspectos. Senão vejamos: (i) No que tange às características bioquímicas, o seu aparelhamento enzimático a faz exibir um padrão bem diferente das outras *Salmonellas* em várias provas laboratoriais,

revelando no tubo de tríplex açúcar ferro – TSI, por exemplo, pequena produção de gás sulfídrico; na prova dos aminoácidos revela a não descarboxilação da ornitina; revela a prova do citrato de Simon negativa por não utilizar esse meio como fonte de carbono; e também pela não produção de gás ao fermentar a glicose; (ii) No que concerne ao ambiente que eleger para viver e ao animal cuja biologia se adaptou ela apresenta uma característica ímpar; enquanto os demais sorotipos se adaptaram às mais diversas espécies animais – répteis, aves e mamíferos – ela se adaptou exclusivamente ao homem e escolheu, neste, a mais oliva das substâncias: a bile, na qual se perpetua em sua saga micribiológica, passando indiretamente de homem a homem por meio das fezes, que contaminam águas e alimentos, os quais são consumidos por suas vítimas. Na vesícula biliar ela consegue manter uma convivência duradoura – às vezes até o fim da vida do paciente – com asquerosos sais biliares, e se camufla astuta e perigosamente por trás do denominado portador assintomático, do qual faz seu transportador, viajando com ele para onde ele for; por onde o homem anda a *Salmonella* Typhi ali também pisa; (iii) No que se refere ao aspecto clínico, essa é a maior e mais expressiva diferença dela para com os demais membros do gênero. Enquanto as outras são inteiramente adaptadas aos animais em geral, acometendo o homem apenas acidentalmente, e por isso lhes causam infecção apenas no intestino e, na maioria das vezes, não passa de uma infecção superficial, a *S. Typhi*, por sua vez, acomete-o de forma virulenta, invadindo o tecido intestinal em sua intimidade, alcançando a corrente sanguínea, através da qual percorre todo o organismo, maltratando-lhe com exuberante quadro febril acompanhado de todos os costumeiros comemorativos clínicos que normalmente se apresentam associados à febre: cefaleia, mialgias, artralgias, prostração. A esses sintomas, somam-se invariavelmente alterações do trânsito intestinal (constipação e/ou diarreia) sempre acompanhadas de cólicas abdominais. Entre as complicações clínico-patológicas a mais temida delas é a perfuração intestinal, que constitui a principal causa de óbito (RAMOS, 2005). Por tudo isso podemos afirmar que a *Salmonella* Typhi é a rainha das *Salmonellas* e as demais são apenas súditas que vivem a reverenciá-la.

A transmissão ao homem se dá, portanto, pela via fecal-oral, ou seja, um portador assintomático contamina a água ou um determinado alimento com suas fezes e um homem sadio, ao ingerir esses produtos, dependendo da carga infectante (10^6 a 10^9 bactérias) poderá desenvolver a doença. O homem, na condição de portador assintomático, pode albergá-la na vesícula biliar por tempo variado, até mesmo por anos, ou mesmo pela vida toda (RAMOS, 2005). É uma bactéria de elevado potencial epidêmico, motivo pelo qual a febre tifoide constitui doença de notificação compulsória e de relevante interesse em saúde pública.

SOBRE A CLÍNICA

Do ponto de vista da apresentação clínica, a febre tifoide está entre as doenças mais versáteis. A febre capitanos os outros sintomas, constituídos de cefaleia, mialgias, artralgias, diarreia e/ou constipação intestinal acompanhados de cólicas abdominais; náuseas e vômitos podem também estar presentes. Mas apresentações atípicas podem ocorrer, como formas ictéricas, meníngeas e pulmonares, ampliando ainda mais o horizonte clínico e, por conseguinte, o diagnóstico diferencial. Doenças como malária, leptospirose, hepatites, doença de Chagas aguda, toxoplasmose, tuberculose, esquistossomose entre outras podem ser confundidas com a febre tifoide (RAMOS, 2004, RAMOS, 2020c).

SOBRE A CONDUTA DIAGNÓSTICA

Em se tratando de doença de largo espectro clínico e que compartilha do mesmo espaço geográfico com tantas outras doenças que podem ser confundidas com ela, eis o primeiro desafio: reconhece-las em meio a esse concorrido ambiente. Essa não é uma tarefa fácil, razão pela qual o diagnóstico diferencial é uma das principais causas do patógeno escapar ao diagnóstico, como costumeiramente acontece (RAMOS & PINTO, 2020, RAMOS, 2020c, UKAEGBU, 2014).

O segundo grande desafio é a abordagem laboratorial. A única maneira de se chegar ao diagnóstico de certeza da febre tifoide é pela cultura, através da qual se consegue a obtenção da bactéria e, conseqüentemente, a confirmação da doença. Os cultivos são representados pela hemocultura e pela coprocultura. Ambos os procedimentos devem ser solicitados sempre, invariavelmente, e sem se levar em conta o tempo de adoecimento (RAMOS, 2005). A urocultura não é praticada na rotina pela sua baixa sensibilidade, e a mielocultura, no que pese sua elevada sensibilidade, não é parte da rotina diagnóstica em função do seu caráter invasivo.

A hemocultura é o teste padrão ouro da febre tifoide, que embute cinco grandes problemas em seu bojo: (i) Tem alto custo, e por isso não está acessível à população mais carente, que é a mais acometida pela doença; (ii) Tem baixa sensibilidade, deixando muitos casos escaparem pelo incômodo corredor da falsanegatividade; esse fato está aliado a alguns fatores interferentes como é o caso do uso de certas drogas pelo paciente, mormente antibióticos, antes de ser submetido ao teste; (iii) Em assim sendo, não só a doença passa despercebida, mas a bactéria também, o que a deixa distante de ações muito importantes ao seu combate como os estudos de resistência aos antimicrobianos usados no seu tratamento; (iv) Ao escapar do diagnóstico, o paciente deixa de ser identificado e por isso não lhe é aplicado o controle de cura, que é a etapa mais importante depois

da identificação do paciente, pois é com essa medida que se corta o elo de transmissão da doença; (v) E por fim, a falta de diagnóstico robustece ainda mais a subnotificação, o que ajuda a ocultar a real prevalência da doença (RAMOS, 2005);

Um dos grandes problemas do diagnóstico da febre tifoide consiste em não se ter disponibilidade da hemocultura nem da coprocultura na assistência primária para se fazer frente à investigação de casos suspeitos. Vem daí uma das causas da doença, na maioria das vezes, escapar ao diagnóstico. E, não sendo diagnosticada, os sintomas persistem e a febre toma curso prolongado. Na experiência do Instituto Evandro Chagas, a média de duração da doença, à primeira abordagem na instituição, gira em torno de três semanas, e isso demanda outro enorme problema ao diagnóstico, uma vez que, com esse tempo de adoecimento é praticamente impossível se ter um paciente livre de ter experimentado algum antibiótico, o que, sabidamente, interfere no rendimento das culturas (ANTILLON, 2018; KALJEE, 2018; MOGASALE, 2016; VOYSEY, 2020). Dessa maneira, muitos casos passam despercebidos da vigilância, dando a falsa impressão de baixa incidência de casos (BRASIL, 2021; SILVA, 2020). As maiores consequências de um grande número de casos escapar ao diagnóstico é a conduta terapêutica inadequada, o que leva ao maior risco de serem formados portadores assintomáticos, pois, com o tratamento inadequado a vesícula biliar não é saneada e o paciente fica eliminando a bactéria silenciosamente pelas fezes por tempo que vai desde um período curto até um tempo bastante duradouro.

Assim, a dificuldade diagnóstica dá início a uma série de fatos que desencadeia um longo e perigoso ciclo vicioso, pois o não reconhecimento da doença obriga o médico a experimentar tratamentos empíricos, que são quase sempre fora do padrão do tratamento da febre tifoide no tocante ao tipo de droga, à dose empregada e ao tempo de tratamento. Esse manejo terapêutico inadequado dá vazão não só à produção de cepas resistentes aos antibióticos como paralelamente propicia a criação do portador assintomático, pois, se essa condição é possível ainda que diante de um tratamento adequado – embora em baixo percentual – ela obviamente aumenta sua chance de ocorrer mediante esquemas inapropriados de tratamento. Ademais, por não se ter a certeza do diagnóstico, o paciente assim enquadrado deixa de passar pelo controle de cura, que é imperativo na febre tifoide, deixando-se assim de se reconhecer esses portadores, que passam despercebidos na sociedade, transmitindo livremente a bactéria entre seus pares susceptíveis, que, por sua vez, levam-na adiante num plano horizontal sem fim, sobretudo onde o saneamento básico e a educação sanitária são precários. Isto posto, concluímos que quanto mais dificuldades tivermos para fazer o diagnóstico da febre tifoide, mais portadores assintomáticos teremos, e, em consequência disso, mais doentes surgirão, e assim sucessivamente. Enquanto não se dispõe de uma vacina eficaz e de obras de saneamento básico capazes de dificultar a

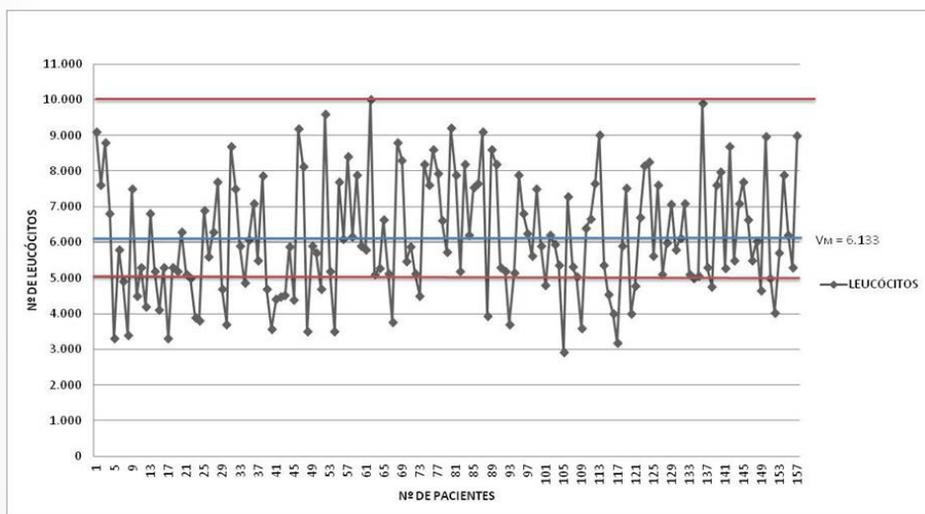
transmissão da doença, devemos investir na melhora do reconhecimento diagnóstico e na provisão de meios laboratoriais que possibilitem esse diagnóstico. Essa medida propiciará o reconhecimento precoce da doença, e em consequência o tratamento adequado e imediato, que quebrará a cadeia de transmissão e a formação do portador, além de dificultar a formação de cepas resistentes, e de prevenir a principal e mais temida complicação: a perfuração intestinal, advinda da demora do tratamento.

Nessa abordagem à febre tifoide devemos ainda levar em consideração o fato do risco da formação de cepas da bactéria resistentes aos antimicrobianos, o que tem sido registrado com preocupação em todo o mundo. A ocorrência dessas cepas pode advir do manejo inadequado do doente, seja pelo uso inadequado de antibióticos (droga inapropriada ou subdoses), seja pelo tempo inadequado de tratamento. (MUYEMB-TAMFUM, 2009)

A condição de portador é a principal forma da bactéria se manter na natureza. O combate a esse estado é fundamental para o efetivo controle da doença. Por isso, é imperioso o controle de cura de todos os pacientes identificados com a doença. Isso se faz com o emprego de três coproculturas, preferencialmente em dias consecutivos. Essa sequência só deve ser iniciada depois de pelo menos cinco a sete dias do término do tratamento.

Ainda no plano diagnóstico, um fato que merece menção é o padrão do hemograma. E, na dificuldade de se aplicar as culturas, devemos atentar para essa ferramenta que pode nos oferecer um importante auxílio, pois um bom entendimento da interpretação desse exame pode ajudar sobremaneira a se chegar ao diagnóstico. O padrão do hemograma nas doenças bacterianas é a neutrofilia, que quase invariavelmente leva à leucocitose. Apesar de ser uma doença bacteriana, a febre tifoide apresenta um padrão diferente nesta prova: ou ela se apresenta com leucopenia ou os leucócitos estão quantitativamente normais. Isso se deve à ação da bactéria sobre o sistema hematopoiético. É comum a bactéria ser encontrada na medula óssea, daí a mielocultura poder ser usada para o diagnóstico. Aliás, é importante salientar que este é o mais sensível método de diagnóstico, uma vez que a mielocultura não sofre a interferência do uso prévio de antibióticos. A presença da bactéria na medula óssea interfere na proliferação celular, o que explica o hemograma não exibir hiperplasticidade, podendo até mesmo mostrar pancitopenia, dependendo da intensidade com que a *Salmonella Typhi* acometer a medula. Segue um gráfico revelando o comportamento dos leucócitos na febre tifoide, extraído de uma série histórica com 157 casos da doença identificados no Instituto Evandro Chagas (IEC) em Belém, Pa (RAMOS, 2020b).

Gráfico 1. Distribuição do número de leucócitos em pacientes com febre tifoide atendidos no Instituto Evandro Chagas no período de janeiro de 2010 a junho de 2017. N = 157.



Fonte: RAMOS, 2020b

SOBRE O TRATAMENTO

O tratamento específico é feito com antibióticos. No passado a febre tifoide era tratada com cloranfenicol, que por muito tempo reinou como a droga de eleição. Mas os efeitos adversos dessa droga, sobretudo pautados na mielotoxicidade, pressionaram a retirada desse medicamento do mercado, dando lugar à ciprofloxacina, que agora ocupa o topo das drogas destinadas ao tratamento da febre tifoide. Drogas como amoxicilina e ampicilina são consideradas de segunda escolha (BRASIL, 2021).

SOBRE O COMBATE E O CONTROLE

O combate e o controle de um agravo à saúde, principalmente se ele tem potencial epidêmico e é de um grande apelo em saúde pública, começa pelo fortalecimento ao diagnóstico. Detectar a doença para tratá-la é o primeiro passo, pois ao se tratar os doentes, quebra-se a cadeia de transmissão. Uma vez detectada, ela deve ser devidamente notificada para que os dados acerca desse agravo constem nos

sistemas de vigilância de modo a gerar informações confiáveis acerca de sua incidência e prevalência. Todos os planejamentos para combater uma doença são dependentes desses passos iniciais. Assim se fica informado sobre um eventual aumento do número de casos e uma ameaça iminente; fica-se a par dos locais onde mais incidem e o período do ano, e qual a característica da população mais atingida tais como idade, profissão, e se existe a suspeita do envolvimento de algum alimento etc, ...

No caso da febre tifoide, por ser uma doença de veiculação hídrico-alimentar o combate e o controle estão muito centrados em obras de saneamento básico e numa boa educação sanitária, além do fornecimento de água potável para o consumo da população. Informar é sempre muito útil para se fortalecer a prevenção. Mas a peculiaridade da *Saçmonella Typhi* em se esconder na vesícula biliar e transformar um doente em seu reservatório natural e mantenedor da doença no meio em que vive, suscita uma boa investida no combate à formação desse elemento denominado portador assintomático e principal ator da cadeia de transmissão. Por isso, é fundamental o reconhecimento do doente para efetivar o correto tratamento e executar o adequado controle de cura.

Por se tratar de doença de veiculação hídrico-alimentar é fundamental que se faça a busca de portadores assintomáticos entre os manipuladores de alimentos para eliminar o risco de contaminação de alimentos consumidos pela população; ou se estabeleça uma política de saúde voltada à emissão de carteiras de saúde para todos os manipuladores de alimentos, em cuja avaliação esteja a obrigatoriedade de o indivíduo ser submetido à coprocultura.

Nos locais onde se tem dificuldade de toda ordem (política, econômica, geográfica etc) em realizar obras de saneamento e de fornecer água potável à população, a melhor maneira de proteger as pessoas é vacinando-as. Há vacinas para febre tifoide, tanto injetáveis quanto por via oral, mas a eficácia ainda é alvo de críticas. Existem duas vacinas, a Ty21a, de organismos vivos atenuados, e a vacina em que se usa o antígeno “vi” como estímulo antigênico. A Ty21a é a mais difundida. No entanto, a cobertura vacinal ainda é alvo de críticas, pois a eficácia varia imensamente indo de 40% a 90%. Elas são empregadas em determinadas circunstâncias como em viajantes (pessoas que vêm de países industrializados, onde a doença só entra de maneira importada, para locais onde a endemicidade é alta). No Brasil não há vacinação para febre tifoide no calendário vacinal (BRASIL, 2021).

REFERÊNCIAS/LEITURA COMPLEMENTAR

ANTILLON, M. et. al. The Relationship Between Blood Sample Volume and Diagnostic Sensitivity of Blood Culture for Typhoid and Paratyphoid Fever: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Infc Dis*. Vol. 218 (Suppl 4). 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças Tropicais Negligenciadas. **Boletim Epidemiológico**, n. esp., 2021.

GBDa 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. vol. 392: 1736-88, 2018.

GBDb 2017 Disease and injury Incidence and prevalence Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. vol. 392: 1789-1858, 2018.

KALJEE, L. M. et. al. Social and economic burden associated with typhoid fever in Kathmandu and surrounding áreas: a quality study. *J Infec Dis*. Vol. 2018 (supl 4), 2018.

LOUREIRO, E. C. B. et. al. Sorovares de *Salmonella* de origem humana, detectados no Estado do Pará, Brasil, no período de 1991 a 2008. *Rev. Pan-Amazônica de Saúde*. vol. 1; n. 1. p. 93-100, 2010.

MARCHELLO, G. S.; HONG, C. Y.; CRUMP, J. A. Global typhoid fever incidence: A systematic review and meta-analysis. *CID*. Vol. 68 (suppl 2). 2019.

MOGASALE, V. et. al. What proportion of *Salmonella* Typhi cases are detected by blood culture? A systematic literature review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. Vol. 15: n. 32. 2016.

MUYEMB-TAMFUM, J. J. et. al. An outbreak of peritonitis caused by mult-resistant *Salmonella* Typhi in Kinshasa. Democratc Republic of Kongo. *Travel medicine Infectious Disease*, 2009.

MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. Elsevier. Rio de Janeiro. p. 315-330, 2006.

RAMOS, F. L. P. Complicações na febre tifoide: relato de um caso atípico e considerações sobre suas implicações no diagnóstico e no controle. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 37 (supl II); p. 90-92. 2004.

RAMOS, F. L. P. Caso Surpreendente II. In: RAMOS, F. L. P. Abordagem à síndrome febril tendo a avaliação do hemograma como ponto de partida. 1 ed. Curitiba: **Editores Appris**, 2020, p. 87-92.

RAMOS, F. L. P. Nem tanto inocente. In: RAMOS, F. L. P. Abordagem à síndrome febril tendo a avaliação do hemograma como ponto de partida. 1 ed. Curitiba: **Editores Appris**, 2020, p. 59-62.

RAMOS, F. L. P. Sociedade Anônima. In: RAMOS, F. L. P. Abordagem à síndrome febril tendo a avaliação do hemograma como ponto de partida. 1 ed. Curitiba: **Editores Appris**, 2020, p. 249-252.

RAMOS, F. L. P. Somos Expostos Demais. In: RAMOS, F. L. P. Abordagem à síndrome febril tendo a avaliação do hemograma como ponto de partida. 1 ed. Curitiba: **Editores Appris**, 2020, p. 191-196.

RAMOS, F. L. P. **Febre tifoide**: A experiência do Instituto Evandro Chagas. 2005. Dissertação (Mestrado em Clínicas das Doenças Tropicais) Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará. Belém, 2005.

SILVA, N. W. F. Febre tifoide no Brasil: aspectos clínico-epidemiológicos – 2007 a 2018. I Congresso Internacional de Saúde Única, 2020.

WAIN, J. et. al. Typhoid Fever. The Lancet. vol. 385, mar 2015.

UKAEGBU, C. O. et. al. Incidencia of concurrent malaria and typhoid fever infections in febrile patients in Jos, Plateau State Nigeria. IJSTR, v. 3, n. 4, p. 157-161, 2014.

VOYSEY, M. et. al. Under-detection of blood culture-positive enteric fever cases: The impact of missing data and methods for adjusting incidence estimates. Neglected Tropical Diseases. Jan 2020.

INFECÇÕES POR *Chlamydia trachomatis*

Leonardo Miranda dos Santos

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical (NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

E-mail: leonn_bio20@yahoo.com.br

Wanderson Santiago de Azevedo Junior

Faculdade de Enfermagem (FAENF), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brasil.

E-mail: wanderson_santiago12@hotmail.com

Josele de Jesus Quaresma Trindade

Faculdade de Enfermagem (FAENF), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brasil.

E-mail: joselly_trindade@hotmail.com

Ingrid Christiane Silva

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical (NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

e-mail:ingridchristiane22@gmail.com

Cassia Cristine Costa Pereira

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical (NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

E-mail: cassiaccpereira@gmail.com

Macy Kamila Queiroz Rolim

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

E-mail: macy1camila@gmail.com

Debora Glenda Lima de La-Roque

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

E-mail: debora.laroque@gmail.com

Valéria Gabriele Caldas Nascimento

Faculdade de Enfermagem (FAENF), Universidade Federal do Pará (UFPA).
Belém, Pará, Brasil.

E-mail: valerianascimento5@gmail.com

Louise de Souza Canto Covre

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical
(NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

E-mail: louisecanto12@yahoo.com.br

Taylana Formigosa Cabral

Faculdade de Biomedicina, Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA),
Belém, Pará, Brasil.

E-mail: taylana.formigosa@gmail.com

Dânia Cardoso Paysan

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical
(NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

E-mail: daniapaysan@yahoo.com.br

Lyzandra Patrícia Maria dos Santos

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo (USP).
Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

E-mail: lyzandrapmsantos@gmail.com

Rosilma dos Santos Albuquerque

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical
(NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

E-mail: rose.rosilma@gmail.com

Luana Maria de Oliveira Lima

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará (UFPA).
Belém, Pará, Brasil.

E-mail: luanamlima3@gmail.com

Ericka Bechara Ferreira

Faculdade de Biomedicina, Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA),
Belém, Pará, Brasil.

E-mail: erickabechara09@gmail.com

Izabela Mendonça Assis

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical
(NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

E-mail: izabela_stm@hotmail.com

Maísa Silva de Sousa

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical
(NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

E-mail: maisaufpa@gmail.com

O ORGANISMO *Chlamydia trachomatis*

Histórico

A palavra “clamídia” vem do grego “*chlamys*”, que significa “*manto envolto em torno do ombro*”, devido envolver-se no meio intracelular. *Chlamydia trachomatis* foi identificada pela primeira vez em 1907, pelos cientistas Von Prowazek e Halberstaedter, a partir de raspagens da conjuntiva de primatas não humanos que continham inclusões intracitoplasmáticas (VON PROWAZEK & HALBERSTADTER, 1907). Lindner (1911) identificou a presença dessas inclusões na conjuntiva de recém-nascidos humanos acometidos por conjuntivite neonatal, sendo encontradas também nas células cervicais das mães, nas células uretrais dos pais e em homens que tinham uretrites não gonocócicas (LINDER, 2011).

Os primeiros registros de isolamento da bactéria se deram com a utilização de sacos vitelinos de ovos de galinha, para que pudessem, posteriormente, serem passados para o meio de cultura e melhores analisados. Inicialmente, ao isolarem o agente do Linfogranuloma Venéreo (LGV), acreditou-se que seria uma doença específica, entretanto, com o aprofundamento dos estudos, pode-se destacar que este agente era, na verdade, uma das sorovariações da *C. trachomatis*. Somente em 1957 foi que

se conseguiu isolar o agente causador do Tracoma (RIPA, 1982). Inicialmente, esses agentes foram considerados como sendo vírus devido ao seu tamanho e parasitismo intracelular obrigatório, inclusive seu ciclo biológico foi descrito e designado como sendo um ciclo viral, porém ao atentarem para sua característica morfológica, foi classificado como organismos intermediários e que se assemelhavam a seres do reino monera (BELL & WANG, 1981; STREPHENS et al., 1987).

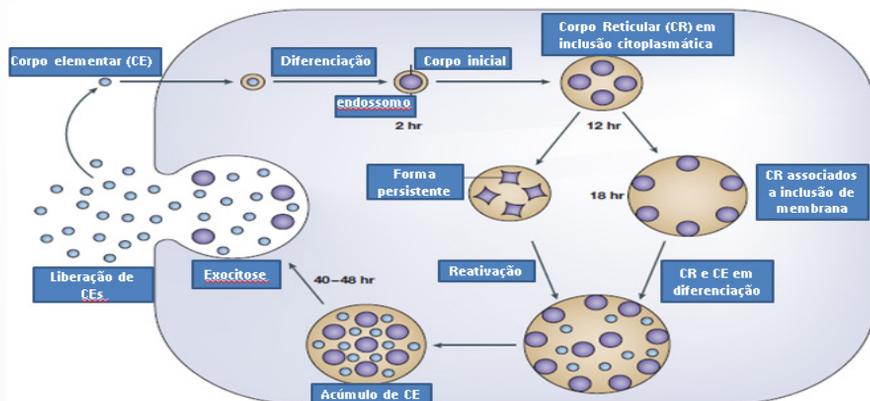
Aspectos morfofuncionais

Chlamydia possui uma deficiência na produção de adenosina trifosfato (ATP), por este motivo, necessita parasitar células para a utilização de ATP (parasitismo energético). A parede celular externa se assemelha com as gram-negativas com um ciclo de desenvolvimento bifásico (extracelular e intracelular). Possui uma estrutura de aproximadamente 0,2 µm de diâmetro, uma parede rígida envolta com uma camada trilaminar, contendo proteínas com ligações dissulfeto-reticulados. A parede celular é constituída de lipopolissacarídeos (LPS) e Proteína Principal de Membrana Externa (MOMP), possuindo semelhança com as gram-negativas, contudo não apresentam o ácido murâmico e a camada de peptidoglicano. Embora não apresente esse peptidoglicano bacteriano típico, esta bactéria possui genes essenciais à sua síntese (LEWIS et al., 2014). Apresentam ácido desoxirribonucléico (DNA) sendo concentrado principalmente no nucleóide central dos corpos elementares. O ácido ribonucléico (RNA) apresenta-se em maior quantidade nos ribossomos. Também dispõem de antígeno lipopolissacarídeos grupo específicos e na membrana externa os antígenos (proteínas) espécie específicos e imunotipo específicos (BROOKS et al., 2014; CHEONG et al., 2019).

Ciclo biológico

C. trachomatis se propaga por um ciclo reprodutivo bifásico iniciado pela adesão e endocitose do corpo elementar extracelular infectante na superfície apical de células epiteliais. Dentro das células, os corpos elementares (CE) se rearranjam em corpos reticulares (CR), metabolicamente ativos e maiores, passando por fissão binária e replicação, resultando em corpos reticulares filhos. Por fim, os corpos reticulares filhos se diferenciam para originar novos corpos elementares filhos e se confinam em vacúolo ou inclusões citoplasmáticas. Posteriormente a replicação é interrompida e então são liberados para o meio extracelular por lise ou apoptose celular, na forma de corpos elementares infectantes. Desta forma, pode acontecer a infecção de novas células epiteliais, completando seu ciclo e iniciando um novo, de acordo com a Figura 1 (BRUNHAM; REY-LADINO, 2005; WAN; ENCISO, 2017; LEVINSON, 2011; BROOKS et al., 2014).

Figura 1: Ciclo biológico de *C. trachomatis*.



Fonte: Brunham; Rey-Ladino, 2005; Wan; Enciso, 2017.

Taxonomia

A primeira classificação taxonômica de *C. trachomatis* foi feita em 1945, onde a clamídia era conhecida como *Miyagawanella* (JONES; RAKE; STEARNS, 1945). Em 1957, foi registrada como pertencente à família *Chlamydiaceae*, contendo duas espécies a *Chlamydia psittaci* e *Chlamydia trachomatis* (RAKE, 1957). Ao final da década de 1990, com o avanço dos estudos e baseados em critérios morfológicos e fenotípicos, como a presença de glicogênio e a sensibilidade a Sulfadiazina respectivamente, propôs-se uma nova taxonomia com dois gêneros, *Chlamydia* e *Chlamydophila*, e nove espécies (EVERETT; BUSH; ANDERSEN, 1999). Atualmente, *C. trachomatis* está agrupada na ordem *Chlamydiales*; Família *Chlamydiaceae*, e é uma das espécies de bactérias que apresentam maior patogenicidade para seres humanos (CHOROSZY-KRÓL et al., 2012; MARTINEZ et al., 2001; SMITH et al., 2002).

Genótipos

O sistema de análise do perfil de variabilidade genética em quatro Domínios Variáveis (VD) do gene *ompA*, que codifica a Proteína Principal de Membrana Externa (MOMP) é amplamente utilizado para a definição dos genótipos da *C. trachomatis*. Por esse padrão de genotipagem, podemos diferenciar 19 genótipos que estão distribuídos em três subgrupos relacionados a três condições clínicas diferente. Os genótipos A, B, Ba e C estão relacionados ao Tracoma (RAMADHANI et al., 2016). Enquanto que

os genótipos L1, L2, L2a e L3 estão relacionados à IST sistêmica e invasiva que pode levar ao linfogranuloma venéreo (STONER; COHEN, 2015). Os genótipos D, Da, E, F, G, Ga, H, Ia, J e K estão associados às IST assintomáticas e não-invasivas (MANIA-PRAMANIK et al., 2012).

O TRACOMA

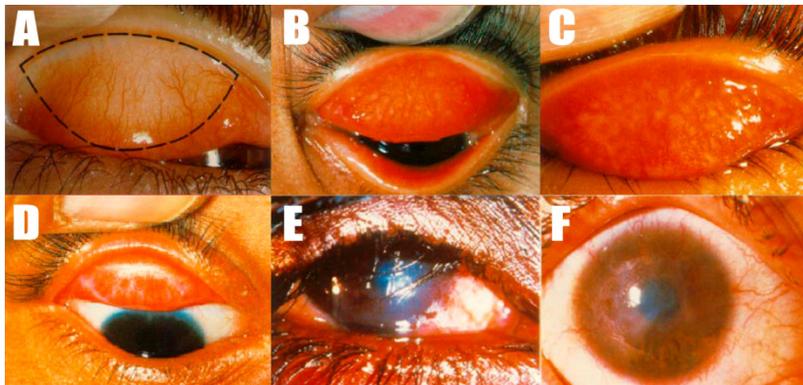
Aspectos Clínicos do Tracoma

O Tracoma ocorre quando, em sua maioria, os genótipos A, B, Ba e C de *C. trachomatis* entram em contato com a conjuntiva ocular, que produz uma reação inflamatória difusa na pálpebra superior, com o aparecimento de folículos que podem evoluir e levar a formação de linhas de cicatrizes. Outros genótipos, como os do LGV ou das IST não invasivas, podem causar Tracoma, porém com menos incidência devido o meio de transmissão. Apesar de nem sempre haver a formação de cicatrizes, quando presentes, estas produzem deformidades que evoluem para a retração da pálpebra (entrópico) e dos cílios (triquíase). Os cílios em posição defeituosa tocam a córnea e provocam abrasão crônica, opacidade da córnea, que promove a diminuição progressiva da visão até à cegueira (BRASIL, 2014; OMS, 2020).

O Tracoma apresenta cinco formas clínicas, classificadas e padronizadas pela Organização Mundial de Saúde – OMS (OMS, 2020) (Figura 2):

- Inflamação tracomatosa - folicular (TF) - que requer principalmente tratamento tópico.
- Inflamação tracomatosa - Intensa (TI) - durante a qual são considerados os tratamentos tópicos e sistêmicos.
- Cicatriz tracomatosa (TS) - quando as cicatrizes são visíveis como na conjuntiva tarsal e podem obscurecer os vasos sanguíneos do tarso.
- Triquíase Tracomatosa (TT) - quando o indivíduo é encaminhado para cirurgia das pálpebras;
- Opacidade da córnea - um estágio durante o qual uma pessoa fica irreversivelmente cega.

Figura 2: Classificação das cinco formas clínicas do Tracoma.



A: Conjuntiva normal; B: Inflamação tracomatosa folicular; C: Inflamação Tracomatosa Folicular intensa; D: Cicatriz tracomatosa; E: Triquíase tracomatosa; F: Opacificação corneana.

Fonte: Brasil, 2014.

O período de incubação do Tracoma dura de 5 a 12 dias e pode se apresentar inicialmente com a aparência de uma inflamação que afeta ambos os olhos. Na fase inicial do Tracoma as crianças são as principais afetadas. A doença apresenta um curso crônico recidivante. Até 25% dos casos de Tracoma não apresentam sintomas, porém, a maioria dos indivíduos com Tracoma apresenta os seguintes sinais e sintomas:

- Fotofobia (sensibilidade e intolerância à luz);
- Prurido (coceira nos olhos);
- Sensação de corpo estranho dentro do olho;
- Vermelhidão nos olhos;
- Secreção;
- Lacrimejamento.

Caso não seja realizada a cirurgia para correção palpebral ou epilação destes cílios, o caso pode evoluir para baixa na acuidade visual até a cegueira, sendo a causa mais frequente de cegueira evitável no mundo.

O Tracoma no Mundo

O Tracoma é considerado uma doença negligenciada, que se caracteriza por fácil prevenção e tratamento, mas que ainda é fortemente encontrado em países e/ou populações desfavorecidas de recursos econômicos e sistemas de saneamento e de saúde que geralmente são encontradas em comunidades remotas e/ou zona rural de países pobres ou em desenvolvimento. Um caso positivo de Tracoma possui vínculo epidemiológico, ou seja, está sempre associado a outro caso. Esta é uma doença endêmica em muitas das áreas mais pobres e remotas da África, Ásia, Austrália, Oriente Médio e América Latina (TAYLOR et al., 2018). Com base nos dados de março de 2020, 137 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas de Tracoma e correm o risco de cegueira por esta doença, a qual se caracteriza como um problema de saúde pública em 44 países e é responsável pela cegueira ou deficiência visual de cerca de 1,9 milhão de pessoas (OMS, 2020). Na América do Sul, o Tracoma é considerado endêmico no Brasil (FREITAS et al., 2016; FAVACHO et al., 2018) e na Colômbia (MILLER; GALLEGU; RODRIGUEZ, 2010).

O Tracoma no Brasil

O Tracoma foi trazido pela colonização e imigrantes europeus ainda no século XVIII, para o Nordeste (Ceará e Maranhão) do Brasil e teria se disseminado para outros estados, como São Paulo e Rio Grande do Sul, estendendo-se pelo Brasil todo. Assim, a primeira medida tomada pelo Governo de São Paulo bloqueou a entrada de imigrantes com Tracoma pelo porto de Santos, porém esta medida foi derrubada. Durante muito tempo foram criados os programas e campanhas de controle e/ou erradicação, até que durante o período do milagre econômico pensou-se que a doença estava erradica, mas, a doença ainda permanece no território brasileiro. Contudo, o Ministério da Saúde possui ações de controle nas regiões com maior prevalência através da Fundação Nacional da Saúde, estando o controle da doença na Gerência Técnica Nacional de Endemias Focais (BRASIL, 2014).

Observa-se que dos 1.030 municípios notificantes, 737 (71%) apresentaram percentual de positividade <5%, 187 (19%) apresentaram percentual de positividade $\geq 5\%$ e <10% e 106 municípios (10%), apresentaram percentual de positividade $\geq 10\%$. A doença é considerada sob controle quando os percentuais de positividade estão abaixo de 5% na população de crianças de 1 a 9 anos de idade, geralmente em escolares de baixa renda familiar e condições precárias de higiene e moradia em uma área geográfica determinada, conforme preconizado pela OMS. Os estados de Ceará e São Paulo examinaram o maior número de pessoas quando comparado aos demais,

sendo responsáveis por 51,8% dos exames realizados no país. Estes apresentaram percentuais médios de positividade de 3,6% e 2,0%, respectivamente. Os estados do Amazonas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Pará, Roraima, Rio Grande do Sul e Santa Catarina foram os que apresentaram os percentuais médios de positividade >5%, conforme dados observados na série histórica de 2008 a 2017 (BRASIL, 2014; FAVACHO et al., 2018; BRITO et al., 2019; SILVA et al., 2020; MACIEL et al., 2020).

Transmissão e prevenção do Tracoma

A transmissão do Tracoma ocorre no contato direto de pessoa a pessoa, ou indireto por meio de objetos contaminados (toalhas, lenços, fronhas etc). As moscas (*Musca domestica*) disseminam o patógeno facilmente por carrear-lo, porém, a contaminação só é possível na presença de lesões ativas. A suscetibilidade à infecção por Tracoma é universal, sendo as crianças as mais suscetíveis, inclusive às reinfeções. O principal reservatório é o homem, principalmente as crianças, com infecção ativa na conjuntiva ou outras mucosas. A prevenção do Tracoma se concentra na adoção de hábitos adequados de higiene, como lavagem do rosto das crianças com frequência e não compartilhamento de objetos de uso pessoal como lenços, roupas e toalhas etc e principalmente pelas boas condições de habitação e saneamento básico nas comunidades (BRASIL, 2014; FAVACHO et al., 2018; BRITO et al., 2019; SILVA et al., 2020)

O LINFOGRANULOMA VENÉREO

Aspectos clínicos do Linfogranuloma Venéreo

O Linfogranuloma venéreo é uma IST causada pelos genótipos L1, L2, L2a, L2b e L3 de *C. trachomatis* que se caracteriza por se espalhar pelo sistema linfático e atingir os linfonodos causando linfadenopatia. Além disso, esta doença se caracteriza por ser sintomática, invasiva e ulcerativa nas áreas genitais e extragenitais (Figura 3 e Figura 4). Caso não seja diagnosticada e tratada precocemente, esta poderá estar associada ao aparecimento de sequelas tardias, tal como formação de hiperplasia intestinal, abscesso profundo, elefantíase genital, estiomene, proctite, megacolon e dor crônica (STONER; COHEN, 2015; VRIES et al., 2015). Esta doença apresenta variações clínicas que permitem ser caracterizada em estágio ou fases diferentes (primária, secundária e terciária), porém, a gravidade e permanência dos sintomas dependerão de outros fatores relacionados à cepa causadora da infecção e à resposta imunológica do hospedeiro (DAL CONTE et al., 2014; CEOVIC; GULIN, 2015).

Estágio primário

O estágio primário ocorre entre três a doze dias, e em alguns casos, pode ocorrer em até 30 dias após a exposição inicial que é a penetração do patógeno na epiderme lesionada devido atrito causado durante a relação sexual. Esta fase é caracterizada pelo desenvolvimento de úlcera herpetiforme genital indolor, pústulas, erosão superficial ou pápulas com cerca de 1 a 6 mm de tamanho que são discretas e podem estar presentes na glande, parede vaginal, vulva e até na boca ou na garganta. Apesar de algumas vezes exibir uma reação inflamatória leve no local da inoculação, esta fase do LGV pode ocorrer silenciosamente e passar despercebido pelo paciente, devido principalmente à característica indolor e localização dificultosa das lesões. As lesões se curam espontaneamente após alguns dias e só podem ser diferenciadas do cancro sífilítico por diagnóstico laboratorial (CEOVIC & GULIN, 2015; LATINI et al., 2017).

Estágio Secundário

O estágio secundário começa de duas a seis semanas após o início da lesão primária e causa dor inguino-fadenopatia femoral. A disseminação sistêmica de *C. trachomatis* LGV pode estar associada à febre baixa, calafrios, mal-estar, mialgias e artralgias. Além disso, a disseminação sistêmica ocasionalmente resulta em artrite, pneumonite, enzimas hepáticas anormais e peri-hepatite. Esta situação progride para o aumento unilateral, inflamação, supuração e abscessos nos linfonodos que se encontram em forma de nódulos. As áreas centrais de tais nódulos linfáticos podem então sofrer necrose. Esses «bubões» podem se romper em um terço dos pacientes. Alguns pacientes desenvolvem o “sinal do sulco”, que resulta do aumento dos nódulos inguinais acima, e dos nódulos femorais abaixo do ligamento inguinal (ligamento de Poupart) (Figura 4). Este sinal é patognômico do LGV, mas ocorre em apenas 15% a 20% dos casos (ROEST; VAN DER MEIJDEN, 2001). Em homens de baixa e média renda, a fadenopatia inguino-femoral é a típica apresentação do LGV. Infecções genitais raramente são observadas em Homens que fazem sexo com Homens (HSH). Contudo os sintomas anorretais são amplamente relatados e se apresentam como uma síndrome anorretal, caracterizada por proctite que é a principal manifestação clínica de LGV entre HSH, a qual se estabelece com dor anorretal, secreção hemopurulenta e sangramento no reto; tenesmo e constipação também são vistos devido ao edema mucoso e perirretal (RONN; WARD, 2011). Dor ao urinar, sangramento retal, dor durante a passagem das fezes, dor abdominal, dor anal, tenesmo são alguns dos sintomas que se apresentam. Sintomas generalizados como dores no corpo, dor de cabeça e febre podem também ocorrer durante este estágio. Essa síndrome geralmente ocorre quando a transmissão é por via anal-oral (VRIES, 2016; LATINI et al., 2017).

Figura 3: Lesão ulcerativa e indolor em uma mulher de 22 anos, esposa de um homem que também foi diagnosticado com LGV



Fonte: Latini et al., 2017.

Figura 4: Lesão peniana ulcerativa e indolor e linfadenopatia inguinal (é possível ver o “sinal do sulco”)

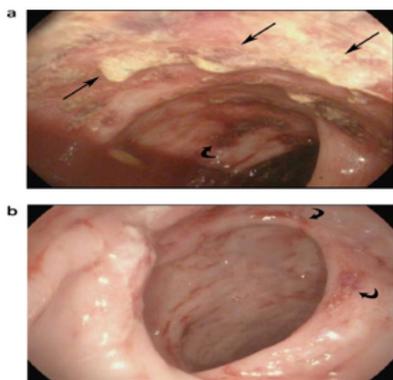


Fonte: Latini et al., 2017.

Estágio terciário

O estágio terciário da doença no LGV costuma ser chamado de “síndrome anogenitoretal” e essa fase se manifesta predominantemente em mulheres, mas também em HSH, devido à localização dos linfáticos envolvidos e na via de contaminação através do sexo anal receptivo. Nestes casos, os pacientes desenvolvem inicialmente proctocolite seguida por abscesso perirretal, fistulas, estenoses e estenose do reto, possivelmente levando a “linforróidas” (manchas semelhantes a hemorróidas de tecido linfático retal obstruído) (SULLIVAN et al., 2018) (Figura 5). Se não for tratado, o proctitis por LGV pode causar estenoses retais, com sequelas subsequentes de sujeira, dor, constipação e possível desenvolvimento de mega cólon. Com a falta de tratamento, a linfangite progressiva crônica pode evoluir para o edema crônico e à fibrose esclerosante, resultando em tensões e fístulas locais que podem levar à elefantíase genital (“pênis de saxofone”) (Figura 6) e estiomene (doença crônica ulcerativa da genitália feminina externa) e à síndrome da pelve congelada (STONER; COHEN, 2015; VRIES et al., 2015).

Figura 5: Proctocolite causada pelo LGV.



Fonte: Sullivan et al, 2018.

Figura 6: Pênis de “saxofone” causado pelo LGV.



Fonte: Koley & Mandal, 2013.

Complicações reativas raras incluem artrite reativa sexualmente adquirida, envolvimento cardíaco asséptico, meningite e doença inflamatória ocular. Complicações sépticas raras incluem artrite, pneumonite ou (peri) hepatite (SERWIN; KOPER; UNEMO, 2018).

O Linfogranuloma Venéreo no Mundo

O linfogranuloma venéreo (LGV) é uma infecção sexualmente transmissível endêmica em populações heterossexuais na África, Ásia, América do Sul e Caribe, mas

a partir de 2004 foi amplamente diagnosticada, principalmente em HSH de diversos outros países da Europa, Holanda, Austrália, Nova Zelândia, Estados Unidos e Canadá. Esta se destacou principalmente entre homens HIV positivos que fazem sexo com homens, sinalizando o ressurgimento de LGV. Atualmente são observados focos de casos também em países desenvolvidos (RONN; WARD, 2011; VAN AAR et al, 2020).

O LGV entre os HSH na Europa é causado principalmente pelo genótipo L2b de *C. trachomatis*. Isso contrasta com as cepas que circulam entre os casos em HSH nos Estados Unidos, que apresentam maior diversidade molecular. Com base nessas descobertas, acredita-se que a epidemia de LGV entre HSH na Europa causada pela variante L2b poderia ter sido importada dos Estados Unidos através da forte rede internacional entre HSH. O mesmo genótipo de *C. trachomatis* foi identificado entre 1979 e 1985 em pacientes infectados pelo HIV em São Francisco e entre 2000 e 2005 em pacientes HSH com LGV em Amsterdã. Antes do ano de 2003, a maioria dos casos de LGV na Europa era importada por viajantes, marinheiros e soldados (VAN DE LAAR, 2006; RONN, WARD 2011; VRIES, 2016; ECDC 2016; VRIES et al., 2019).

Nos Estados Unidos, a verdadeira incidência é desconhecida porque a notificação nacional de LGV terminou em 1995. Entre novembro de 2004 e janeiro de 2006, o LGV foi identificado em 180 pessoas, com 27 pessoas identificadas como sendo obtidas de HSH. Um estudo publicado em 2011 relatando dados de vigilância de LGV de vários locais nos Estados Unidos descobriu que menos de 1% das amostras obtidas de esfregaços retais de mulheres que fazem sexo com mulheres (MSM), as quais eram positivas para *C. trachomatis*, testavam positivo para LGV (PATHELA et al., 2019).

O Linfogranuloma Venéreo no Brasil

Apesar de o LGV ser uma doença de notificação compulsória no Brasil, são raros os estudos sobre a mesma, contudo, ocorreu um relato de caso em um paciente no Rio de Janeiro (PASSOS et al., 2012) e um relato de estreitamento retal relacionado ao LGV manifestado tardiamente (MOLING et al, 1994). No geral, a maioria dos casos ocorre nos grandes centros urbanos (BRASIL, 2015).

INFECÇÃO SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEL NÃO INVASIVA POR *C. trachomatis*

Aspectos gerais da IST por C. trachomatis

A infecção sexual não invasiva por *C. trachomatis* é considerada a IST mais prevalente no mundo. Esta é encontrada com facilidade entre todas as populações jovens e é encontrada com altas prevalências em países de todos os continentes. A epidemiologia desta infecção é caracterizada por se apresentar predominantemente de forma silenciosa, isto é, sem a presença de sinais ou sintomas. No entanto, quando presentes, os sintomas iniciais são inespecíficos e podem ser facilmente confundidos com outras patologias do aparelho reprodutor. Pacientes homens podem apresentar dor ao urinar, prurido e corrimento uretral incolor. Os sintomas nas mulheres podem ser cervicite, salpingite e uveíte, na maioria dos casos a infecção chega a um clearance e desaparece. Na mulher a gravidade desta infecção ocorre quando há ascendência do processo inflamatório/infeccioso e consecutiva deposição de tecido conjuntivo em regiões do trato reprodutivo superior no processo chamado Doença Inflamatória Pélvica (DIP), que atinge endométrio (endometrite), tubas uterinas (salpingite e se caso houver fecundação, poderá ocorrer gravidez ectópica e aborto) e ovários, além de uveíte e infertilidade evitável (MANIA-PRAMANIK et al., 2012; HOENDERBOOM et al., 2019).

IST por C. trachomatis no Mundo

Estima-se que ocorram cerca de 100 milhões de novos casos por ano com custos anuais de aproximadamente 517 milhões de dólares nos países desenvolvidos (CDC, 2014; REDMOND et al, 2015). As taxas de infecção não invasiva por *C. trachomatis* crescem cerca de 3% ao ano e acomete com altas frequências os jovens (principalmente mulheres) menores de 24 anos de idade, que apresentam baixa renda familiar e que se encontram em comportamento sexual de risco, como multiplicidade de parceiros sexuais, falta do uso do preservativo durante as relações sexuais e início precoce da vida sexual (SHERINGHAM et al., 2013; LÓPEZ-CORBETO et al., 2015; WOODHALL et al., 2015; ECDC, 2009; CDC, 2014).

IST por C. trachomatis no Brasil

No Brasil, a prevalência da infecção sexual não invasiva por *C. trachomatis* varia de 1,8% para 20,5% entre os diversos tipos de população de homens e mulheres deste

país, incluindo pessoas sem sintomas que foram recrutadas por estudos de demanda espontânea ou sintomáticas oriundas de clínicas de atendimento ginecológico e obstétrico. Existem poucos estudos de genotipagem de *C. trachomatis* no Brasil, contudo os genótipos D (8%), E (9,3%) e F (11,4%) são mais prevalentes (MACHADO et al., 2011; BRASILIENSE; BORGES; FERREIRA, 2016; SANTOS et al., 2017; SANTOS et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019; ROCHA et al., 2019; RIBEIRO et al., 2020; SILVEIRA et al., 2020).

No Brasil os programas públicos voltados para as IST não incluem a infecção sexual por *C. trachomatis* em seu esquema de rastreamento, caracterizando-se como uma infecção negligenciada. Contudo, as mulheres de baixa renda procuram assistência à saúde apenas tardiamente, quando as patologias já estão instaladas. Este cenário mostra apenas a “ponta do iceberg” sobre a real situação epidemiológica desta infecção nas mulheres brasileiras (PINTO et al., 2011, BRASIL, 2017). As populações mais vulneráveis são aquelas que apresentam indicadores sociais e econômicos relacionados com esta infecção, como baixa acessibilidade aos serviços públicos de saúde, baixa escolaridade, condições insalubres de moradia e alto índice de promiscuidade sexual (SHERINGHAM et al., 2013; CRICHTON et al., 2014).

Diagnóstico das infecções por C. trachomatis

O diagnóstico do Tracoma é basicamente clínico, e geralmente é feito por meio de um exame ocular externo, observando-se as pálpebras e a córnea, verificando-se a presença ou a ausência de entropião, triquiase e opacificações corneanas rever esta frase, pois está sem sentido. A conjuntiva normal é lisa, fina, transparente e de coloração rósea. Os vasos sanguíneos tarsais podem ser observados em toda sua extensão. No Tracoma, é observado espessamento e opacificação difusa da conjuntiva e a confirmação do diagnóstico ocorre por meio de cultura, imunofluorescência e dos testes laboratoriais de alta sensibilidade e especificidade, como a Amplificação de Ácidos Nucleicos (NAAT) por Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR) ou por sorologia nos casos avançados da doença (BRASIL, 2014).

O diagnóstico do LGV pode ser clínico ao identificar o sinal clínico que é a linfadenopatia do tipo “bubões”, porém, tem bom resultado nas análises moleculares de esfregaço de lesão anogenital primária (exsudato de base de úlcera), esfregaço de mucosa retal (quando há suspeita de LGV anorretal) e linfa aumentada ou flutuante aspirado de nódulos ou bubões (quando há suspeita de LGV inguinal) (CEOVIC; GULIN, 2015). O uso do teste de PCR para linfogranuloma venéreo deve ser considerado em pacientes com sinais de linfadenopatia femoro-inguinal ou bubão e / ou (uma história de) úlceras genitais ou proctite / proctocolite em mulheres e HSH, (VRIES et al, 2019).

Existem outras propostas específicas de ensaios de PCR para identificar e distinguir exclusivamente as cepas de *C. trachomatis* causadoras de Linfogranuloma venéreo (BACHMANN et al., 2010; CEOVIC; GULIN, 2015; SMIT; CORNELISSEN; BRUISTEN, 2020).

Métodos convencionais de PCR e sequenciamento de fragmentos do DNA de *C. trachomatis* permite identificar a infecção assintomática e o genótipo dessa. Por isso a pesquisa molecular é indicada como padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial da IST não invasiva por *C. trachomatis* (CDC, 2014). Estas técnicas apresentam alto nível de sensibilidade e especificidade que permite a identificação dos genótipos que fornecem informações importantes para estudos epidemiológicos. Os testes sorológicos, que podem ser utilizados para o diagnóstico de confirmação em outras doenças como o Tracoma e LGV, para as IST não invasivas, estes não são indicados devido a possibilidade de reação cruzada e resultados falso-positivos (BACHMANN et al., 2010; CEOVIC; GULIN, 2015; SMIT; CORNELISSEN; BRUISTEN, 2020).

TRATAMENTO DAS INFECÇÕES POR *C. trachomatis*

O esquema terapêutico principal para esta infecção é a administração de dose única de Azitromicina 1g (LANJOUW et al., 2016), contudo as contraindicações o tratamento com Azitromicina é contraindicado para pacientes terminais e com doenças imunossupressoras; para aqueles com hepatopatias; quem apresenta hipersensibilidade aos macrolídeos, em geral, ou à Azitromicina, especificamente; para os que são diagnosticados com insuficiência renal grave e/ou com miocardiopatia dilatada; pra quem faz tratamento concomitante com o Astemizol ou Terfenadina e derivados do ergo (Ergotamina), Nelfinavir, Pimozida, Amiodarona, Disopiramida, Rifabutina, Dígoxina, Teofilina, Varfarina, Opióides, Carbamazepina, Ciclosporina. Os casos que se enquadram em qualquer um desses critérios de exclusão deverá ser avaliados por médicos.

Para o Tracoma é recomendado o tratamento para a cura da infecção. Em nível populacional, o objetivo é interromper a cadeia de transmissão da doença e diminuir a circulação do agente etiológico na comunidade, o que leva à redução da frequência das reinfecções e da gravidade dos casos. O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde é Azitromicina (20 mg/kg de peso) em dose única, via oral, dose máxima de 1g (BRASIL, 2014).

Para o LVG é recomendado Doxiciclina 100 mg, via oral, 1 comprimido, 2x/dia, por 21 dias ou em segunda opção, Azitromicina 500 mg, 2 comprimidos, via oral, 1x semana, por 21 dias (preferencial nas gestantes) (BRASIL, 2015). Para as IST não invasivas é recomendado Azitromicina 500 mg, 2 comprimidos, via oral, dose única ou

Doxiciclina 100 mg, via oral, duas vezes ao dia, 7 dias (Exceto gestantes) ou Amoxicilina 500 mg, via oral, três vezes ao dia, 7 dias (BRASIL, 2015).

PREVENÇÃO DAS INFECÇÕES POR *C. trachomatis*

Recomenda-se para a prevenção do LGV, como indicado também para outras IST, o uso de preservativos masculinos ou femininos nas relações sexuais (vaginal, anal e/ou oral); realizar constantemente o autoexame, com o intuito de observar alterações visíveis no corpo; comparecer regularmente para consultas com profissionais de saúde, para que haja diagnóstico e tratamento o mais rápido possível (CEOVIC, 2015; PINTO et al., 2011).

No caso do Tracoma, por ser mais presente em áreas de vulnerabilidades socioeconômicas, as recomendações estão ligadas à higiene pessoal e familiar, com a lavagem das mãos e do rosto com frequência; evitar coçar os olhos com as mãos sujas; não compartilhar objetos pessoais (roupas, toalhas, lenços etc); prover de boas condições de saneamento básico, tratamento de água e descarte correto do lixo nas residências; ofertar à população Educação em Saúde, visando a disseminação de informações (BRASIL, 2019; BRASIL, 2009)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACHMANN, L.H. et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* rectal infections. **J Clin Microbiol.** v. 48, n. 5, p. 1827–1832, 2010.

BELL, T.A.; WANG, S.P. Pneumonia in infancy. **Clin Pediatr (Phila).** v. 20, n. 1, p. 68-69, 1981.

BENEDETTI, M. S. G.; SAKAZAKI, V.M.; SILVA, M.S. Prevalência do Tracoma em Roraima no período de 2002 a 2005. **Atas de Saúde Ambiental**, v. 3, n. 3, p. 12-25, 2015.

BOSTON PUBLIC Health Commission. Fact Sheet. Clamídia. 2017. Disponível em: <<https://www.bphc.org/whatwedo/infectious-diseases/Infectious-Diseases-A-to-Z/Pages/Chlamydia.aspx>> Acesso em 04 dez. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância do tracoma e sua eliminação como causa de cegueira 2ª ed.**, revisada do Manual de Controle do Tracoma. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Um olhar sobre o tracoma** (Folder). Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas- Infecções Sexualmente Transmissíveis**. Relatório técnico administrativo: 04/2015. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: < http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2015/Relatorio_PCDT_IST_CP.pdf> Acesso: em 04 dez. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde: volume único** [recurso eletrônico]. 3ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL, Indicadores de dados básicos da Sífilis nos municípios Brasileiros. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017

BRASILIENSE, D.M.; BORGES, B.N.; FERREIRA, W.A. Genotyping and prevalence of Chlamydia trachomatis infection among women in Belém, Pará, northern Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 10(2):134-7, 2016.

BRITO, C.M.G. et al. Household Survey of Trachoma among Children Living in Pernambuco, Brazil. **Pathogens**. v. 25, n. 8, p. 263, 2019.

BROOKS, G.F., et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26 ed. Porto Alegre, Artmed, 2014. p. 874.

BRUNHAM, R.C.; REY-LADINO, J. Immunology of Chlamydia infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. **Nat Rev Immunol**. v. 5, n. 2, p. 149-61, 2005.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **2015 Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines**. 2015. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/std/tg2015/default.htm>>. Acesso em: 04 dez. 2020.

CEOVIC, R.; GULIN, S.J. Lymphogranuloma venereum: diagnostic and treatment challenges. **Infect Drug Resist**. v. 27, n. 8, p. 39-47, 2015.

CHAVES, A. F. *Chlamydia trachomatis*, na Patologia Médica. **Rev. Pat. Trop**. v. 16, n. 2, p. 109-128, 1987.

CHEONG, H.C.; LEE, C.Y.Q.; CHEOK, Y.Y.; SHANKAR, E.M.; SABET, N.S.; TAN, GMY.; MOVAHED, E.; YEOW, TC.; SULAIMAN, S.; WONG, WF.; LOOI, CY.; GUPTA, R.; HASSAN, J.; ARULANANDAM, B.; ABUBAKAR, S. CPAF, HSP60 and MOMP antigens elicit pro-inflammatory cytokines production in the peripheral blood mononuclear cells from genital *Chlamydia trachomatis*-infected patients. **Immunobiology**. 224(1):34-41. doi: 10.1016/j.imbio.2018.10.010. Epub 2019.

CHOROSZY-KRÓL, I. et al. Characteristics of the *Chlamydia trachomatis* species – Immunopathology and Infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 21, n. 6, p. 799–808, 2012.

CRICHTON, J. et al. Prevalence of Chlamydia in Young Adulthood and Association with Life Course Socioeconomic Position: Birth Cohort Study. **PLoS One**. v. 9, n. 8, e104943, 2014.

DAL CONTE, I. et al. Lymphogranuloma venereum: an old, forgotten re-emerging systemic disease. **Panminerva Med**. v. 56, n. 1, p. 73-83, 2014.

EVERETT, K.D.E.; BUSH, R.M.; ANDERSEN, A.A. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. **Int J Syst Bacteriol**. v. 49, p. 415–440, 1999.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, Chlamydia control in Europe, ISBN 978-92-9193-165-1. Stockholm, 2009.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Lymphogranuloma venereum. In: Annual epidemiological report for 2016.

FAVACHO, J. et al. Prevalence of trachoma in school children in the Marajó Archipelago, Brazilian Amazon, and the impact of the introduction of educational and preventive measures on the disease over eight years. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 12, n. 2, e0006282, 2018.

FREITAS, H.S. et al. Tracoma em assentamentos indígenas no Brasil, 2000–2008. **Ophthalmic Epidemiol**. v. 23, p. 354–359, 2016.

HOENDERBOOM, BM; BENTHEM, BHB; BERGEN, JEAM; DUKERS-MUIJRERS, NHTM; GÖTZ, HM; HOEBE, CJPA; HOGEWONING, AA; LAND, JAL; SANDE, MAB; A MORRÉ, SA; BROEK IVF. Relation Between *Chlamydia trachomatis* Infection and Pelvic Inflammatory Disease, Ectopic Pregnancy and Tubal Factor Infertility in a Dutch Cohort of Women Previously Tested for *Chlamydia* in a Chlamydia Screening Trial. **Sex Transm Infect.** Jun;95(4):300-306. doi: 10.1136/sextrans-2018-053778. Epub. 2019.

JONES, H.; RAKE, G.; STEARNS, B. Studies on lymphogranuloma venereum. III. The action of the sulfonamides on the agent of lymphogranuloma venereum. **J Infect Dis.** v. 76, p. 55-69, 1945.

KOLEY S; MANDAL R K. Saxophone penis after unilateral inguinal bubo of lymphogranuloma venereum. **Indian J Sex Transm Dis AIDS.** Jul;34(2):149-51. doi: 10.4103/0253-7184.120575. 2013.

LANJOUW, E. et al. 2015 European guideline on the management of *Chlamydia trachomatis* infections. **Int J STD AIDS.** v. 27, n. 5, p. 333-348, 2016.

LATINI, A. et al. Linfogranuloma venéreo inguinal e anorretal: uma série de casos de um centro de doenças sexualmente transmissíveis em Roma, Itália. **BMC infecciosa doenças.** v. 17, n. 1, p. 386, s12879-017-2484-8, 2017.

LEWIS, M.E. et al. Morphologic and molecular evaluation of *Chlamydia trachomatis* growth in human endocervix reveals distinct growth patterns. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 10, n. 4, p. 71, 2014.

LINDNER, K. Gonoblennorrhöe, einschlussblennorrhöe und trachom. **Albrecht von Graefes Archiv für Ophthalmologie,** v. 78, n. 2, p. 345-380, 1911.

LÓPEZ-CORBETO, E. et al. Prevalence and re-infection rate of *C. trachomatis* genital infections in young people under 25 years in Catalonia. **Enfermedades Infecciosas y Microbiology Clinic.** V. 35, n. 6, p. 359-363, 2015.

MABEY, D.; PEELING, R.W. Lymphogranuloma venereum. **Sex Transm Infect.** v. 78, n. 2, p. 90-2, 2002.

MACIEL, A.M.S. et al. Factors associated with trachoma treatment and control treatment in schools of municipality of the Northeast Region, Brazil. **Rev Bras Epidemiol.** v. 23, e200011, 2020.

MACHADO, A.C.S. et al. Distribution of Chlamydia trachomatis genovars among youths and adults in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**. v. 60, p. 472-476, 2011.

MANIA-PRAMANIK, J. et al. Current Chlamydia trachomatis Infection, a Major Cause of Infertility. **Journal of Reproduction and Infertility**. v. 13, n. 4, p. 204-210, 2012.

MARTÍNEZ, T.M.A., et al. Taxonomy and clinical importance of the new families of the order Chlamydiales. **Revista Chilena de Infectología**. v. 18, n. 3, p. 203-211, 2001.

MILLER, H.; GALLEGU, G.; RODRIGUEZ, G. Clinical evidence of trachoma in Colombian Amerindians of the Vaupés Province. **Biomedica**. v. 30, n. 3, p. 432 - 439, 2010.

MOHAMMADPOUR, H. et al. Tracoma: passado, presente e futuro. **J Curr Ophthalmol**. v. 28, p. 165 - 169, 2016.

MOLING, O. et al. Rectal Stricture due to Lymphogranuloma Venereum Manifesting Four Years After Temporary Residence in Brazil. **J Travel Med**. v. 1, n. 4, p. 228-230, 1994.

PASSOS, M.R.L. et al. Lymphogranuloma venereum and non-Hodgkin lymphoma: a case report. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 45, n. 3, p. 412-414, 2012.

PATHELA P. et al. Lymphogranuloma Venereum: An Increasingly Common Anorectal Infection Among Men Who Have Sex With Men Attending New York City Sexual Health Clinics. **Sex Transm Dis**. v. 46, n. 2, e14-e17, 2019.

PAVILANIS, A.V. Chlamydia trachomatis: a genital infection of particular concern to the young. **Can Fam Physician**. v. 33, p. 1813-7, 1987.

PINTO, V.M. et al. Chlamydia trachomatis prevalence and risk behaviors in parturient women aged 15 to 24 in Brazil. **Sex Transm Dis**. v. 38, n.10, p. 957-61, 2011.

RAKE, G.W. Family II. Chlamydiaceae Rake, Fam. Nov. In: BREED, R.S.; MURRAY, E.G.D.; SMITH, N.R. (org.) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7 ed. The Williams & Wilkins Co, Baltimore. p. 957. 1957.

RAMADHANI, A.M. et al. Blinding trachoma: systematic review of rates and risk factors for progressive disease. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 10, n. 8, e0004859, 2016.

REDMOND, S.M. et al. Genital Chlamydia prevalence in Europe and non-European high income countries: systematic review and meta-analysis. **PLoS One**. v. 10, n. 1, e0115753, 2015.

RIBEIRO, A.A. et al. Human Papillomavirus and Chlamydia Trachomatis Infections in Adolescents and Young Women: Prevalence and Risk Factors. **Diagn Cytopathol**. v. 48, n. 8, p. 736-744, 2020.

RIPA, K.T. Microbiological diagnosis of Chlamydia trachomatis infection. **Infection**, v. 10, p. 19–24, 1982.

ROEST, R.W.; VAN DER MEIJDEN, W.I. European guideline for the management of tropical genito-ulcerative diseases. **Int J STD AIDS**. v. 12, n. 3, p. 78–83, 2001.

RONN, M.M.; WARD, H. The association between lymphogranuloma vener-eum and HIV among men who have sex with men: system atic review andmeta-analysis. **BMC Infect Dis**. v. 11, p. 70, 2011.

ROCHA, D. et al. Chlamydia trachomatis infection in women living in remote areas in Amazonas, Brazil-a self-collection screening experience. **Int J STD AIDS**. v. 30, n. 4, p. 336-343, 2019.

RODRIGUES, L.L.S. et al. Sexually transmitted infections among HIV-infected and HIV-uninfected women in the Tapajós region, Amazon, Brazil: Self-collected vs. clinician-collected samples. **PLoS One**. v. 14, n. 4, e0215001, 2019.

SANTOS, U.W.L. et al. Prevalência da infecção endocervical de Chlamydia trachomatis em universitárias do Estado do Pará, região Amazônica, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde (Online)**, v. 8, p. 27-33, 2017.

SANTOS, L.M. et al. High prevalence of sexual Chlamydia trachomatis infection in young women from Marajó Island, in the Brazilian Amazon (2018). **PLoS One**, v. 13, e0207853, 2018.

SERWIN, A. B.; KOPER, M.; UNEMO, M. Lymphogranuloma venereum genovar L2b concomitantly with syphilis and hepatitis C in a male patient in Poland – case report. **Przegl Epidemiol**. v. 72, n. 1, p. 45-51, 2018.

SHERINGHAM, J. et al. It matters what you measure: a systematic literature review examining whether young people in poorer socioeconomic circumstances are more at risk of Chlamydia. **Sexually Transmitted Infections**. v. 89, n. 2, p. 175-180, 2013.

SILVA, E.J. et al. Prevalence of trachoma and associated factors in students from the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba. v. 53, e20200056, 2020.

SILVEIRA, M.F. et al. Prevalence and Risk Factors Associated With Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, and Mycoplasma genitalium Among Women in Pelotas, Southern Brazil. **Int J STD AIDS.** v. 31, n. 5, p. 432-439, 2020.

SMITH, J.S. et al. Evidence for *Chlamydia trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. **The Journal of infectious diseases.** v. 185, n. 3, p. 324-331, 2002.

SMIT, P.W.; CORNELISSEN, A.R.; BRUISTEN, S.M. Reduction of non-typeable results using a plasmid oriented Lymphogranuloma venereum PCR for typing of *Chlamydia trachomatis* positive samples. **PLoS One.** v. 15, n. 6, e0233990, 2020.

STONER, B.P.; COHEN, S.E. Lymphogranuloma venereum 2015: clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clin Infect Dis.** v. 61, n. 8, p. 865-873, 2015.

STEPHENS, R.S. et al. Diversity of Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes. **J Bacteriol.** v. 169, n.9, p. 3879-3885, 1987.

SULLIVAN B. et al. Lymphogranuloma venereum (LGV) proctocolitis mimicking rectal lymphoma. **Radiol Case Rep.** 2018 Sep 13;13(6):1119-1122. doi: 10.1016/j.radcr.2018.08.015. eCollection 2018 .

TAYLOR, H.R. et al. Trachoma. **Lancet.** v. 384, p. 2142 – 2152, 2014.

VAN AAR, F et al. Increasing trends of lymphogranuloma venereum among HIV-negative and asymptomatic men who have sex with men, the Netherlands, 2011 to 2017. **Euro Surveill.** v. 25, n. 14, 2020.

VAN DE LAAR, M.J.W. The emergence of LGV in Western Europe: what do we know, what can we do?. **Euro Surveill.** v. 11, n. 9, p. 146-148, 2006.

VON PROWAZEK, S.; HALBERSTADTER, L. Zur aetiologie des trachoms. **Dtsch. Med. Wochenschr.** v. 33, p. 1285-1287, 1907.

VRIES, H.J.C. et al. 2013 European guideline on the management of lymphogranuloma venereum. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** v. 29, p. 1-6, 2015.

VRIES, H.J.C. The enigma of lymphogranuloma venereum spread in men who have sex with men: does ano-oral transmission plays a role?. **Sex Transm Dis.** v. 43, p. 420-422, 2016.

VRIES, H.J.C. et al. 2019 European guideline on the management of lymphogranuloma venereum. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** v. 33, n. 10, p. 1821-1828, 2019.

WAN, F.Y.M.; ENCISO, G.A. Optimal Proliferation and Differentiation of Chlamydia Trachomatis. **Stud Appl Math.** v. 139, n. 1, p. 129-178, 2017.

WOODHALL, S.C. et al. Can we use postal surveys with anonymous testing to monitor chlamydia prevalence in young women in England? Pilot study incorporating randomised controlled trial of recruitment methods. **Sexually Transmitted Infections.** v. 91, n. 6, p. 412-414, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global WHO Alliance for the Elimination of Blinding Trachoma by 2020. **Weekly Epidemiological Record,** v. 87, n. 17, p. 161-168, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2012/wer8717.pdf>. Acesso em: 07 dez. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global WHO Trachoma. **Key facts.** Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trachoma> Acesso em: 07 dez. 2020.

INFECÇÃO POR *Treponema pallidum*

Thalyta Mariany Rêgo Lopes Ueno

Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA),
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará
(UEPA). Belém, Pará, Brasil.

E-mail: thalyta_mlopes@hotmail.com

Luciano Chaves Franco Filho

Laboratório de Infecções Sexualmente Transmissíveis (LBIST), Seção de
Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de
Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: lucianofranco6@gmail.com

Eliete da Cunha Araújo

Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal do Pará (UFPA),
Belém, Pará, Brasil.

E-mail: elieteca@ufpa.br

Vera Regina da Cunha Menezes Palácios

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do
Pará (UEPA). Belém, Pará, Brasil.

E-mail: verareginapalacios@gmail.com

Joana da Felicidade Ribeiro Favacho

Laboratório de Infecções Sexualmente Transmissíveis (LBIST), Seção de
Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de
Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: joanafavacho@iec.gov.br

Ana Maria Revorêdo da Silva Ventura

Seção de Parasitologia (SAPAR), Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: ana_mariaventura@hotmail.com

Karla Valéria Batista Lima

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: karlalima@iec.gov.br

AGENTE ETIOLÓGICO E A TRANSMISSÃO DA SÍFILIS

O *Treponema pallidum* o agente causador da sífilis é um dos principais determinantes de infecções sexualmente transmissíveis, como bejel, pinta e boubá (LU et al, 2017). O *T. pallidum* é um microrganismo espiralado fino, com cerca de 8 a 20 espiras e mede entre 6 a 15 micra de comprimento. É patogênico apenas para o homem, embora alguns animais como coelhos e macacos possam albergá-los, o que não significa haver sífilis entre esses animais. Seu ciclo evolutivo é de 30 horas (LUKEHART, 2013).

A virulência do patógeno está associada a motilidade, a habilidade de aderir às células e a quimiotaxia. São fatores que resultam em sua extrema capacidade de invasão, rápida fixação em superfícies celulares e penetração nas junções endoteliais e nos tecidos. O *T. pallidum* resseca-se rapidamente e, portanto, apresenta baixa resistência ao meio ambiente. Pode sobreviver por até 10 horas em superfícies úmidas, porém, é muito sensível à ação do sabão e de outros desinfetantes (AZULAY et al, 2013).

A sífilis é uma doença curável e de caráter sistêmico. Quase todos os casos são adquiridos por meio de contato sexual com lesões infecciosas, a saber: cancro, placa mucosa, exantema cutâneo ou condilomas planos. No entanto, o risco de infecção em intercurso sexual é de 60% nas lesões de cancro duro e condiloma plano. Outros modos de transmissão incluem infecção intrauterina, transfusão sanguínea e transplante de órgãos (NASCIMENTO; CURY-MARTINS, 2017; LUKEHART, 2013).

Epidemiologia

A OMS, com bases nos dados de prevalência de 2009 a 2016, estimou 376,4 milhões de casos de infecções sexualmente transmissíveis (IST) curáveis, entre as quais 6,3 milhões por sífilis. A prevalência global estimada de sífilis foi de 0,5%, com valores regionais variando de 0,1 a 1,6% (ROWLEY et al., 2019). Nas Américas, em 2012, a OMS calculou que aproximadamente 2 milhões de adolescentes e adultos apresentaram sífilis com quase 1 milhão de novas reinfeções anualmente. Os países das Américas apresentam variações importantes no impacto da sífilis em que grupos específicos são desproporcionalmente afetados pela doença, de 10,3% entre homens que fazem sexo com homens, de 2,3% entre as profissionais do sexo e de 0,4% na soroprevalência da população em geral (OPAS, 2019).

Nos EUA, em 2018, o registro de casos de sífilis atingiu o mais alto patamar desde 1991, com a taxa de 10,8 casos por 100.000 habitantes, que representou um aumento de 14,9% em comparação com o ano de 2017 (9,4 casos por 100.000 habitantes, e um aumento de 71,4% em comparação com 2014 (6,3 casos por 100.000 habitantes). Entre 2017 e 2018, esse aumento foi de 13,3% (101.584 casos para 115.045 casos) considerando-se a sífilis em todos os estágios, de 14,4% (de 30.644 para 35.063), para a notificação de sífilis primária e secundária, de 13,3% (de 34.013 para 38.539 casos) para sífilis não secundária e não primária, de 11,5% (de 35.992 para 40.137 casos) para os casos de duração desconhecida ou sífilis tardia e, por último, de 39,7% (de 935 para 1.306) para sífilis congênita (CDC, 2019b).

No Brasil, a situação da sífilis adquirida, agravo de notificação compulsória desde o ano de 2010, não difere daquela de outros países: em 2018, foi registrado um aumento dos casos da doença com 75,8 casos por 100.000 habitantes em comparação com 59,1 casos por 100.000 habitantes, em 2017. Ainda nesse ano de 2018, observou-se também uma taxa de detecção de sífilis em gestantes de 21,4/1.000 nascidos vivos, com taxa de incidência de sífilis congênita de 9,0/1.000 nascidos vivos e taxa de mortalidade de 8,2/100.000 nascidos vivos. Neste particular, a taxa de incidência de sífilis congênita não ultrapassou a taxa de detecção de casos de sífilis em gestantes em nenhum estado da federação, o que parece indiretamente indicar melhora na assistência pré-natal, com detecção e tratamento dos casos da doença ainda na gravidez (BRASIL, 2019).

Em 2018, o Ministério da Saúde do Brasil (2019) registrou 158.051 casos de sífilis adquirida (taxa de detecção de 75,8 casos/100.000 habitantes); 62.599 casos de sífilis em gestantes (taxa de detecção de 21,4/1.000 nascidos vivos); 26.219 casos de sífilis congênita (taxa de incidência de 9,0/1.000 nascidos vivos); e 241 óbitos por sífilis congênita (taxa de mortalidade de 8,2/100.000 nascidos vivos). Nesse mesmo ano, a

região Sudeste notificou 71.842 casos de sífilis adquirida, seguidos das regiões Sul (36.808), Nordeste (26.644), Centro-Oeste (12.855) e Norte (9.890). Na região Norte além dos casos de sífilis adquirida, houve 5.675 casos de sífilis em gestantes, 2.213 de sífilis congênita com 27 óbitos. Especificamente para a região norte, o Pará esteve em primeiro lugar para registro de casos de sífilis em gestantes (2.039), de sífilis congênita (790) e de óbitos por sífilis congênita (790) e, em segundo para sífilis adquirida (13).

Classificação e manifestações clínicas da sífilis

No quadro I, observa-se a classificação da sífilis, de acordo com a sua manifestação clínica e o tempo de evolução: recente (menos de um ano de evolução) e tardia (mais de um ano de evolução). Na sífilis recente estão incluídas as fases primária, secundária e latente recente. Na tardia, encontram-se as fases latente tardia e terciária (NASCIMENTO; CURY - MARTINS, 2017).

Ademais, a sífilis terciária que ocorre também uma década ou mais depois da infecção inicial se não tratada, pode apresentar:

- Doença cardiovascular - incluindo aneurisma da aorta, insuficiência da válvula aórtica, estenose coronária ou miocardite;
- Complicações neurológicas tardias - incluindo gerais paresia, tabes dorsalis e doença cerebral ou medula espinhal;
- Sífilis benigna tardia - apresentando goma (lesões granulomatosas inflamatórias progressivas) de pele, osso, vísceras e outros tecidos moles que levam à destruição dos órgãos afetados.

Embora a sífilis terciária seja mais rara, complicações neurológicas, oculares e óticas de complicações não tratadas a sífilis ainda ocorre e a doença pode levar a sequelas irreversíveis. Além disso, a sífilis em gestantes não tratadas ou inadequadamente tratadas pode levar a consequências trágicas para o concepto (CDC, 2019a).

Quadro 1 – Classificação e manifestações clínicas da sífilis

Evolução	Estágio	Manifestações Clínicas
Sífilis recente	Primária - 10-90 dias (média de 21 dias) após o contato.	<p>Geralmente se manifesta como um nódulo indolor único no local do contato, que se úlcera rapidamente, formando o cancro duro. Costuma surgir na genitália, mas também pode ocorrer no períneo, ânus, reto, orofaringe, lábios ou mãos.</p> <p>A lesão primária é rica em treponemas.</p>
	Secundária - 6 semanas a 6 meses após o contato.	<p>Nessa fase da doença, são comuns sinais e sintomas sistêmicos da infecção, mimetizando manifestações clínicas de outras enfermidades e, dessa forma, sendo frequentemente confundida com outros diagnósticos. Podem ocorrer erupções cutâneas em forma de máculas (roséola) e/ou pápulas, principalmente no tronco; lesões eritemato-escamosas palmo-plantares (essa localização, apesar de não patognomônica, sugere fortemente o diagnóstico de sífilis no estágio secundário); placas eritematosas branco-acinzentadas nas mucosas; lesões pápulo-hipertróficas nas mucosas ou pregas cutâneas (condiloma plano ou condiloma lata); alopecia em clareira e madarose (perda da sobrancelha, em especial do terço distal), febre, mal-estar, cefaleia, adinamia e linfadenopatia generalizada.</p> <p>As lesões secundárias são ricas em treponemas</p>
	Latente recente - Nos primeiros 2 anos da infecção	<p>Período em que não se observa nenhum sinal ou sintoma clínico de sífilis, verificando-se, porém, reatividade nos testes imunológicos que detectam anticorpos. A maioria dos diagnósticos ocorre nesse estágio. Aproximadamente 25% dos indivíduos intercalam lesões de secundarismo com os períodos de latência, durante o primeiro ano da infecção.</p>
Sífilis tardia	Latente tardia - Após 2 anos de infecção	
	Terciária	<p>Menos frequente na atualidade. É comum o acometimento do sistema nervoso e cardiovascular (dilatação aórtica, regurgitação aórtica, estenose do óstio carotídeo). Além disso, verifica-se a formação de gomas sífilíticas (tumorações com tendência a liquefação) na pele, em mucosas, ossos ou qualquer tecido.</p> <p>As lesões terciárias não apresentam treponemas viáveis</p>

Fonte: BRASIL, 2019.

Sífilis congênita e sífilis na gestação

No Brasil, a notificação compulsória da sífilis congênita foi instituída pela Portaria nº 542, de 22 de dezembro de 1986 (BRASIL, 1986), enquanto a de sífilis em gestante ocorreu por meio da Portaria nº 33, de 14 de julho de 2005 (BRASIL, 2005).

A sífilis congênita é transmitida de mãe para o feto (transmissão vertical) pela via intrauterina (com taxa de transmissão em até 80%) e pode causar perda fetal após o primeiro trimestre e morte do feto ou recém-nascido. A mãe pode transmitir a doença ao recém-nascido durante o parto se ela apresentar lesões primárias de sífilis na genitália (BRASIL, 2018).

Dados epidemiológicos globais apresentados, em 2012, mostram que ocorreram cerca de 930 mil infecções maternas por sífilis que causaram 350 mil desfechos adversos na gravidez, incluindo 143 mil mortes fetais precoces e natimortos, 62 mil mortes neonatais, 44 mil nascimentos prematuros ou com baixo peso e 102.000 crianças infectadas em todo mundo. Vale ressaltar, que quase 80% (274 mil) dos desfechos adversos ocorreram em mulheres que receberam cuidados pré-natais pelo menos uma vez (WIJESORIYA et al, 2016).

No Brasil, em 2018, foram registrados 62.599 casos de sífilis em gestantes (taxa de detecção de 21,4/1.000 nascidos vivos); 26.219 casos de sífilis congênita (taxa de incidência de 9,0/1.000 nascidos vivos); e 241 óbitos por sífilis congênita (taxa de mortalidade de 8,2/100.000 nascidos vivos). Em comparação com o ano de 2017, observou-se aumento de 25,7% na taxa de detecção em gestantes e de 5,2% na incidência de sífilis congênita. Ademais, em relação à sífilis em gestantes, observa-se que o Sudeste e o Sul apresentam taxas de detecção superiores à do Brasil. Quanto à sífilis congênita, as regiões com taxas maiores que a nacional são o Nordeste e o Sudeste (BRASIL, 2019).

Vale ressaltar, que o aumento de casos de detecção de sífilis em gestantes deve-se em parte à mudança no critério de definição de casos para fins de vigilância, enquanto o aumento menos acentuado de sífilis congênita deve-se ao novo critério mais específico, instituído por meio da Nota Informativa nº 2-SEI/2017-DIAHV/SVS/MS (BRASIL, 2019), veja o Box 1 para mais informações.

Box 1: Novos critérios para notificação em sífilis em gestante e sífilis congênita

SAIBA MAIS!!!

- Todos os casos de mulheres diagnosticadas com sífilis durante o pré-natal, parto e/ou puerpério devem ser notificados como **sífilis em gestantes** e não como sífilis adquirida.
- Para a definição dos casos de **sífilis congênita** deve ser avaliada a história clínico-epidemiológica da mãe e/ou os critérios clínicos e laboratoriais da criança exposta, deixando de ser considerado, para fins de notificação desses casos, o tratamento da parceria sexual da mãe.

Fonte: BRASIL, 2017.

As manifestações clínicas da sífilis congênita podem ser classificadas em precoce e tardia. A sífilis congênita precoce surge até o segundo ano de vida (Quadro 2) e sífilis congênita tardia ocorre após o segundo ano de vida (quadro 3).

Quadro 2: Manifestações clínicas e laboratoriais da sífilis congênita precoce

Manifestações Clínicas	Alterações Laboratoriais
<ul style="list-style-type: none">○ Hepatomegalia com ou sem esplenomegalia e icterícia; Lesões cutâneas (pênfigo palmo-plantar, condiloma plano), petéquias, púrpura;○ Periostite ou osteíte ou osteocondrite, pseudoparalisia dos membros;○ Sofrimento respiratório com ou sem pneumonia;○ Rinite sero-sanguinolenta, anemia e linfadenopatia generalizada (epitrocLEAR);○ Fissura peribucal, síndrome nefrótica, hidropsia, edema, convulsão e meningite;	<ul style="list-style-type: none">○ Anemia, trombocitopenia, leucocitose (podendo ocorrer reação leucemoide, linfocitose e monocitose) e leucopenia.

Fonte: Brasil, 2018.

Quadro 3: Manifestações clínicas da sífilis congênita tardia

Manifestações Clínicas
<ul style="list-style-type: none">○ Tíbia em “lâmina de sabre”○ Articulações de Clutton○ Fronte “olímpica” e nariz “em sela”○ Dentes incisivos medianos superiores deformados (dentes de Hutchinson), molares em “amora”○ Rágades periorais, mandíbula curta, arco palatino elevado○ Ceratite intersticial○ Surdez neurológica e dificuldade no aprendizado

Fonte: Brasil, 2018.

Para o tratamento da sífilis congênita, priorizam-se dois momentos, a saber: período neonatal (até os 28 dias de vida) (quadro 7) e período pós-natal (após os 28 dias de vida) (BRASIL, 2018).

Confirmando-se o diagnóstico de sífilis no período pós-natal, deve-se realizar aplicações de penicilina cristalina, no intervalo de quatro em quatro horas, e para a penicilina G procaína, de 12 em 12 horas, mantendo-se os esquemas de doses recomendados (BRASIL, 2018). O tratamento para sífilis em gestantes segue o preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil e a OMS, vide Quadro 4.

Quadro 4: Tratamento da sífilis congênita no período neonatal, de acordo com a situação clínico - laboratorial da mãe

<p>A – Para todos os RN de mães com sífilis não tratada ou inadequadamente tratada, independentemente do resultado do teste não treponêmico (ex.: VDRL) do RN, realizar: hemograma, radiografia de ossos longos e punção lombar*, além de outros exames, quando houver indicação clínica</p>	<p>A1 – Presença de alterações clínicas e/ou imunológicas e/ou radiológicas e/ou hematológicas</p>	<p>- Penicilina cristalina, na dose de 50.000 UI/kg/dose, IV, a cada 12 horas (nos primeiros 7 dias de vida) e a cada 8 horas (após 7 dias de vida), durante 10 dias;</p> <p>- Penicilina G procaína 50.000 UI/kg, dose única diária, IM, durante 10 dias.</p>
	<p>A2 – Presença de alteração líquórica</p>	<p>- Penicilina cristalina, na dose de 50.000 UI/kg/dose, IV, a cada 12 horas (nos primeiros 7 dias de vida) e a cada 8 horas (após 7 dias de vida), durante 10 dias.</p>
	<p>A3 – Ausência de alterações clínicas, radiológicas, hematológicas e/ou líquóricas, e teste não treponêmico não reagente</p>	<p>- Penicilina G benzatina, na dose única de 50.000 UI/kg, IM.</p> <p>O acompanhamento é obrigatório, incluindo o seguimento com teste não treponêmico sérico após conclusão do tratamento. Sendo impossível garantir o acompanhamento, o RN deverá ser tratado com o esquema: Penicilina G procaína 50.000 UI/kg, dose única diária, IM, durante 10 dias OU Penicilina cristalina, 50.000 UI/kg/dose, IV, a cada 12 horas (nos primeiros 7 dias de vida) e a cada 8 horas (após 7 dias de vida), durante 10 dias.</p>

<p>B – Para todos os RN de mães adequadamente tratadas, realizar o teste não treponêmico (ex.: VDRL) em amostra de sangue periférico do RN. Se reagente e com titulação maior do que a materna, e/ou na presença de alterações clínicas, realizar hemograma, radiografia de ossos longos e análise do LCR</p>	<p>B1 – Presença de alterações clínicas e/ou radiológicas e/ou hematológicas, sem alterações líquóricas</p>	<p>Esquema A1</p>
	<p>B2 – Presença de alteração líquórica</p>	<p>Esquema A2</p>
<p>C – Para RN de mães adequadamente tratadas, realizar o teste não treponêmico em amostra de sangue periférico do RN</p>	<p>C1 – Se o RN for assintomático e o teste não treponêmico for não reagente, proceder apenas ao seguimento clínico-laboratorial. Na impossibilidade de garantir o seguimento, deve se proceder ao tratamento do RN</p>	<p>Penicilina G benzatina, IM, na dose única de 50.000 UI/kg</p>
	<p>C2 – Se o RN for assintomático e o teste não treponêmico for reagente, com título igual ou menor que o materno, acompanhar clinicamente. Na impossibilidade do seguimento clínico, investigar e tratar de acordo com alterações líquóricas.</p>	<p>Esquema A1 (sem alterações de LCR) Esquema A2 (com alterações no LCR) Esquema A3 (penicilina G benzatina + seguimento obrigatório, se exames normais e LCR normal)</p>

Fonte: BRASIL, 2015.

Testes diagnósticos

Os testes diagnósticos para sífilis são divididos em duas categorias: exames diretos e testes imunológicos. Os exames diretos são realizados em pesquisa do treponema em campo escuro e pesquisa direta do agente etiológico com material corado, já os imunológicos em testes treponêmicos e testes não treponêmicos (BRASIL, 2016).

O exame em campo escuro consiste na visualização direta das espiroquetas no material coletado da secreção da lesão do cancro duro ou nas placas e lesões cutâneas da fase secundária, ao microscópio com luz polarizada. A sensibilidade varia de 74 a 86%, em que a especificidade alcançar 97%, dependendo da experiência do avaliador (NASCIMENTO; CURY-MARTINS, 2017).

A pesquisa direta com material corado consiste em técnicas de microscopia (método Fontana-Tribondeau, método de Burri, método de coloração pelo Giemsa e método de Levaduti) utilizando materiais corados com sensibilidades inferiores à microscopia de campo escuro (BRASIL, 2016).

O Ministério da Saúde do Brasil (2016b) descreve os testes imunológicos não treponêmicos como aqueles que detectam anticorpos anticardioplipina, que não são específicos para os antígenos G do *T. pallidum*, já os treponêmicos, por sua vez, detectam anticorpos específicos para os antígenos dessa espiroqueta (BRASIL, 2016).

Os testes não treponêmicos são provas sorológicas de mais fácil disponibilidade e acesso. No entanto, são métodos quantitativos inespecíficos usados para triagem e seguimento sorológicos de pessoas tratadas com sífilis. O teste mais utilizado é o VDRL (*Venereal Diseases Research Laboratories*). O RPR (*Rapid Test Reagin*), USR (*Unheated Serum Reagin*) e o TRUST (*Toluidine Red Unheated Serum Test*) são modificações do VDRL que visam aumentar a estabilidade da suspensão antigênica, ao possibilitar a utilização de plasma (RPR e TRUST) com leitura do resultado a olho nu (PEELING et al, 2017).

Os testes não treponêmicos podem gerar resultados falso-positivos em situações como gestação, em indivíduos com doenças autoimunes, em usuários de substâncias intravenosas, em portadores de HIV, na malária, na hanseníase, entre outros. Testes falso-negativos podem ser observados em exame precoce (20 a 30% dos pacientes com cancro duro podem ter sorologia negativa), no fenômeno prozona (o excesso de anticorpos dificulta a aglutinação do complexo Ag-AC) e em casos de imunossupressão avançada (HIV) (NASCIMENTO; CURY- MARTINS, 2017).

A partir da segunda semana após o aparecimento do cancro, os testes não treponêmicos já estão positivos, com resultado expresso em titulações, em geral, com

títulos mais elevados no segundo estágio da doença. Após o tratamento, os títulos diminuem duas diluições a cada 3 meses, podendo permanecer baixos indefinidamente (cicatriz sorológica). Elevação repentina dos títulos e até mesmo títulos altos sugerem reinfeção. Títulos baixos sem tratamento ou com história incerta podem indicar doença antiga não tratada ou tratamento inadequado, sugerindo-se o retratamento. Os testes não treponêmicos não confirmam o diagnóstico de sífilis, sendo recomendado para o acompanhamento do tratamento dos casos de sífilis (NASCIMENTO; CURY-MARTINS, 2017).

Os testes treponêmicos são provas sorológicas mais específicas, capazes de identificar se o paciente teve contato com o treponema. Tornam-se positivos 15 dias após a infecção. Os principais testes são FTA-ABS (*Fluorescent Treponemal Antigen-Absorption*), primeiro a se tornar reagente após a infecção, e mais recente o ELISA (*Enzyme - Linked Immunosorbent Assay*) – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, cujo resultado é expresso em reagente (positivo) ou não reagente (negativo). Não estão indicados para o acompanhamento do tratamento, haja vista permanecerem positivos por toda a vida do indivíduo, na maioria dos casos. Na sífilis primária, é comum se observar teste não treponêmico não reagente e teste treponêmico reagente (o FTA-ABS pode se tornar reativo aproximadamente três semanas após a infecção) (AZULAY et al, 2013). Cerca de 1% da população apresenta resultado falso-positivo para os testes treponêmicos, em geral, em portadores da doença de Lyme (BRASIL, 2016).

O teste rápido para sífilis é um teste treponêmico disponível no Brasil, de fácil execução, leitura e interpretação, com disponibilidade do resultado em no máximo 30 minutos, sem a necessidade de estrutura laboratorial. É baseado na detecção de anticorpos específicos para treponemas (BRASIL, 2016). O Ministério da Saúde do Brasil (2016) recomenda que para o diagnóstico da sífilis adquirida devam ser utilizados um teste treponêmico e um teste não treponêmico, cuja ordem de realização fica a critério do serviço de saúde. Em caso de teste rápido de triagem reagente para sífilis, deverá ser coletada uma amostra de sangue venoso para realização de um teste não treponêmico, por exemplo, o VDRL.

Outra modalidade para diagnóstico é o exame do LCR (líquido cefalorraquidiano), classicamente indicado nos casos de sífilis não tratada com 2 a 5 anos de duração; nos pacientes com títulos elevados nas reações sorológicas sanguíneas, mesmo após tratamento correto da sífilis; em indivíduos com neurosífilis sintomática, inclusive como critério para alta definitiva. Nenhum teste sorológico isoladamente é seguro no diagnóstico de neurosífilis. Embora, o exame histopatológico não seja rotineiramente empregado para o diagnóstico, os achados descritos pelo patologista são sugestivos (infiltrado granulomatoso, constituído de linfócitos, plasmócitos, células

epitelioides gigantes, com ou sem necrose central), mas ainda assim, há necessidade de confirmação sorológica feita pela combinação da positividade do teste sorológico, aumento de células e de proteínas no LCR. (TUDDENHAM; GHANEM, 2018).

Embora o principal método utilizado para o diagnóstico da sífilis seja sorológico, as técnicas de biologia molecular são de grande valia como ferramentas auxiliares para o diagnóstico de sífilis primária, secundária e congênita. Não são recomendadas para neurosífilis, em virtude da baixa sensibilidade da reação em cadeia da polimerase no LCR. O uso da biologia molecular permite discriminar variantes genéticas do *T. pallidum* e investigar seu potencial associação com características fenotípicas, como patogenicidade e resistência a antibióticos, especialmente à penicilina (droga de eleição para o tratamento da sífilis) e aos macrolídeos (eritromicina, nos casos de indivíduos comprovadamente alérgicos à penicilina). Pode ainda fornecer dados de estrutura populacional usado para mapear a distribuição geográfica de tipos de linhagens do *T. pallidum*, e estabelecer associação entre essas linhagens e grupos demográficos específicos e examinar a dinâmica de transmissão, de modo a contribuir nos estudos epidemiológicos da sífilis, inclusive na elucidação de sua origem controversa (GRILLOVÁ et al, 2018; GUERRA, VALDÉZ, 2020).

Diagnóstico molecular da sífilis

Desde a descoberta do *T. pallidum* em 1905 por Fritz Schaudin e Paul Erich Hoffman, várias tentativas da implementação de uma metodologia de cultivo para o *T. pallidum* foram realizadas, entretanto a falta de conhecimento sobre as condições ideais de cultivo inicialmente resultou em insucessos na implementação de uma metodologia eficiente (EDMONDSON et al, 2018). Em 1981, Fieldsteel e Moeckli, baseando-se em novas descobertas sobre o *T. pallidum*, desenvolveram um método utilizando células de tecido epitelial de coelho (Sf1EP) uma atmosfera de 1,5% de O₂ e ditiotreitól (DTT). Apesar do sucesso do cultivo *in vitro* do *Treponema*, a multiplicação e sobrevivência da bactéria ficou limitada entre 12 e 18 dias, mesmo com várias tentativas de melhoria da técnica. Somente em 2018, uma adaptação da técnica realizada por Edmondson e colaboradores, que apresenta o status de pendente no Escritório de Patentes e Marcas dos Estados Unidos (*United States Patent and Trademark Office* - US20200032201A1), foi capaz de manter a replicação por mais de seis meses. Entretanto, ainda hoje, a principal forma de manutenção das linhagens de treponema é a propagação através da infecção em coelhos (EDMONDSON et al, 2018).

A ausência por mais de um século de uma técnica de cultivo eficiente limitou consideravelmente os meios de estudo sobre o *T. pallidum*. Entretanto, os avanços das técnicas de biologia molecular possibilitaram estudos independentes de cultivo

que viabilizaram novas abordagens para a descoberta de características específicas dos treponemas. Entre as novas técnicas desenvolvidas as metodologias baseadas na reação em cadeia da Polimerase (PCR) se mostraram como as mais promissoras. As técnicas podem ser desenvolvidas para diferentes finalidades que envolvam análises qualitativas, com uso da PCR convencional, e quantitativa, com uso da PCR qualitativa, além de outras adaptações. Uma variedade de alvos e metodologias com enfoque em pesquisas foram desenhados, tanto para uma avaliação do progresso do *T. pallidum* no início da infecção (TIPPLE, et al, 2011), para detecção do patógeno em amostras de baixa qualidade (GAMA et al, 2017), assim como o desenvolvimento de metodologias de biologia molecular de mais fácil acesso, como a metodologia de LAMP PCR (*loop-mediated isothermal amplification*), que não necessita da utilização de um termociclador (BECHERER et al, 2020). Porém entre as técnicas baseadas em PCR mais utilizadas são as que envolvem tipagem dos subtipos do *T. pallidum* através de diferentes metodologias.

Em 1998 primeira metodologia de tipagem molecular foi implementada, sendo denominada CDC-typing (CDCT - *Centers for Disease Control and Prevention Typing*), a qual foi desenvolvida por Pillay e colaboradores (Quadro 5) e se baseia na determinação do número de repetições em tandem de 60 pares de bases no gene *arp*, além da análise do perfil de fragmentação através do uso de enzimas de restrição (RFLP - restriction fragment length polymorphism) de três genes *tpr* (*tprE*, *tprG*, *tprJ*). Com aparecimento de cepas resistentes aos antibióticos da classe dos macrolídeos, normalmente utilizados como uma segunda opção de tratamento em casos de pacientes alérgicos a penicilina, um novo método foi proposto em 2006 utilizando a tecnologia de sequenciamento por Sanger, tendo como alvo uma região do 23S rRNA, para a identificação das duas possíveis mutações (A2058G e A2059G) ligadas a resistência aos macrolídeos, além de dois outros alvos TP0136 e TP0548 (Quadro 5) (FLASAROVÁ et al, 2006). Duas novas melhorias da técnica de CDC-typing foram propostas em 2010 com intuito de melhorar a eficiência da metodologia. A primeira melhoria denominada *Enhanced CDCT-typing* (ECDCT), proposta por Marra e colaboradores, envolve os alvos originais da CDCT além do sequenciamento por Sanger do gene TP0548 anteriormente proposto por Flasarová e colaboradores. A segunda metodologia proposta (CDCT-rspA) envolve a adição da análise do número repetições Poli-G no gene *rspA* (KATZ et al, 2010). Mais recentemente uma nova metodologia baseada em sequenciamento por Sanger, denominada high-resolution *multilocus sequence typing* (MLST), foi proposta como uma alternativa para uma maior acurácia na tipagem, a nova metodologia mantém todos os alvos TP0136, TP0548 e 23S rRNA proposto por Flasarová e colaboradores e adiciona o sequenciamento do alvo TP0705 (Quadro 5) (GRILLOVÁ et al, 2018).

Quadro 5: Metodologias de tipagem por biologia molecular para *T. pallidum*.

Tipo de método	Gene/locus	Metodologia	Ano de implementação	Referência
<i>CDC-typing (CDCT)</i>	<i>arp, tprE, tprG, tprJ</i>	<i>RFLP</i> nos genes <i>tpr</i> , determinação do número de repetições no gene <i>arp</i>	1998	Pillay et al, 1998
<i>Sequencing-based molecular typing (SBMT)</i>	<i>TP0136, TP0548, 23S rRNA</i>	Sequenciamento por Sanger	2006	Flasarová et al, 2006
<i>Enhanced CDCa -typing (ECDCT)</i>	<i>arp, tprE, tprG, tprJ, TP0548</i>	<i>RFLP</i> nos genes <i>tpr</i> , determinação do número de repetições no gene <i>arp</i> , sequenciamento por Sanger do gene <i>TP0548</i>	2010	Marra et al, 2010
<i>CDCa -typing com a análise adicional do gene rpsA (CDC-rpsA)</i>	<i>arp, rpsA, tprE, tprG, tprJ</i>	<i>RFLP</i> nos genes <i>tpr</i> , determinação do número de repetições nos genes <i>arp</i> e <i>rspA</i>	2010	Katz et al, 2010
<i>High-resolution multilocus sequence typing (MLST)</i>	<i>TP0136, TP0548, TP0705, 23S rRNA</i>	Sequenciamento por Sanger	2018	Grillová et al, 2018

Fonte: Adaptado de Grillová et al, 2018.

Uma análise comparativa entre todas as metodologias mostra que por mais que os genes *tpr* e *arp* estejam envolvidos em processos ligados a virulência do *T. pallidum*, a utilização somente dos dois genes não é adequada para a tipagem dos subtipos de *T. pallidum*. Essa deficiência é observada quando as técnicas melhoradas de ECDCT e CDCT-rspA são comparadas com sua predecessora CDCT, a qual apresenta uma eficiência de tipagem menor em comparação com as duas outras técnicas que possuem marcadores adicionais. Entre todas as técnicas, a MLST se apresenta como mais promissora, pois possui maior poder discriminatório de tipificação, entretanto ainda existem poucos trabalhos que utilizam a técnica e análises adicionais são necessárias para confirmar a eficiência da nova metodologia (FU et al, 2019).

Juntamente com a criação e evolução da PCR o avanço nas tecnologias de sequenciamento possibilitou grandes ganhos no estudo de microrganismos não cultiváveis ou de altas restrições de cultivo, como no caso do *T. pallidum*, a geração de várias sequências completas ou parciais proporcionaram informações valiosas em relação a possíveis genes de virulência e resistência, relações evolutivas e filogeográficas. As análises filogenéticas das subespécies de *Treponema*, mostraram que diferentemente das subespécies *Treponema pallidum subsp. endemicum* (TEN) e *Treponema pallidum subsp. pertenue* (TPE) que se agrupam em quadros monofiléticos, o *Treponema pallidum subsp. pallidum* (TPA) forma dois clados distintos, denominados Nichols-like e SS14-like, possuindo um ancestral comum por volta de 1744 (1611-1859). Outra descoberta interessante foi a observação de que a grande maioria das amostras clínicas classificadas nos últimos anos pertencem ao clado SS14-like (94,1%), contrapondo o fato que a maioria das linhagens de referência mantidas em laboratório pertencem ao clado Nichols-like (ARORA et al, 2016; ŠMAJS et al, 2018). Todavia, a maioria das cepas de laboratório de referência foram isoladas nos EUA durante o século passado, sugerindo uma mudança na distribuição das cepas, ocasionado pelo aumento das linhagens pertencentes a SS14-like, provavelmente ligados a aquisição precoce de resistência a macrolídeos (ŠMAJS et al, 2018). Uma outra teoria para a diferença de distribuição seria relacionada a eficiência de infecção dos isolados do tipo Nichols, mais eficiente em coelhos ou uma vantagem seletiva para cepas pertencente ao clado SS14 em infecções humanas. Entretanto as duas teorias ainda carecem de dados para serem confirmadas (ŠMAJS et al, 2018).

REFERÊNCIAS

- ARORA, N., SCHUENEMANN, V., JÄGER, G. et al. Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster. **Nat Microbiol.** V.2, 16245, 2017.
- AZULAY, D. R.; AZULAY, R.D.; NERY, J.A.C. Sífilis. IN: COURA, J.R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.** 2^a ed. ampliada e atualizada. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. v.02, p.1610 -20, 2013.
- BECHERER, L., KNAUF, S., MARKS, M., LUEERT, S., FRISCHMANN, S., BORST, N., VON STETTEN, F., BIEB, S., ADU-SARKODIE, Y., ASIEDU, K., MITJÀ, O., & BAKHEIT, M. Multiplex Mediator Displacement Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Treponema pallidum* and *Haemophilus ducreyi*. **Emerging infectious diseases**, v.26, n.2, p.282-288, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria Nº 542 de 22 dezembro de 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria Nº 33 de 14 de julho de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis**. Brasil: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais. **Manual Técnico para Diagnóstico da Sífilis**. Brasil: Ministério da Saúde, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Informativa nº 2-SEI/2017-DIAHV/SVS/MS. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/ Aids e das Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST)**. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim Epidemiológico Sífilis**. Número especial. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2019.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. The diagnosis, management and prevention of syphilis: na update and review. Department of Health and Mental Hygiene Bureau of Sexually Transmitted Infections. 2019a. Disponível em: https://www.nycptc.org/x/Syphilis_Monograph_2019_NYC_PTC_NYC_DOHMH.pdf Acesso em: 02/11/2020.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Sexually Transmitted Disease Surveillance 2018**. 2019b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/std/stats18/syphilis.htm>. Acesso em: 26.03.2020

EDMONDSON, D.G.; HU, B.; NORRIS, S.J. Long-Term In Vitro Culture of the Syphilis Spirochete *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. **mBio**. v.9, n.3, jun 2018.

FLASAROVÁ, M.; SMAJS, D.; MATĚJKOVÁ, P.; WOZNICOVÁ, V.; HEROLDOVÁ-DVOŘÁKOVÁ, M.; VOTAVA, M. Molecular detection and subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in clinical specimens. **Epidemiol Mikrobiol Imunol**, v.55: p.105-111, 2006.

FU, B.; LI, H.; ZHAO, Y.; et al., The comparison of molecular typing in *Treponema pallidum*: Review and meta-analysis, *Infection*, **Genetics and Evolution**, 2019.

GAMA, A.; CARRILLO-CASAS, E.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; et al. *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* identification by real-time PCR targeting the *polA* gene in paraffin-embedded samples positive by immunohistochemistry. **International Journal of STD & AIDS**, V.28, n.13, p.1299-1304, 2017.

GRILLOVÁ, L. et al. Molecular characterization of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Switzerland and France with a new multilocus sequence typings scheme. **PlosOne**, v.13, n. 7, p. 1-16, 2018.

GUERRA, L.O.; VALDÉS, F.V. Molecular diagnostic of syphilis. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. v. supl.38, p.1-7, 2020.

LU, Y.; QI, WU, WANG, L.; JI, L. Molecular epidemiological survey of *Treponema pallidum* in pregnant women in the Zhabei District of Shanghai. *Journal of Medical Microbiology*, v.66, p. 391 -396,2017

LUKEHART, S.A. Sífilis. IN: KASPER, D.L.; FAUCI, A. S. **Doenças Infecciosas de Harrison**. São Paulo: Artemed, 2ª ed, p. 577 -86, 2013.

NASCIMENTO, M. M. do; CURY-MARTINS, J. Infecções Sexualmente Transmissíveis. IN: SALOMÃO, R. **Infectologia: Bases clínicas e tratamento**.1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

PEELING, R. W.; MABEY, D.; KAMB, M. L. et al. Syphilis. *Nat. Rev. Dis. Primers*, [S.l.], v. 3 17073, 12 out. 2017.

OPAS. Pan Americana Health Organization. **Estrutura integrada sustentável para a eliminação de doenças transmissíveis nas américas**. Nota conceitual. Washington, D.C.: OPAS; 2019. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51461>. Acesso em: 20.03.2020.

ROWLEY, J.; VANDER, H. S.; KORENROMP, E.; et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates 2016. **Bull World Health Organ**. v.97, n.8, p. 548-562, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/bulletin/volumes/97/8/18-228486/en/>. Acesso em: 1 mar. 2020.

ŠMAJS, D.; STROUHAL, M.; KNAUF, S. Genetics of human and animal uncultivable treponemal pathogens. **Meegid**. 2018.

TIPPLE, C.; HANNA, M.O.F.; HILL, S.; et al. Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. **Sexually Transmitted Infections**, 2011;87:479-485. 2011.

TUDDENHAM, S.; GHANEM, K.G. Neurosyphilis: Knowledge Gaps and Controversies. **Sex Transm Dis**. v.45, n.3, p.147-151, 2018. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000723. PMID: 29420441; PMCID: PMC5808573.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE. US20200032201A1, Disponível em: <https://patents.google.com/>. Acesso em: 18.11.2020.

WIJESORIYA, N. S. et al. Global burden of maternal and congenital syphilis in 2008 and 2012: a health systems modelling study. **The Lancet Global health**, v. 4, n. 8, p. e525-e533, Aug. 2016.

LEPTOSPIROSE: Desafios para o diagnóstico e saúde pública

Ana Roberta Fusco da Costa

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

Laboratório de Tuberculose e outras Micobactérias. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: anacosta@iec.gov.br

Maria Luiza Lopes

Laboratório de Leptospirose e outras Zoonoses. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil. Laboratório de Tuberculose e outras Micobactérias. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto

Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil. *E-mail: marialopes@iec.gov.br*

Alex Brito Souza

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: alexsouza@iec.gov.br

Tuane Carolina Ferreira Moura

Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas II. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

Laboratório de Leptospirose e outras Zoonoses. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: tuanemoura@iec.gov.br; tuanecfmoura@gmail.com

Leni Célia Reis Monteiro

Laboratório de Leptospirose e outras Zoonoses. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: lenimonteiro@iec.gov.br

Cintya de Oliveira Souza

Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas II. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

Laboratório de Leptospirose e outras Zoonoses. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: cintyaoliveira@iec.gov.br

LEPTOSPIROSE

A leptospirose é um problema de saúde pública de interesse mundial, particularmente em países de clima tropical como o Brasil. É uma antropozoonose de caráter sazonal que causa epidemias urbanas durante os períodos chuvosos (BRASIL, 2019). A doença está relacionada às áreas com precárias condições sanitárias, atingindo principalmente as periferias urbanas e apresenta um elevado impacto socioeconômico pelos dias de afastamento do trabalho, letalidade de 40% e alto custo hospitalar (BHARTI *et al.*, 2003).

AGENTE ETIOLÓGICO: Classificação e patogenia

As leptospiros são espiroquetas, Gram-negativas, catalase e oxidase positivas, altamente móveis, aeróbias obrigatórias, que medem cerca de 0,1 μm de diâmetro por 6 a 20 μm de comprimento. A membrana citoplasmática e o peptidoglicano da parede celular destas espiroquetas são cobertos por uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos (LPS), principal constituinte antigênico das leptospiros (FAINE *et al.*, 1999).

São estruturalmente constituídas por um corpo celular cilíndrico, cujas extremidades são encurvadas em forma de gancho. Apresentam dois filamentos axiais (flagelos periplasmáticos), inseridos subterminalmente nas extremidades do corpo celular, com suas terminações livres dirigidas para o meio da célula (Figura 1) (MACEDO, 2005). O filamento axial representa um elemento do citoesqueleto responsável pelo movimento. A aparência e motilidade da leptospira variam com a natureza do meio em que elas são cultivadas (CULLEN *et al.*, 2005).

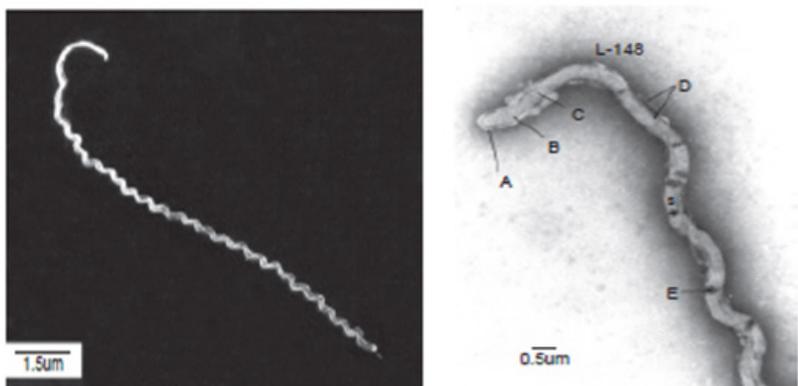


Figura 1. Micrografia de *Leptospira biflexa* sorovar Andamana cepa JNS. Célula com um dos extremos encurvados. Escala de 2,5 μm . Aumento de 8000x. Fonte: Macedo (2005).

Pertencentes ao filo Spirochaetes, classe Spirochaetes, ordem Leptospirales da família Leptospiraceae, que comporta três gêneros: Leptospira, Leptonema e Turneriella (LEVETT *et al.*, 2005; LPSN, 2020). De acordo com as relações filogenéticas, as leptospirosas são distinguidas em três clados, que incluem espécies patogênicas, intermediárias e não patogênicas (saprofiticas).

Tradicionalmente são agrupadas nos complexos *L. interrogans*, com os sorogrupos patogênicos, e *L. biflexa*, raramente patogênicas (WINN JR *et al.*, 2008). Além dos critérios de patogenicidade, as espécies podem ser classificadas através de suas características fenotípicas. Na prática, a taxonomia das leptospirosas é baseada nas propriedades antigênicas das cepas, sendo denominadas em sorotipos ou sorovares. Os sorovares antigenicamente relacionados são organizados em sorogrupos denominados por nomes (LEVETT, 2001). Os sorogrupos não são taxonomicamente padronizados, mas são úteis para o diagnóstico sorológico inicial e conhecimento epidemiológico em nível regional ou populacional (LEVETT, 2010).

São conhecidos pelo menos 29 sorogrupos que reúne mais de 260 sorovares (INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY, 2009; WINN JR *et al.*, 2008). Entretanto, apoiado em heterogeneidades genéticas, o gênero *Leptospira* está composto por 65 espécies (LPSN, 2020). O aumento no número de espécies nos últimos anos ocorreu devido à descrição de novas espécies como: *L. broomii* (LEVETT *et al.*, 2006), *L. licerasiae* (MATTHIAS *et al.*, 2008), *L. wolffii* (SLACK *et al.*, 2008), *L. venezuelensis* (PUCHE *et al.*, 2018), *L. mayottensis* (BOURHY *et al.*, 2014) e novas espécies isoladas de solo (THIBEAUX *et al.*, 2018).

As espécies de leptospira atualmente reconhecidas não correspondem as duas espécies previamente descritas: *L. interrogans* lato sensu e *L. biflexa* lato sensu. Interessantemente, sorovares patogênicos e não patogênicos ocorrem dentro de várias espécies. Heterogeneidades genéticas também têm sido demonstradas. A presença do mesmo gene codificador de LPS em cepas de diferentes espécies implica em transferência genética. Portanto, nem o sorogrupo ou sorovar de um isolado prediz uma espécie de *Leptospira*. Além disso, características fenotípicas padronizadas e utilizadas não diferenciam as genomoespécies (LEVETT, 2001).

Dentre as dificuldades encontradas nos estudos de taxonomia de leptospirosas está a discordância entre as divisões sorológicas e as espécies descritas, onde se observa sorovares de um mesmo sorogrupo não pertencente à mesma espécie e uma única espécie contendo sorovares de diversos sorogrupos (LPSN, 2020; WINN JR *et al.*, 2008; LEVETT, 2005) (Quadro 1).

Os mecanismos moleculares pelo qual a leptospira causa a infecção ainda não estão completamente elucidados, no entanto, estudos envolvendo mutagênese e comparação dos genomas de cepas patogênicas, atenuadas e não patogênicas,

testadas em modelos animais ou por ferramentas moleculares, vêm permitindo maior conhecimento sobre a patogênese da leptospirose (ADLER *et al.*, 2011; LEHMANN *et al.*, 2013).

Quadro 1. Espécies de *Leptospira*, sorovares e sorogrupos associados.

Espécies	Sorovares	Sorogrupo
<i>L. alexanderi</i>	Manhao3	Manhao
<i>L. alstonii</i>	Pingchang	Ranarum
	Schuam	-
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Ballum
	Castellonis	Ballum
	Javanica	Javanica
	Sejroe	Sejroe
	Tarassovi	Tarassovi
<i>L. interrogans</i>	Australis	Australis
	Bratislava	Australis
	Bataviae	Bataviae
	Canicola	Canicola
	Hebdomadis	Hebdomadis
	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae
	Copenhageni	Icterohaemorrhagiae
	Lai	Icterohaemorrhagiae
	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Pyrogenes
Hardjo	Sejroe	
<i>L. kirschneri</i>	Bim	Autumnalis
	Cynopteri	Cynopteri
	Grippotyphosa	Grippotyphosa
	Mozdok	Pomona
	Panama	Panama
<i>L. kmetyi</i>	-	-
<i>L. noguchii</i>	Fortbragg	Autumnalis

<i>L. santarosai</i>	Brasiliensis Georgia	Bataviae Mini
<i>L. weilli</i>	Celledoni	Celledoni
<i>L. broomii</i>	-	-
<i>L. inadai</i>	Lyme	Lyme
<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge
<i>L. licerasiae</i>	-	-
<i>L. wolffii</i>	-	-
<i>L. biflexa</i>	Patoc	Semarang
<i>L. meyeri</i>	Seramaga	Semarang
<i>L. terpstrae</i>	Hualin	Icterohaemorrhagiae
<i>L. vanthielii</i>	Holland Sejroe	Holland Sejroe
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice
<i>L. yanagawae</i>	Saopaulo	Semarang

Nota: As leptospirosas patogênicas estão destacadas em vermelho, enquanto as azuis e verdes representam intermediárias e não patogênicas, respectivamente. (-): sorovar ou sorogrupo não classificado. Fonte: LEVETT, 2005; 2010.

Como toda infecção, a ocorrência da leptospirose depende de fatores relacionados à virulência da bactéria, da carga infectante e da resposta imune do hospedeiro. Entre os fatores de virulência observados nas leptospirosas são citadas as toxinas (endotoxinas e hemolisinas), as proteínas da membrana externa (OMP) e outras proteínas de superfície, bem como, moléculas de adesão (McBRIDE *et al.*, 2005; EVANGELISTA e COBURN, 2010). A principal endotoxina é o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa, considerado fator de virulência chave em todas as bactérias Gram-negativas, portanto, não é surpreendente que também o seja para as leptospirosas, embora esta evidência só tenha sido possível depois da construção de modelos mutantes (ADLER, 2014). Proteínas com provável atividade hemolítica podem estar implicadas na lesão endotelial, como a lipoproteína L32 (LipL32) associada à hemólise e lesão renal (HOKE *et al.*, 2008) e as esfingomielinases, como a esfingomielinase H (Sph), responsável pela formação de poros na membrana celular humana e danos irreversíveis na célula (LEE *et al.*, 2002; SILVA, 2013). São relatadas inúmeras proteínas presentes na superfície das leptospirosas, conhecidas como proteínas de membrana. Dentre essas, destacam-se as Ligs (proteína fibronectina-ligante), as proteínas de membrana externa

(OMP): OmpL1 OmpL36, OmpL 37, OmpL47, OmpL5 e a Loa22 (LO *et al.*, 2009). A Loa22 é considerada como possível mediadora da ligação entre a membrana externa e a camada de peptidoglicano e a ompL1 evidenciada como uma porina associada a lesão renal (ADLER, 2014). As Ligs são importantes para que haja adesão da leptospira às células da pele e/ou das mucosas. Foram descritas duas proteínas, LigA e LigB, expressas em todas as espécies patogênicas de leptospira que possuem a capacidade de se aderirem a fibronectina, colágeno e laminina, estando possivelmente envolvidas na colonização dos tecidos nos hospedeiros, servindo como adesinas (CHOY *et al.*, 2007; SILVA, 2013).

LEPTOSPIROSE SOBRE O OLHAR DA EPIDEMIOLOGIA

A leptospirose permanece como uma das mais comuns zoonoses mundiais apresentando incidência de 1.000.000 de casos e 60.000 óbitos (VAN DE WEYER, RAMAKERS e PICKKERS, 2015; COSTA *et al.*, 2015). Tradicionalmente está relacionada às condições socioeconômicas ou climáticas que favorecem a endemicidade em vetores animais e à exposição humana. A fonte de infecção é comumente o contato direto ou indireto com a urina de um animal infectado. A porta de entrada comum é através de abrasão ou corte da pele, ou via conjuntiva. A transmissão direta entre humanos é rara. Entretanto, a excreção de leptospiras em amostras de urina humana meses após a cura tem sido relatada (LEVETT, 2001; LUCCHESI *et al.*, 2004).

A doença é mantida na natureza através da infecção crônica nos túbulos renais dos reservatórios. Os reservatórios mais importantes são os pequenos mamíferos, que podem transmitir a infecção aos animais domésticos e humanos (LEVETT, 2001; SANTIM, SELLA e CARDOSO, 2006). De modo geral, cada sorovar está adaptado a certo hospedeiro: roedores, insetívoros, cães, suínos e bovinos compreendem os mais conhecidos. Os sorovares podem estar adaptados a vários hospedeiros, enquanto alguns hospedeiros podem carrear vários sorovares distintos. Além disso, os sorovares continuam a adaptar-se a novos hospedeiros devido aos ciclos ambientais complexos e dinâmicos (HARTSKEERL *et al.*, 2011).

A ecologia da leptospirose envolve a complexa interação entre humanos, reservatórios animais, leptospiras e o meio ambiente no qual coexistem (LAU *et al.*, 2010). Nos países desenvolvidos, casos de infecção têm sido frequentemente associados à exposição em atividades recreacionais em campo e viagens internacionais a países tropicais (LAU *et al.*, 2010). A incidência é significativamente maior em países de clima quente do que nas regiões temperadas, onde apresenta picos de incidência ocorrendo no verão ou inverno. Em áreas rurais a transmissão é geralmente associada às atividades agropecuárias, enquanto que nas áreas urbanas a infecção está associada a regiões de

grande densidade populacional, baixos padrões de higiene, precário saneamento básico e pobreza, tipicamente nas periferias de países em desenvolvimento (LEVETT, 2001). Nesse contexto o Brasil apresenta-se como área endêmica com ocorrência de casos durante todos os meses do ano, entretanto os principais picos epidêmicos ocorrem nos períodos chuvosos, especialmente após enchentes em áreas carentes de cidades como São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador e Recife (KO *et al.*, 1999; BRASIL, 2014).

Destacando a cidade de São Paulo, como sendo a principal capital do país em número de habitantes e pelo seu importante papel na economia, uma pesquisa descreveu os casos leptospirose que ocorreram na Região Metropolitana da Baixada Santista (RMBS) nos anos de 2010 a 2015. No período foram confirmados 385 casos, correspondendo à incidência média anual de 3,71/100.000 habitantes (COELHO, ALVES e FARIAS, 2019). Em Fortaleza, acredita-se que o número de casos de leptospirose notificados não represente a realidade, dados demonstram que esse valor seja de 26 a 49 vezes maior que o diagnosticado pelas unidades de saúde (FONTE *et al.*, 2015). É possível que o aumento no número de registros de casos de leptospirose em períodos chuvosos possa ser decorrente de uma maior atenção dada doença nessa ocasião (ÁVILA-PIRES, 2006).

No período de 2003 a 2018 no Brasil, os registros de casos de leptospirose apresentaram uma média anual de 3.693, entretanto vale salientar que apesar da obrigatoriedade de notificação acredita-se que esse número possa ser muito maior devido à subnotificação, em decorrência da dificuldade em se estabelecer um diagnóstico específico. A incidência média foi de 1,95 casos por 100 mil habitantes, com elevado número de registros nas regiões Sul e Sudeste, embora as maiores incidências tenham ocorrido nas regiões Norte e Sul (BRASIL, 2019).

Na região Sul, o estado do Rio Grande do Sul destaca-se por ser um representante significativo devido à alta incidência (10 casos por 100 mil habitantes) (BARCELLOS *et al.*, 2003). Em compensação a região Norte apresenta características ecológicas favoráveis à disseminação da leptospirose. Nesse contexto o município de Rio Branco - Acre, o qual é atingido com as cheias do rio Acre durante quase todos os meses do ano, apresentou dados onde a influência dos níveis de precipitação de chuva e a cheia do rio nos anos de 2008 a 2013, podem ter interferência no aumento das ocorrências de casos de leptospirose, 4,0% e 7,0%, respectivamente (DUARTE e GIATTI, 2019). Outros trabalhos destacam a investigação da incidência de leptospirose nessa região. O município de Ji-Paraná - Rondônia - realizou um levantamento utilizando os dados do departamento de vigilância epidemiológica no período de 2015 a 2018, no qual demonstrou um aumento do número de casos (SANTOS *et al.*, 2019).

O crescente aumento de casos de leptospirose na Região Norte também foi evidenciado na investigação de dados laboratoriais realizada pelo Laboratório

de Leptospirose e outras zoonoses (LBLEPT) – Instituto Evandro Chagas (IEC) – Ministério da Saúde (MS). Entre 1.103 amostras de casos suspeitos de leptospirose no período de 2017 e 2018, 299 (27,1%) foram reagentes à pelo menos um sorovar, pelo método de aglutinação microscópica (MAT). Os sorovares mais frequentes foram *Icterohaemorrhagiae* (RGA) com 269 (89,9%) seguido por *Copenhageni* (M20) com 199 (66,5%). Esses sorovares estão relacionados aos casos mais graves da doença (BRASIL, 2019).

As mudanças climáticas (aquecimento global, El Niño) e ecológicas (expansão de cidades e desmatamento) têm influência sobre a distribuição de sorovares de leptospirosas e, conseqüentemente, sobre a prevalência e as características clínicas de casos humanos, enquanto as práticas antropogênicas e sistemas de manejo animal provavelmente determinam os riscos de exposição e infecção (HARTSKEERL *et al.*, 2011).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O período médio de incubação da Leptospirose é de 10 dias (5 a 14 dias) e sua apresentação pode variar de formas assintomáticas e subclínicas até quadros clínicos graves, associados a manifestações fulminantes (LEVETT e HAAKE, 2005). A forma sintomática da doença pode apresentar uma ampla variedade de manifestações clínicas e a gravidade da infecção depende da espécie ou sorovar envolvido, densidade do inóculo, bem como da idade e do estado imunológico do indivíduo infectado (EVANGELISTA e COBURN, 2010).

A leptospirose é considerada uma doença bifásica, em virtude das manifestações clínicas serem classificadas de acordo com duas fases: a fase precoce ou fase leptospirêmica e a fase tardia ou fase imunológica (Figura 2) (LEVETT e HAAKE, 2005; PICARDEAU *et al.*, 2014).

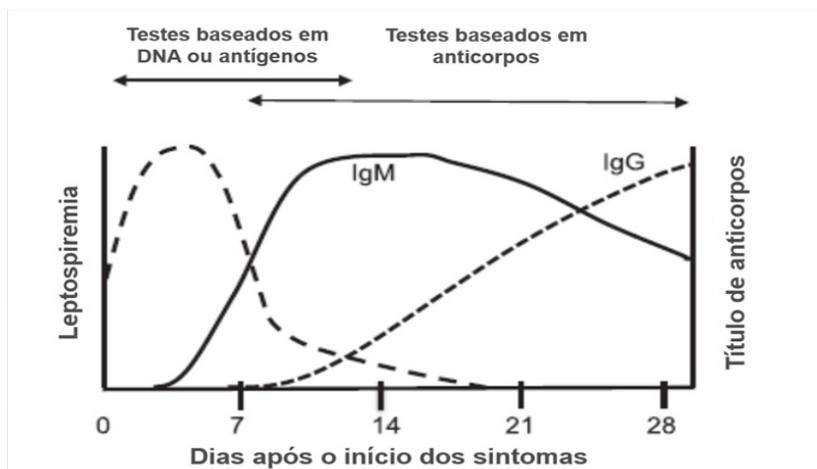


Figura 2. Cinética da infecção de leptospira no sangue. A infecção produz leptospiremia nos primeiros dias após a exposição, que é rapidamente seguida pela migração das leptospiras para os órgãos-alvo. Anticorpos IgM anti-leptospira são detectados antes do aparecimento de aglutinação e anticorpos IgG. A linha tracejada (---) indica a dinâmica da presença de leptospiras ou antígenos e DNA de leptospiras no sangue; a linha sólida indica o nível de anticorpos IgM anti-leptospira; a linha pontilhada (---) indica a dinâmica de resposta dos anticorpos IgG. Fonte: PICARDEAU *et al.* (2014).

A fase precoce da leptospirose é caracterizada como uma síndrome febril aguda, semelhante a um resfriado ou a algumas doenças como dengue e outras arboviroses. Esta fase tende ser autolimitada, durando em torno de 3 a 7 dias e os sintomas mais frequentes são: febre alta, cefaleia, calafrios e mialgia, que podem estar acompanhadas de artralgia, diarreia, náuseas e vômito. Com a progressão da doença, os pacientes também podem desenvolver petéquias, hemorragias conjuntivais (LEVETT, 2001; BHARTI *et al.*, 2003) e sufusão conjuntival, que é um achado característico da leptospirose que aparece no final da fase precoce e caracteriza-se por hiperemia e edema da conjuntiva ao longo das fissuras palpebrais. Geralmente, a leptospirose é associada à intensa mialgia, principalmente em região lombar e nas panturrilhas e o acometimento pulmonar é comum, geralmente leve e frequentemente negligenciado (HÜTTNER, PEREIRA e TANAKA, 2002). Nesta fase, a suspeita clínica de leptospirose se torna mais frequente nas formas fulminantes que evoluem rapidamente com quadros pulmonares desde a síndrome da angústia respiratória do Adulto (SARA) às hemorragias pulmonares, falência renal e hepática (SILVA *et al.*, 2013).

A fase tardia ou imune é caracterizada pelo desaparecimento das leptospiras do sangue e aparecimento dos anticorpos a partir da segunda semana de doença e pode durar de 1 a 3 semanas. Nesta fase, a severidade clínica da doença não apresenta proporção com os achados histopatológicos, sendo a resposta imunológica considerada um fator de influência para a severidade dos sintomas (LEVETT, 2001).

A manifestação clássica da leptospirose grave é a síndrome de Weil, caracterizada pela tríade de icterícia, insuficiência renal e hemorragia, mais comumente pulmonar (BHARTI *et al.*, 2003) A icterícia é considerada um sinal característico aparecendo entre o 3º e o 7º dia da doença e sua presença costuma ser usada para auxiliar no diagnóstico da leptospirose, sendo um preditor de pior prognóstico devido a sua associação com essa síndrome. A síndrome de hemorragia pulmonar, caracterizada por lesão pulmonar aguda e sangramento pulmonar maciço, vem sendo cada vez mais reconhecida no Brasil como uma manifestação distinta e importante da leptospirose na fase tardia (BRASIL, 2014).

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEPTOSPIROSE

Informações epidemiológicas e sintomas clínicos geralmente não são suficientes para o diagnóstico da leptospirose, devido a sua sintomatologia ser semelhante às doenças febris agudas como dengue, febre amarela, hantavirose e hepatites virais são comuns. O diagnóstico laboratorial específico é essencial para a confirmação dos casos de leptospirose e o tipo de método empregado depende da fase da doença. Os métodos de detecção direta são utilizados na fase precoce ou leptospirêmica e os de detecção indireta na fase tardia ou imunológica (LEVETT, 2001).

Métodos de detecção direta

Os métodos de detecção direta são: a microscopia, o isolamento e à amplificação de material genético. A investigação microbiológica deve ser baseada na demonstração de leptospiras nos órgãos internos e fluidos corporais, como sangue, LCR, líquido torácico e peritoneal. As leptospiras podem ser visualizadas em material clínico por microscopia de campo escuro ou microscopia de imunofluorescência. Sendo esta última de maior credibilidade pelo fato de utilizar corantes específicos (gamaglobulina antileptospira conjugada com fluorocromo) (SILVA *et al.*, 2013).

A leptospiremia ocorre durante a primeira fase da doença, começando antes do aparecimento dos sintomas e diminuindo a partir do final da primeira semana, desta forma, as leptospiras podem ser isoladas durante os 10 primeiros dias de doença

(LEVETT; HAAKE, 2005). Amostras de sangue (1, 2 e 3 gotas) são inoculadas em meios de cultura específicos como o EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris), acrescido de 0,2% de ágar, albumina bovina e ácidos graxos, e o Fletcher, enriquecido com soro de coelho. As culturas são incubadas sob temperatura de 28 a 30 °C e examinadas semanalmente por microscopia de campo escuro por até dois meses (SILVA *et al.*, 2013).

Métodos baseados na amplificação do DNA de leptospiros por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) estão se tornando mais amplamente utilizados para detecção de leptospiros patogênicos, devido a sua maior sensibilidade e capacidade de fornecer um diagnóstico precoce. A PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR), utilizando a tecnologia Taqman ou SYBR Green, tem a vantagem de oferecer um resultado mais rápido do que a PCR convencional e é menos propenso à contaminação (PICARDEAU *et al.*, 2014). Dessa forma um ensaio de qPCR foi desenvolvido utilizando um alvo de 423 pb no gene *lipL32* (codificador de uma lipoproteína de membrana externa), que é conservado entre os sorovares patogênicos de *Leptospira*. Este ensaio detectou DNA de leptospira com sucesso a partir de amostras de soro e urina de pacientes, evidenciando a possibilidade de um diagnóstico rápido e sensível da leptospirose aguda (LEVETT *et al.*, 2005). Uma PCR positiva indica que espécie patogênica de *Leptospira* está presente na amostra, mas não é capaz de identificar o sorovar, o que é uma limitação do diagnóstico molecular da leptospirose (PICARDEAU *et al.*, 2014). Entretanto quando se leva em consideração um paciente em estado grave, testes que proporcionam um diagnóstico rápido são os mais indicados.

Dados de um estudo prévio realizado pelo IEC/MS com 105 casos suspeitos revelou que 43,8% deles apresentou ao menos um teste positivo para leptospirose (ELISA, MAT ou qPCR), dos quais 27,6% atendiam aos critérios de confirmação clínico-laboratorial (ELISA e MAT). Daqueles confirmados, 86,2% exibiram soros reagentes no MAT para 13 diferentes sorovares, com maior frequência para Icterohaemorrhagiae e Copenhageni. Comparações entre os ensaios sorológicos de ELISA-IgM e MAT indicou concordância de 50% entre os resultados dos dois testes. Entretanto, a confirmação de um caso que evoluiu a óbito só foi possível com o uso de qPCR, evidenciando a importância de métodos moleculares para elucidação diagnóstica.

Métodos de Detecção Indireta

A maioria dos casos de leptospirose é diagnosticada pela utilização de métodos de detecção indireta. Os anticorpos geralmente são detectáveis no sangue cerca de 5 a 7 dias após o início dos sintomas, atingindo níveis máximos dentro de 3 a 4 semanas. Os níveis de anticorpos diminuem gradualmente, mas podem permanecer

detectáveis durante anos (LEVETT, 2001; BUDIHAL e PERWEZ, 2014). Entre os testes sorológicos indicados para o diagnóstico da leptospirose estão o teste de ELISA (gênero-específico) e o MAT (sorogrupo-específico) (SAMBASIVA *et al.*, 2003; MUSSO e LA SCOLA, 2013).

O método de referência, considerado padrão ouro, para diagnóstico sorológico da leptospirose é o MAT, onde soros de pacientes reagem com suspensões de leptospiras vivas. Após a incubação, as misturas soro-antígeno são examinadas sob microscopia de campo escuro e os títulos são determinados pela aglutinação das leptospiras (WHO, 2011; AHMED *et al.*, 2005). O teste é considerado específico e sensível na fase imune da doença, porém, apresenta baixa sensibilidade na fase inicial da doença (CRODA *et al.*, 2007). As dificuldades no MAT ocorrem principalmente por não diferenciar anticorpos IgM de IgG (LEVETT, 2001; BUDIHAL e PERWEZ, 2014).

O painel de antígenos utilizados deve incluir sorovares representantes de todos os sorogrupos e dos sorovares locais. Os títulos de anticorpos para isolados locais são frequentemente mais elevados que os títulos para cepas de referência laboratorial de sorovares do mesmo sorogrupo. Resultados falso-negativos são possíveis se o sorogrupo infectante não estiver incluído no painel do MAT (LEVETT, 2001). Soros pareados são necessários para confirmar o diagnóstico. Um aumento de quatro vezes ou mais no título entre soros pareados confirma o diagnóstico, independentemente do intervalo de tempo entre a coleta das amostras. No entanto, se o paciente se apresenta no início do curso da doença ou se a data de início não é precisamente conhecida, um intervalo de 10 a 14 dias entre as amostras é mais adequado. Caso a soroconversão não ocorra nesse período, o que é pouco comum, um intervalo mais longo entre as amostras (ou amostragem repetida) é necessário (LEVETT, 2001). Uma primeira sorologia negativa não é suficiente para descartar o diagnóstico (VAN DE WEYER, RAMAKERS e PICKKERS, 2015).

Em áreas onde a leptospirose é endêmica, um único título de 1:800 em pacientes sintomáticos é geralmente indicativo de doença recente. Os títulos, após a infecção aguda, podem tornar-se muito elevados e levar meses ou até anos para declinarem. É importante examinar vários soros colhidos após vários meses da doença aguda, a fim de presumir o sorovar infectante (LEVETT, 2001). No entanto, a falta de conhecimento sobre os títulos de base em uma população pode resultar em superestimação da carga de doença (AHMED *et al.*, 2005).

Anticorpos IgM contra leptospiras tornam-se detectáveis durante a primeira semana da doença. A detecção de IgM pelo ELISA tem demonstrado ser mais sensível do que o MAT, quando o espécime clínico é coletado na fase aguda da doença, servindo como teste de triagem (SILVA *et al.*, 1995; LEVETT *et al.*, 2001). Apesar da maior

sensibilidade do ELISA, que eleva sua habilidade em detectar infecções recentes, o fato do mesmo não utilizar antígenos vivos, infere a baixa especificidade quando comparado com o MAT (SMITH *et al.*, 1994; LEVETT, 2001). Em geral, os antígenos usados para o ELISA podem não reconhecer a diversidade de cepas circulantes e a sensibilidade global para esses testes é reduzida (LEVETT *et al.*, 2001; McBRIDE *et al.*, 2005).

Interpretação dos critérios laboratoriais brasileiros para confirmação da leptospirose

O Brasil possui comportamento endêmico e epidêmico (período chuvosos) para leptospirose e o serviço de vigilância em saúde mantém recomendações atualizadas sobre a conduta a ser seguida para a investigação e confirmação dos casos suspeitos (BRASIL, 2014).

O método de diagnóstico de escolha para confirmação laboratorial do caso suspeito depende da fase evolutiva da doença. Métodos de detecção do agente etiológico (isolamento e PCR) são importantes na primeira semana de início dos sintomas e métodos de detecção de anticorpos específicos (ELISA-IgM e MAT) a partir do sétimo dia da doença. Em virtude das dificuldades inerentes à suspeição de caso no início da doença, os métodos sorológicos são os mais comumente utilizados. Entretanto, como afirmado no Manual alguns critérios precisam ser cumpridos, pois diversos fatores como, a técnica utilizada, a ordem cronológica das amostras coletadas durante a evolução da doença, tratamento com antibióticos, nível de circulação endêmica, cicatriz sorológica e circulação de outras doenças, podem influenciar no resultado laboratorial. O pareamento das amostras é relevante para detectar a soroconversão, caracterizando infecção recente ou atual e encerrando dessa forma o caso pelo critério laboratorial (BRASIL, 2013).

Ferramentas moleculares para o diagnóstico

As ferramentas de biologia molecular são opções diagnósticas rápidas e com maior sensibilidade e especificidade quando comparadas aos métodos microbiológicos e sorológicos tradicionais. Constituem uma alternativa valiosa quando opções como cultura ou MAT não estão disponíveis ou quando essas metodologias consomem tempo crucial no desfecho do diagnóstico. Ainda assim, a escolha, a aplicação e o desenvolvimento das diversas técnicas moleculares para o diagnóstico de leptospirose requerem equipamentos e corpo técnico capacitado, o que nem sempre está disponível na rede de laboratórios clínicos, ficando assim, restrita, em sua grande maioria, aos laboratórios de referência e centros de pesquisas.

A completa identificação por meios moleculares passa por um longo fluxo de trabalho iniciando com a extração de DNA e amplificação de alvos específicos por PCR convencional, a partir dos mais variados tipos de amostras clínicas (sangue, soro, urina ou tecidos), com posterior sequenciamento e análise bioinformática utilizando para comparações seqüências depositadas em banco de dados mundiais (MARQUEZ *et al.*, 2017; WAGGONER e PINSKY, 2017; LAM, LOW e CHEE, 2020).

Com a finalidade de agilizar o diagnóstico e principalmente a identificação de espécies patogênicas de leptospiros, a utilização da metodologia de qPCR tem sido a opção mais frequente entre as metodologias moleculares (MARQUEZ *et al.*, 2017; THIBEAUX *et al.*, 2018; KARPAGAM e GANESH, 2020). Esta técnica fornece informações quantitativas referente às concentrações de DNA de cada amostra (THIBEAUX *et al.*, 2018; KARPAGAM e GANESH, 2020). Os genes escolhidos como alvos são pontos chaves no diagnóstico e geralmente são constituídos por regiões conservadas e específicas, como é o exemplo do gene *lipL32*, que é expresso em todas as espécies patogênicas e intermediárias, mas não está presente em cepas saprofitas (MARQUEZ *et al.*, 2017; WAGGONER e PINSKY, 2017; BAHUAUD *et al.*, 2020). Os genes *flaB* e *lfb1* também têm sido utilizados para diferenciar entre leptospiros patogênicos e saprofitas (MARQUEZ *et al.*, 2017; LAM, LOW e CHEE, 2020; WAGGONER e PINSKY, 2017; THIBEAUX *et al.*, 2018; BAHUAUD *et al.*, 2020; LAM, LOW e CHEE, 2020). Outros genes como *rrs*, *secy* e *gyrB*, não diretamente específicos para espécies patogênicas, vêm sendo usados em ensaios clínicos com o objetivo de ampliar o espectro de detecção (THIBEAUX *et al.*, 2018; PÉREZ *et al.*, 2020).

Métodos moleculares para tipagem de leptospiros

Métodos moleculares que permitem identificar o sorovar de uma cepa contribuem para a identificação e conhecimento de leptospiros circulantes e/ou reservatórios em determinada área (WAGGONER e PINSKY, 2017). Diversas técnicas estão disponíveis, cada uma com suas vantagens e limitações. No entanto, Marquez *et al.*, (2017) sugere que a utilização de protocolos baseados em enzimas de restrição, como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE - Pulsed field gel Electrophoresis) e o sequenciamento de regiões específicas, permitem a identificação do sorovar. Contudo o mesmo autor relata ainda que a utilização de técnicas como a análise de enzima de restrição (REA - Restriction Enzyme Analysis) e RAPD (random amplified polymorphic DNA fingerprinting) apresentam custo operacional baixo, por não necessitar de sequenciamento e apresentam alta reprodutibilidade nos resultados, podem ser utilizadas para caracterizar espécies patogênicas. O PFGE é o método padrão

para tipagem molecular de microrganismos e é altamente reprodutível permitindo análises comparativas de perfis eletroforéticos, possibilitando a identificação a nível de espécie. Mesmo considerada um ferramenta importante esta técnica apresenta limitações, como a dificuldade de cultivo de cepas para análise, principalmente de cepas ambientais e mesmo a técnica possibilitando a análise de variação em todo genoma, a completa identificação do sorovar de uma cepa pode não ser possível, pois alguns sorovares podem ser indistinguíveis (GALLOWAY; LEVETT, 2008; BENACER et al., 2016; MARQUEZ et al., 2017).

Outras metodologias estão sendo utilizadas rotineiramente para tipagem de leptospiras contribuindo para levantamentos epidemiológicos e têm a vantagem de serem reprodutíveis, como a tipagem de sequência multi-locus (MLST - Multilocus Sequence Typing). Este método que têm a vantagem de ser fortemente apoiado por dados experimentais e um banco de dados que permite comparar diversidade genética das leptospiras de diferentes regiões geográficas (VARNI et al., 2013; WAGGONER e PINSKY, 2017; BILUNG et al., 2018; FERREIRA et al., 2020).

Os métodos VNTR (Variable number tandem repeat), MLVA (Multi-locus VNTR analysis) e MSLT (Multilocus Sequence Typing) são métodos baseados em PCR utilizados para tipar cepas através de análises e comparações de padrões moleculares para determinar relações genéticas entre os isolados e assim, contribuindo em inquéritos epidemiológicos moleculares e vigilância de populações de *Leptospira* (BERTASIO et al., 2020a).

O método VNTR é de fácil padronização que foi desenvolvido para estudos epidemiológicos contribuindo com a identificação de 3 espécies na França (*L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. kirschneri*), e na identificação de único grupo de sorovares de *Leptospira interrogans*, chamado Pomona, encontrado em leões marinhos da Califórnia (MARQUEZ et al., 2017).

A técnica de MLVA foi inicialmente desenvolvida para estudar cepas de *L. interrogans* sorovar Australis, no entanto, quando aplicada em grande estudo nas Américas permitiu melhor diversificação entre isolados de *L. santarosai* (MARQUEZ et al., 2017; WAGGONER e PINSKY, 2017). Foi utilizada também por Koizumi et al. (2019) na investigação de genótipos e sorotipos presentes em ratos capturados na área urbana de Hanoi, Vietnã.

A metodologia MLST é utilizada rotineiramente para tipagem de leptospiras e tem a vantagem de apresentar melhor reprodutibilidade, sendo fortemente apoiada por dados experimentais e um banco de dados que permite comparar diversidade genética das leptospiras de diferentes regiões geográficas (VARNI et al., 2013; BILUNG et al., 2018; FERREIRA et al., 2020; PÉREZ et al., 2020). Até recentemente a técnica MLST

era aplicável apenas a cepas isoladas, pela necessidade de grandes quantidades de DNA e desafios como o cultivo de leptospiras e uso de antibióticos na fases pré-analítica são condições que afetam a obtenção de DNA em processos de extração (BERTASIO et al., 2020b). Contornando essas limitações, a metodologia foi aprimorada tornando-se mais rápida e específica permitindo sua aplicação diretamente em amostras biológicas, consolidando-se como ferramenta útil e poderosa na investigação epidemiológica da leptospirose (VARNI et al., 2018; WEISS et al., 2016).

A aplicação e complementação de técnicas é um exemplo que podemos observar em AP PCR (Arbitrarily primed PCR) e Rep-PCR (Repetitive element-based PCR). A primeira permite a rápida identificação de espécies, bem como a comparação de sorovariedades, contudo a baixa reprodutibilidade prejudica sua indicação como método eficaz de tipagem (Arbitrarily primed PCR) (BENACER et al., 2016; MARQUEZ et al., 2017; KARPAGAM e GANESH, 2020). Já as técnicas de Rep-PCR (Repetitive element-based PCR) como BOX-PCR e ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus- PCR) têm sido amplamente utilizadas em estudos de genomas bacterianos, incluindo a avaliação de leptospiras patogênicas em amostras humanas e ambientais, como ferramenta metodológica para análise comparativa e de tipagem de isolados (MARQUES et al., 2008; WATURANGI et al., 2012; BILUNG e CHAI; et al., 2018; BILUNG e PUI et al., 2018; ZAREI et al., 2018; LAMON et al., 2019).

Diante das diversas opções metodológicas, seja para detecção e/ou identificação do sorovar, essas ferramentas específicas e sensíveis tem como objetivo o diagnóstico oportuno e preciso da leptospirose. O diagnóstico molecular que para algumas regiões mais carentes pode parecer uma realidade distante, aliados a técnicas sorológicas e condição mais acessível, são importantes e os alicerces para a melhor compreensão tanto do patógeno quanto da doença, bem como permite melhor tomada de decisão na conduta terapêutica (WAGGONER e PINSKY, 2017; BAHUAUD et al., 2020; LAM, LOW e CHEE, 2020) e assim elaborar medidas de controle e prevenção de caráter mais específico e eficaz.

REFERÊNCIAS

ADLER, B.; LO, M.; SEEMANN, T.; MURRAY, G. L. Pathogenesis of leptospirosis, the influence of genomics. *Veterinary Microbiology*, v. 153, p. 73-81, 2011.

ADLER, B. Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects. *Veterinary Microbiology*, v. 172, p. 353-358, 2014.

AHMED, S. N.; SHAH, S.; AHMED, F. M. H. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **Journal Postgraduate Medicine**, v. 51, p. 195-200, 2005.

ÁVILA-PIRES, F. D. Leptospire e enchentes: uma falsa correlação? **Revista Patologia Tropical**, v. 35, n. 3, p. 199-204, 2006.

BARCELLOS, C.; LAMMERHIRT C. B.; ALMEIDA M. A. B.; SANTOS E. Spatial distribution of leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: recovering the ecology of ecological studies. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 1283-1292, 2003.

BAHUAUD, O. et al. Seven Years Leptospirosis Follow-Up in a Critical Care Unit of a French Metropolitan Hospital; Role of Real Time PCR for a Quick and Acute Diagnosis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 9, p. 3011, 2020.

BERTASIO, C. et al. Serological Survey and Molecular Typing Reveal New Leptospira Serogroup Pomona Strains among Pigs of Northern Italy. **MDPI**, p. 01-23, 2020a.

BERTASIO, C. et al. Detection of New Leptospira Genotypes Infecting Symptomatic Dogs: Is a New Vaccine Formulation Needed? **MDPI**, p. 01-19, 2020b.

BENACER, D. et al. Determination of *Leptospira borgpetersenii* serovar Javanica and *Leptospira interrogans* serovar Bataviae as the persistent *Leptospira* serovars circulating in the urban rat populations in Peninsular Malaysia. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 01-11, 2016.

BILUNG, L. M.; PUI, C. F. et al. Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as Molecular Typing Tools for Pathogenic *Leptospira*. **Disease Markers**, 2018.

BILUNG, L. M.; CHAI, L. S. *et al.* Prevalence, Genetic Heterogeneity, and Antibiotic Resistance Profile of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* at Farm Level: A Highlight of ERIC- and BOX-PCR to Reveal Genetic Diversity. **BioMed Research International**, 2018.

BHARTI, A. R. et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Nota Técnica Conjunta Nº 01/2013: **Métodos laboratoriais para o diagnóstico da leptospirose**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Leptospirose: diagnóstico e manejo clínico. Brasília, p. 44, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Leptospirose. Brasília, p. 651-670, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico. Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019**. Da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico - 2019**. 3ª edição, 2019.

BOURHY, P.; COLLET, L.; BRISSE, S.; PICARDEAU, M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 64, p. 4061-4067, 2014.

BUDIHAL, S. V.; PERWEZ, K. Leptospirosis Diagnosis: Competancy of Various Laboratory Tests. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 8, n. 1, p. 199-202, 2014.

CHOY, H. A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 2441-2450, 2007.

CRODA, J., et al. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 45, n. 5, p. 1528-1534, 2007.

COELHO, A. G. V.; ALVES, I. J.; FARIAS, V. L. V. Epidemiological profile of the leptospirosis cases in the Metropolitan Region of Baixada Santista (SP), Brazil. **BEPA**, v. 16, n. 183, p. 03-14, 2019.

COSTA, F. et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 9:e0003898, 2015.

CULLEN, P. A. et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4853-4863, 2005.

DUARTE, J. L.; GIATTI, L. L. Incidence of leptospirosis in a capital of the Western Brazilian Amazon and its relationship with climate and environmental variability, between the years of 2008 and 2013. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, Brasília, v. 28, n. 1, e2017224, 2019.

EVANGELISTA, K. V., COBURN, J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiology*, v. 5, n. 9, p. 1413-1425, 2010.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and Leptospirosis*. Melbourne, Australia: Medisci, p.295, 1999.

FERREIRA, A. S. et al. Genetic diversity of pathogenic leptospires from wild, domestic and captive host species in Portugal. n. August 2019, p. 852-864, 2020.

FONTES, R. M. et al. A new possibility for surveillance: do we identify all cases of leptospirosis? *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 57, n. 5, p. 443-446, 2015.

GALLOWAY, R. L.; LEVETT, P. N. Evaluation of a Modified Pulsed-Field Gel Electrophoresis Approach for the Identification of *Leptospira* Serovars. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 628-632, 2008.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 17, p. 494-50, 2011.

HOKE, D. E., EGAN, S., CULLEN, P. A., ADLER, B. LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infection and Immunity*, v. 76, p. 2063-2069, 2008.

HÜTTNER, M. D.; PEREIRA, H. C. P.; TANAKA, M. M. Pneumonia por leptospirose. *Journal Pneumologia*, v. 28, n. 4, p. 229-232, 2002.

INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY. Taxonomic Subcommittee. Disponível em: <<http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.html>>. Acesso em: 28 novembro. 2020.

KARPAGAM, K. B.; GANESH, B. Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance—an updated review. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, n. 5, p. 835-846, 2020.

KOIZUMI, N. et al. Molecular epidemiology of *Leptospira interrogans* in *Rattus norvegicus* in Hanoi, Vietnam. **Acta Tropica** v. 194, n. November 2018, p. 204-208, 2019.

KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. **The Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820-825, 1999.

LAM, J. Y.; LOW, G. K. K.; CHEE, H. Y. Diagnostic accuracy of genetic markers and nucleic acid techniques for the detection of *Leptospira* in clinical samples: A meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 2, p. 01-22, 2020.

LAMON, S. et al. Clonal relationship among *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and grooved carpet shells (*Ruditapes decussatus*) harvested in Sardinia (Italy). **Journal Of Food Microbiology**, v. 84, p. 103-258, 2019.

LAU, C. L.; SMYTHE, L. D.; CRAIG, S. B.; WEINSTEIN, P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 10, p. 631-638, 2010.

LEE, S. H.; KIM, S.; PARK, S. C.; KIM, M. J. Cytotoxic activities of *Leptospira interrogans* hemolysin SphH as a pore-forming protein on mammalian cells. **Infection and Immunity**, n. 70, p. 315-322, 2002.

LEHMANN, J. S. et al. Pathogenomic Inference of Virulence-Associated Genes in *Leptospira interrogans*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. 01-11, 2013.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 196-326, 2001.

LEVETT, P. N.; SMYTHE, L. International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of Leptospiraceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, 2006.

LEVETT, P. N.; HAAKE, D. A. *Leptospira* species (leptospirosis). In GL Mandell, JE Bennett, R Dolin (eds.), *Principles and practice of infectious diseases*, Churchill Livingstone Elsevier, p. 3059-3065, 2010.

LEVETT, P. N. et al. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 349-351, 2001.

LEVETT, P. N. et al. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 45-49, 2005.

LO, M. et al. Comparative transcriptional and translational analysis of leptospiral outer membrane protein expression in response to temperature. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 12, p. 560, 2009.

LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=leptospira>. Acesso em: 24 novembro. 2020.

Lucchesi, P. M. A. et al. Recommendations for the detection of *Leptospira* in urine by PCR. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n. 2, p. 131-134, 2004.

MARQUES, A. S. A. et al. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. *the Brazilian Society of Genetics*, v. 115, p. 106-115, 2008.

MARQUEZ, A. et al. Overview of laboratory methods to diagnose leptospirosis and to identify and to type leptospires. *International Microbiology*, v. 20, n. 4, p. 184-193, 2017.

MACEDO, S. A. Estudio ultraestructural de *Leptospira biflexa* serovar Andamana cepa JNS al microscopio electrónico de transmisión y barrido. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, v. 22, n. 4, p. 281-289, 2005.

MATTHIAS, M. A. *et al.* Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2:e213, 2008.

McBRIGE, A. J. A.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. *Current Opinion in Infection Diseases*. v.18, p. 376-386, 2005.

MUSSO, D.; LA SCOLA, B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 46, p. 245-252, 2013.

PÉREZ, L. J. et al. A Validated Multiplex Real-Time PCR Assay for the Diagnosis of Infectious *Leptospira* spp. A Novel Assay for the Detection and Differentiation of Strains From Both Pathogenic Groups I and II. *Frontiers in microbiology*, v. 11, p. 01-18, 2020.

PICARDEAU, M. et al. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 78, p. 01-08, 2014.

PUCHE, R. *et al.* *Leptospira venezuelensis* sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 68, p. 513-517, 2018.

SANTIM, K.; SELLA, A. B.; CARDOSO, M. R. I. Pesquisa de aglutininas anti-Leptospira em cães clinicamente sadios e em cães com suspeita clínica de leptospirose. **Clínica Veterinária**, v. 60, p. 48-52, 2006.

SANTOS, S. *et al.* DIAGNOSTICS OUTLINE OF NOTIFIED LEPTOSPIROSE CASES IN A CITY OF THE LEGAL AMAZON. **SAJEBTT**, Rio Branco, UFAC, v. 6, n. 1, p. 227-243, 2019.

SAMBASIVA, R. R.; NAVEEN, G.; BHALLA, P.; AGARWAL, S. K. Leptospirosis in India and the Rest of the World. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 7, n. 3, p. 178-193, 2003.

SILVA, M. V. *et al.* Leptospirose. *Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia*. Belém, Samauma Editorial, v. 2, p. 1011-1037, 2013.

SILVA, M. V. *et al.* Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during convalescence. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 98, p. 268-272, 1995.

SLACK, A. T. *et al.* *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 58, p. 2305-2308, 2008.

SMITH, C. R.; KETTERER, P. J.; MCGOWAN, M. R.; CORNEY, B. G. A review of laboratory techniques and their use in the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cattle. **Australian Veterinary Journal**, v.71, p. 290-294, 1994.

THIBEAUX, R. *et al.* Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. 818, p. 01-14, 2018.

VAN DE WEYER, R. W. L.; Ramakers, B. P.; Pickkers, P. Leptospirosis. **Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde**, v. 159, p. 77-97, 2015.

VARNI, V. *et al.* Reassessment of MLST schemes for *Leptospira* spp. typing worldwide Vanina. **Infection, genetics and evolution**, 2013.

VARNI, V. et al. Simplified MLST scheme for direct typing of *Leptospira* human clinical samples. **Pathogens and Global Health**, v. 112, n. 4, p. 203-209, 2018.

WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Molecular Diagnostics for Human Leptospirosis. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139-148, 2017.

WATURANGI, D. E. et al. Use of REP- and ERIC-PCR to reveal genetic heterogeneity of *Vibrio cholerae* from edible ice in Jakarta , Indonesia. **Gut Pathogens**, v. 4, n. 1, p. 2, 2012.

WEISS, S. et al. An Extended Multilocus Sequence Typing (MLST) Scheme for Rapid Direct Typing of *Leptospira* from Clinical Samples. **PLoS Neglected Tropical Diseases** v. 10, n. 9, p. 01-11, 2016.

WINN JR, W. et al. Infecções por Espiroquetas. In: Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 20, 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record. Leptospirosis: an emerging public health problem. v. 86, p. 45-52, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2011/wer8606.pdf>>. Acesso em: 23 novembro. 2020.

ZAREI, O. et al. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical, environmental and cockroach sources by ERIC PCR. **BMC Research Notes**, p. 01-07, 2018.

DOENÇA DE LYME E DOENÇA DE LYME-SÍMILE BRASILEIRA

Cintya de Oliveira Souza

Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas II. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

Laboratório de Leptospirose e outras Zoonoses. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail:cintyaoliveira@iec.gov.br

Leni Célia Reis Monteiro

Laboratório de Leptospirose e outras Zoonoses. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail:lenimonteiro@iec.gov.br

Marcia de Nazaré Miranda Bahia

Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas II. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail:marciabahia@iec.gov.br

DOENÇA DE LYME

A Doença de Lyme (DL) é a zoonose mais prevalente no hemisfério Norte com áreas endêmicas na Europa, Ásia e América do Norte. É caracterizada como uma infecção multissistêmica, ocasionada por bactérias (espiroquetas) do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) e transmitida aos humanos por meio da picada de carrapatos do complexo *Ixodes ricinus* (STEERE, 2001).

Classificação, características moleculares e genéticas do agente etiológico: *Borrelia burgdorferi*

As espiroquetas que integram o complexo *B. burgdorferi* s.l. pertencem à família *Borreliaceae* e ao gênero *Borrelia* (LPSN, 2020). Além dos agentes da DL, também

fazem parte deste gênero os agentes da febre recorrente (MANNELLI *et al.*, 2012; FRANKE; HILDEBRANDT; DORN, 2013).

Atualmente o gênero *Borrelia* é composto por 42 espécies válidas e 8 novas “*Candidatus*” à espécie (LPSN, 2020). O complexo *B. burgdorferi* s.l. é um grupo diversificado de bactérias, de ampla distribuição geográfica, atualmente constituído por 22 genospecies que são identificadas como: patogênicas, não patogênicas e de patogenicidade incerta (Quadro 1) (MARGOS *et al.*, 2011; WANG & SSHWARTZ, 2011; IVANOVA *et al.*, 2013; LAGER, 2020).

Entre essas espécies, cinco são conhecidas por serem patogênicas para humanos (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s, *B. bavariensis* e *B. spielmanii*). E recentemente a *B. mayonii* foi identificada como uma nova espécie patogênica (PRITT *et al.*, 2016). Outras cinco espécies têm potencial patogênico (Quadro 1), uma vez que foram detectadas eventualmente em humanos e sua patogenicidade ainda é incerta (RUDENKO *et al.*, 2011; CASJENS *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2014; CHOMEL, 2015).

As espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l. são bactérias Gram-Negativas espiraladas, anaeróbias ou microaerófilas, longas medindo 10 a 30 µm de comprimento e finas com diâmetro de 0,2-0,5 µm. Apresentam movimento eficiente através de meios com alta viscosidade, em comparação com outras bactérias cujos movimentos são lentos ou inibidos (BARBOUR & HAYES, 1986; STANEK & STRLE, 2003; KARAMI 2012, CHARON & GOLDSTEIN, 2002; TSAO, 2009). Estas espiroquetas têm uma membrana dupla, flagelos, espaço periplasmático e cilindro protoplasmático. Esta membrana dupla é formada por uma membrana celular interna (citoplasmática), com uma camada de peptidoglicano e uma membrana externa com inúmeras lipoproteínas, que substituem o revestimento lipopolissacarídeo comum nas bactérias Gram-Negativas. Entre as membranas está situado o espaço periplasmático (BARBOUR & HAYES, 1986; WANG & SSHWARTZ, 2011; RADOLF *et al.*, 2012). Ligados à membrana citoplasmática estão 7 a 14 flagelos periplasmáticos que se cruzam ao redor do cilindro protoplasmático, sendo estes responsáveis pela motilidade bacteriana bidirecional e um importante fator de virulência (Figura 1) (BURGDORFER; BARBOUR; HAYES, 1982).

Quadro 1: Espécies de *Borrelia* dentro do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato, distribuição geográfica e patogenicidade em humanos (Adaptada de LAGER, 2020 e MAJEROVÁ *et al.*, 2020).

Espécie	Distribuição geográfica	Patogenicidade em Humanos	Espécie	Distribuição geográfica	Patogenicidade em Humanos
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (s. s.)	America do Norte Europa	Patogênica	<i>B. valaisiana</i>	Eurásia	Potencialmente Patogênica
<i>B. garinii</i>	Eurásia	Patogênica	<i>B. yangtzensis</i>	China	Não Patogênica
<i>B. afzelii</i>	Eurásia	Patogênica	<i>B. americana</i>	America do Norte	Não Patogênica
<i>B. bavariensis</i>	Eurásia	Patogênica	<i>B. andersonii</i>	America do Norte	Não Patogênica
<i>B. spielmanii</i>	Europa	Patogênica	<i>B. californiensis</i>	America do Norte	Não Patogênica
<i>B. japonica</i>	Japão	Não Patogênica	<i>B. carolinensis</i>	America do Norte	Não Patogênica
<i>B. lusitaniae</i>	Norte da Africa Europa	Potencialmente Patogênica	<i>B. kurtenbachii</i>	America do Norte Europa	Potencialmente Patogênica
<i>B. sinica</i>	China	Não Patogênica	<i>B. finlandensis</i>	Finlândia	Potencialmente Patogênica
<i>B. bissettii</i>	America do Norte Europa	Potencialmente Patogênica	<i>B. chilensis</i>	Chile	Não Patogênica
<i>B. turdi</i>	Japão	Não Patogênica	<i>B. mayonii</i>	America do Norte	Patogênica
<i>B. tumukii</i>	Japão	Não Patogênica	<i>B. lanei</i>	America do Norte	Não Patogênica

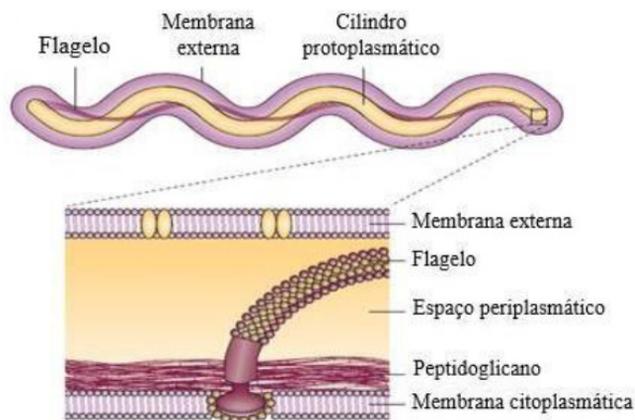


Figura 1: Estrutura de uma espiroqueta do complexo *Borrelia burgdorferi* s.l. (Fonte: ROSA; TILLY; STEWART, 2005).

A estrutura da membrana citoplasmática circunda o cilindro protoplasmático (região central da célula). Nessa região está localizado o genoma das espiroquetas, esse material genético apresenta aproximadamente 1.5 Mb, sua constituição é composta por um cromossomo linear (1000 kb) e vários plasmídeos lineares e circulares (FRASER *et al.*, 1997; CASJENS *et al.*, 2000).

A estirpe B31 que pertence à espécie *B. burgdorferi* s.s. foi a primeira borrelia sequenciada e apresentou um genoma total de 1.521.419 pares de bases (pb), constituído de um cromossomo linear de 910.725 pb e por 21 plasmídeos (12 lineares e 9 circulares) compreendendo 610.694 pb (XU *et al.*, 1996; FRASER *et al.*, 1997; CASJENS *et al.*, 2000).

A estrutura do cromossomo apresenta elevada homologia genética, as proteínas codificadas por genes constituintes do cromossoma linear apresentam diversas funções vitais da bactéria (FRASER *et al.*, 1997; SINGH & GIRSCHICK, 2004; KARAMI, 2012), contudo nos plasmídeos é observada uma grande variabilidade genética entre as bactérias do complexo *B. burgdorferi* s.l., mesmo entre estirpes da mesma genoespécie (TSAO, 2009). As proteínas codificadas por genes plasmidiais são responsáveis pela patogenicidade da espiroqueta em hospedeiros vertebrados, como exemplo as proteínas da membrana externa (*Outer surface proteins*-Osp), que são as lipoproteínas de superfície importantes na interação bactéria-vetor-hospedeiro (FRASER *et al.*, 1997; SINGH & GIRSCHICK, 2004; KARAMI, 2012).

As lipoproteínas de superfície da membrana externa (Osp) variam de A à F. A presença de mutações gênicas que influenciam na expressão ou supressão de algumas dessas proteínas, que constituem a estrutura da membrana, influenciam na não detecção do patógeno através da técnica de *Western blotting* (WB) (SAL *et al.*, 2008). Além das lipoproteínas já citadas, a membrana apresenta o antígeno variável de superfície (VlsE), a proteína de ligação à fibronectina (BBK32) e as proteínas de ligação à decorina (DbpA e DbpB) (BHATE & SCHWARTZ, 2011). Estas proteínas de superfície conferem às borrelíias a capacidade de variação antigênica e de sobrevivência em ambientes diversificados, sendo de fundamental importância imunológica, pois são indutoras dos primeiros anticorpos produzidos durante a doença (FRANCA, 2000; BHATE & SCHWARTZ, 2011).

A estrutura flagelar se divide em: corpo basal, filamento e gancho (*flgE*). O gancho flagelar (*flgE*) é a estrutura que conecta o filamento flagelar periplasmático ao corpo basal. Esse componente é sintetizado por um gene cromossômico único (1kb), e por ser altamente conservado é utilizado na identificação de espécies de *Borrelia* (PICKEN, 1992; FUKUNAGA *et al.*, 1996). As proteínas flagelares FlaA (38 KDa) e FlaB (41 KDa), compõem a flagelina que é o principal componente estrutural do flagelo (KRUPKA *et al.*, 2007; SAL, 2008).

Epidemiologia: distribuição das espécies do Complexo *B. burgdorferi*, vetores e reservatórios.

A distribuição geográfica da DL é ampla, estando presente na América do Norte, Europa e Ásia. Nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa, é considerada a doença mais prevalente de transmissão por vetores (carrapatos). Essa distribuição encontra-se em expansão, entretanto a maioria dos casos se concentra em regiões de zonas temperadas. As manifestações clínicas variam conforme a espécie do complexo *B. burgdorferi* s.l encontrada em cada localidade geográfica (KUGELER *et al.*, 2015; RUDENKO *et al.*, 2011; BORCHERS *et al.*, 2014).

Os carrapatos (principal vetor) são artrópodes hematófagos e apresentam ciclo de vida dividido em fases: ovo, larva, ninfa e adulto. Após a eclosão dos ovos, a cada fase evolutiva se faz necessário um repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado e durante o processo de alimentação ocorre à infecção. Esse vetor pode parasitar quase todas as classes de vertebrados (STANEK *et al.*, 2012; SONENSHINE & ROE, 2014).

Os carrapatos do gênero *Ixodes* são os principais vetores, destacando-se as espécies do complexo *Ixodes ricinus*: *I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. persulcatus* e *I. pacificus*. Essas espécies de carrapatos se diferem entre as regiões geográficas e podem transmitir, principalmente, três genoespécies do complexo *B. burgdorferi* s.l responsáveis pela DL: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* e *B. garinii*. Entre os transmissores da *B. garinii* e *B. afzelii* destaca-se o *I. ricinus* e o *I. persulcatus* (SANTOS *et al.*, 2010; LAGER, 2020).

A espécie *I. scapularis* é o vetor mais frequente nos EUA e o *I. pacificus* é o vetor mais importante no oeste do país. Dados demonstram que a *B. burgdorferi* s. s. é a principal causa da borreliose de Lyme no continente norte americano. Em muitos países endêmicos para DL na Europa (regiões central e nordeste), o principal vetor é o *I. ricinus*. Práticas de notificação epidemiológica diferenciada entre as localidades europeias tornam a comparação da incidência difícil. Dados coletados demonstram que a espécie *B. afzelii* é mais frequentemente isolada nas regiões centro e leste europeu, enquanto a *B. garinii* ocorre em países ocidentais da Europa (MARGOS *et al.*, 2011; MEAD, 2015).

No continente asiático a espécie *I. persulcatus* é a responsável pela transmissão de *B. afzelii* e *B. garinii*, confirmando assim a DL em muitas províncias da China, principalmente nas regiões nordeste e noroeste (FANG *et al.*, 2015). Dados sobre a doença de Lyme no hemisfério sul são escassos, embora casos prováveis tenham sido relatados em países como Brasil e Austrália (LOPES *et al.*, 2017).

Apesar da capacidade de parasitismo do carrapato ser ampla, os principais hospedeiros da borreliose são os mamíferos silvestres, domésticos e os seres humanos, podendo afetar aves e répteis de forma esporádica. Dentre os mamíferos silvestres

destacam-se os roedores e outros pequenos mamíferos, que são reservatórios assintomáticos. Entre os mamíferos domésticos os principais afetados são os equinos e os cães, que podem apresentar manifestações clínicas da doença (GERN, 2009; PARRY, 2016). A espécie *B. afzelii* apresenta como principal reservatório os roedores. Os pássaros são reservatórios para *B. garinii*, acredita-se que as aves migratórias possam ter um papel na expansão da gama de carrapatos para novas áreas, contribuindo assim para a dispersão da doença (PIESMAN, & GERN, 2004), esse fato já foi observado no centro e leste do Canadá (OGDEN, 2008).

O ciclo enzoótico de transmissão das espiroquetas *Borrelia* pode ocorrer de diferentes formas: 1- Durante o repasto sanguíneo em diferentes estágios de vida do carrapato (transmissão transestadial ou horizontal) podendo ser: do hospedeiro reservatório infectado (mamíferos, aves e répteis) para o carrapato e do carrapato infectado para hospedeiro saudável (animais domésticos e humanos); 2- Transmissão entre um carrapato fêmea adulto infectado e a prole (transmissão transovariana ou vertical). No entanto, de modo geral a transmissão transovariana ou vertical não ocorre com *Borrelia* do grupo de Lyme (SOARES *et al.*, 2000; CUTLER *et al.*, 2019; LAGER, 2020).

Manifestações clínicas da Doença de Lyme

A DL é uma doença multissistêmica que apresenta uma variedade de manifestações clínicas e pode ser classificada em três estágios. A primeira evidência clínica da DL é o eritema migratório (EM), definido como a expressão de uma infecção localizada precoce caracterizada por lesão cutânea conhecida como “olho de boi” e sintomas inespecíficos. Caso não tratada, nesta primeira fase, a doença pode progredir para o segundo estágio, uma infecção disseminada precoce com manifestações articulares, neurológicas, cardíacas e oftalmológicas. O terceiro estágio é caracterizado por infecção disseminada tardia com quadros clínicos em órgãos específicos. Outras apresentações clínicas como Síndrome da Doença de Lyme Pós-Tratamento (SDLPT) e a Doença Crônica de Lyme (tema de controvérsias) são relatadas. Uma melhor descrição das manifestações/definições clínicas e achados microbiológicos da DL pode ser visualizada no Quadro 2. A apresentação sequencial e/ou completa desses sintomas é extremamente incomum e nas infecções disseminadas, os pacientes podem apresentar sinais e sintomas que dependem de um conjunto de fatores tais como geografia, espécies infectantes, vetores/hospedeiros, interação vetor/patógeno, predisposição do hospedeiro e histórico de tratamento (STRLE & STANEK, 2009; HATCHETTE; DAVIS; JOHNSTON, 2014; BAMB *et al.* 2019).

Quadro 2: Estágios da DL com manifestações/definições clínicas e achados microbiológicos. Fonte: Adaptado de BAMB *et al.*, 2019; HATCHETTE; DAVIS; JOHNSTON, 2014.

Estágio	Sistema	Manifestações clínicas/ definições	Microbiologia
Estágio 1 Doença localizada precoce: 3–30 dias após a inoculação	Cutâneo	Lesão de pele: Eritema Migratório/EM (média 70% dos pacientes)	Infecção localizada de <i>Borrelia</i>
	Sistêmico	Sintomas leves: fadiga, dor de cabeça, mialgias, artralgias e febre	
Estágio 2 Doença disseminada precoce: dias até meses	Cutâneo	EM com múltiplas lesões Linfocitoma borrelial (descrita somente na Europa)	<i>Borrelia</i> entra na corrente sanguínea e se dissemina sistemicamente
	Sistêmico	Febre Artralgias Dor de cabeça Linfadenopatia	
	Nervoso	Neuroborreliose aguda Meningite asséptica Neuropatia craniana (especialmente paralisia do nervo facial) Radiculopatia motora ou sensorial	
	Cardíaco	Cardite de Lyme: Bloqueio atrioventricular Taquiarritmias Miopericardite Disfunção miocárdica	
	Ocular	Conjuntivite (raro)	

Estágio	Sistema	Manifestações clínicas/ definições	Microbiologia
Estágio 3 Doença disseminada tardia <i>meses a anos (não tratada):</i> Sinais objetivos intermitentes ou contínuos com lesões de órgãos específicos	Cutâneo	Acrodermatite crônica atrófica e linfocitoma borreliol (descrita somente na Europa)	Infecção contínua por <i>Borrelia</i> em órgãos terciários
	Nervoso	Encefalite, polineuropatia, Encefalomielite crônica Neuroborreliose crônica	
	Músculo esquelético	Artrite de Lyme	
	Cardíaco	Cardite de Lyme	
	Ocular	Retinite (raro)	
Síndrome da doença de Lyme pós-tratamento (SDLPT)	Evidência objetiva de infecção anterior; Tratamento com antibióticos seguido de resolução dos sinais objetivos; Sintomas subjetivos (fadiga, dor musculoesquelética generalizada e dificuldades cognitivas) dentro de 6 meses de tratamento, que persiste por pelo menos 6 meses		Infecção por <i>Borrelia</i> já tratada com antibióticos.
Doença de Lyme crônica (DLC)	Sintomas contínuos consistentes com a doença de Lyme (fadiga, artralguas, mialgias, disfunção do sistema nervoso) que não atendem às definições de outra categoria.		Tema de controvérsia

O EM é um importante marcador clínico para a suspeita diagnóstica e alerta à vigilância epidemiológica. Em regiões sabidamente endêmicas, este é o único sinal que permite o diagnóstico clínico confiável da DL (STANEK *et al.*, 2011). Após o estabelecimento do EM, as manifestações clínicas iniciais como mal-estar, febre, cefaleia, rigidez de nuca, mialgias, artralguas migratórias e linfadenopatias podem estar presentes. É comum esses sinais e sintomas durarem várias semanas, nos casos em que o tratamento não é instituído. Nessas situações, semanas ou meses após a picada podem surgir manifestações neurológicas (15% dos casos), tais como meningite asséptica, encefalite, neurite de pares cranianos (incluindo a paralisia facial bilateral), radiculoneurite motora e sensorial (HALPERIN *et al.*, 2007; SHINJO *et al.*, 2009, MARQUES, 2015). Cerca de 8% dos pacientes desenvolvem comprometimento cardíaco com alterações expressas em eletrocardiograma do tipo bloqueio atrioventricular, miopericardite aguda e evidências de disfunção ventricular esquerda (ROSTOFF *et al.*, 2009; YOSHINARI

et al., 2010). Cerca de 60% dos pacientes, após semanas ou anos do início da doença, podem desenvolver artrite, em geral caracterizada por crises intermitentes de edema e dor articular, em especial nas grandes articulações (STEERE *et al.*, 1977). Mesmo que não haja lesão cutânea na fase inicial, ainda assim a doença pode se manifestar anos mais tarde (MONTIEL *et al.*, 2002). A evolução básica da doença é similar no mundo inteiro, mas há variação regional, primariamente entre a doença encontrada nos EUA e na Europa e Ásia (STEERE, 2001). Essa variação estaria relacionada com a distribuição geográfica das espécies de borrelias patogênicas ao homem e aos seus respectivos organotropismos. Assim, nos EUA cuja principal espécie é a *B. burgdorferi* s.s há predomínio de manifestações articulares, enquanto na Europa, onde o maior número de casos está relacionado às espécies *B. afzelii* e *B. garinii*, o predomínio é de sintomas cutâneos e neurológicos. Na Ásia, a manifestação é basicamente cutânea (BAUM, 1997; STEERE; COBURN; GLICKSTEIN, 2004; STANEK *et al.*, 2011). Manifestações cutâneas como linfocitoma borreliar e acrodermatite crônica atrófica são fenômenos aparentemente europeus. Meningoradiculoneurite na neuroborreliose de Lyme, com dor radicular intensa, é mais proeminente na Europa (STANEK *et al.*, 2011).

As manifestações neurológicas da DL podem ser observadas no estágio 2 da doença, considerada neuroborreliose aguda e no estágio 3, reconhecida como neuroborreliose crônica. Na neuroborreliose aguda observa-se com frequência meningite linfocítica e a Síndrome de Bannwarth. Em um estudo com 310 pacientes, o predomínio de sintomas nesta síndrome foi dor radicular em 90% dos pacientes, 35% apresentavam paralisias de nervos cranianos (principalmente da face) e 27% demonstravam dor de cabeça e 13% de rigidez do pescoço. Além dessas manifestações neurológicas agudas, observa-se também neurite craniana, plexo neurite, mononeurite múltipla e, raramente, encefalite e mielite aguda. Quanto à neuroborreliose crônica, há ocorrência de encefalites ou encefalomielites progressivas, vasculite cerebral, miosite (com paresia e dor focal) e polineuropatia crônica, principalmente do tipo axonal que podem estar associadas à acrodermatite crônica atrófica. A neuroborreliose crônica é de curso progressivo e o fator crucial para diferenciá-la da esclerose múltipla é a detecção de anticorpos intratecais específicos contra *B. burgdorferi* (PFISTER *et al.*, 2006).

Aproximadamente de 10-20% dos pacientes relatam uma série de sintomas contínuos denominados Síndrome da Doença de Lyme Pós-Tratamento (SDLPT). Esta síndrome é descrita em pacientes que após o tratamento para doença de Lyme, apresentam sintomas inespecíficos como fadiga e dor musculoesquelética generalizada que podem ser confundidas com fibromialgia ou síndrome da fadiga crônica (VAN HOUT, 2018; LANTOS *et al.*, 2010). As razões para estes sintomas são desconhecidas, no entanto, causas como doença autoimune, infecção persistente, outras doenças ou

processos inflamatórios crônicos desencadeados por componentes bacterianos não vivos, são consideradas (NIAID, 2019). Há evidências de que pacientes com SDLPT não sofram de infecção persistente por *B. burgdorferi* e não se beneficiam de terapia antibiótica, portanto alternativas adicionais de tratamento devem ser estabelecidas para esses pacientes (KOEDEL; FINGERLE; PFISTER, 2015), bem como a busca por diagnósticos diferenciais. Essas informações corroboram com as diretrizes de 2010 e 2020 da IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) para a SDLPT, que destacam a falta de evidências biológicas para existência de infecção crônica sintomática por *B. burgdorferi* entre pacientes pós-tratamento e ausência de comprovação da antibioticoterapia, portanto não deve ser recomendada para pacientes com sintomas crônicos (LANTOS *et al.*, 2010; LANTOS *et al.*, 2021). Para o futuro, ensaios clínicos cuidadosos são necessários para explorar se SDLPT é uma doença ou simplesmente parte de um complexo de sintomas com múltiplas etiologias. Especialmente, buscando esclarecer se pacientes com possível SDLPT podem ser realmente distintos daqueles com fibromialgia (KOEDEL & PFISTER, 2017).

Abordagens e critérios para o diagnóstico da DL

O diagnóstico da DL perpassa obrigatoriamente pela definição do quadro clínico (Quadro 2), observação de aspectos epidemiológicos (contato/picada de carrapatos, acesso às áreas endêmicas) e investigação laboratorial cuidadosa (STEERE, 2001). A indicação para o diagnóstico laboratorial da DL são os testes sorológicos com a detecção de anticorpos IgM e IgG séricos específicos para *B. burgdorferi* (WILSKE & FINGERLE, 2002; DESSAU *et al.*, 2018).

Os testes de detecção direta do microrganismo a partir de amostras clínicas como a cultura microbiológica e a detecção de DNA apresentam baixa sensibilidade devido à insuficiente espiroquetemia e natureza fastidiosa da bactéria. No entanto, podem ser utilizados com mais segurança em manifestações clínicas específicas (LEBECH, 2002; MARQUES, 2015). Exemplos para utilização da detecção direta das espiroquetas são nas manifestações atípicas de EM e em pacientes com neuroborreliose de Lyme (NBL) precoce (<2 semanas), ainda negativa para síntese de anticorpos intratecais específicos. Nestes casos, a detecção de espiroquetas em amostras biológicas por cultura e/ou PCR é útil para provar a infecção por *B. burgdorferi* s.l e auxiliar no diagnóstico (LEBECH, 2002; STANEK *et al.*, 2011). No entanto, para neuroborreliose de Lyme, a IDSA recomenda o teste de anticorpos séricos em vez da detecção molecular ou cultura de LCR ou soro (LANTOS *et al.*, 2021).

Os métodos moleculares, além de apoio ao diagnóstico na DL, são utilizados para rastreamento de vetores competentes, confirmação e investigação de hospedeiros. Os genes de *Borrelia* utilizados como alvos moleculares são as principais proteínas de superfície externa (*osp A*, *osp B*), flagelina (*fla B*, *fla E*), rRNA 16S, *rpoB* e região espaçadora intergênica *rrfA-rrlB* (IGS) (RADULOVIC *et al.*, 2010; FLORES *et al.*, 2020; DAS *et al.*, 2020).

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos IgM e IgG séricos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e *Western blotting* (WB), são os métodos recomendados por órgão oficiais dos EUA (CDC- *Centers for Disease Control*) e da União Européia (ECDC- *European Centre for Disease Prevention and Control*) para investigação laboratorial e diagnóstico da DL. Ambos recomendam a investigação sorológica da DL em duas etapas para todas as manifestações clínicas. A primeira etapa é a realização do ensaio de ELISA como teste de triagem. Caso o resultado seja positivo ou inconclusivo, deve ser realizada a segunda etapa por meio do ensaio de WB para confirmação do diagnóstico (ECDC, 2016; MEAD; PETERSEN; HINCKLEY, 2019). Na Europa, para interpretação do WB há critérios específicos e padronizados para as diferentes regiões geográficas, pois não há critérios interpretativos únicos que forneçam resultados com alta sensibilidade e especificidade em todos os países, devido à presença de diferentes espécies de *Borrelia* associadas a DL (ELDIN *et al.*, 2019).

Nos EUA, segundo os critérios do CDC, o WB é interpretado com a presença de bandas específicas para anticorpos IgM e IgG. WB para IgM é considerado positivo se duas das três bandas a seguir estiverem presentes: 24 kDa (*OspC*), 39 kDa (*BmpA*) e 41 kDa (*Fla*) e positivo para IgG se cinco das 10 bandas seguintes forem evidenciadas: 18 kDa, 21 kDa (*OspC*), 28 kDa, 30 kDa, 39 kDa (*BmpA*), 41 kDa (*Fla*), 45 kDa, 58 kDa (não GroEL), 66 kDa e 93 kDa (CDC, 1995). Na Europa, o WB é utilizado e interpretado de forma criteriosa devido à heterogeneidade das espécies de *Borrelia* associadas a DL que ocorrem no continente (HAUSER; LEHNERT; WILSKE, 1999). Até 30 dias de doença é recomendado a pesquisa de IgM e IgG, após esse período recomenda-se apenas determinação de IgG. Para DL em estágio inicial, a evidência sorológica é melhor com amostras pareadas de soro nas fases aguda e convalescente. Já em estágio avançado observa-se uma forte resposta de IgG aos antígenos de *B. burgdorferi* (CDC, 1995).

Apesar das diretrizes e critérios estabelecidos pelos órgãos oficiais, a variabilidade interlaboratorial, a má interpretação dos testes sorológicos (falso positivos) sem a realização do teste confirmatório e a frequência de reação cruzada entre as infecções por *B. burgdorferi* e outras doenças infecciosas e autoimunes continuam sendo um problema para o diagnóstico da DL (FALLON *et al.*, 2014, BORCHERS *et al.*, 2014;

CDC, 2019). Fatores específicos da interação *B. burgdorferi* / hospedeiro como modulação imunológica e evasão, a biodiversidade e variação antigênica de *Borrelia* e as respostas recorrentes IgM e IgG aumentam a complexidade e interpretação dos testes sorológicos (BAMM *et al.*, 2019).

De acordo com os cuidados necessários para realização e divergências na interpretação do diagnóstico sorológico para DL, o grupo de estudo em Borreliose de Lyme do ESCMID (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) publicou as seguintes recomendações para regiões endêmicas: 1) o eritema migratório típico deve ser diagnosticado clinicamente e não requer exames laboratoriais; 2) o diagnóstico de neuroborreliose de Lyme requer investigação laboratorial do líquido espinhal, incluindo a produção de anticorpos intratecais; 3) as manifestações restantes da doença requerem testes de anticorpos séricos para *B. burgdorferi*; 4) testar indivíduos com sintomas subjetivos inespecíficos não é recomendado, devido ao baixo valor preditivo positivo dos testes (DESSAU *et al.*, 2018).

Para o diagnóstico da neuroborreliose de Lyme (NBL) além das manifestações clínicas no sistema nervoso central e periférico, os sinais laboratoriais de inflamação no LCR (pleocitose, sinais de lesão da barreira hematoencefálica, síntese intratecal de IgG) tornam provável o NBL, mas a ausência de anticorpos no LCR não indica ausência de envolvimento do sistema nervoso central, especialmente se o exame foi realizado nos primeiros dias de doença (ISSAKAINEN *et al.*, 1996; STANEK *et al.*, 2011). Apesar das recomendações de investigação de anticorpos no LCR, os títulos de anticorpos IgM e IgG séricos auxiliam na identificação de pacientes com NBL (STANEK *et al.*, 1996; MYGLAND *et al.*, 2010; SCHNEIDER *et al.*, 2020). A investigação mais adequada é a obtenção simultânea de amostras de LCR e soro para determinação do índice de anticorpos LCR/soro que realizado por laboratórios com metodologia validada (LANTOS *et al.*, 2021).

DOENÇA DE LYME-SÍMILE BRASILEIRA - DLS

Contexto Histórico

A Doença de Lyme-Símile Brasileira (DLS) também é conhecida como Borreliose de Lyme Brasileira ou Síndrome de Baggio-Yoshinari (SBY) em homenagem aos pesquisadores e autores dos primeiros relatos no Brasil: o entomologista Dr Domingos Baggio e o médico Dr Natalino Yoshinari. Foi descrita como uma enfermidade similar a DL, mas com particularidades, e definida como: “Enfermidade

infecciosa nova e emergente brasileira, transmitida por carrapatos não pertencentes ao complexo *Ixodes ricinus*, causada por espiroquetas de morfologia atípica e latente, que origina manifestações clínicas semelhantes às observadas na DL, exceto pela frequência de recidivas clínicas e desordens autoimunes” (GAUDITANO *et al.*, 2005; SHINJO *et al.*, 2009; YOSHINARI, *et al.*, 2010). Os primeiros relatos da DLS no Brasil, foram identificados em 1992 na cidade de Itapevi, São Paulo. Os pacientes após serem picados por carrapatos desenvolveram EM, acompanhado de febre, adinamia, cefaleia, mialgia, tosse, dores articulares e radiculite, apresentando sorologia positiva para IgM (1/600) (YOSHINARI *et al.*, 1993). Outros casos foram confirmados em São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro e Manaus (AZULAY; ABULAFIA; SODRE, 1991; TALHARIS; TALHARI; FERREIRA, 1992; YOSHINARI *et al.*, 1993; COSTA *et al.*, 1996).

Evidência sorológica na população brasileira

Estudos epidemiológicos para determinação da soroprevalência da doença são baseados na pesquisa de anticorpos IgM e/ou IgG por meio de ELISA (GRODZICKI, 1998). Yoshinari *et al.* (1997) estimaram que a frequência de anticorpos anti-*B. burgdorferi* na população brasileira era de 3%, resultado obtido após testes sorológicos em pessoas saudáveis. Em 2007 foi demonstrado a frequência de anticorpos anti-*B. burgdorferi* em doadores de sangue no estado de Mato Grosso do Sul (MS), com 7,8% (9/115) de soros reagentes, sendo 1,8% reagentes para IgM, 3,4% para IgG, e 2,9% para IgG e IgM concomitantemente (BRANDÃO, 2007). Em estudos envolvendo população de risco (tratadores de animais silvestres) e indivíduos saudáveis provenientes de áreas endêmicas, como Itapevi e Cotia, foi constatada soroprevalência de 6,4% e 7,5% respectivamente (CORRADI; CARVALHO; COUTINHO, 2006; YOSHINARI, 2001).

Manifestações clínicas

As principais manifestações clínicas entre pacientes brasileiros com DLS são sintomas gerais inespecíficos como febre (78,9%) e linfadenomegalia (36,8%), problemas de pele (31,5%), artralgia ou artrite (31,5%) e sintomas neurológicos (42%), dos quais alguns pacientes apresentaram anticorpos anti-*B. burgdorferi* no LCR. Os pacientes com casos neurológicos foram diagnosticados com ataxia, meningite e meningoencefalite (GOUVEIA *et al.*, 2010). Cerca de 35% dos casos de DLS apresentam

manifestações neurológicas e as principais síndromes envolvendo o sistema nervoso compõe a tríade: meningite, neurite craniana e radiculite periférica, podendo haver casos de encefalite e/ou encefalomielite (SHINJO *et al.*, 2009; MIZIARA, *et al.*, 2018).

Do diagnóstico à vigilância epidemiológica da DLS

No Brasil, os testes sorológicos de ELISA e WB para detecção de anticorpos contra *B. burgdorferi* são realizados com antígenos de *B. burgdorferi* norte-americana (G39/40) e apresentam baixa sensibilidade e especificidade (títulos baixos e oscilantes), portanto os critérios utilizados pelo CDC para diagnóstico sorológico de DL falham para a abordagem laboratorial da DLS. Desta forma, a FMUSP (Faculdade de Medicina da USP), pioneira na pesquisa de DLS, realiza ELISA e WB simultaneamente nos casos suspeitos. Para o diagnóstico da DLS são consideradas as manifestações clínicas e os aspectos epidemiológicos. Os testes sorológicos apesar de relevantes não fornecem diagnóstico conclusivo (YOSHINARI *et al.*, 2010; MIZIARA *et al.*, 2018). Os ensaios sorológicos para identificação de anticorpos contra *B. burgdorferi* foram otimizados pelo Laboratório de Investigação em Reumatologia da FMUSP com o intuito de melhorar a sensibilidade do teste. Portanto, os procedimentos laboratoriais e interpretação do WB diferem significativamente daqueles adotados no hemisfério norte (MANTOVANI *et al.*, 2007). O WB é considerado positivo quando quatro ou mais bandas de IgG ou duas ou mais bandas de IgM, ou pelo menos duas bandas de IgG e uma de IgM são visualizadas no teste (SHINJO *et al.*, 2009).

O critério diagnóstico da doença de Lyme-Símile compreende três parâmetros maiores e três menores. Os parâmetros maiores são: 1) dados epidemiológicos positivos no início da doença; 2) sorologia positiva para *B. burgdorferi* G 39/40 de origem norte-americana (ELISA ou WB) e 3) presença de EM ou qualquer manifestação sistêmica (articular, neurológica, cardíaca ou ocular). Os parâmetros menores são: 1) sintomas de fadiga crônica durante pelo menos seis meses; 2) presença de estruturas semelhantes a espiroquetas no sangue periférico observadas em microscopia de campo escuro e 3) episódios recorrentes de sintomas cutâneos ou sistêmicos. O diagnóstico da doença de Lyme-Símile é considerado positivo na presença de três parâmetros maiores ou dois parâmetros maiores associados a dois parâmetros menores (MANTOVANI *et al.*, 2007).

Como acontece no diagnóstico da DL do hemisfério norte, Gouveia *et al.* (2010) demonstraram que os testes sorológicos no Brasil apresentavam reação cruzada (falso positivo para *B. burgdorferi*) para as seguintes doenças: reumáticas ou autoimunes (18,3%), leptospirose (6,6%), dengue (3,3%), meningoencefalite tuberculosa (3,3%)

e outras incluindo febre maculosa brasileira, HIV, salmonelose, meningococcemia, meningite pneumocócica, meningite por *Toxocara canis*, meningite por herpes vírus, meningite associada a mastoidite e piomiosite tropical.

No Brasil, a presença de anticorpos anti-*Borrelia burgdorferi* s.l. foram detectados em diferentes espécies de animais domésticos (cães, bovinos e equinos) e silvestres (marsupiais e roedores). Esses animais podem representar os hospedeiros reservatórios e de manutenção da DLS (MANTONDON *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2016; SOCOLOSKI *et al.*, 2018). A prevalência variou entre as regiões brasileiras chegando a 86,8% em cães acautelados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) no Rio de Janeiro (SANTOS, 2008; CORDEIRO *et al.*, 2012; PRADO *et al.*, 2017).

Apesar das evidências clínicas e sorológicas em humanos e animais no Brasil, o agente etiológico não foi cultivado e identificado em fluidos biológicos, mesmo quando biópsias de pele de pacientes com DLS foram utilizadas para cultura (YOSHINARI, 2009; SHINJO *et al.*, 2009).

Buscando esclarecer o agente etiológico e a epidemiologia da DLS no Brasil, testes moleculares (Nested-PCR), utilizando alvos específicos (*flgE* e região espaçadora intergênica 5S *rrf* -23S *rrl*), demonstraram a presença de DNA com elevada homologia com *B. burgdorferi* s.l., *B. garinii* e *B. burgdorferi* s.s. em amostras humanas (soro e sangue), de animais domésticos (bovinos) e carrapatos do gênero *Rhipicephalus* e da espécie *Dermacentor nitens* (MANTOVANI *et al.* 2012; GONÇALVES *et al.*, 2013a; GONÇALVES *et al.*, 2013b; LOPES *et al.*, 2017).

Apesar desses achados, mais estudos em humanos, hospedeiros e vetores são necessários para delinear a presença desses patógenos no Brasil e compreender o ciclo de transmissão da DLS (GONÇALVES *et al.*, 2015), pois uma das hipóteses para as particularidades clínicas, microbiológicas e laboratoriais é a existência de uma espiroqueta com características morfológicas e genéticas específicas que se adaptou as condições de biodiversidade e clima locais, e que tenha se originado da *B. burgdorferi* devido as passagens pelo trato digestivo de carrapatos exóticos brasileiros (YOSHINARI *et al.*, 2010; MIZIARA *et al.*, 2018).

Desafios para saúde pública e pesquisa científica brasileira

Como marco na pesquisa da DLS, a partir de 2013 iniciaram na América do Sul, os primeiros registros de diferentes haplótipos de *B. burgdorferi* s.l. infectando carrapatos *Ixodes* spp no Uruguai (BARBIERI *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2014), Argentina (NAVA *et al.*, 2014), Chile (INOVA *et al.*, 2014) e mais recentemente no

sul do Brasil (DALL'AGNOL *et al.*, 2017; MUNÕZ-LEAL *et al.*, 2020). No estudo de Dall'Agnol *et al.* (2017), realizado entre 2014 e 2016, foi pesquisado carrapatos *Ixodes* spp. provenientes de roedores silvestres e da vegetação em 11 municípios do Rio Grande do Sul, dos quais uma larva e uma ninfa de *Ixodes longiscutatus* apresentaram teste positivo para *Borrelia* spp. Através da análise filogenética do fragmento *flaB* foi identificado a *Borrelia* sp. haplótipo Pampa, sendo esta, a primeira evidência de circulação de *B. burgdorferi* s.l. em vetor clássico, carrapatos do gênero *Ixodes* spp., no Brasil. Até uma nova genoespécie "*Candidatus Borrelia ibitipoquensis*", relacionada a *B. valaisiana* foi caracterizada em *I. paranaensis* também no Sul do Brasil (MUNÕZ-LEAL *et al.*, 2020). Porém, ambas espécies de *Ixodes* relatadas acima não são antropofílicas. Oliveria *et al.*, (2018a) destaca a possibilidade de que a translocação de vetores infectados ou a migração de aves com bacteremia provenientes de áreas endêmicas para o Brasil possam ser responsáveis por infecções humanas de Borreliose de Lyme, enquanto Dall'Agnol *et al.*, 2017 relata que a falta de maiores informação sobre *B. burgdorferi* s.l. em carrapatos no Brasil pode ser devido à ausência de um programa de vigilância ou pesquisas com foco na detecção de *Borrelia* spp.

Diante dos questionamentos e evidências sobre a ocorrência DLS, Oliveira *et al.* (2017) analisando dados do Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) do SUS (Sistema Único de Saúde), observaram que durante os anos de 2009 a 2016 foram realizados 4.078 testes para investigação da DLS, solicitados por 5,02% (280-5570) dos municípios brasileiros. Casos reagentes foram detectados por WB (67,89%) e ELISA (32,10%) em 1,92% (107-5570) dos municípios brasileiros, com destaque para os estados do Paraná, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul e Tocantins. Os autores chamam a atenção para a necessidade de pesquisas, intervenções e vigilância epidemiológica nessas áreas. Neste mesmo período, amostras de soro, sangue total e líquido cefalorraquidiano de 1.543 pacientes com suspeita de DLS foram submetidos a 4.708 exames (ELISA e/ou WB), dos quais 221 (14,3%) pacientes foram positivos para um ou ambos os testes sorológicos. Quando os critérios de diagnóstico do CDC foram levados em consideração apenas 0,02% (3/1543) correspondiam a DL (OLIVERIA *et al.*, 2018b). Estas informações evidenciam à conscientização e o envolvimento da classe médica na detecção e investigação laboratorial dos casos suspeitos da DLS. No entanto, destaca-se a necessidade de envolvimento do governo brasileiro em promover uma melhor qualificação dessas suspeitas clínicas e melhoria das informações epidemiológicas ajudando a compreender os casos da DLS (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Cameron (2016) identifica que os desafios vividos no Brasil com a DLS lembram os mesmos enfrentados nos Estados Unidos com a DL para obter conhecimento dessa doença de estimativas subestimadas e com potencial de causar manifestações clínicas debilitantes. E que os brasileiros com DLS estão lutando para vencer os mesmos

obstáculos. No Brasil, é necessário à implementação de políticas públicas de saúde para o diagnóstico e prevenção da borreliose humana e estudos para melhor compreensão da distribuição, patogenicidade, potenciais animais reservatórios e vetores dos atuais haplótipos sul-americanos de *B. burgdorferi* s.l. circulantes e sua associação com a DLS brasileira (DALL'AGNOL *et al.*, 2017).

REFERÊNCIAS

AZULAY, R. D.; ABULAFIA, L.; SODRE, C. S. Lyme disease in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal Dermatology**, v. 30, n. 8, p. 569-571, 1991.

BARBIERI, A. M.; *et al.* *Borrelia burgdorferi* sensu lato infecting ticks of the Ixodes ricinus complex in Uruguay: first report for the Southern Hemisphere. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**, v.13, n. 3, p. 147-53, 2013.

BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. Biology of *Borrelia* Species. **Microbiology Reviews**, v. 50, n. 4, p. 381-400, 1986.

BAMM, V. V.; *et al.* Lyme Disease Frontiers: Reconciling *Borrelia* Biology and Clinical Conundrums. **Pathogens**, v. 8, n 4, p. 299, 2019.

BAUM, J. Lyme disease in the USA. **Review of Rheumatology**. v. 64, p. 200-201, 1997.

BHATE, C.; SCHWARTZ, R. A. Lyme disease: Part I. Advances and perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 64, n. 4, p. 619-636, 2011.

BRANDÃO, C.A. **Pesquisa de anticorpos anti-Borrelia e Anti-Babesia em soro de doadores de sangue**. 2007. Dissertação de Mestrado (Ciências da Saúde). Faculdade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.

BORCHERS, A. T.; KEEN, C. L; HUNTLEY, A. C.; GERSHWIN, M. E. Lyme disease: A rigorous review of diagnostic criteria and treatment. **Journal of Autoimmunity**, v. 57, p. 82-115, 2014.

BURGDORFER, W.; BARBOUR, A. G.; HAYES, S. F. Lyme disease: a tick borne spirochetosis? **Science**, 216, p.1317-1319, 1982.

CARVALHO, L. A.; *et al.* *Borrelia burgdorferi* sensu lato infecting *Ixodes auritulus* ticks in Uruguay. **Experimental and Applied Acarology**. v. 80, n. 1, p. 109-125, 2020.

CASJENS, S.; *et al.* A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. **Molecular Microbiol**, p. 490-516, 2000.

CASJENS, S. R.; *et al.* Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 6, p. 1489-1490, 2011.

CDC - Centre for Disease Control and Prevention. Recommendations for Test Performance and Interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. MMWR Morbidity and Mortality *Weekly Report*. v. 44, n 31, p. 590-591, 1995. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00038469.htm>. Acesso em: 06 dez. 2020.

CDC - Centre for Disease Control and Prevention. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/lyme/diagnostesting/index.html>. Acesso em: 06 dez. 2010.

CHARON, N.; GOLDSTEIN, S. Genetics of motility and chemotaxis o a fascinating group of bacteria: the spirochetes. **Annual Review of Genetics**, p. 47-73, 2002.

CHOMEL B. Lyme disease. **Revue scientifique et technique**, v. 34, n. 2, p. 569-576, 2015.

CORDEIRO, M.; MEIRELES, G. J. S.; SOUZA, M.; FONSECA, A. H. Soroprevalência para *Borrelia* spp. em cães no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 3, p. 251-256, 2012.

CORRADI, D.A.; CARVALHO, V.M.; COUTINHO, S.D. Anticorpos para *Borrelia burgdorferi* em indivíduos que trabalham com animais silvestres. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinário e Zootecnia**. v. 58, n. 5, p. 966-968, 2006.

COSTA I.P.; *et al.* Doença de Lyme em Mato Grosso do Sul: relato de três casos clínicos, incluindo o primeiro relato de meningite de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina São Paulo**. v. 51, n. 5, p. 253-257, 1996.

CUTLER S.; *et al.* A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* - a human health risk? **Euro Surveill**, v. 24, n. 18, 2019.

DALL'AGNOL, B.; *et al.* *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes longiscutatus* ticks from Brazilian Pampa. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 8, p. 928-932, 2017.

DAS, S.; *et al.* Development of a sensitive molecular diagnostic assay for detecting *Borrelia burgdorferi* DNA from blood of Lyme disease patients by digital PCR. bioRxiv, **PLOS ONE**, p. 01-26, 2020.

DESSAU R. B.; *et al.* To test or not to test? Laboratory support for the diagnosis of Lyme borreliosis: a position paper of ESGBOR, the ESCMID study group for Lyme borreliosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 2, p. 118-124, 2018.

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. A systematic literature review on the diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis. Stockholm: ECDC; 2016.

ELDIN, C.; *et al.* Review of European and American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 49, p. 121-132, 2019.

FANG, L.; *et al.* "Emerging tick-borne infections in mainland China: an increasing public health threat." **The Lancet Infectious diseases**, v. 15, n. 12, p. 1467-1479, 2015.

FLORES, F. S.; *et al.* *Borrelia* genospecies in *Ixodes* sp. cf. *Ixodes affinis* (Acari: Ixodidae) from Argentina. **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 11; n. 6, p. 101546, 2020.

FRANCA, I. Borreliose de Lyme: Uma introdução à doença. **Trabalhos da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venerologia**, v. 58, p. 11-39, 2000.

FRANKE, J.; HILDEBRANDT, A.; DORN, W. Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes – Updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, p. 11-25, 2013.

FRASER C.; *et al.* Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. **Nature**, v. 390, p. 580-586, 1997.

FUKUNAGA, M.; *et al.* Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Iowa, v. 46, n. 4, p. 898-905, 1996.

GAUDITANO, G.; *et al.* Síndrome de Lyme-*símile* ou complexo infecto-reacional do carrapato-Síndrome de Baggio-Yoshinari. **Revista Paulista de Reumatologia**. v. 4, p. 16-17, 2005.

GERN L. Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. **Current problems in dermatology**, v. 37, p. 18-30. 2009.

GONÇALVES, D. D.; *et al.* Zoonoses in humans from small rural properties in Jataizinho, Parana, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 125-131, 2013a.

GONÇALVES, D.D.; CARREIRA, T.; NUNES, M. *et al.* First record of *Borrelia burgdorferi* B31 strain in *Dermacentor nitens* ticks in the northern region of Parana (Brazil). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 883-887, 2013b.

GONÇALVES, D.D.; MOURA, R.A.; NUNES, M.; CARREIRA, T.; VIDOTTO, O.; FREITAS, J.C.; VIEIRA, M.L. **Brazilian Journal of Microbiology** *Borrelia burgdorferi* sensu lato in humans in a rural area of Paraná State, Brazil. v.46(2):571-5, 2015.

HATCHETTE, T. F; DAVIS, I.; JOHNSTON, B. L. Lyme disease: clinical diagnosis and treatment. **Canada Communicable Disease Report**, v. 40, p. 11, 2014.

HALPERIN, J. J.; *et al.* Practice parameter: Treatment of nervous system Lyme disease (an evidence-based review). **Neurology**, v. 69, p. 91-102, 2007.

HAUSER, U.; LEHNERT, G, WILSKE, B. Validity of interpretation criteria for standardized western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, p. 2241-2247, 1999.

KARESH, W. B.; *et al.*, Wildlife trade and global disease emergence. **Emerging Infectious Disease**. v. 11, n. 7, p. 1000-1002, 2005.

IVANOVA, L. B.; TOMOVA, A.; GONZALES-AXUÑA, D. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. **Environ Microbiol**, p.1069-1080, 2013.

ISSAKAINEN, J.; GNEHM, H. E.; LUCCHINI, G. M.; ZBINDEN, R. Value of clinical symptoms, intrathecal specific antibody production and PCR in CSF in the diagnosis of childhood lyme neuroborreliosis. **Klinische Padiatrie**, v. 208, n. 3, p. 106-109, 1996.

KARAMI, A. Molecular Biology of *Borrelia burgdorferi*. In **Lyme Disease**. Dr. Ali Karami (ed.). InTech China, p. 01-26. 2012.

KOEDEL, U.; FINGERLE, V.; PFISTER, H. W. Lyme neuroborreliosis - epidemiology, diagnosis and management. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 8, p. 446-456, 2015.

KOEDEL, U.; PFISTER, H. W. Lyme neuroborreliosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, 101-107, 2017.

KRUPKA, M.; Biological aspects of Lyme disease spirochetes: Unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky*, v. 151, n. 2, p. 175-186, 2007.

KUGELER, K. J.; FARLEY, G. M.; FORRESTER, J. D.; MEAD, P. S. Geographic distribution and expansion of human Lyme Disease, United States. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 8, p. 1455-1457, 2015.

LAGER, M. Molecular and Serological Tools for Clinical Diagnostics of Lyme Borreliosis - Can the Laboratory Analysis Be Improved? PhD dissertation. Linköping: Linköping University Electronic Press (Linköping University Medical Dissertations), 114p, 2020.

LANTOS, P. M.; *et al.* Final report of the Lyme disease review panel of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, p. 01-05, 2010.

LANTOS, P. M.; *et al.* Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA), American Academy of Neurology (AAN), and American College of Rheumatology (ACR): 2020 Guidelines for the Prevention, Diagnosis and Treatment of Lyme Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, p. 1-48, 2021.

LEBECH, A. M. Polymerase chain reaction in diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections and studies on taxonomic classification. *APMIS Suppl*, 105, p. 01-40, 2002.

LOPES, F. A.; *et al.* Molecular evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients in Brazilian central-western region. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 57, n. 6, p. 641-645, Dec. 2017.

LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=borrelia>. Acesso em: 30 novembro. 2020.

MAJEROVÁ, K.; *et al.* Hedgehogs, Squirrels, and Blackbirds as Sentinel Hosts for Active Surveillance of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* Complex in Urban and Rural Environments. **Microorganisms**, v.8, p.1908. 2020.

MANNELLI, A.; *et al.* 2012. Inventory of available data and data sources and proposal for data collection on vector-borne zoonoses in animals. Supporting Publications 234. *European Food Safety Authority (EFSA). External Scientific Report*, v. 9, n. 3, p. 189, 2012.

MANTOVANI E.; *et al.* Introducing Lyme Disease Like Syndrome or Lyme Disease Imitator Syndrome. Is it Borreliosis or a new Brazilian Tickborne Disease? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 40, p. 443-56, 2007.

MANTOVANI, E.; *et al.* Amplification of the *flgE* gene provides evidence for the existence of a Brazilian borreliosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 54, p.153–158, 2012.

MONTANDON, C. E. *et al.* Evidence of *Borrelia* in wild and domestic mammals from the state of Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, v. 23, n. 2, p. 287-290, 2014.

MARGOS, G.; VOLLMER, S. A.; OGDEN, N. H.; FISH, D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection, Genetics and Evolution*. v. 11, p. 1545–1563, 2011.

MARQUES, A. R. Lyme Neuroborreliosis. Continuum (Minneapolis, Minn). Dec;21(6 Neuroinfectious Disease). p. 1729-44, 2015.

MEAD, P. S. Epidemiology of Lyme Disease. *Infectious Disease Clinics of North America*, Philadelphia, v. 29, n. 2, p.187-210, June 2015.

MEAD,P.;PETERSEN,J.;HINCKLEY,A.UpdatedCDCrecommendationforserologic diagnosis of Lyme disease. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 68, p. 703, 2019.

MIZIARA, C.S.M.G; GELMETI SERRANO, V. A.; YOSHINARI, N. Passage of *Borrelia burgdorferi* through diverse Ixodid hard ticks causes distinct diseases: Lyme borreliosis and Baggio-Yoshinari syndrome. *Clinics*, São Paulo, v. 73, p. 394, 2018.

MYGLAND, A.; *et al.* European Federation of Neurological Societies. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *European Journal of Neurology*. v. 17, n. 1, p. 8-16, 2010.

MONTIEL, N.J., BAUMGARTEN, J.M., SINHA, A.A. Lyme disease part II: clinical features and treatment. *Cutis*. v. 69, p. 443-8, 2002.

MUÑOZ-LEAL, S.; *et al.*, “*Candidatus* *Borrelia ibitipoquensis*,” a *Borrelia valaisiana*-Related Genospecies Characterized from *Ixodes paranaensis* in Brazil. ***Microbial Ecology***, v. 80, p. 682–689, 2020.

NASCIMENTO, D.A.; *et al.* Serosurvey of *Borrelia* in dogs, horses, and humans exposed to ticks in a rural settlement of southern Brazil. ***Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*** = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria., v. 25, n. 4, p. 418-422, 2016.

NAVA, S.; *et al.* ***Borrelia* infection in *Ixodes pararicinus* ticks (Acari: Ixodidae) from northwestern Argentina.** *Acta Tropica*, v. 139, p. 1-4, 2014.

NIAID: Nation Institute Allergy and Infectious Diseases. Current Efforts in Lyme Disease Research, 2019 Update. p.14. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/sites/default/files/NIAIDLymeReport.pdf>. Acesso em: 19 de novembro de 2020.

OGDEN, N.H.; *et al.* “Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada.” ***Applied and environmental microbiology***. vol. 74, n. 6, p. 1780-90, 2008.

OLIVEIRA. S.V.; *et al.* Geographical distribution of Lyme-like borreliosis in Brazil: Hot spots for research and surveillance. ***Journal of Parasitic Disease: Diagnosis and Therapy***, v. 2, n. 1, p. 1-2, 2017.

OLIVEIRA, S. V.; *et al.* Evidência sorológica da doença de Lyme e possível introdução de *Borrelia* ao longo das rotas de aves migratórias no Brasil. ***Vector Biology Journal***, v. 3, p. 1, 2018a.

OLIVEIRA S.V; FACCINI-MARTÍNEZ Á. A.; CERUTTI Jr. C. Lack of serological evidence for Lyme-like borreliosis in Brazil, ***Travel Medicine and Infectious Disease***, v. 26, p. 62-63, 2018b.

PARRY, N. Canine borreliosis: epidemiology, pathogenesis, clinical signs, and diagnostics. ***Companion Animal***, v. 21, n. 6, p. 392-397, 2016.

PFISTER, H. W.; RUPPRECHT, T. A. Clinical aspects of neuroborreliosis and post-Lyme disease syndrome in adult patients. ***International Journal of Medical Microbiology***. v. 40, p. 11-6, 2006.

PICKEN, R. N. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme Disease and North American Relapsing Fever. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 1, p. 99-114, Jan. 1992.

PIESMAN, J.; GERN, L. *Lyme borreliosis in Europe and North America*. **Parasitology**, 129(7), S191-S220, 2004.

PRADO, R. F. S.; *et al.* Soroprevalência de anticorpos homólogos antiBorrelia burgdorferi em equinos de uso militar no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v.24, n. 2, 2017.

PRITT, B. S.; *et al.* "Identification of a novel pathogenic Borrelia species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetemia: a descriptive study." **The Lancet. Infectious diseases**, v. 16, n. 5 p. 556-564, 2016.

RADOLF, J. D.; CAIMANO, M. J.; STEVENSON, B.; HU, L. T. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 87-99, 2012.

RADULOVIC, Z.; *et al.* Detection of Borrelia-specific 16S rRNA sequence in total RNA extracted from Ixodes ricinus ticks. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 4, p. 862-867, 2010.

RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; GRUBHOFFERA, L.; OLIVER JR, J. H. Updates on Borrelia burgdorferi sensu lato complex with respect to public health. **Ticks and Tick-borne Diseases**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 123-128, Sept. 2011.

ROSA, P.; TILLY, K.; STEWART, P. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. **Nature reviews Microbiol**, v. 3, p. 129-43, 2005.

ROSTOFF, P.; *et al.* Lyme carditis: Epidemiology, pathophysiology, and clinical features in endemic areas. **International Journal of Cardiology** .v. 27, p. 231-234, 2009.

SAL, M. L. *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook basal body structure. **Journal of Bacteriology**, p. 1912-1921, 2008.

SANTOS, M.; JÚNIOR, V. H.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; TALHARI, S. Borreliose de Lyme. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.85 n.6, Rio de Janeiro, 2010.

SANTOS, V. G. Aspectos clínicos e laboratoriais da Cinomose, Ehrlichiose e Borreliose em cães (*Canis familiaris, linnaeus, 1758*) naturalmente infectados. Dissertação (Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, p. 58, 2008.

SCHNEIDER, C. Quantitative serological antibody testing for suspected neuroborreliosis. **Journal of Neurology**. v. 267, n. 5, p. 1476-1481, 2020.

SHINJO, S. K.; *et al.* Manifestações neurológicas na síndrome de Bagio-Yoshinari (Síndrome Brasileira semelhante á doença de Lyme). **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 49, n. 5, p. 492-505, 2009.

SINGH, S. K.; GIRSCHICK, H. J. Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. **Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 9, p. 575-583, 2004.

SOCOLOSKI, S. N. G.; *et al.* Epidemiological investigation of *Borrelia burgdorferi* in horses in the municipality of Sinop-MT, Brazil. SOCOLOSKI, S. N. G.; *et al.* **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, n. 4, p. 831-836, 2018.

SOARES, C. O.; ISHIKAWA, M. M.; FONSECA, A. H.; YOSHINARI, N. H. Borrelioses, Agentes e Vetores. **Pesquisa Veterinária Brasileira**; v. 20, p. 1-19, 2000.

SONENSHINE, D.; ROE, R. **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, v. 1, 2014.

STANEK, G.; STRLE, F. Lyme borreliosis. **The Lancet**, v. 362, p. 1639-1647, 2003.

STANEK, G.; WORMSER, G. P.; GRAY, J.; STRLE, F. Lyme borreliosis. **The Lancet**, v. 379, p. 461-473, 2012.

STANEK G.; *et al.* Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 1, p. 69-79, 2011

STANEK G.; *et al.* European Union Concerted Action on Risk Assessment in Lyme Borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. **Wiener klinische Wochenschrift**. v. 108, p. 741-747, 1996.

STANEK G.; *et al.* Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 1, p. 69-79, 2011.

STEERE A. C., *et al.* Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. **Arthritis Rheumatology**. v. 27, p. 7-17, 1977.

STEERE, A. C. Lyme disease. **The New England Journal of Medicine**. v. 345, n. 2, p. 115-125, 2001.

STEERE, A. C.; COBURN, J.; GLICKSTEIN, L. The emergence of Lyme disease. **Journal of clinical Invest.** v. 113, n. 8, p. 1108-1132, 2004.

STRLE, F.; STANEK, G. Clinical Manifestations and Diagnosis of Lyme Borreliosis. Lipsker, D.; Jaulhac, B. [Current Problems in Dermatology] **Lyme Borreliosis**. v. 37, p. 51-110. 2009.

TALHARIS, S.; TALHARI, A.; FERREIRA, L. C. L. Eritema crônico migrans, eritema migratório, doença de Lyme ou borreliose de Lyme. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v. 67, n. 5, p. 205-209, 1992.

TSAO, J. Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, p. 36, 2009.

WANG, G.; SCHWARTZ, I. Genus II - Borrelia. Em N. R. Krieg, J. T. Staley, D.R. Brown, B. P. Hedlund, B. J. Paster, N. L. Ward, . . . W. B. Whitman, Bergey's Manual of Systematic: The Bacteroides, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. (pp. 484-498). Springer, 2011.

WANG G.; *et al.* Molecular Typing of Borrelia burgdorferi. **Current Protocols in Microbiology**, v. 34, p. 12C.5.1-12C.5.31, 2014.

WILSKE B.; FINGERLE V. Patient mit fraglicher Lyme-Borreliose. Welche Laborparameter sichern Ihren klinischen Verdacht? [Patient with questionable Lyme borreliosis. Which laboratory parameters validate your clinical suspicion?]. **MMW Fortschritte der Medizin**. v. 144, n. 22, p. 29-32, 2002.

VAN HOUT, M. C. The Controversies, Challenges and Complexities of Lyme Disease: A Narrative Review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, v. 21, n. 1, p. 429, 2018.

XU, Y.; KODNER, C.; COLEMAN, L.; JOHNSON, R. Correlation of plasmids with infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto type strain B31. **Infection and Immunity**, p. 3870- 3876, 1996.

YOSHINARI, N. H.; *et al.* Doença de Lyme: Relato de um caso observado no Brasil. **Revista do Hospital de clínicas da faculdade de medicina de São Paulo.** v. 48, n. 44, p. 170-174, 1993.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONALDI, V. L. N. Perfil da borreliose de Lyme no Brasil. **Revista do Hospital de clínicas da faculdade de medicina de São Paulo.** v. 52, p. 111-117, 1997.

YOSHINARI, N. H. Doença de Lyme-*simile* no Brasil. **Revista da associação nacional de clínicos veterinários de pequenos animais.** v. 26, p. 13-15, 2001.

YOSHINARI, N. H.; *et al.* Doença de Lyme-*simile* Brasileira ou Síndrome Baggio-Yoshinari: Zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. **Revista da associação médica Brasileira.** v. 56, n. 3, p. 363-369, 2010.

YOSHINARI, N. H. Uma longa jornada para entender a *Borrelia burgdorferi* no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia.** v. 49, n. 5, p. 483-6. São Paulo, 2009.

ASPECTOS CLÍNICOS, MICROBIOLÓGICOS E MOLECULARES ASSOCIADOS À INFECÇÕES POR *Klebsiella pneumoniae*

Pablo Antony Silva dos Santos

Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará (UEPA), Belém, Pará, Brasil.

E-mail: antonnypablo@gmail.com

Karla Valéria Batista Lima

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: karlalima@iec.gov.br

Yan Corrêa Rodrigues

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará (UEPA), Belém, Pará, Brasil.

E-mail: yan.13@hotmail.com

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DE INFECÇÕES POR *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* pertence à grande família Enterobacteriaceae, sendo *K. pneumoniae* a espécie de maior relevância clínica do gênero (VUOTTO *et al.*, 2014). Tratam-se de bastonetes Gram-negativos com uma proeminente cápsula mucoide polissacarídica que cobre toda a superfície da célula, aeróbios facultativos, mas com um crescimento mais significativo em condições aeróbias, não esporulados e cujo tamanho varia de 0,3 a 1 μ de diâmetro e 0,6 a 6 μ de comprimento. São imóveis e produzem

colônias grandes e gomosas quando cultivadas em placas com nutrientes (SCARPATE & COSSATIS, 2009; MARTÍNEZ *et al.*, 2004).

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista associado a diferentes tipos de infecções, incluindo pneumonia, infecção do trato urinário, infecções de sítio cirúrgico, bacteremia e meningite. Indivíduos imunocomprometidos ou que apresentem fatores de risco possuem maior suscetibilidade a infecções e quadro clínicos graves. Historicamente, *K. pneumoniae* também destaca-se entre os principais patógenos associados a casos de infecções comunitárias no Brasil e no mundo (SANTOS *et al.*, 2020; AZEVEDO *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2016; PACZOSA E MECSAS, 2016).

Características inerentes ao microrganismo, como resistência e virulência, estão relacionadas com aumento das taxas de morbidade e mortalidade, tempo de internação e custos para tratamento (OLIVEIRA *et al.*, 2010; MATOS *et al.*, 2016; MATOS *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020). *K. pneumoniae* é um dos mais importantes patógenos associados a infecções nosocomiais, com elevado potencial para causar morbidade e mortalidade severa, e relatos cada vez mais frequentes de surtos hospitalares causados por esse agente justificam sua monitoração no ambiente hospitalar, principalmente pelo aumento da resistência antimicrobiana e disseminação de cepas virulentas (*World Health Organization* - WHO, 2014; SCARPATE; COSSATIS, 2009; PEREIRA, 2003).

É um dos patógenos mais frequentemente associados a infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS), onde sua transmissão ocorre por contato direto, principalmente, com profissionais da saúde, ou por uma fonte comum, podendo ocorrer em qualquer local do hospital e afetar pacientes clínicos, cirúrgicos, pediátricos e neonatais (SCARPATE & COSSATIS, 2009; HLOPE & MCKERROW, 2014).

Pacientes com diferentes prognósticos e condições clínicas, incluindo pacientes imunossuprimidos e que possuem doenças de base como diabetes mellitus ou obstrução pulmonar crônica, possuem maior risco de infecções severas causadas por *K. pneumoniae*. Além do mais, procedimentos externos como ventilação mecânica e cateter venoso central podem funcionar como facilitadores de infecção por microrganismos patogênicos oportunistas e agravar quadros infecciosos (SCARPATE & COSSATIS, 2009; HLOPE & MCKERROW, 2014; EFFAH, SUN e WU, 2020). Recentemente, SANTOS ET AL. (2020) destacou a vulnerabilidade no sistema imunológico que pacientes oncológicos apresentam, principalmente pelo uso de vários medicamentos para o tratamento, os torna um grupo suscetível a desenvolver infecções por *K. pneumoniae*.

De acordo com NAVON-VENEZIA, KONDRATYEVA e CARATTOLI (2017), *K. pneumoniae* é responsável por cerca de um terço de todas as infecções causadas por bactérias Gram-negativas, incluindo infecções do trato urinário, cistite, pneumonia,

infecções de ferida cirúrgica, endocardite e septicemia. Infecções mais graves como pneumonia necrosante, abscessos hepáticos piogênicos e endoftalmite endógena também foram relatados anteriormente (PODSCHUN e ULLMANN, 1998). O aumento drástico na incidência de cepas de *K. pneumoniae* com características de multidroga resistência (MDR), resistência extensiva (XDR) e/ou hipervirulentas causam grande impacto econômico devido aos custos de tratamento, hospitalização prolongada, e consequente elevação das taxas de morbidade e mortalidade (GISKE *et al.*, 2008; EFFAH, SUN e WU, 2020).

RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Segundo OPAS (2017), a resistência antimicrobiana é considerada atualmente uma crise global. Dentre as principais causas da resistência antimicrobiana, encontram-se o uso indiscriminado e inadequado de antibióticos nos hospitais, o uso de antibióticos pela população sem prescrição e acompanhamento médico, interrupção do tratamento antes do tempo de prescrição, falta de barreiras regulatórias, venda ilegal dos antibióticos em alguns países, e o atraso no diagnóstico das infecções bacterianas (ESTRELA, 2018; MOBARKI, ALMERABI, HATTAN, 2019).

A incidência de infecções microbianas vem aumentando nas últimas décadas, levando ao uso contínuo e descontrolado de drogas antimicrobianas para prevenção e tratamento em várias partes do mundo. Isso, por sua vez, causou o surgimento de cepas de diferentes microrganismos com resistência a múltiplas drogas (MDR e/ou XDR), com destaque para *K. pneumoniae*. (TANWAR *et al.*, 2014). Portanto, as infecções causadas por *K. pneumoniae* multirresistentes representam um sério problema de saúde pública e um grande desafio terapêutico (KEYNAN & RUBINSTEIN, 2007).

Em 2014, a *World Health Organization* (WHO) incluiu *K. pneumoniae* como um dos patógenos bacterianos prioritários pertencentes ao grupo ESKAPE, que inclui as espécies *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* Tais patógenos apresentam elevadas taxas de resistência a um amplo espectro de antibióticos, com destaque para os beta-lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, necessitando de estabelecimento de medidas para controle de disseminação e desenvolvimento de novos antibióticos (FAIR e TOR, 2014; DSOUZA *et al.*, 2017). Essa resistência limita a escolha de antibioticoterapia adequada para infecções comunitárias, e principalmente, IRAS (DAVIES E DAVIES, 2010).

As altas proporções de resistência à cefalosporinas de 3ª geração relatadas para *K. pneumoniae* sinalizam para um aumento na utilização de carbapenêmicos para o tratamento de graves infecções associadas a essa bactéria, sendo esta classe

de antibióticos um dos últimos recursos para o tratamento de pacientes em diversos países, com destaque para o Brasil. Além disso, carbapenêmicos são antibióticos de custo elevado, podendo não estar disponível em locais com recursos limitados, e sua utilização indiscriminada também tende a acelerar ainda mais desenvolvimento de resistência. De grande preocupação é o fato de que cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos foram identificadas na maioria dos países, com taxas de resistência de até 54% na América latina e Europa (TOLLENTINO *et al.*, 2011; WHO, 2014). No Brasil, o Programa Nacional de Monitoramento da Resistência Bacteriana relatou taxas anuais crescentes de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos em isolados de infecções da corrente sanguínea (ANVISA, 2017).

A resistência antimicrobiana está comumente relacionada à disseminação de plasmídeos transmissíveis e à aquisição de genes de resistência que normalmente ocorrem por transferência horizontal de genes, incluindo entre bactérias de diferentes gêneros, agravando o problema da resistência aos antibióticos em *K. pneumoniae* (LIVERMORE, 2003; MUNOZ-PRICE & QUINN, 2009; DERAKHSHAN *et al.*, 2016).

Um dos principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* é a produção de carbapenemase. As cepas de *K. pneumoniae* que hidrolisam antibióticos como imipenem e meropenem são classificadas como classe A, B ou D, de acordo com as diferenças genéticas (Ambler) ou como 2f, 3a ou 3b, de acordo com sua preferência de substrato e estrutura molecular (Bush- Jacoby-Medeiros) (YANG *et al.*, 2013; DJAHMI *et al.*, 2014; ABBAS e JARALLAH, 2017). Uma variedade de carbapenemases de classe A molecular de Ambler foi descrita; alguns são codificados em um cromossomo (NMC, SME e IMI), enquanto outros são codificados em plasmídeos (KPC e GES) (DIENE e ROLAIN, 2014; ABBAS e JARALLAH, 2017).

As carbapenemases KPC são as enzimas de classe A molecular de Ambler mais frequentes (DJAHMI *et al.*, 2014). Essas enzimas hidrolisam a maioria dos beta-lactâmicos e têm o maior potencial de disseminação; em parte porque estão localizados em plasmídeos, mas principalmente porque são encontrados com frequência em *K. pneumoniae*, que é notória por sua capacidade de acumular e transferir determinantes de resistência. Até o momento, existem 24 variantes conhecidas de KPC, e KPC-2 e KPC-3 são as mais frequentes em todo o mundo (PEIRANO *et al.*, 2009; MAYA *et al.*, 2013; DJAHMI *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2016; CHAKRABORTY, 2016; ARAÚJO *et al.*, 2018). No Brasil, o primeiro tipo KPC foi relatado em 2006 (MAYA *et al.*, 2013). *K. pneumoniae* KPC-2 foi encontrada em isolados clínicos recuperados de dois hospitais no Rio de Janeiro, Brasil (PEIRANO *et al.*, 2009). Recentemente, *K pneumoniae* produtora de KPC-2 foi isolada de amostras nosocomiais de várias regiões brasileiras (ARAÚJO *et al.*, 2018).

As carbapenemases de classe B foram identificadas, principalmente, em membros da família *Enterobacteriaceae* e incluem VIM, IMP e o grupo NDM (New Delhi metalo- β -lactamase) emergente (JEONG *et al.*, 2015). Entre eles, NDM é uma das carbapenemases mais clinicamente significativas em *K. pneumoniae*. Até o momento, 15 variantes NDM foram detectadas (JEONG *et al.*, 2015), e a maioria delas se originou na Ásia (NORDMANN e POIREL, 2014). Desde 2008, *K. pneumoniae* produtoras de NDM se espalharam rapidamente em muitos países (BERRAZEG *et al.*, 2014). Além das carbapenemases do tipo NDM, os grupos IMP e VIM também foram detectados em isolados de *K. pneumoniae* ao redor do mundo, mas outras carbapenemases, como GIM-1, KHM-1 e SPM-1, de alta prevalência no Brasil, não foram relatadas. *K. pneumoniae* produtoras de IMP e VIM se espalharam na Europa e na Ásia, mas raramente foram relatados em outras regiões, como América e África (LEE *et al.*, 2016).

As β -lactamases de classe D são denominadas de oxacilinas (OXAs), pois geralmente hidrolisam isoxazolilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina e dicloxacilina) (JEONG *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016). De mais de 400 β -lactamases de Classe D, apenas algumas variantes realmente possuem atividade carbapenemase. Com base em sua sequência de aminoácidos, carbapenemases de classe D foram recentemente reclassificadas em 12 subgrupos: OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-134a, OXA-143, OXA-211, OXA-213, OXA-214, OXA-229 e OXA235 (JEONG *et al.*, 2015). Entre eles, apenas vários subgrupos, como OXA-23, OXA-48, OXA-51 e OXA-58, são relatados em *K. pneumoniae*. OXA-48 é a carbapenemase de classe D mais eficiente para degradação do imipenem e é uma das carbapenemases de classe D mais prevalentes em *K. pneumoniae* (JEONG *et al.*, 2015). OXA-48 foi identificado pela primeira vez em *K. pneumoniae* na Turquia em 2003, e até agora, 10 variantes do gene blaOXA-48 foram identificadas (JEONG *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016).

Além dos mecanismos enzimáticos de resistência, os sistemas de bombas de efluxo e alteração na permeabilidade de porinas são importantes causas da resistência aos antibióticos em *K. pneumoniae*. Os sistemas de bomba de efluxo em *K. pneumoniae* incluem os sistemas AcrAB e mdtK, que pertencem às bombas de efluxo da família *Resistance Nodulation Division* (RND) e *Multi Antimicrobial Extrusion* (MATE), respectivamente. A bomba AcrAB-TolC é composto por um canal de membrana externa (TolC), um transportador secundário localizado na membrana interna (AcrB), e um componente periplasmático (AcrA). (DU *et al.*, 2014). Esta bomba é responsável pela resistência a aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina e cloranfenicol em vários isolados MDR. (OKUSU *et al.*, 1996; EFFAH, SUN e WU, 2020). As bombas MATE, como o sistema mdtK, também transportam alguns desses agentes antimicrobianos.

(SUN; DENG & YAN, 2014). Porinas como OmpK35 e OmpK36 são cruciais para a penetração de antibióticos nas células e para a suscetibilidade a cefalosporinas e carbapenêmicos. (SHI *et al.*, 2013).

VIRULÊNCIA E PATOGÊNESE

Embora a resistência aos antimicrobianos seja um fator complicador para o tratamento de quadro de infecções, particularmente por *K. pneumoniae*, sua patogenicidade é multifatorial, dependendo da regulação e expressão de fatores de virulência (PODSCHUN e ULLMANN, 1998; HUYNH *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2020). Recentemente, novas variantes hipervirulentas de *K. pneumoniae* (hvKP) emergiram no Pacífico Asiático e infecções associadas a tais cepas cada vez mais reconhecidas como um problema clínico crítico em todo o mundo. Variantes hvKP podem causar infecções nosocomiais e adquiridas na comunidade com elevadas taxas de mortalidade, incluindo bacteremia, abscessos hepáticos, endoftalmite e meningite. As características relacionadas a maior virulência quando comparada a cepas clássicas de *K. pneumoniae* são a habilidade de adquirir ferro com mais eficiência, aumento na produção de cápsulas e mecanismos de adesão (SHON *et al.*, 2013; NAMIKAWA *et al.*, 2019).

Os fatores de virulência são moléculas expressas que contribuem para o aumento da patogenicidade ou a “capacidade de causar infecção” por diferentes agentes patogênicos (RODRIGUES *et al.*, 2020). *K. pneumoniae* possui uma ampla gama de mecanismos de virulência que contribuem para a sua patogenicidade, dentre elas se destacam a presença de adesinas, cápsula, lipoproteínas de membrana externa (LPS), toxinas e sideróforos (PACZOSA, MECSAS, 2016; FERREIRA *et al.*, 2019).

Em *K. pneumoniae*, os genes *fimH* e *mrkD* codificam as fímbrias tipo 1 e tipo 3 que atuam como adesinas, mediando a ligação do patógeno com as células e tecidos alvo, além de promover e facilitar o desenvolvimento de biofilme, desempenhando um papel fundamental na colonização e persistência de infecções (ALCÁNTAR-CURIEL *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2017; FU *et al.*, 2018). Embora estudos tenham relatado que isolados clínicos de *K. pneumoniae* normalmente expressam adesinas fimbriais tipo 1 e tipo 3, diferenças na detecção desses genes foram observadas em outros estudos (SAHLY *et al.*, 2008; STRUVE *et al.*, 2009; WASFI *et al.*, 2016).

MrkD participa especificamente da ligação à matriz extracelular, facilitando a aderência de *K. pneumoniae* ao tecido danificado e revestindo dispositivos hospitalares internos, como cateteres urinários e tubos endotraqueais (PACZOSA E MECSAS, 2016). As fímbrias do tipo 3 desempenham um papel essencial na formação de biofilme de *K. pneumoniae* e também podem mediar a ligação de *K. pneumoniae* às células

endoteliais e às células epiteliais do trato respiratório e urinário (DI MARTINO *et al.*, 2003; SCHROLL *et al.*, 2010; HORNICK *et al.*, 1992; TARKKANEN *et al.*, 1997). As fímbrias do tipo 1 são expressas em 90% dos isolados de *K. pneumoniae* clínicos e ambientais; no entanto, seu papel preciso na produção de biofilmes permanece obscuro (STAHLHUT *et al.*, 2009; PACZOSA e MECSAS, 2016). As fímbrias do tipo 1 expressas por *K. pneumoniae*, em particular, causam infecções do trato urinário e podem desempenhar um papel importante na colonização do intestino e na liberação, entrada e persistência de *K. pneumoniae* em casos de pneumonia associadas a ventilação mecânica (KOLLEF, 2004; STRUVE *et al.*, 2008; KALANURIA *et al.*, 2014).

Além disso, a presença dos genes *mrkD* e *fimH-1* foi anteriormente associada a *K. pneumoniae* KPC-positiva (DE CÁSSIA *et al.*, 2014). Embora pouco se saiba sobre as características potenciais de virulência da *K. pneumoniae* produtora de KPC (ANDRADE *et al.*, 2014; LIU Y. *et al.*, 2014), estudos relataram que isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL são capazes de produzir mais adesinas fimbriais, são mais invasivas e são mais resistentes ao efeito bactericida do sistema imune humano (SAHLY *et al.*, 2004). Portanto, os dados previamente apresentados ilustram a importância da avaliação desses fatores de virulência.

A cápsula é um dos fatores de virulência mais importantes em *K. pneumoniae*, principalmente por auxiliar na evasão do sistema imunológico durante a infecção, protegendo as bactérias da opsonização e da fagocitose (MARTIN, BACHMAN, 2018; HSU *et al.*, 2011). São descritos mais de 77 sorotipos capsulares distintos, sendo o sorotipo K1 e K2 os mais patogênicos e prevalentes em infecções humanas causadas por *K. pneumoniae*. O sorotipo K1 predomina na Ásia e o sorotipo K2 tem sido frequentemente isolado na América e na Europa (CATALÁN; GARZA; BARRIOS, 2017). O sorotipo K1 associou-se à quadros graves, como bacteremia, abscessos hepáticos metastáticos e endoftalmite séptica em Taiwan e na Coreia (RUSSO; MARR, 2019).

Nas últimas duas décadas, ao contrário das cepas “clássicas” de *K. pneumoniae* (cKP), novas variantes hipervirulentas de *K. pneumoniae* (hvKP) exibindo o fenótipo de hiper mucoviscosidade surgiram como um patógeno clinicamente significativo causando infecções altamente invasivas, como abscessos hepáticos, tanto em indivíduos saudáveis como imunocomprometidos (PROKESCH *et al.*, 2016). A cepa hvKP é hiper mucoviscosa, normalmente devido à superprodução de sua cápsula de polissacarídeo (PACZOSA e MECSAS, 2016). É importante notar que os genes que codificam o regulador do fenótipo mucoide A (*rmpA*), K1 ou K2 foram altamente associados com a variante hvKP que causa infecção comunitárias graves, e emergiu como *K. pneumoniae* hipervirulenta resistente a carbapenêmicos (CR-HvKP) em

ambientes nosocomiais (SHON *et al.*, 2013; LIU YM *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015; ZHANG Y. *et al.*, 2016; ZHANG R. *et al.*, 2016; FANG *et al.*, 2004; YEY *et al.*, 2007; ARENA *et al.*, 2017; MARTIN e BACHMAN, 2018).

O ferro é um nutriente necessário como cofator para várias enzimas, envolvidas por exemplo no transporte de elétrons, na biossíntese de aminoácidos e DNA, além de ser essencial para o crescimento bacteriano e desempenha um papel crucial na progressão da infecção, incluindo infecções por *K. pneumoniae*. Porém, esse nutriente não está disponível de imediato, visto que o hospedeiro, durante uma infecção, utiliza o ferro como parte da resposta imune inespecífica para restringir o crescimento de possíveis patógenos. Em contrapartida, *K. pneumoniae* desenvolveu mecanismos para competir pelo ferro das células hospedeiras através da síntese de compostos que possuem afinidade pelo ferro, chamados sideróforos (CLEGG, MURPHY, 2016; FERREIRA *et al.*, 2016; PACZOSA, MECSAS, 2016).

Sideróforos são moléculas quelantes de ferro de alta afinidade que são essenciais para o crescimento, replicação e virulência bacteriana (LAWLOR *et al.*, 2007; BACHMAN *et al.*, 2015; HOLDEN e BACHMAN, 2015). O repertório de sideróforos difere entre diferentes cepas de *K. pneumoniae*; assim, o papel de cada sideróforo no potencial de virulência pode variar (PACZOSA e MECSAS, 2016; LAM *et al.*, 2018). Genes associados a sideróforos, como aerobactina sintase (*iucC*), Enterobactina (bacteriocina) (*entB*), Yersiniabactina (*ybtS*) e Transporte de ferro e fosfotransferase (*kfu*) são amplamente disseminados entre cepas de *K. pneumoniae* (COMPAIN *et al.*, 2014). Embora *K. pneumoniae* secrete uma combinação específica de sideróforos, que pode afetar tecidos específicos, disseminação sistêmica e sobrevivência do hospedeiro, o efeito dessas moléculas no hospedeiro durante a infecção ainda é controverso, porém de grande relevância clínica (HOLDEN *et al.*, 2016).

A primeira linha de defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores inclui a atividade bactericida sérica. Embora o mecanismo de resistência sérica não esteja totalmente esclarecido, em *K. pneumoniae* o gene plasmidial *traT* codifica uma lipoproteína de membrana externa, e cepas carreadoras desse marcador possuem um alto potencial invasivo devido a inativação dos fatores séricos de defesa por essa invasina e bloqueio da cascata metabólica mediada pelo sistema complemento (EL FERTAS-AISSANI, *et al.*, 2013; MONTENEGRO *et al.*, 1980).

Os genes *hlyA* e *cnf-1* são geralmente co-expressos quando detectados, pois estão localizados na mesma ilha de patogenicidade e estão associados à codificação de toxinas. A alfa-hemolisina, codificada pelo gene *hlyA*, é uma toxina citolítica formadora de poros que disponibiliza nutrientes como ferro para o metabolismo bacteriano através da destruição de hemácias, enquanto que CNF-1, uma toxina ativadora de

GTPase é responsável pela necrose tecidual. Enquanto que a presença do marcador associados a atividade hemolítica *hylA* seja amplamente relatada em isolados de *K. pneumoniae*, ainda há poucos relatos presença de *cnf-1* (EL FERTAS-AISSANI, *et al.*, 2013; GUDOGAN *et al.*, 2011).

MÉTODOS DE TIPAGEM MOLECULAR

Investigações epidemiológicas nosocomiais contribuem para o entendimento da dinâmica de transmissão e infecção por microrganismos de alto grau de patogenicidade e resistência. A aplicação de métodos de tipagem molecular, ou genotipagem, permite a determinação de relações genéticas entre os micro-organismos, estudos de estrutura populacional, identificação de surtos e suas fontes de transmissão (FEIL & ENRIGHT, 2004).

Diversas abordagens experimentais, variando de análises de *locus* únicos até mapeamento e sequenciamento de genoma completo, têm sido utilizadas para definição da diversidade genética de *K. pneumoniae*, incluindo: eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (ESPINAL *et al.*, 2004; KIRATISIN *et al.*, 2008), *Multilocus Sequencing Typing* (MLST) (SUH *et al.*, 2010; ELHANI *et al.*, 2010; HRABA *et al.*, 2009), perfil de plasmídeo (PRODINGER *et al.*, 1996), ribotipagem (GAZOULI *et al.*, 1997) e métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), como detecção de elementos extragenômicos repetitivos palindrômicos (rep-PCR) (ESPINAL *et al.*, 2004; VERSALOVIC *et al.*, 1991; MANTILLA *et al.*, 2004) e *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC-PCR) (OTMAN *et al.*, 2007; GAZOULI *et al.*, 1997; PADILLA *et al.*, 2003).

A tipagem molecular baseada em MLST é a abordagem mais amplamente utilizada (MAIDEN, 2006). O MLST é totalmente padronizado para diversas espécies bacterianas, e é capaz de detectar variações genéticas filogeneticamente informativas em genes constitutivos estritamente conservados (*housekeeping genes*). Portanto, este esquema é capaz de diferenciar cepas e de rastrear de forma precisa a história clonal global de diferentes espécies. Em *K. pneumoniae*, a abordagem é baseada no sequenciamento de sete *loci* (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* e *tonB*) proposta por DIANCOURT *et al.* (2005).

Surtos hospitalares causados por *K. pneumoniae* estão principalmente associados a disseminação de cepas denominadas de clones de alto risco e carreadoras de plasmídeos de resistência epidêmicos (MATHERS *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016). Em geral, esses clones pertencem ao grupo clonal 258 (CG258) que compreende 43 linhagens (*sequence types* – ST) diferentes. Estudos de epidemiologia molecular demonstram que os ST 11, 258, 340, 437 e 512 compreendem a maioria dos isolados

do CG258 carreadores do gene *bla*KPC (CHEN *et al.*, 2014; BOWERS *et al.*, 2015; GAIARSA *et al.*, 2015). Além disso, os plasmídeos de resistência epidêmica que abrigam as variantes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC} são comuns entre os membros dos STs de CG258 (MATHERS *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016).

A técnica de eletroforese em gel de campo pulsado – PFGE – é considerada o padrão ouro para tipagem molecular de isolados de *K. pneumoniae*, devido a sua utilidade na diferenciação de cepas patogênicas e no monitoramento de sua distribuição na comunidade (GAUTOM, 1997). Esta técnica teve vários tipos e variantes desde que foi usada pela primeira vez em 1984 por Schwartz e Cantor (CARDOZO-BERNAL, *et al.*, 2013), mas segue os mesmos fundamentos, que consistem em uma macro restrição usando enzimas de restrição que reconhecem sítios específicos de DNA bacteriano, formando fragmentos de DNA com alto peso molecular (10Kb) (CARDOZO-BERNAL *et al.*, 2013; ASHAYERI-PANAH *et al.*, 2013), que migrarão em um gel de agarose impulsionado por campos elétricos que podem ou não ser constantes e que podem mudar alternadamente formando pulsos (CARDOZO-BERNAL *et al.*, 2013).

PFGE tornou-se um método padrão entre laboratórios de saúde pública, devido à sua acurácia e reprodutibilidade (GAUTOM, 1997; GARAIJAR *et al.*, 2000). Este método permite a diferenciação de isolados caracterizados como idênticos por outras análises como sorotipagem, fagotipagem, ribotipagem, análise de plasmídeos, entre outras (MURAKAMI *et al.*, 2001; LAPUZ *et al.*, 2007).

Desse modo, a técnica PFGE foi adquirindo modificações ao longo dos anos, como modificações nas características do equipamento, na ordem dos eletrodos, na reorientação dos campos elétricos e na sua intensidade, o que se refletirá nos resultados, tanto na intensidade dos padrões de banda e na reprodutibilidade dos resultados (CARDOZO-BERNAL *et al.*, 2013).

Devido à estabilidade dos perfis gerados e ao seu poder discriminatório, o método se mostra adequado para a criação de bases de dados, uma tendência atual na pesquisa epidemiológica (LACONCHA *et al.*, 1998; OLIVE & BEAN, 1999). As bases de dados podem armazenar os perfis genéticos submetidos, permitindo um acompanhamento epidemiológico não apenas em escala regional, mas também a nível nacional ou internacional (SWAMINATHAN *et al.*, 2001).

A etapa anterior ao PFGE consiste na restrição do DNA por meio de enzimas, que irão reconhecer sítios de restrição específicos que estão pouco presentes no genoma bacteriano, produzindo fragmentação do DNA bacteriano (ASHAYERI-PANAH *et al.*, 2013).

As enzimas utilizadas para restrição de DNA dependem da porcentagem de C e G do genoma bacteriano (CARDOZO-BERNAL *et al.*, 2013), neste caso *Klebsiella*

pneumoniae apresenta uma porcentagem de C + G de 57,5% (LIU *et al.*, 2012), motivo pelo qual é proposta a utilização da enzima XbaI, que possui sítios de reconhecimento ricos em C + G, o que produziria um padrão de bandas entre 15 a 20, o que facilitaria a análise dos resultados obtidos (ASHAYERI -PANAHA *et al.*, 2013; CARDOZO-BERNAL *et al.*, 2013).

Os usos desta técnica no campo microbiológico têm demonstrado alto poder discriminatório, uma vez que é utilizada em casos de surtos causados por microrganismos de importância clínica (ASHAYERI-PANAHA *et al.*, 2013; TIJET *et al.*, 2014), como é o caso de *Klebsiella pneumoniae*. Além disso, esta técnica permite identificar as fontes de infecção, transmissão cruzada de microrganismos e uma interpretação dos resultados com base em programas de bioinformática, que nos ajudam a estabelecer relações clonais entre as cepas analisadas (CARDOZO-BERNAL *et al.*, 2013).

REFERÊNCIAS

ABBAS FM and JARALLAH EM (2017). Detection of OXA-23 among carbapenem-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Hilla. **JUBPAS**, v. 25, p. 435–445.

ALCÁNTAR-CURIEL, M. D.; BLACKBURN, D.; SALDAÑA, Z.; GAYOSSO-VÁZQUEZ, C.; IOVINE, N. M.; DE LA CRUZ, M. A., *et al.* (2013). Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. **Virulence**, v. 4, p. 129–138. doi: 10.4161/viru.22974.

ANDRADE, B. G. N.; DE VEIGA RAMOS, N.; MARIN, M. F. A.; FONSECA, E. L.; and VICENTE, A. C. P. (2014). The genome of a clinical *Klebsiella variicola* strain reveals virulence-associated traits and a pl9-like plasmid. **FEMS Microbiol. Lett.** 360, p. 13–16. doi: 10.1111/1574-6968.12583.

ANVISA (2017). Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº. 16: Avaliação dos Indicadores Nacionais Das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana do ano de 2016. **Singapore: IRAS.**

ARAÚJO, B. F; FERREIRA M. L; CAMPOS, P. A; ROYER S, *et al.* (2018). Hypervirulence and biofilm production in KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 isolated in Brazil. **J. Med. Microbiol**, v. 67: p. 523–528. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000711>.

ARENA, F.; HENRICI, DE ANGELIS, L.; D'ANDREA, M. M.; CANNATELLI, A.; FOSSATI, L., *et al.* (2017). Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with hypermucoviscous phenotype: a case report and literature review. **Virulence**, v. 8, p. 1900–1908. doi: 10.1080/21505594.2017.1286439.

ASHAYERI-PANAH, M.; EFTEKHAR, F.; MOBARAK GHAMSARI, M.; PARVIN, M.; & MEHDI FEIZABADI, M. (2013). Genetic profiling of *Klebsiella pneumoniae*: comparison of pulsed field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 7, p. 823–828.

AZEVEDO, P. A. A., *et al.* (2019). Molecular characterisation of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to CC258 isolated from outpatients with urinary tract infection in Brazil. *Journal of global antimicrobial resistance*, v. 18, p. 74–79.

BACHMAN, M. A.; BREEN, P.; DEORNELLAS, V.; MU, Q.; ZHAO, L.; WU, W. *et al.*, (2015). Genome-wide identification of *Klebsiella pneumoniae* fitness genes during lung infection. **mBio** 6:e00775. doi: 10.1128/mBio.00775-15.

BERRAZEG, M.; DIENE, S.; MEDJAHED, L.; PAROLA, P.; DRISSI, M.; RAOULT, D., *et al.* (2014). New Delhi Metallo-b-lactamase around the world: an eReview using Google Maps. **Euro. Surveill.** 19:20809. doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.20.20809.

BOWERS, J. R.; KITCHEL, B.; DRIEBE, E. M.; MACCANNELL, D. R.; ROE, C.; LEMMER, D., *et al.* (2015). Genomic analysis of the emergence and rapid global dissemination of the clonal group 258 *Klebsiella pneumoniae* Pandemic. **PLoS One** 10:e0133727. doi: 10.1371/journal.pone.0133727.

CARDOZO-BERNAL, Á. M.; RAMÓN, L. F.; POUTOU-PIÑALES, R. A.; CARRASCAL-CAMACHO, A. K.; & ZAMBRANO, D. C. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la 69 diferenciación molecular de *Listeria monocytogenes*. **Universitas Scientiarum**, v. 18(2), p. 203–222. doi:10.11144/Javeriana.SC18-2.egcp

CATALÁN-NÁJERA, J. C.; GARZA-RAMOS, U.; BARRIOS-CAMACHO, H. (2017). Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella spp.* phenotypes? **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1111–1123.

CHAKRABORTY, A. K. (2016). In silico analysis of hotspot mutations in the bacterial NDM1 and KPC-1 carbapenemases that cause severe MDR phenotypes. **Biochem. Biotechnol. Res.** v. 4, p. 17–26.

CHEN, L.; MATHEMA, B.; CHAVDA, K. D.; DELEO, F. R.; BONOMO, R. A.; KREISWIRTH, B. N.; et al. (2014). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. **Trends Microbiol.** v. 22, p. 686–696. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.003.

CLEGG, S.; MURPHY, C. N. (2016). Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology Spectrum**, v. 4, p. 1.

COMPAIN, F. et al. (2014). Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4377–4380.

DAVIES, J.; AND DAVIES, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 74, p. 417–433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10

DE CÁSSIA, A. M. R.; DE BARROS, E. M.; LOUREIRO, N. G.; DE MELO, H. R.; MACIEL, M. A.; and SOUZA, A. C. L. (2014). Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. **Curr. Microbiol.** v. 69, p. 824–831. doi: 10.1007/s00284-014-0662-0

DERAKHSHAN, S.; PEERAYEH, S. N.; AND BAKHSHI, B. (2016). Association between presence of virulence genes and antibiotic resistance in clinical *Klebsiella Pneumoniae* isolates. **Lab. Med.** v. 47, p. 306–311. doi: 10.1093/labmed/lmw030.

DIANCOURT, L. et al. (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4178-4182.

DIENE, S. M. and ROLAIN, J. M. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 20, p. 831–838. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12655>.

DIMARTINO, P.; CAFFERINI, N.; JOLY, B.; and DARFEUILLE-MICHAUD, A. (2003). *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Res. Microbiol.** v. 154, p. 9–16. doi: 10.1016/S0923-2508(02)00004-9.

DJAHMI, N.; DUNYACH-REMY, C.; PANTEL, A.; DEKHIL, M., et al. (2014). Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. **BioMed. Res. Int.** 2014: 305784. <https://doi.org/10.1155/2014/305784>.

DSOUZA, R.; PINTO, N. A.; HWANG, I.; CHO, Y.; YONG, D.; CHOI, J., *et al.* (2017). Panel strain of *Klebsiella pneumoniae* for beta-lactam antibiotic evaluation: their phenotypic and genotypic characterization. **PeerJ** 5:e2896. doi: 10.7717/peerj.2896.

DU, D. *et al.* (2014). Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. **Nature**, v. 509, p. 512–515. doi: 10.1038/nature13205.

EFFAH, C. Y.; SUN, T.; LIU, S., *et al.* (2020). *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** v. 19, p. 1. <https://doi.org/10.1186/s12941-019-0343-8>.

EL FERTAS-AISSANI, R. *et al.* (2013). Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie Biologie**, v. 61, n. 5, p. 209–216.

ELHANI, D; BAKIR, L; AOUNI, M; *et al.* (2010). Molecular epidemiology of extended-spectrum b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a university hospital in Tunis, Tunisia, 1999–2005. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, p. 157–164.

ESPINAL, P; MANTILLA, J; SAAVEDRA, C; LEAL, A; ALPUCHE, C; VALENZUELA, E. (2004). Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasa de espectro extendido. **Biomédica**, v. 24(3) p. 252-261.

ESTRELA, T. S. (2018). Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. **Saúde e Política Externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde** (1998- 2018), p. 307–327.

FAIR, R. J.; and TOR, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st Century. **Perspect. Med. Chem.** v. 6, p. 25–64. doi: 10.4137/PMC.S14459.

FANG, C. T.; YI-PING, C.; CHIA-TUNG, S.; CHANG, S. C.; and WANG, J. T. (2004). A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. **J. Exp. Med.** v. 199, p. 697–705. doi: 10.1084/jem.20030857.

FEIL, E. J.; ENRIGHT, M. C. (2004). Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 308-313.

FERREIRA, D. *et al.*, (2016). Targeting human pathogenic bacteria by siderophores: A proteomics review. **Journal of Proteomics**, v. 145, p. 153–166.

FERREIRA, R. L.; DA SILVA, B. C. M.; REZENDE, G. S.; NAKAMURA-SILVA, R.; PITONDO-SILVA, A.; CAMPANINI, E. B.; BRITO, M. C. A.; DA SILVA, E. M. L.; FREIRE, C. C. M.; CUNHA, A. F. and PRANCHEVICIUS, M. C. (2019). High Prevalence of MultidrugResistant *Klebsiella pneumoniae* Harboring Several Virulence and β -Lactamase Encoding Genes in a Brazilian Intensive Care Unit. **Front. Microbiol.** 9:3198. doi: 10.3389/fmicb.2018.03198

FU, L.; HUANG, M.; ZHANG, X.; YANG, X.; LIU Y.; ZHANG, L., *et al.* (2018). Frequency of virulence factors in high biofilm formation blaKPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals. **Microb. Pathog.** v. 116, p. 168–172. doi: 10.1016/j.micpath.2018.01.030.

GAIARSA, S.; COMANDATORE, F.; GAIBANI, P.; CORBELLA, M.; VALLE, C. D.; EPIS, S., *et al.* (2015). Genomic epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* in Italy and novel insights into the origin and global evolution of its resistance to carbapenem antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 59, p. 389–396. doi:10.1128/AAC.04224-14.

GARAZAR, J.; LÓPEZ-MOLINA, N.; LACONCHA, I.; BAGGESEN, D.L.; REMENTERIA, A.; VIVANCO, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I. (2000). Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Applied and Environmental Microbiology, Washington**, v. 66, n.12, p.5273-5281.

GAUTOM, R. K. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2977-2980.

GAZOULI, M; KAUFMANN, M; TZELEPI, E; DIMOPOULOU, H; PANIARA, O; TZOUVELEKIS, LS. (1997). Study of an Outbreak of Cefoxitin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a General Hospital. **J Clin Microbiol**, v. 35, p. 508– 510.

GISKE, C. G.; MONNET, D. L.; CARS, O.; CARMELI, Y. (2008). Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 52(3):8, p. 13–21.

HLOPE, S. T. & MCKERROW, N. H. (2014). Hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* infections in a paediatric intensive care unit. **South African Journal of Child Health.** v. 8 (4), p. 125–128.

HOLDEN, V. I.; and BACHMAN, M. A. (2015). Diverging roles of bacterial siderophores during infection. **Metalomics.** v. 7, p. 986–995. doi: 10.1039/c4mt00333k.

HOLDEN, V. I.; BREEN, P.; HOULE, S.; DOZOIS, C. M.; and BACHMAN, M. A. (2016). *Klebsiella pneumoniae* siderophores induce inflammation, bacterial dissemination, and HIF-1^α stabilization during pneumonia. **mBio**. v. 7:e0139, p. 7–16. doi: 10.1128/mBio.01397-16.

HORNICK, D. B.; ALLEN, B. L.; HORN, M. A.; and CLEGG, S. (1992). Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. **Infect. Immun**, v. 60, p. 1577–1588.

HRABA, J; EMPEL; BERGEROVA, T *et al.* (2009). International Clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with Extended-Spectrum β -Lactamases in a Czech Hospital. **J Clin Microbiol**, v. 47(10), p. 3353-3357.

HSU, C. R.; LIN, T. L.; CHEN, Y. C.; CHOU, H. C.; and WANG, J. T. (2011). The role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. **Microbiology**, v. 157, p. 3446–3457. doi: 10.1099/mic.0.050336-0.

HUYNH, D. T. N.; KIM, Ah-Young; KIM, Young-Rok. (2017). Identification of Pathogenic Factors in *Klebsiella pneumoniae* Using Impedimetric Sensor Equipped with Biomimetic Surfaces. **Sensors**, v. 17, n. 6, p. 1406.

JEONG, S. H.; LEE, K. M.; LEE, J.; BAE, I. K.; KIM, J. S.; KIM, H. S., *et al.* (2015). Clonal and horizontal spread of the blaOXA-232 gene among *Enterobacteriaceae* in a Korean hospital. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**. v. 82, p. 70–72. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.02.001.

KALANURIA, A. A.; ZAI, W.; and MIRSKI, M. (2014). Ventilator-associated pneumonia in the ICU. **Crit. Care**, v. 18, p. 208. doi: 10.1186/cc13775.

KEYNAN, Y.; RUBINSTEIN, E. (2007). The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. **Int. J. Antimicrob. Agents**. v. 30, n. 5, p. 385–9.

KIRATISIN, P; APISARNTHANARAK, A; LAESRIPA, C; SAIFON, P. (2008). Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, Where the CTX-M Family Is Endemic. **Antimicrob Agents Chemoth**, v. 52(8), p. 2818–2824.

KOLLEF, M. H. (2004). Prevention of hospital-associated pneumonia and ventilator-associated pneumonia. **Crit. Care Med**. v. 32, p. 1396–1405. doi: 10.1097/01.CCM.0000128569.09113.

LACONCHA, I.; LÓPEZ-MOLINA, N.; REMENTERIA, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I.; GARAIZAR, J. (1998). Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. **International Journal of Food Microbiology, Amsterdam**, v. 40, p. 27-34, 1998.

LAPUZ, R.; TANI, H.; SASAI, K.; SHIROTA, K.; KATOH, H.; BABA, E. (2007). An epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* contamination in a rat-infested chicken layer farm, an egg processing facility, and liquid egg samples by pulsed-field gel electrophoresis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 6, p. 649-652.

LAWLOR, M. S.; O'CONNOR, C.; and MILLER, V. L. (2007). Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. **Infect. Immun.** v. 75, p. 1463– 1472. doi: 10.1128/IAI.00372-06.

LEE C-R; LEE J. H; PARK, K. S.; KIM, Y. B.; JEONG, B. C.; and LEE, S. H. (2016). Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. **Front. Microbiol**, v. 7, p. 895. doi: 10.3389/fmicb.2016.00895.

LIU, P.; LI, P.; JIANG, X.; BI, D.; XIE, Y.; TAI, C.; ... Ou, H.-Y. (2012). Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. pneumoniae HS11286, a multidrugresistant strain isolated from human sputum. **Journal of bacteriology**, v. 194(7), p. 1841–2. doi:10.1128/JB.00043-12

LIVERMORE, D. M. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. **Clin Infect Dis.** v. 36, p. S11–S23.

MAIDEN, M. C. J. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 60, p. 561–588.

MANTILLA, J.; GARCÍA, I.; ESPINAL, P.; VALENZUELA, E. (2004). Estandarización y evaluación de tres sistemas de repPCR para la tipificación de *Klebsiella pneumoniae*. **Rev Col Cienc Quím Farm**, v. 33 (1), p. 48-58.

MARTIN, R. M.; and BACHMAN, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Front. Cell Infect. Microbiol**, v. 22, p. 4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004.

MARTIN, R. M.; and BACHMAN, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Front. Cell Infect. Microbiol**, v. 22, p. 4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004.

MARTÍNEZ, J. *et al.* (2004). How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, v. 7 (4), p. 261–268.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; and PITOUT, J. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, p. 565–591. doi: 10.1128/CMR.00116-14.

MATOS, E. C. O. DE; MATOS, H. J. DE; CONCEIÇÃO, M. L.; RODRIGUES, Y. C.; CARNEIRO, I. C. DO R. S.; LIMA, K. V. B. (2016). Clinical and microbiological features of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 305–311.

MATOS, E. C. O.; ANDRIOLO, R. B.; RODRIGUES, Y. C.; LIMA, P. D. L.; CARNEIRO, I. C. R. S.; LIMA, K. V. B. (2018). Mortality in patients with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a meta-analysis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, p. 415–420

MAYA, J. J.; RUIZ, S. J.; BLANCO, V. M.; GOTUZZO, E., *et al.* (2013). Current status of carbapenemases in Latin America. **Expert Rev Anti. Infect. Ther.** v. 11, p. 657–667. <https://doi.org/10.1586/14787210.2013.811924>.

MOBARKI, N.; ALMERABI, B.; HATTAN, A. (2019). Antibiotic Resistance Crisis. **International Journal of Medicine in Developing Countries**, v. 40, n. 4, p. 561–564.

MONTENEGRO, M. A.; BITTER-SUERMAN, D.; TIMMIS, J. K.; AGUERO, M. E.; CABELLO, F. C.; SANYAL S., *et al.* (1980). *traT* gene sequences, serum resistance and pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. **J Gen Microbiol**, v. 131, p. 1511–21.

MUNOZ-PRICE, L. S. & QUINN, J. P. (2009). The Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases: A Tale of Strains, Plasmids, and Transposons. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 1739–1741. doi: 10.1086/648078.

MURAKAMI, K. *et al.* (2001). Environmental survey of *Salmonella* and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan. **Epidemiology and Infection**, v. 126, p. 159-171.

NAMIKAWA, H., *et al.* (2019). Clinical and virulence factors related to the 30-day mortality of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia at a tertiary hospital: a case-control study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 38, n. 12, p. 2291–2297.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 3, p. 252–275.

NORDMANN, P.; and POIREL, L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 20, p. 821–830. doi: 10.1111/1469-0691.12719.

OKUSU, H.; MA, D. & NIKAIDO, H. (1996). AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (MAR) mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 306–308.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology, Washington**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669.

OLIVEIRA, A. C.; CARDOSO, C. S.; MASCARENHAS, D. (2010). Precauções de contato em Unidade de Terapia Intensiva: fatores facilitadores e dificultadores para adesão dos profissionais. **Rev Esc Enferm USP**, v. 44, n. 1, p. 161–165.

OPAS. (2017). OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:omspublica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticosurgente-mente&Itemid=812

OTMAN, J.; PERUGINI, M.; TOGNIM, M.; VIDOTTO, M. (2007). Atypical phenotypic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from an outbreak in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 38, p. 273-277.

PACZOSA, M. K.; and MECSAS, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 80, p. 629–661. doi: 10.1128/MMBR.00078-15.

PADILLA, C.; VENTURA, G. (2003). Genotipificación de aislamientos de *Bartonella bacilliformis* por amplificación de elementos repetitivos mediante el uso de REP-PCR y ERIC-PCR. **Rev Peru Med Expe Salud Pública**, v. 20 (3), p. 128-131.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; PASSOS, V. L. V.; PINTO, M. C. F. G., *et al.* (2009). Carbapenem-hydrolysing b-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 63, p. 265–268. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn484>.

PEREIRA, A., *et al.* (2003). Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, p. 301–8.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. (1998). *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. (1998). *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589–603.

PRODINGER, W.; FILLE, M.; BAUERNFEIND, A. *et al.* (1996). Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta- lactamase: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. **J Clin Microbiol**, v. 34(3), p. 564.

PROKESCH, B. C.; TEKIPPE, M.; KIM, J.; RAJ, P.; TEKIPPE, E. M.; and GREENBERG, D. E. (2016). Primary osteomyelitis caused by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Lancet Infect. Dis.** V, 16, p. e190–e195. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30021-4.

RUSSO, T. A.; MARR, C. M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Clin Microbiol Rev**; p. 32(3).

SAHLY, H.; AUCKEN, H.; BENEDÍ, V. J.; FORESTIER, C.; FUSSING, V.; HANSEN, D. S., *et al.* (2004). Increased serum resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum b-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 48, p. 3477–3482. doi: 10.1123/AAC.48.9.3477-3482.

SAHLY, H.; AUCKEN, H.; BENEDÍ, V. J.; FORESTIER, C.; FUSSING, V.; HANSEN, D. S., *et al.* (2004). Increased serum resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum b-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 48, p. 3477–3482. doi: 10.1123/AAC.48.9.3477-3482.

SANTOS, A. L. S. D.; RODRIGUES, Y.C.; MELO, M.V.H.D.; SILVA DOS SANTOS, P. A.; OLIVEIRA, T. N. D. C.; SARDINHA, D.M.; LIMA, L. N. G. C.; BRASILIENSE, D.M.; LIMA, K. V. B. (2020). First Insights into Clinical and Resistance Features of Infections by *Klebsiella pneumoniae* among Oncological Patients from a Referral Center in Amazon Region, Brazil. **Infect. Dis. Rep.** v. 12, p. 110-120.

SCARPATE, E. C.; COSSATIS, J. J. (2009). A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. **Saúde & Amb.** v. 4(1), p. 1-11

SHAH, R. K.; NI, Z. H.; SUN, X. Y.; WANG, G. Q.; and LI, F. (2017). The determination and correlation of various virulence genes, ESBL, serum bactericidal effect and biofilm formation of clinical isolated classical *Klebsiella pneumoniae* and Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from respiratory tract infected patients. **Pol. J. Microbiol.** v. 66, p. 501-508. doi: 10.5604/01.3001.0010.7042.

SHI, W., *et al.* (2013). Carbapenem and cefoxitin resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains associated with porin OmpK36 loss and DHA-1 beta-lactamase production. **Braz J Microbiol**, v. 44, p. 435-442. doi: 10.1590/s1517-83822013000200015.

SHON, A. S.; BAJWA, R. P.; and RUSSO, T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, p. 107-118. doi: 10.4161/viru.22718.

STAHLHUT, S. G.; TCHESNOKOVA, V.; STRUVE, C.; WEISSMAN, S. J.; CHATTOPADHYAY, S.; YAKOVENKO, O., *et al.* (2009). Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 191, p. 6592-6601. doi: 10.1128/JB.00786-09.

STRUVE, C.; BOJER, M.; and KROGFELT, K. A. (2008). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. **Infect. Immun.** v. 76, p. 4055-4065. doi: 10.1128/IAI.00494-08.

STRUVE, C.; BOJER, M.; and KROGFELT, K. A. (2009). Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. **Infect. Immun.** v. 77, p. 5016-5024. doi: 10.1128/IAI.00585-09

SUH, J.; SON, J.; CHUNG, D.; PECK, K.; KO, K.; SONG, J. (2010). Nonclonal Emergence of Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Blood Samples in South Korea. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54 (1), p. 560-562.

SUN, J.; DENG, Z. & YAN, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, p. 254–267. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>.

SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J.; HUNTER, S. B.; TAUXE, R. V.; CDC PULSENET TASK FORCE. (2001). PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. **Emerging Infectious Diseases, Atlanta**, v. 7, n. 3, p. 382-389.

TANWAR, J.; DAS, S.; FATIMA, Z. & HAMEED, S. (2014). Multidrug Resistance: An Emerging Crisis. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, p. 7. doi: 10.1155/2014/541340.

TARKKANEN, A. M.; VIRKOLA, R.; CLEGG, S.; and KORHONEN, T. K. (1997). Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. **Infect. Immun.** v. 65, p. 1546–1549.

TIJET, N.; SHETH, P. M.; LASTOVETSKA, O.; CHUNG, C.; PATEL, S. N.; & MELANO, R. G. (2014). Molecular Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) - Producing *Enterobacteriaceae* in Ontario, v. 2, p. 2008–2011. doi:10.1371/journal.pone.0116421

TOLLENTINO, F. M.; POLOTTO, M.; NOGUEIRA, M. L.; LINCOPAN, N.; NEVES, P.; MAMIZUKA, E. M.; REMELI, G. A.; DE ALMEIDA, M. T.; RÚBIO, F. G.; NOGUEIRA, M. C. (2011). High prevalence of bla(CTX-M) extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of bla(SHV-12), bla(SHV-31), bla(SHV-38), and bla(CTX-M-15) in Brazil. **Microb. Drug Resist.**, v. 17, n. 1, p. 7–16.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 19(24), p. 6823-6831.

VUOTTO, C. *et al.* (2014). Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3 (3), p. 743–758.

WASFI, R.; ELKHATIB, W. F.; and ASHOUR, H. M. (2016). Molecular typing and virulence analysis of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from Egyptian hospitals. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 38929. doi: 10.1038/srep38929.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization.

YANG, J.; YE, L.; GUO, L.; ZHAO, Q., *et al.* (2013). A nosocomial outbreak of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 19, p. E509–515. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12275>.

YEH, K. M.; KURUP, A.; SIU, L. K.; KOH, Y. L.; FUNG, C. P.; LIN, J. C., *et al.* (2007). Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. **J. Clin. Microbiol.** v. 45, p. 466–471. doi: 10.1128/JCM.01150-06.

YU, J.; TAN, K.; RONG, Z.; WANG, Y., *et al.* (2016). Nosocomial outbreaks of KPC-2 and NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal ward: a retrospective study. **BMC. Infect. Dis.** v. 16: p. 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1870-y>.

ZHANG, R.; LIN, D.; CHAN, E. W.; GU, D.; CHEN, G. X.; and CHEN, S. (2016). Emergence of carbapenem-resistant serotype K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKP) strains in China. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 60, p. 709–711. doi: 10.1128/AAC.02173-15.

ZHANG, Y. W.; ZENG, J.; LIU, W. E.; ZHAO, F.; HU, Z.; ZHAO, C., *et al.* (2015). Emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from clinical infections in China. **J. Infect.** v. 71, p. 553–560. doi: 10.1016/j.jinf.2015.07.010.

ZHANG, Y.; ZHAO, C.; WANG, Q.; WANG, X.; CHEN, H.; LI, H., *et al.* (2016). High Prevalence of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Infection in China: geographic distribution, clinical characteristics, and antimicrobial resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 60, p. 6115–6120. doi: 10.1128/AAC.01127-16.

ZHAO, J. *et al.* (2016). Multilocus sequence types and virulence determinants of hypermucoviscosity-positive *Klebsiella pneumoniae* isolated from community-acquired infection cases in Harbin, North China. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 69, n. 5, p. 357–360.

***Acinetobacter* spp: Aspectos clínicos, epidemiológicos e moleculares**

Danielle Murici Brasiliense

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: daniellemurici@iec.gov.br

Ana Judith Pires Garcia Quaresma

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: anaquaresma@iec.gov.br

Crislaine Seabra Leal

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: crislaineseabra@hotmail.com

CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO

O gênero *Acinetobacter* (do grego *akinetos*- não móvel) pertence à família Moraxellaceae, e é composto por um grupo heterogêneo de bactérias que apresentam morfologia de coco-bacilos Gram-negativos em cultura, com tendência a duplo arranjo, não móveis, estritamente aeróbios, catalase positivo, oxidase negativo, não fermentador da glicose e com conteúdo de guanina-citosina (G+C) variando entre 39% a 47% nas sequências de DNA (MISBAH et al., 2005; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008). Para a maioria das espécies, a temperatura ótima de crescimento é de 33°C a 35°C, entretanto algumas espécies de relevância clínica podem crescer de 37°C a 42°C (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996). *Acinetobacter* spp. é um microrganismo não-fastidioso que apresenta bom crescimento em meios de cultura artificiais utilizados na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica. Em meio de cultura ágar sangue apresentam colônias lisas, cremosas, com coloração branco-acizentadas e em ágar MacConkey colônias levemente rosadas, normalmente cremosas, que podem eventualmente ter aspecto mucoide (DOUGHARI et al., 2011)

Este gênero tem ampla distribuição na natureza, a maioria das espécies são organismos não patogênicos que podem ser encontrados em diversos ambientes ecológicos como solo, água, animais, alimentos, e na microbiota da pele e trato digestivo em humanos saudáveis (JANSSEN et al., 1997; MALTA; RAMOS; NASCIMENTO, 2020). Algumas espécies, como *Acinetobacter baylyi*, *Acinetobacter bouvetii*, e *Acinetobacter grimontii* também já foram descritas em estações de tratamento de esgoto (ATROUNI et al., 2016).

Até a década de 1980, acreditava-se que *Acinetobacter* spp. era saprófita, de baixa virulência e de pouca relevância clínica (BERGOGNE-BÉRÉZIN; TOWNER, 1996). Entretanto, nas últimas décadas, as infecções relacionadas a estes microrganismos aumentaram em frequência e gravidade, e seu significado clínico foi impulsionado por uma marcante capacidade de adquirir determinantes de resistência aos antimicrobianos, em especial a espécie *Acinetobacter baumannii*, considerada um dos patógenos mais relevantes em saúde pública da atualidade. Esta espécie foi incluída pela Sociedade Americana de Doenças Infecciosas no grupo denominado “ESKAPE” (acrônimo para *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter*), em referência aos principais microrganismos que causam infecções relacionadas aos serviços de saúde (IRAS) e que apresentam mecanismos de escape a diversos antimicrobianos (CHANG et al., 2005; FONTANA et al., 2008).

Ao contrário de outras bactérias Gram-negativas, *Acinetobacter* spp. é capaz de sobreviver em ambiente seco e suporta a dessecação, permitindo a permanência do microrganismo em superfícies no ambiente hospitalar por longos períodos, o que potencializa sua capacidade em causar surtos prolongados e de grande abrangência (DOUGHARI et al., 2011). Essa tolerância pode ser devido a diferentes mecanismos, como a super expressão de proteínas envolvidas na resistência aos antimicrobianos, presença de bombas de efluxo, regulação negativa de proteínas envolvidas no ciclo celular, transcrição e tradução, que permite a célula entrar em um estado de latência (ATROUNI et al., 2016).

Recentemente, tem sido demonstrado que o ambiente natural, sob impacto antrópico ou não, pode servir de reservatório para *Acinetobacter* spp. multidroga resistente. O controle da disseminação destes microrganismos tanto em ambientes naturais como no ambiente hospitalar é um grande desafio em saúde pública (ATROUNI et al., 2016).

TAXONOMIA DO GÊNERO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

O gênero *Acinetobacter spp.* tem uma longa história de mudanças e alterações em sua taxonomia. O gênero foi originalmente proposto em 1954, com o objetivo de separar os microrganismos móveis dos não móveis dentro do gênero *Achromobacter*. Entretanto, somente a partir de 1968 o gênero *Acinetobacter spp.* passou a ser reconhecido, após análise fenotípica detalhada realizada por Baumann e colaboradores (BAUMANN, P., DOUDOROFF, M., STANIER, 1968). Finalmente, em 1974, o gênero foi incluso no Manual Bergey de Bacteriologia Sistemática, com uma única espécie, *Acinetobacter calcoaceticus*.

Posteriormente, em 1986, Bouvet e Grimont observaram inconsistências na identificação das espécies por métodos fenotípicos e propuseram uma nova classificação baseada em estudos de hibridização de DNA, onde os grupos com mais de 70% de homologia foram chamados de espécies genômicas (genoespécies), o que permitiu distinguir 12 grupos dentro do gênero *Acinetobacter* (BOUVET; GRIMONT, 1987; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008)

A partir desta classificação, diversos outros estudos taxonômicos foram realizados e novas espécies descritas, demonstrando a diversidade dentro do gênero, que atualmente é composto por mais de 60 espécies válidas (<https://lpsn.dsmz.de/genus/acinetobacter>).

Algumas espécies no gênero *Acinetobacter spp.* apresentam elevada similaridade fenotípica e genotípica, sendo de difícil diferenciação pelos métodos bioquímicos utilizados nos laboratórios clínicos. Um exemplo são as espécies agrupadas no chamado Complexo *Acinetobacter baumannii-Acinetobacter calcoaceticus* (CABC). Originalmente este grupo incluiu quatro espécies: *A. baumannii* (genoespécie 2), *A. pittii* (genoespécie 3), *A. nosocomialis* (genoespécie 13TU) e *A. calcoaceticus* (genoespécie 1). As três primeiras espécies são isoladas com maior frequência em amostras clínicas humanas e estão correlacionadas a infecções em ambiente hospitalar. Já *A. calcoaceticus* é um microrganismo ambiental, comumente isolado do solo e água e raramente envolvido em infecções humanas.

Estudos taxonômicos utilizando hibridização de DNA demonstraram que as espécies que compõem o CABC são mais relacionadas geneticamente entre si em comparação as outras espécies do gênero. Posteriormente, estudos utilizando sequenciamento de genoma completo apoiaram esta visão, demonstrando que o CABC representa um subgrupo filogeneticamente bem definido (clado) dentro do gênero

(Nemec et al., 2015). Recentemente, Nemec e colaboradores (2015) propuseram a inclusão da espécie *A. seifertii* no CABC, linhagens obtidas principalmente de espécimes clínicos humanos (sangue, trato respiratório e ulcera), e algumas linhagens isoladas também de ambiente (água, solo, ambiente hospitalar) (NEMEC et al., 2015). Posteriormente, foi proposto por COSGAYA et al., (2016) a inclusão da espécie *A. dijkshoorniae* obtida de espécimes clínicos diversos no CABC.

A correta identificação das espécies do gênero *Acinetobacter*, especialmente das espécies que compõem o CABC é um grande desafio para os laboratórios de microbiologia clínica. Por outro lado, é fundamental para elucidar as características epidemiológicas e a relevância clínica de cada espécie do gênero. A identificação fenotípica das espécies é bastante complexa e laboriosa, sendo necessários aproximadamente 37 testes fenotípicos. Esta metodologia é inviável para a rotina dos laboratórios clínicos devido ao custo e tempo necessários para realização dos testes (NEMEC; DIJKSHOORN; JEŽEK, 2000).

Atualmente, a maioria dos laboratórios de microbiologia clínica utiliza métodos bioquímicos semi-automatizados, como os sistemas Vitek 2 (BioMerieux), Phoenix (Becton Dickinson) e MicroScan Walkaway (Beckman Colter) na rotina de identificação bacteriana. Entretanto, estes métodos não possuem poder discriminatório suficiente para diferenciar as espécies do CABC, resultando em erros de identificação de até 25% de *Acinetobacter* não-*baumannii* como *A. baumannii* (HIGGINS et al., 2010).

Com o uso de metodologias com maior poder discriminatório a prevalência de outras espécies além de *A. baumannii* como agentes de infecções tem aumentado nos últimos anos, sendo que mais estudos são necessários para melhor elucidar as diferenças nas características epidemiológicas, clínicas e microbiológicas destas espécies (ZHANG; ZHANG; QIAO, 2013).

Nos últimos anos, métodos moleculares vêm sendo propostos na tentativa de suprir as falhas na caracterização das espécies bacterianas do gênero. O primeiro método desenvolvido foi o de hibridização de DNA, utilizado por Bouvet e Grimont em 1986, e considerado por muitos anos como a técnica de referência (BOUVET; GRIMONT, 1987), mas que foi posteriormente substituído por outras metodologias menos laboriosas, como análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), ribotipagem, e sequenciamento parcial ou total de genes como, por exemplo, o gene codificador de RNA ribossômico 16S ou da região intergênica entre os codificadores do RNA ribossômico 16S-23S, e dos genes *rpoB*, *recA* e *gyrB* (HIGGINS et al., 2010; SCOLA et al., 2006a). O sequenciamento do gene de RNA ribossomal 16S tem sido utilizado na identificação e no delineamento de relações filogenéticas bacterianas, entretanto

este marcador não é suficientemente polimórfico para distinguir algumas espécies do gênero *Acinetobacter* (PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008).

O MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight*) é uma técnica baseada em espectrometria de massa, que tem sido utilizada para identificação bacteriana e é baseada primariamente na ionização de proteínas ribossomais. Este método apresenta como vantagens a rapidez, alta sensibilidade e baixo custo, entretanto erros de identificação têm sido descritos em bacilos Gram-negativos não fermentadores (WANG *et al.*, 2014).

A presença do gene *blaOXA-51-like* tem sido proposta como marcador para identificação de *A. baumannii*, por ser intrínseco desta espécie. Entretanto, estudos prévios têm sugerido que a detecção do gene *blaOXA-51-like* pode não ser confiável para identificação da espécie *A. baumannii* por duas razões: (i) o gene pode não ser detectado por reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) em isolados em que estiver interrompido pela presença de sequencias de inserção da família ISAbah; (ii) ou o gene *blaOXA-51-like* pode ser adquirido por outras espécies além de *A. baumannii* por transferência gênica horizontal. Entretanto, os eventos relatados acima permanecem, até o presente momento, raros na literatura, não havendo evidencias suficientes para invalidar o valor da presença do gene *blaOXA-51-like* como marcador genético da espécie *A. baumannii* (Wang *et al.*, 2014).

Vários estudos têm demonstrado a utilidade das sequencias do gene *rpoB* para identificação de diversas espécies bacterianas. La Scola e colaboradores (2006) realizaram o sequenciamento completo do gene *rpoB* de diversas espécies de *Acinetobacter spp.* e evidenciaram a presença de quatro regiões hipervariáveis, duas dentro do gene e duas regiões flanqueadoras. A análise de uma dessas regiões, chamada Zona 1 (350 pares de bases), foi predita por ser confiável para identificação das espécies do CABC (SCOLA *et al.*, 2006a). Dessa forma, o sequenciamento parcial do gene *rpoB* tem sido considerado método de referência para identificação das espécies do gênero *Acinetobacter* (WANG *et al.*, 2014). Este método, entretanto, requer amplificação e sequenciamento de DNA, metodologias geralmente não disponíveis na maioria dos laboratórios clínicos (HIGGINS *et al.*, 2007; SCOLA *et al.*, 2006b).

EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES CAUSADAS POR *Acinetobacter* spp

Infecções causadas por *Acinetobacter baumannii*

As infecções causadas por *Acinetobacter* spp ocorrem em grande maioria no ambiente hospitalar acometendo pacientes imunocomprometidos ou com alguma comorbidade pré-existente. Diferentes fatores favorecem o desenvolvimento dessas infecções nesses pacientes, como o uso de dispositivos médicos invasivos, internação em unidade de terapia intensiva e terapia antimicrobiana prolongada (LUPO; HAENNI; MADEC, 2018). Embora *A. baumannii* não seja considerado um patógeno comunitário, pode ocasionalmente causar bronquite e traqueobronquite em crianças e indivíduos imunocomprometidos. Casos de pneumonia nas regiões da Austrália e Ásia tem sido associado em pacientes com histórico de alcoolismo, fumantes e portadores de Diabetes mellitus (MALTA; RAMOS; NASCIMENTO, 2020).

A espécie de maior relevância clínica, *A. baumannii*, é responsável por causar diversos tipos de infecção, incluindo pneumonia, infecções de pele e de tecidos moles, infecções de feridas, infecções do trato urinário, meningite e infecções de corrente sanguínea. A sua habilidade de colonizar a pele, mucosas e superfícies plásticas facilitam a sua adaptação e persistência no ambiente hospitalar, favorecendo a ocorrência de surtos e o desenvolvimento de infecções nosocomiais de difícil controle, contribuindo para o aumento das taxas de mortalidade que podem variar de 30 a 50% (FONTANA et al., 2008; GAIARSA et al., 2019).

Fatores intrínsecos da espécie como tolerância a dessecação, viabilidade e crescimento em uma ampla faixa de temperatura e pH, além da multirresistência contribui para a disseminação hospitalar. Estudos baseados nas redes de vigilâncias hospitalares observaram que *Acinetobacter* spp foi o responsável por 1,8% de todas as IRAS na Europa e na América Latina. Essa frequência é bem maior em países como China, Tailândia, Taiwan, Vietnã e outros da América do Sul, sendo considerado o patógeno predominante em alguns países. Na Ásia e na América Latina é uma das três causas mais comuns de bacteremia e pneumonia nosocomial. Cerca de 45.000 casos de infecções por este agente são relatados nos Estados Unidos e um milhão de casos globalmente reportado por ano (WONG et al., 2017)

Infecções causadas por outras espécies do gênero *Acinetobacter* spp

Apesar da inegável relevância clínica da espécie *A. baumannii*, outras espécies do gênero vem aumentando em prevalência nos últimos anos como agentes de infecção. A melhora na acuraria dos métodos de identificação das espécies do gênero tem possibilitado reconhecer a relevância clínica destas espécies, erroneamente identificadas como *A. baumannii* por métodos bioquímicos semi-automatizados. Pouco ainda se conhece sobre os fatores de virulência e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos destas espécies, mas os dados existentes demonstram que são mais suscetíveis quando comparadas a *A. baumannii*. Apesar disso, a emergência de isolados de *A. pittii* e *A. nosocomialis* MDR e produtores de carbapenemases tem sido descritos no Brasil e em outros países (BRASILIANENSE et al., 2019).

Outras espécies incluindo *A. lwoffii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. schindleri* e *A. ursingii* também têm sido ocasionalmente reportadas como patógenos. *A. seifertii* é um patógeno emergente na Ásia, geneticamente relacionada com *A. baumannii* e por isso muitas vezes erroneamente identificada como tal. No entanto, análises multivariadas de estudos clínicos e de modelos animais tem demonstrado que *A. baumannii* é a mais virulenta destas espécies (WONG et al., 2017). Nos últimos anos as espécies *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii*, *A. junii*, *A. soli*, *A. ursingii*, *A. bereziniae* e *A. nosocomialis* vem sendo crescentemente identificadas como agentes causadores de infecções e surtos nosocomiais em unidades de terapia intensiva (BARAKA et al., 2021; VISCA; SEIFERT; TOWNER, 2011).

RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência antimicrobiana é um problema de saúde pública mundial responsável por cerca de 700.000 mortes por ano. Nos últimos anos o tratamento das IRAS causadas por *A. baumannii* tem se tornado cada vez mais desafiador devido a emergência de isolados carreando genes de resistência a diferentes antimicrobianos como beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina e macrolídeos (GAIARSA et al., 2019). Aproximadamente 45% dos isolados são considerados multidroga resistentes com taxas superiores a 60% nos Estados Unidos, América Latina e Oriente Médio. Países como a Grécia e Turquia têm reportado taxas acima de 90% de resistência em isolados de *A. baumannii*. As infecções por isolados multidroga resistentes aumentam as taxas de morbidade e mortalidade, prolongam o tempo de

internação e contribuem para a disseminação de patógenos no ambiente hospitalar (DE OLIVEIRA et al., 2020).

Atualmente diferentes mecanismos de resistência antimicrobiana são conhecidos, dentre eles a produção de enzimas inativadoras de fármacos, hiperexpressão de sistemas de efluxo, alteração da permeabilidade da membrana e a alteração dos sítios-alvo. O desenvolvimento destes fenótipos de resistência é resultante principalmente da transferência horizontal de genes. De maior importância clínica e epidemiológica destaca-se a produção de enzimas carbapenemases que inativam a maioria dos betalactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, principais antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções graves por *A. baumannii* (BROVEDAN et al., 2020; SALGADO-CAMARGO et al., 2020).

Resistência aos carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são antimicrobianos da classe dos betalactâmicos da qual também pertencem as penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. O anel beta-lactâmico presente em sua estrutura promove a ligação às proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), importantes para a composição da parede celular bacteriana. Ao ligar-se a essas PBPs, os carbapenêmicos inibem a síntese da parede celular desencadeando a morte bacteriana. Estes antimicrobianos apresentam um espectro de ação amplo com efeitos adversos mínimos e por isso são destinados principalmente ao tratamento de pacientes em unidades de terapia intensiva e com infecção grave (ZHANEL et al., 2007).

Os carbapenêmicos compreendem um importante grupo de antimicrobianos utilizados para o tratamento das infecções por *Acinetobacter* spp. No entanto relatos de isolados resistentes têm aumentado globalmente, tornando as opções terapêuticas cada vez mais escassas. O principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos é a produção de enzimas carbapenemases, que inativam praticamente todos os betalactâmicos e que podem ser expressas em vários níveis e diferem significativamente com relação as características bioquímicas e atividade hidrolítica frente a drogas específicas, e incluem enzimas das classes A, B e D de Ambler. A grande maioria são enzimas adquiridas, codificadas por genes localizados em elementos genéticos móveis, como transposons e plasmídios, estruturas que facilitam sua transmissão horizontal (BRINK, 2019; ESPINAL; ROCA; VILA, 2011).

Embora diferentes tipos de carbapenemases possam ser encontradas em *Acinetobacter* spp., as mais prevalentes são as enzimas do tipo OXA, conhecidas

como oxacilinases ou β -lactamase de classe D que hidrolisam carbapenem (CHDL), e em menor frequência as enzimas de classe B do tipo metalobetalactamases, como New Delhi Metalo- β -lactamase (NDM) e Imipenem β -lactamase (IMP). *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), pertencente a classe A de Ambler, tem sido raramente relatada em membros do gênero *Acinetobacter* (RODRÍGUEZ; NASTRO; FAMIGLIETTI, 2018).

As enzimas do tipo OXA hidrolisam preferencialmente oxacilina ou cloxacilina, algumas com uma baixa taxa de hidrólise para os carbapenêmicos. Apresentam-se com mais de 150 variantes, sendo as mais reportadas as pertencentes aos grupos OXA-23, OXA-51, OXA-24/40, OXA-58, OXA-143 e OXA-235 (ESPINAL; ROCA; VILA, 2011; RODRÍGUEZ; NASTRO; FAMIGLIETTI, 2018). As enzimas OXA-23 e OXA-58 são mais frequentemente identificadas em isolados clínicos, enquanto OXA-24/40, OXA-143 e OXA-235 são mais raras. A sequência de inserção ISAbal pode mediar a super expressão dos genes *blaOXA*, levando a resistência de alto nível aos carbapenêmicos (EVANS; AMYES, 2014).

A disseminação de isolados resistentes aos carbapenêmicos tem sido relacionada a circulação de três linhagens internacionais denominadas CC1, CC2 e CC3. A linhagem CC1 tem prevalência mundial enquanto as linhagens CC2 e CC3 estão mais restritas a países da Europa e América do Norte. Em menor proporção as linhagens CC15 CC79 são observadas na América do Sul e América Central (SALGADO-CAMARGO et al., 2020). O predomínio dessas linhagens é determinado pela capacidade do seu pangenoma incorporar determinantes de resistência que proporcionam sua adaptação contínua ao ambiente hospitalar e à pressão de antibióticos (BRINK, 2019).

No Brasil são relatadas taxas hiperendêmicas de *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos, um cenário diferente é observado, com predominância dos complexos clonais CC1/IC1, CC15/IC4, CC25/IC7 e CC79/IC5. Diferentes padrões de resistência são observados nessas linhagens clonais, mas a predominância de carbapenemases OXA-23-, OXA-24 / 40- e enzimas semelhantes a OXA-143 é bem documentado. De fato, em modelos in vitro, as cepas CC79 / IC5 mostraram-se mais virulentas do que os outros clones (CAMARGO et al., 2020).

Apesar da espécie *A. baumannii* ser considerada a mais resistente do gênero, é importante destacar que atualmente diversos estudos têm reportado a circulação das espécies *A. pittii*, *A. nosocomialis* e *A. haemolyticus* carreando genes de resistência relacionados principalmente à produção de betalactamases. Estes isolados têm sido recuperados de diferentes ambientes como solo, água e alimentos sugerindo seu possível papel como reservatório de determinantes genéticos de resistência (MALTA; RAMOS; NASCIMENTO, 2020).

FATORES DE VIRULÊNCIA

A virulência e patogenicidade das espécies deste gênero pode ser atribuída a um amplo espectro de fatores e características, que incluem a capacidade de formar biofilme, degradação de compostos aromáticos, produção de lipopolissacarídeos, ação de fosfolipases, cápsula polissacarídica, expressão de proteínas de membrana externa com função de adesinas, entre outros (LIU et al., 2018). O potencial destes fatores desempenha um papel fundamental no processo de infecção, desde a disseminação, ligação a estruturas hospedeiras, dano celular e invasão (DOI; MURRAY; PELEG, 2015).

Os biofilmes microbianos são agregados celulares envoltos por uma matriz extracelular polissacarídica altamente estruturada e com modo de crescimento protegido. Em geral são encontrados em superfícies de plástico, vidros e vários tipos de dispositivos médicos, com capacidade de resistir à dessecação, detergentes e antibióticos (BRAVO et al., 2018). Seu desenvolvimento está associado às proteínas associadas ao biofilme (Bap), que são moléculas de alto peso molecular, comumente expressas na superfície celular de espécies do gênero *Acinetobacter* e desempenham um papel fundamental na formação e maturação do biofilme, assim como na adesão ao epitélio humano (DE GREGORIO et al., 2015).

A proteína associada ao biofilme foi inicialmente caracterizada em *Staphylococcus aureus*, e deste então tem sido amplamente identificada em outros microrganismos patogênicos (DE GREGORIO et al., 2015; VIJAYASHREE PRIYADHARSINI; SMILINE GIRIJA; PARAMASIVAM, 2018). São comumente expressas na superfície da membrana celular e apresentam-se em diferentes formatos, tanto por alterações no número e tipo de repetições, quanto pela organização da região COOH, e consequentemente, são classificadas em Bap-1, Bap-2 e Bap-3 (DE GREGORIO et al., 2015).

O conjunto destas proteínas está envolvido em vários estágios conceituais e sequenciais no processo de formação do biofilme, incluindo: fixação reversível primária de células individuais a uma superfície (I), ligação progressiva irreversível mediada por polissacarídeo extracelular (II), desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme (III), maturação do biofilme (IV) e dispersão de células únicas do biofilme (V). Além de *A. baumannii*, os genes *bap-1* e *bap-2* já foram descritos em *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter pittii* e *Acinetobacter nosocomialis*, enquanto que *bap-3* parece estar associado com as espécies *A. baumannii*, *Acinetobacter baylyi* e *Acinetobacter radioresistens* (DE GREGORIO et al., 2015).

Espécies bacterianas metabolizadoras de fenilacetato foram identificadas há mais de 50 anos, mas a via de degradação e sua caracterização foram descritas

recentemente (TEUFEL et al., 2010). A via catabólica do ácido fenilacetato (PAA) codificada pelo operon *paa* é uma via fundamental para metabolização de vários compostos aromáticos que contribuem para a virulência de patógenos, que ocorre através da geração de compostos tóxicos ao hospedeiro e da utilização da fenilalanina como fonte única de carbono. Em estudo envolvendo *A. baumannii*, a deleção de *paaE* e *paaA* resultou em perda da função da via PAA (CERQUEIRA et al., 2014).

Outra importante via de aquisição de nutrientes ocorre através da ação de fosfolipases (PL), consideradas enzimas chave e essenciais para o metabolismo da fosfatidilcolina (PC) presente em membranas eucarióticas (STAHL et al., 2015). Estas são classificadas em PLA, PLC e PLD, e atuam na hidrólise de ácidos graxos, fosforilação e liberação do fosfolípido e separação do grupo principal, respectivamente. Até o momento, apenas PLC e PLD foram identificados como fatores de virulência em *A. baumannii* (CAMARENA et al., 2010; JACOBS et al., 2010).

Reconhecida como um importante fator de virulência, as proteínas de membrana externa (OMPs) apresentam-se como uma classe de proteínas transmembranas altamente estáveis, compostas por estrutura B-barril formado por 8 a 26 fios (ROLLAUER et al., 2015). Até o momento, os tipos de OMPs não foram identificados claramente em *Acinetobacter*, apenas alguns relatos envolvendo Bama, LptD, Omp33-36, OmpW e OmpA em *A. baumannii*. Entre os OMPs de *A. baumannii*, OmpA é o fator de virulência mais estudado, já que desempenha um papel fundamental na regulação da adesão, agressividade do biofilme e resposta imune do hospedeiro (NIE et al., 2020).

TRATAMENTO DAS INFECÇÕES

Devido a característica de desenvolver resistência aos antimicrobianos, as atuais estratégias de tratamento para infecções causadas por *Acinetobacter* MDR permanecem limitadas (WONG et al., 2017). Com o aumento das taxas de resistência a cefalosporinas de terceira geração, os carbapenêmicos tornaram-se as drogas de escolha para tratamento de infecções graves por *Acinetobacter*. Entretanto, nos últimos anos, a disseminação de clones produtores de OXA, principalmente OXA-23, comprometeu a eficácia destas drogas (KIYASU et al., 2020). Além disso, as opções terapêuticas para tratamento destas infecções se tornaram muito restritas, uma vez que a resistência cruzada com outras classes de antimicrobianos é comum, como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos.

Por outro lado, até o presente momento, as taxas de resistência às polimixinas e a tigeciclina permanecem baixas, podendo ser utilizadas como drogas alternativas para tratamento de infecções por *A. baumannii* MDR. A tigeciclina surgiu como opção

para tratar infecções causada por isolados multidroga resistentes (MDR), no entanto, alguns estudos apontam para resultados inferiores quando comparados a outros agentes antimicrobianos, como os betalactâmicos, além da associação com maior mortalidade intra-hospitalar e tempo prolongado de internação hospitalar (PRASAD et al., 2012). Entretanto, estes antimicrobianos têm suas próprias limitações e podem não ser adequados para determinadas situações clínicas, como a polimixina B, que pode apresentar efeitos nefrotóxicos e neurotóxicos (CORTIVO et al., 2015; WONG et al., 2017).

REFERÊNCIAS

ATROUNI, A. AL et al. Reservoirs of non-baumannii Acinetobacter species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–12, 2016.

BARAKA, A. et al. An acinetobacter non-baumannii population study: Antimicrobial resistance genes (ARGs). **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2021.

BAUMANN, P., DOUDOROFF, M., STANIER, R. Y. A Study of the Moraxellk Group. **Journal of bacteriology**, v. 95, n. 5, p. 1520–1541, 1968.

BERGOGNE-BÉREZIN, E.; TOWNER, K. J. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 148–165, 1996.

BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Identification and biotyping of clinical isolates of Acinetobacter. **Annales de l'Institut Pasteur. Microbiologie**, v. 138, n. 5, p. 569–578, 1987.

BRASILIENSE, D. et al. Diversity of metallo- β -lactamase-encoding genes found in distinct species of acinetobacter isolated from the brazilian amazon region. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 4, p. 1–6, 2019.

BRAVO, Z. et al. Acinetobacter pittii biofilm formation on inanimate surfaces after long-term desiccation. **Journal of Hospital Infection**, v. 98, n. 1, p. 74–82, 2018.

BRINK, A. J. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. **Current Opinion in Infectious Diseases**, p. 609–616, 2019.

BROVEDAN, M. A. et al. What do we know about plasmids carried by members of the Acinetobacter genus? **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 8, p. 1–15, 2020.

CAMARENA, L. et al. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1–14, 2010.

CAMARGO, C. H. et al. Genomic and phenotypic characterisation of antimicrobial resistance in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* hyperendemic clones CC1, CC15, CC79 and CC25. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, n. 6, 2020.

CERQUEIRA, G. M. et al. A Global Virulence Regulator in *Acinetobacter baumannii* and Its Control of the Phenylacetic Acid Catabolic Pathway. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 1, p. 46–55, 1 jul. 2014.

CHANG, H. C. et al. Species-Level Identification of Isolates of the. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1632–1639, 2005.

CORTIVO, G. D. et al. Antimicrobial resistance profiles and oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from hospitalized patients in Santa Catarina, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 699–705, 2015.

COSGAYA, C. et al. *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. Nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4105–4111, 2016.

DE GREGORIO, E. et al. Biofilm-associated proteins: News from *Acinetobacter*. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2015.

DE OLIVEIRA, D. M. P. et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. 1–18, 13 maio 2020.

DOI, Y.; MURRAY, G. L.; PELEG, A. Y. *Acinetobacter baumannii*: Evolution of Antimicrobial Resistance – Treatment Options. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 1, p. 85–97, 2015.

DOUGHARI, H. J. et al. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An overview. **Microbes and Environments**, v. 26, n. 2, p. 101–112, 2011.

ESPINAL, P.; ROCA, I.; VILA, J. Clinical impact and molecular basis of antimicrobial resistance in non-*baumannii* *Acinetobacter*. **Future Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 495–511, 2011.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 241–263, 2014.

FONTANA, C. et al. Acinetobacter baumannii in intensive care unit: A novel system to study clonal relationship among the isolates. **BMC Infectious Diseases**, v. 8, p. 1–9, 2008.

GAIARSA, S. et al. Can Insertion Sequences Proliferation Influence Genomic Plasticity? Comparative Analysis of Acinetobacter baumannii Sequence Type 78, a Persistent Clone in Italian Hospitals. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. September, 2019.

GERNER-SMIDT, P.; TJERNBERG, I.; URSING, J. Reliability of phenotypic tests for identification of Acinetobacter species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 277–282, 1991.

HIGGINS, P. G. et al. A PCR-based method to differentiate between Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomic species 13TU. p. 2–4, 2007.

HIGGINS, P. G. et al. gyrB multiplex PCR to differentiate between Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter genomic species 3. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4592–4594, 2010.

JACOBS, A. C. et al. Inactivation of phospholipase D diminishes Acinetobacter baumannii pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 1952–1962, 2010.

JANSSEN, P. et al. Discrimination of Acinetobacter genomic species by AFLP fingerprinting. **International journal of systematic bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1179–87, 1997.

KIYASU, Y. et al. Characteristics of invasive Acinetobacter infection: A multicenter investigation with molecular identification of causative organisms. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 26, n. 5, p. 475–482, 2020.

LIU, C. et al. Distribution of virulence-associated genes and antimicrobial susceptibility in clinical Acinetobacter baumannii isolates. **Oncotarget**, v. 9, n. 31, p. 21663–21673, 2018.

LUPO, A.; HAENNI, M.; MADEC, J.-Y. Antimicrobial Resistance in Acinetobacter spp. and Pseudomonas spp. In: **Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2018. v. 11p. 377–393.

MALTA, R. C. R.; RAMOS, G. L. DE P. A.; NASCIMENTO, J. DOS S. From food to hospital: We need to talk about *Acinetobacter* spp. **Germes**, v. 10, n. 3, p. 210–217, 2020.

MISBAH, S. et al. Genomic species identification of *Acinetobacter* of clinical isolates by 16S rDNA sequencing. **Singapore Medical Journal**, v. 46, n. 9, p. 461–464, 2005.

NEMEC, A. et al. *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 934–942, 2015.

NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L.; JEŽEK, P. Recognition of two novel phenons of the genus *Acinetobacter* among non-glucose-acidifying isolates from human specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 3937–3941, 2000.

NIE, D. et al. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 1–8, 2020.

PELEG, A. Y.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p. 538–582, 2008.

PRASAD, P. et al. Excess deaths associated with tigecycline after approval based on noninferiority trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 12, p. 1699–1709, 2012.

RODRÍGUEZ, C. H.; NASTRO, M.; FAMIGLIETTI, A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 50, n. 3, p. 327–333, 2018.

SALGADO-CAMARGO, A. D. et al. Structure and Evolution of *Acinetobacter baumannii* Plasmids. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–21, 2020.

SCOLA, B. LA et al. The principles of DNA Sequencing. **Society**, v. 44, n. 3, p. 827–832, 2006a.

SCOLA, B. LA et al. Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species. **Society**, v. 44, n. 3, p. 827–832, 2006b.

STAHL, J. et al. *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–19, 2015.

TEUFEL, R. et al. Bacterial phenylalanine and phenylacetate catabolic pathway revealed. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 32, p. 14390–14395, 2010.

VIJAYASHREE PRIYADHARSINI, J.; SMILINE GIRIJA, A. S.; PARAMASIVAM, A. In silico analysis of virulence genes in an emerging dental pathogen *A. baumannii* and related species. **Archives of Oral Biology**, v. 94, n. July, p. 93–98, 2018.

VISCA, P.; SEIFERT, H.; TOWNER, K. J. Acinetobacter infection - An emerging threat to human health. **IUBMB Life**, v. 63, n. 12, p. 1048–1054, 2011.

WANG, J. et al. Species distribution of clinical Acinetobacter isolates revealed by different identification techniques. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–7, 2014.

WHO. **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis Essential medicines and health products**, 2017. Disponível em: https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/antibacterial_agents_clinical_development/en/%0Ahttp://www.who.int/medicines/areas/rational_use/PPLreport_2017_09_19.pdf?ua=1%0Ahttp://www.who.int/medicines/areas/rational_use/prioritization-of-pathogens/en

WONG, D. et al. Clinical and pathophysiological overview of Acinetobacter infections: A century of challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 409–447, 2017.

ZHANEL, G. G. et al. Comparative review of the carbapenems. **Drugs**, v. 67, n. 7, p. 1027–1052, 2007.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; QIAO, L. The Acinetobacter baumannii group: a systemic review. **World Journal of Emergency Medicine**, v. 4, n. 3, p. 169, 2013.

Escherichia coli COMO RESERVATORIO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Luciana Sampaio Lima

Laboratório Especial de Microbiologia Aplicada (LEMA). Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). Macapá, Amapá, Brasil.

E-mail: lucianasampaio@unifap.br

Aldo Aparecido Proietti-Junior

Laboratório Especial de Microbiologia Aplicada (LEMA). Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). Macapá, Amapá, Brasil.

E-mail: aldo.proietti@unifap.br

Yan Corrêa Rodrigues

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: yan.13@hotmail.com

Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: luanalima@iec.gov.br

Cintya de Oliveira Souza

Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas II. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: cintyaoliveira@iec.gov.br

Verônica Dias Gonçalves

Laboratório de Referência Nacional em Enteroinfecções Bacterianas (LABENT). Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

E-mail: vgonc@bol.com.br

Dália dos Prazeres Rodrigues

Laboratório de Referência Nacional em Enteroinfecções Bacterianas (LABENT).
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

E-mail: dalia.rodrigues@yahoo.com.br

Karla Valéria Batista Lima

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI),
Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: karlalima@iec.gov.br

INTRODUÇÃO

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos são substâncias químicas que possuem nas células dos microrganismos moléculas que funcionam como alvos, que podem ser elementos estruturais ou funcionais/regulatórios da bioquímica e fisiologia microbiana, na qual após a substância alcançar concentração suficiente no citosol microbiano e interagir com seus respectivos alvos, desencadeiam respostas que podem ser biocidas, quando resultam na morte do microrganismos, ou bioestáticas, quando inibem o crescimento microbiano (AARESTRUP, 1999; GUIMARÃES et al., 2010; BAPTISTA, 2013).

A resistência bacteriana aos antibióticos representa um sério problema de saúde pública, pois contribui com aumentos da morbidade e mortalidade mundial em decorrência da redução das opções terapêuticas efetivas, prolongamento dos períodos de doença e transmissibilidade, aumento dos custos de tratamento e de intervenções de controle (BONELLI; MOREIRA; PICÃO, 2014; IREDELL; BROWN; TAGG, 2015; PEÑA, 2000; SALUTIS, 2019; VENTOLA, 2015). A resistência bacteriana aos antibióticos é determinada pela expressão de genes de resistência, que individualmente ou em conjunto, determinam o funcionamento dos mecanismos de resistência, maquinarias bioquímicas e/ou estruturais que promovem falha no mecanismo de ação do antibiótico.

No setor da produção animal, também aumentam as taxas de morbidade e mortalidade, com intensificação da dinâmica de transmissão de infecções entre animais suscetíveis, gerando expressivas perdas econômicas, além de reduzir os meios de subsistência e segurança alimentar (ORÚS et al., 2015; SILVA; SILVA; RIBEIRO, 2012).

Ressaltando que a resistência aos antimicrobianos é um fenômeno biológico natural de caráter adaptativo frente a pressão seletiva que estes fármacos exercem sobre a sobrevivência dos microrganismos, favorecendo *booms* populacionais de variantes resistentes dentro de uma população que normalmente não apresentam quantitativo representativo, mas que se tornam expressivas por conta da redução da competição por espaço e nutrientes com as células suscetíveis aos antimicrobianos (BLAIR et al., 2015).

Podendo a resistência bacteriana aos antimicrobianos se apresentar de duas formas: 1) Intrínseca, quando a bactéria possui uma determinada característica estrutural ou funcional inerente a espécie que a torna naturalmente resistente aos antibióticos; ou 2) adquirida, na qual a célula bacteriana adquire genes de resistência por meio de transferência horizontal de genes (DA COSTA; SILVA JUNIOR, 2017).

Sendo os mecanismos de transferência horizontal de genes atuantes na promoção de variabilidade genética em bactérias os seguintes: Conjugação bacteriana, nas quais genes plasmídiais são transferidos de uma célula doadora para uma receptora através de pili sexual; transdução, onde bactérias infectadas por bacteriófagos lisogênicos contendo em seu genoma genes de resistência passam a expressar tais genes, tornando-se resistentes; e por transformação, que é um processo nas quais células competentes incorporam material genético exógeno contendo genes de resistência ao seu genoma e o expressam (LEVY; BONNIE, 2004).

Havendo ainda a possibilidade de desenvolvimento da resistência adquirida por meio de mutações espontâneas que ocorrem em uma frequência aproximada de 10^{-9} à 10^{-10} por gene em decorrência de erros de replicação (LIVERMORE, 2003); ou por meio de elementos genéticos móveis que asseguram a promoção de flexibilidade ao genoma bacteriano por meio de deslocamento de determinadas sequências do DNA de uma região para outra, tanto ao nível cromossômico como plasmídial, tais como integrons e transposons (STRAHILEVITZ, 2009; LIVERMORE, 2012; BROADERS et al., 2013; MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015; SULTAN et al., 2018).

Resultando as mutações adquiridas e a expressão de genes de resistência obtidos por mecanismos de transferência horizontal, na expressão de mecanismos de resistência, que podem ser: 1) Diminuição da permeabilidade do antibiótico na membrana celular bacteriana por modificação de sua composição bioquímica; 2) sistemas de efluxo que impedem que o fármaco alcance concentrações efetivas

no citosol bacteriano; 3) modificações estruturais do alvo farmacológico sem o comprometimento de sua função; e 4) a degradação enzimática do antimicrobiano (BLAIR et al., 2015; DA COSTA; SILVA JUNIOR, 2017; IREDELL; BROWN; TAGG, 2015; PETCHIAPPAN; CHATTERJI, 2017).

A utilização não criteriosa de fármacos na clínica médica e na medicina veterinária, comercialização de medicamentos falsificados que comprometem sua eficiência, a extensa utilização de antimicrobianos como promotores de crescimento; transmissão hospitalar; contaminação ambiental; testes diagnósticos inefcazes, entre outros de cunho social, são fatores que contribuem para aquisição de resistência em ambientes hospitalares, na comunidade e na natureza, conforme Figura 1 (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008; BERENDONK et al., 2015; BLAIR et al., 2015; MANAIA et al., 2016; SABRI et al., 2018; SHIVAKUMARASWAMY; DEEKSHIT; VITTAL, 2019).

Como as superbactérias podem se espalhar

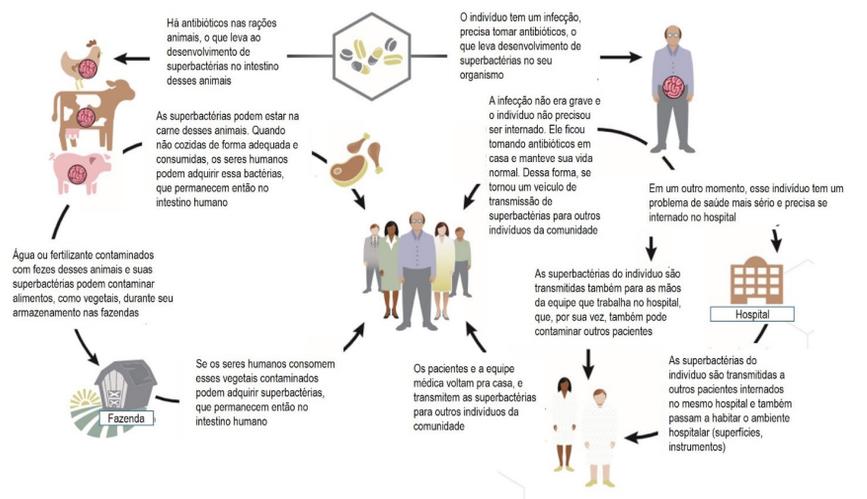


Figura 1 – Ciclo de disseminação de resistência a antimicrobianos.

Fonte: Adaptada de CDC, 2013.

DISSEMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA NA CADEIA ALIMENTAR

Embora o papel dos alimentos como veículo de transmissão de genes de resistência entre comunidades bacterianas seja controverso, muitos trabalhos demonstram a existência de resistência aos antibióticos em comensais e patógenos bacterianos em alimentos de origem animal, tais como carne, leite e derivados (TERRANCE et al., 2008; MENIN et al., 2008; ÂNGULO, 2009; NEPOMUCENO et al., 2016); e da relação clonal entre microrganismos encontrados em animais e os isolados em seres humanos (KIRBIS; KRISMA, 2015; MELO et al., 2015).

E dentro de um cenário pós transição epidemiológica advindo de tecnologias efetivas na conservação de alimentos, avanços nas áreas médicas e biomédicas (ferramentas diagnósticas, agentes anti-infecciosos, vacinas, medicamentos para o tratamento de doenças crônicas, e principalmente avanços cirúrgicos), o crescimento populacional têm se tornado cada vez mais vertiginoso (COSTA; NETO; SILVA-JUNIOR, 2018), e impulsionado a demanda por alimentos, que por sua vez vem pressionando o setor de produção animal e alimentos a adotarem meios que otimizem a produção (FIORENTINO et al., 2012).

Os antimicrobianos têm sido amplamente utilizados na produção animal com o intuito de assegurar a prevenção de doenças, promoção de crescimento, da saúde e bem-estar dos animais, e também promoção da segurança alimentar, manutenção dos meios de subsistência e sustentabilidade da produção (VOLKOVA; KUKANICH; RIVIERE, 2016).

No entanto, considerando que o uso de antimicrobianos na medicina veterinária, agropecuária e na medicina humana representam um determinante na disseminação da resistência a esse tipo de drogas (BERENDOK et al., 2015; MANAIA, 2014; WHO, 2016). E que a quantidade de antimicrobianos empregados na criação de animais chega a ser até 4 vezes maior que a utilizada em seres humanos em determinados países; preocupações a respeito da utilização desses fármacos na produção animal e saúde pública têm se tornado cada vez mais relevantes (WHO, 2016).

Pois os antimicrobianos, além de modularem a microbiota dos animais, facilitam a instalação de bactérias resistentes, assim como de doenças infecciosas zoonóticas (MENIN et al., 2008; ROCHA, 2010; NEPOMUCENO et al., 2016), também promovendo a disseminação de genes de resistência entre comensais sem importância clínica que podem atuar como estoque de microrganismos resistentes, por meio dos resíduos de produção (esgoto) ou pela cadeia alimentar (WHO, 2014; LEVERSTEIN VAN HALL et al., 2011; HAMMERUM et al., 2014; LAZARUS et al., 2015; VAN HOEK et al., 2016; WANG et al., 2016).

Nas quais os alimentos que chegam até a mesa do consumidor contendo bactérias comensais resistentes podem se instalar no hospedeiro humano, e compartilhar genes de resistência com outros microrganismos comensais ou até mesmo patógenos (TERRANCE et al., 2008). Sendo o perfil epidemiológico destes microrganismos em populações humanas modulado por diversos fatores, tais como condições ambientais, uso de antibióticos, taxas de introdução de novos patógenos resistentes na população, e o perfil de interação social entre indivíduos infectados e indivíduos suscetíveis (EISENBERG et al., 2012), entre outros fatores.

Manifestando-se a preocupação com os efeitos dos antibióticos utilizados na agropecuária sobre a saúde pública por meio de várias ações, como o programa preventivo “*One Health*” a nível global; e no Brasil por meio de ações como a criação da Comissão de Vigilância Sanitária em Resistência Antimicrobiana em 2016, e a proibição da fabricação e comercialização do antibiótico colistina como aditivo zootécnico pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2016).

DISSEMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM AMBIENTE AQUÁTICO

Em ecossistemas aquáticos, a resistência bacteriana aos antibióticos pode ser percebida em rios, lagos, águas superficiais, oceanos, e até mesmo em água potável (BAQUERO; MARTÍNEZ; CANTÓN, 2008), que podem atuar como reservatórios de bactérias resistentes (ÂNGULO, 2009), na qual os resíduos oriundos da produção animal, esgoto doméstico e hospitalar, contendo antimicrobianos, neste contexto, são classificados como poluentes emergentes, ou seja, substâncias químicas que normalmente não são monitoradas, mas que após sua difusão no meio ambiente, causam inúmeros efeitos adversos ecológicos e à saúde humana; constituindo a principal causa de promoção do surgimento e disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos no meio ambiente (GEISSEN et al., 2015).

Também devendo ser considerando além dos antibióticos como poluentes emergentes, a ocorrência de transferência de genes de resistência ao ecossistema por meio bactérias de fontes humanas presentes no esgotos descartado em águas residuais, particularmente em vias navegáveis (HUIJBERS et al., 2015), que mesmo considerando a aplicação de processos de tratamento hídrico rotineiramente, não eliminam eficazmente diversas bactérias resistentes, as quais podem persistir após o tratamento (CONTE et al., 2017).

E por último, os movimentos globais de animais aquáticos vivos através do comércio, que ocasionou uma disseminação de uma ampla variedade de patógenos exóticos, e têm gerado sérios danos à produtividade de alimentos cultivados nesse tipo de ambiente, pondo em risco não apenas os sistemas de cultura, mas também o ambiente aquático natural, ampliando a necessidade do uso de antibióticos nos meios de produção animal (FAO, 2016).

De forma genérica, em peixes, os padrões de resistência bacteriana também podem refletir o uso intensivo de substâncias antimicrobianas utilizadas no cultivo desses animais e no ambiente onde eles vivem (CABELLO et al., 2013; ÂNGULO, 2009; SCHMIDT et al., 2000). Onde os fatores que corroboram para a disseminação de doenças na aquicultura e que justificam o emprego de antibióticos nessa atividade são: manejo inadequado, condições do ambiente insatisfatórias, alta densidade de animais, nutrição ineficiente, além disso alterações físico-químicas bruscas no ambiente aquático afetam diretamente a sanidade desses organismos (QUESADA; PASCHOAL; REYES, 2013).

Ressaltando que mesmo em ambientes com boas condições de manejo e fazendo uso de vacinas, na prática da criação desses animais, nem sempre assegura o êxito na produção, pois quando sofrem estresse elevado, podem ter seus sistemas imunológicos e barreiras não específicas como a pele comprometidos, tornando-os vulneráveis a infecções por patógenos, gerando a necessidade do emprego de antimicrobianos (CABELLO et al., 2013; ANGULO, 2009; CABELLO, 2006).

AQUICULTURA

A pesca desempenha um grande papel na segurança alimentar e na subsistência e é uma fonte de renda e desenvolvimento social nos países em desenvolvimento (FAO, 2016). Recentemente, o setor atraiu grande atenção e está crescendo rapidamente através do desenvolvimento da aquicultura (ASSEFA, ABUNNA, 2018; KUBEČKA et al., 2016) Novos avanços tecnológicos e aumento da demanda por peixes como fonte de proteína animal são os principais motivos do crescimento da indústria. Devido à expansão da indústria, os métodos de cultura tornaram-se mais intensivos para produzir rendimentos mais altos (RICO et al., 2012).

A produção de peixes para aquicultura representa 44% da produção total de peixes em 2014, o que equivale a 74 milhões de toneladas de peixes, no valor de 160 bilhões de dólares. Quase todo peixe produzido a partir da aquicultura é para consumo humano (FAO, 2016), sendo essa atividade um meio de produção de grande valor econômico por suprir as demandas por peixe (alimento proteico) em um cenário de

elevados aumentos demográficos, sendo alternativa à exploração predatória deste alimento riquíssimo em nutrientes, principalmente para comunidades ribeirinhas, de pescadores e de assentamentos rurais (OLIVEIRA, 2017).

Sendo essa uma prática amplamente difundida no mundo, que somente no ano de 2014, alcançou o recorde de 73,8 milhões de toneladas, com um valor total estimado de US \$ 160,2 bilhões, das quais 49,8 milhões de toneladas eram de peixe. Destacando-se a China como a maior produtora de organismos cultivados do planeta; ocupando o Brasil no ranking mundial a 14^o posição (FAO, 2016).

PRINCIPAIS CLASSES DE DROGAS EMPREGADAS NA AQUICULTURA

O uso de antimicrobianos na aquicultura tem mobilizado órgãos internacionais como Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e especialistas da Organização Mundial da Saúde (OMS), os quais recomendam que medidas devem ser desenvolvidas e implementadas a níveis nacional e internacional para coibir o desenvolvimento e disseminação da resistência antimicrobiana na aquicultura, e expandir o monitoramento dessa resistência também em ambientes aquáticos de criação de animais (WHO; FAO; OIE, 2006).

Dentre os antibióticos mais utilizados mundialmente na aquicultura encontram-se as Tetraciclínas, as Quinolonas e Fluoroquinolonas, o Florfenicol e o Cloranfenicol, betalactâmicos e macrolídeos em geral. Sendo no Brasil apenas o Florfenicol e a Oxitetraciclina licenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para uso na aquicultura, contudo, o uso desse tipo de fármaco indevidamente e a utilização de medicamentos proibidos são uma realidade em diversos sistemas de produção animal (MOREIRA, 2012).

Em relação ao florfenicol, este fármaco atua na inibição da síntese proteica procariótica, consequentemente comprometendo o crescimento bacteriano. Apresentando este antibiótico como alvo farmacológico moléculas ribossômicas, principalmente no canal peptil-transferase, evitando o transporte de aminoácidos para que as cadeias polipeptídicas bacterianas sejam formadas (REZENDE, 2012).

E a oxitetraciclina é um antibiótico de amplo espectro, de natureza anfotérica, com mecanismo de ação dependente de íons metálicos (COUTO et al., 2000) que

atua induzindo vazamentos do conteúdo citoplasmático para fora da célula bacteriana, mas que possui como mecanismo de ação primário a inibição da síntese proteica após ligação o ribossoma bacteriano por meio de bloqueio do alongamento das cadeias peptídicas (NGUYEN et al., 2014).

Dentre as principais classes de drogas utilizadas na criação de animais encontram-se as Quinolonas e Fluoroquinolonas (substâncias antimicrobianas sintéticas derivadas do ácido nalidíxico), fármacos inicialmente aplicados no tratamento de infecções do trato urinário, mas atualmente são aplicados no tratamento de um amplo espectro de doenças humanas e veterinárias que conseguem atingir níveis terapêuticos em pele, articulações e ossos (MOREIRA, 2012).

No Quadro 1, são expostas as principais classes de antibióticos (incluindo as utilizadas na aquicultura) e os mecanismos de resistência apresentados pelas bactérias.

Quadro 1 - Antimicrobianos e seus respectivos mecanismos de resistência.

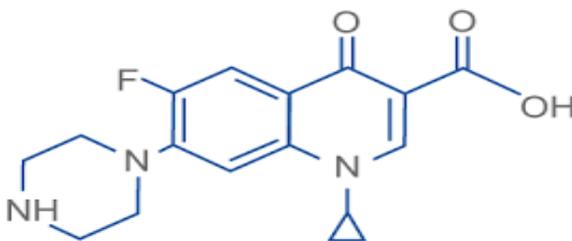
ANTIMICROBIANO	MECANISMO DE RESISTÊNCIA
Quinolonas	- Modificações na DNA girase e Topoisomerase IV - Alterações na permeabilidade da membrana
β-lactâmicos: - Cefalosporinas: - Penicilinas: - Monobactâmicos - Carbapenêmicos:	- β-lactamases - Mutações na PBP - Redução da permeabilidade da membrana - Alterações na Bomba de Efluxo
Aminoglicosídeos	- Modificação enzimática - Modificação do alvo
Cloranfenicol	- Inibição enzimática
Tetraciclina	- Alterações na Bomba de Efluxo - Proteção dos alvos - Inibição Enzimática

Quinolonas

As quinolonas são antibióticos que estruturalmente possuem um núcleo naftiridina contendo átomos de nitrogênio nas posições 1 e 8, um núcleo quinolina com um átomo de nitrogênio na posição 1, um grupo oxigenado ceto na posição C4 e uma cadeia carboxílica na posição C3, que são fundamentais para a atividade bactericida dos antibióticos desta classe (PARK et al., 2002).

As quinolonas e seus derivados são amplamente utilizadas na medicina humana para o tratamento de infecções urinárias, infecções sistêmicas causadas por gram negativos, infecções do trato respiratório, infecções gastrointestinais, infecções ginecológicas, infecções de pele e tecidos mole, além de infecções sexualmente transmissíveis (BENES, 2005; OLIPHANT; GREEN, 2002). Apresentando também emprego na medicina veterinária e na produção de animais, na qual os antibióticos enrofloxacino, sarafloxacino, difloxacino, ácido oxolínico, flumequina e ciprofloxacino (Figura 2) são regulamentados para a prática da piscicultura no Brasil (QUESADA; PASCHOAL; REYES, 2013).

Figura 2 – Estrutura Química da Fluoroquinolona Ciprofloxacino.



Fonte: <https://www.euroclinux.net/br/saude-do-viajante/diarreia-de-viajante/ciproxi-na-ciprofloxacina>

De forma genérica, as quinolonas são antibióticos que podem ter espectro de ação variável, mas que apresentam o mesmo mecanismo de ação, que se dá pela inibição das enzimas topoisomerase II (DNA girase) e topoisomerase IV, que são importantes nos processos de replicação do material genético e divisão celular, também levando à falhas nos mecanismos de reparo de DNA que causam a morte da célula bacteriana (REDGRAVE et al, 2014; HOOPER; JACOBY, 2015).

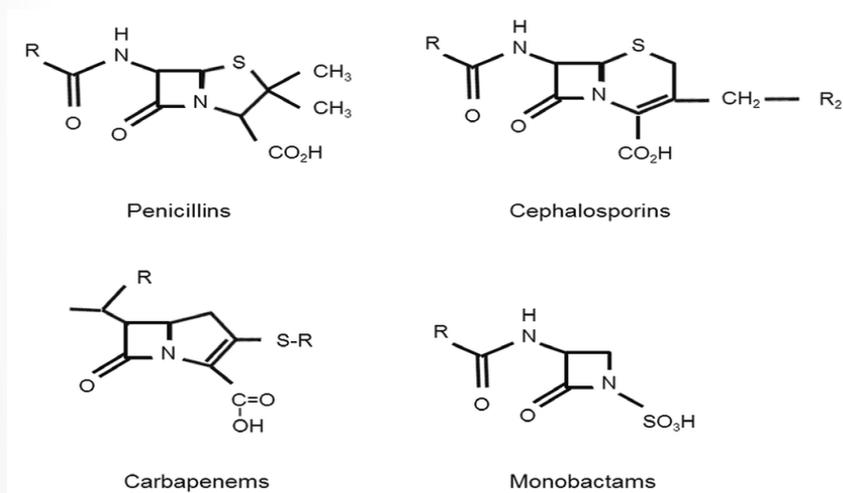
Ressaltando que a resistência bacteriana aos antibióticos da classe das quinolonas pode se manifestar de três formas, que são: 1) por modificações no gene do sítio alvo de ação do fármaco, 2) bombas de efluxo, e 3) ações enzimáticas que interferem na ação farmacológica do antibiótico; na qual a elevada incidência e prevalência de resistência a esses antibióticos acabou por motivar a criação de um novo subgrupo de quinolonas, as Fluoroquinolonas, que apresentam em sua estrutura química a presença de um átomo de flúor (APPELBAUM; HUNTER, 2000; HOOPER; JACOBY, 2015).

Betalactâmicos

Outro grupo importante de fármacos para a medicina veterinária e humana são os β -lactâmicos, que foram os primeiros derivados de produtos naturais utilizados no tratamento terapêutico de infecções bacterianas, como é o caso da penicilina, que foi o primeiro antimicrobiano descoberto (GUIMARÃES et al., 2010).

Os β -lactâmicos (Figura 3) são um grupo de antibióticos que possuem a presença do anel β -lactâmico, constituindo uma classe de elevada importância devido à sua excelente eficácia terapêutica e baixa toxicidade, por atuar na parede celular através da inibição da síntese do peptidoglicano que não ocorre nas células eucarióticas humanas (SUAREZ; GUDIOL, 2009).

Figura 3 – Representação da estrutura química dos principais grupos de β -lactâmicos.



Fonte: Adaptado de (KIM; LEE, 2014)

A síntese de β -lactamases é considerada a principal causa de resistência bacteriana contra os agentes β -lactâmicos, por inativar antibióticos β -lactâmicos através da hidrólise, resultando na ineficácia do fármaco. Esse tipo de mecanismo de resistência tem sido associado ao uso frequente de antimicrobianos oportunizando a seleção de bactérias resistentes, que ocorre frequentemente em gram-negativas (RASMUSSEN; HOIBY, 2007; PITOUT; LAUPLAND, 2008).

Havendo diversas classificações propostas para as várias β -lactamases identificadas em virtude da diversidade de características bioquímicas e moleculares. Entretanto, as β -lactamases são divididas, comumente de acordo com duas classificações: a de Ambler (1980), que propôs classificá-las em quatro classes moleculares principais: (A) serino- β -lactamases, incluindo as β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs), penicilinas e carbenicilinas; (B) metalo- β -lactamases; (C) cefalosporinas cromossômicas e (D) oxacilinas; e a classificação de BUSH-JACOBY-MEDEIROS (1995), que combina características estruturais e funcionais das enzimas.

Entre as β -lactamases encontram-se também as ESBLs as quais são capazes de inativar penicilinas, cefalosporinas de terceira e quarta geração e Aztreonam, porém não hidrolisam cefamicinas ou carbapenêmicos e a grande maioria é inibida por inibidores de β -lactamases como o Ácido Clavulânico (LIVERMORE, 2012).

Sendo o fato de as ESBL serem inibidas pelo Ácido Clavulânico o que as diferencia das β -lactamases do tipo AmpC (Classe C de Ambler ou Grupo 1 de Bush e Jacoby), enzimas cromossômicas produzidas por micro-organismos como *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp. e que não são inibidas por Ácido Clavulânico. Com exceção das ESBL do tipo OXA, que estão classificadas na Classe D de Ambler, o restante das ESBLs pertence à Classe A (PATERSON; BONOMO, 2015).

Se dando como principais produtores de ESBL as espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, que são os organismos mais isolados em todo o mundo, no entanto, essas enzimas também foram identificadas em vários outros membros da família Enterobacteriaceae e em alguns não fermentadores. Podendo essas β -lactamases causarem resistência a vários tipos de antibióticos β -lactâmicos mais novos, incluindo cefalosporinas de espectro expandido (ou terceira geração) (por exemplo, Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima) e monobactams (por exemplo, Aztreonam), mas não as cefamicinas (por exemplo, Cefoxitina e Cefotetan) e carbapenêmicos (por exemplo, Imipenem, Meropenem e Ertapenem) (PITOUT; LAUPLAND, 2008).

Enterobacteriaceae, é a família de bactérias gram-negativas oxidase negativo que inclui *Escherichia coli*, a qual faz parte da flora normal do trato gastrointestinal de animais e humanos (EWERS et al., 2012; TADESSE et al, 2012; FDA, 2011). Entretanto, algumas variantes patogênicas podem causar infecções tais como: as intestinais, as gastroenterites, as infecções do trato urinário, meningite, peritonite e sepse.

Os organismos dessa espécie são bastonetes gram-negativos, móveis, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose, e produtores de ácidos e gás em caldo EC, em 24 horas a 37°C, e são comumente associados à contaminação fecal em água e alimentos relacionados a falhas higiênico-sanitárias (JAY, 2005; FENG; WEAGANT; JINNEMAN, 2011; OLIVEIRA, 2011).

Várias linhagens de enterobactérias adquiriram atributos de virulência específicos, que conferem maior capacidade em se adaptar a novos nichos e ocasionar um amplo espectro de doenças, inclusive *E. coli* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Entretanto, a maioria das bactérias dessa espécie são transportadas como organismos comensais, mas têm o potencial de se tornar agentes patogênicos oportunistas, e dentro do trato gastrointestinal, esse grupo bacteriano pode transferir material genético que codifica resistência a antimicrobianos, tanto para outras bactérias comensais como para bactérias patogênicas (SMITH, 2008; MARTINÉZ; BAQUERO, 2014; FDA, 2011).

As *E. coli* são um grupo de bactérias potencialmente doadoras e receptoras na transferência horizontal de elementos genéticos móveis, portadores de resistência antimicrobiana. Cepas resistentes dessa espécie podem ser selecionadas e disseminar esse atributo entre os microrganismos presentes nos animais e no ambiente, mantendo sua circulação em locais de produção (AARESTRUP; WEGENER; COLLIGNON, 2008; TADESSE et al, 2012; FDA, 2011).

Apresentando esta espécie um grande potencial para transferir seus genes de resistência para outras bactérias no intestino, e se disseminar como comensal ou patógeno em humanos por conta da carência de higiene durante a manipulação de alimentos (KIRBIS; KRIZMAN, 2015).

Ressaltando que entre as bactérias gram-negativas, a resistência aos antimicrobianos de moléculas grandes ou hidrofóbicas é uma característica intrínseca, devido as propriedades físico-químicas da membrana externa dessas bactérias, que além disso, podem conter resistência adquirida com importantes repercussões clínicas (LIVERMORE, 2012; MARTINÉZ; BAQUERO, 2014).

Sendo reportado com destaque em dados de vigilância que indicam que a resistência em *E. coli* é elevada frente aos agentes antimicrobianos rotineiramente usados na medicina humana e veterinária (FDA, 2011). A resistência antimicrobiana na família Enterobacteriaceae inclui resistência principalmente três classes importantes de antimicrobianos: fluoroquinolonas, β -lactâmicos e aminoglicosídeos (PITOUT; LAUPLAND, 2008).

FATORES DE VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE EM *Escherichia coli*

Mecanismos de virulência são características intrínsecas dos microrganismos patogênicos que lhes propiciam resistir as características físico-químicas dos tecidos do hospedeiro e vencer suas barreiras de defesa inata e adaptativas, estabelecer relações com a microbiota endógena e transitória, e conseqüentemente iniciar a patogênese microbiana (EISENREICH; DANDEKAR; HEESEMAMN, 2010; STACY et al., 2015). Sendo os mais comuns entre bactérias, a presença de capsula, exotoxinas, endotoxinas, formação de biofilmes, fatores de aderência e enzimas que degradam as matrizes celulares do hospedeiro (CROSS, 2008; AL-MEBAIRIK et al., 2016).

E. coli é uma espécie bacteriana normalmente encontrada em animais e seres humanos como comensal, ou simbiote, participando da digestão de nutrientes e síntese de vitaminas; mas com capacidade de se tornar patogênica em casos de comprometimento das defesas imunológicas do hospedeiro, ou perda da integridade dos tecidos normalmente colonizados pela bactéria, como em casos de peritonite, existindo também cepas altamente especializadas no estilo de vida parasitário, que são portadoras de um grande número de fatores de virulência, que em sua maioria são de origem clonal encontrados em ilhas de patogenicidade oriundas de transferência horizontal de genes, transdução ou elementos gênicos móveis (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Havendo até o presente momento descrito na literatura o registro de 171 antígenos somático (O), 55 flagelares (H) e 80 capsulares (K), com a existência de 160 sorotipos, ou seja, variedades antigênicas distintas dentro da mesma espécie, distribuídas em diferentes grupos que causam doenças de espectros similares ou distintos. Sendo normalmente as cepas patogênicas de *E. coli* classificadas de acordo com o espectro de doença/síndrome que causam, que pode ser 1) entérica/ doenças diarreicas, 2) infecções do trato urinário, e 2) infecções do trato respiratório, sepsse, meningite e endocardite, sendo este último espectro de doença atribuído a cepas denominadas extraintestinais ou aviárias, por também causarem doenças em animais (SAROWSKA et al., 2019).

Das quais as cepas de *Escherichia coli* responsáveis por doenças entéricas em seres humanos são mais amplamente estudadas e classificadas nos seguintes patotipos (CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004):

- *Escherichia coli* Enteroagregativa, que adere aos epitélios do intestino delgado e grosso em um biofilme espesso e secreta enterotoxinas e citotoxinas secretórias que causam dano ao epitélio da mucosa intestinal, predominantemente na região do colon (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004);
- *Escherichia coli* Enteropatogênica, que coloniza principalmente o intestino delgado aderindo às microvilosidades intestinais onde induz lesões chamadas de *attaching and effacing*, que são caracterizadas por uma adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal, com destruição das microvilosidades intestinais, alterações no citoesqueleto, com formação de estruturas semelhantes a pedestais e acúmulo de actina polimerizada logo abaixo da ligação da bactéria à célula (COURA; LAGE; HEINEMAMN, 2014);
- *Escherichia coli* Enteroinvasiva; que são capazes de invade as células epiteliais do cólon, lisar o fagossomo e se move através da célula nucleando microfilamentos de actina, e ainda se moverem lateralmente através do epitélio por propagação direta de célula a célula, ou saírem e entrarem novamente na membrana plasmática baso-lateral (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004)
- *Escherichia coli* Enterotoxigênica, caracterizadas por causarem não causarem alterações morfofuncionais no intestino, mas reduzem a absorção de água e nutrientes, que se acumulam na luz do trato gastrointestinal e causam diarreia osmótica por meio da produção das enterotoxinas termoestáveis (*st*) e termolábeis (*lt*), tendendo este patotipo a colonizar a superfície da mucosa do intestino delgado, principalmente o íleo (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004);
- *Escherichia coli* Enterohemorrágica; cepas patogênicas que também induzem a *attaching and effacing*, que, mas no cólon, se diferenciando do patotipo enteropatogênico por produzir toxina Shiga (*stx*), cuja absorção sistêmica pode causar complicações sistêmicas potencialmente fatais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MAINIL, 2013).
- *Escherichia coli* difusamente aderente, que causam longas projeções celulares em formato de dedo nos enterócitos, induzidas por processos de sinalização celular, que envolvem como bactérias (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Entre outros patótipos como aviária patogênica, verotoxigênico, necrotoxigênico, e uropatogênico, que podem afetar seres humanos, mas são mais patogênicos mais comuns em animais (NAKAZATO et al., 2009; MAINIL, 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SAROWSKA et al., 2019).

Existindo também esquemas classificatórios para a espécie baseados em análises filogenéticas, nas quais as cepas podem ser classificadas como pertencentes aos grupos A e B1, que incluem cepas não patogênicas que abrigam a mucosa gastrointestinal, com poucas variantes patogênicas, que também ocupam o grupo D, cepas pertencentes ao grupo D, responsável por infecções extraintestinais, e os grupos E e F, que são relacionados filogeneticamente com os grupos D e B2 respectivamente (SAROWSKA et al., 2019).

No entanto, a classificação das cepas patogênicas e não patogênicas de *Escherichia coli* são controversas por apresentarem cepas que possuem atributos que possibilitam sua classificação em mais de um grupo, demonstrando estudos moleculares de MLST que a maioria das cepas patogênicas são variantes clonais, das quais o clone ST131, portador de genes de resistência aos antibióticos é o mais comum e amplamente disseminado pelo mundo (SAROWSKA et al., 2019).

Mas apesar da grande diversidade antigênica e filogenética presente na espécie *Escherichia coli*, os mecanismos de virulência apresentado por esta espécie podem ser genericamente classificados em fatores de aderência e colonização como fimbrias, proteínas adesivas da membrana externa; exotoxinas, como os oligopeptídeos tóxicos, a toxina AB, a toxina termolábil, a toxina vero/shiga e as toxinas formadoras de poros; que são proteínas que afetam o citoesqueleto celular, proteínas com atividade enzimática de elementos intracelulares ou de componentes da membrana, e proteínas que ativam mecanismos em cascata do metabolismo do hospedeiro (MAINIL, 2013), capsulas, biofilmes, fatores de aquisição de ferro, lipopolissacarídeos, que apresentam atividade imunogênica e protetora para as bactérias (SAROWSKA et al., 2019).

Ressaltando que tais fatores de virulência podem estar presente em mais de um tipo de *E. coli*, ou serem encontrados com maior especificidade em um determinado grupo, influenciando no seu perfil de transmissibilidade e patogenicidade que podem vir a apresentar sinais do tipo patognomônico ou não; e da mesma forma que a resistência aos antimicrobianos, a virulência é um atributo biológico transmissível entre as bactérias por meio de mecanismos intrínsecos a genética bacteriana (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2014).

MÉTODOS DE TIPAGEM MOLECULAR EM BACTÉRIAS RESISTENTES

Embora técnicas tradicionais de tipagem baseadas em características fenotípicas como a sorotipagem, fagotipagem e antibiograma tenham sido utilizadas por muitos anos, desde o surgimento e implementação das ferramentas moleculares de tipagem, estas tem sido frequentemente utilizadas para elucidar a evolução, epidemiologia, genética populacional e as relações filogenéticas pelo reconhecimento de diferentes tipos de organismos dentro de uma mesma espécie e suas variantes (SABAT et al, 2013).

O objetivo principal da tipagem de bactérias é avaliar as relações genéticas entre os isolados, para compreender o parentesco clonal entre as cepas, e assim identificar a fonte e rotas de infecção, detectar surtos e suas rotas de transmissão, além de analisar a eficácia das medidas de controle e auxiliar na implementação de programas racionais de controle de infecções e destinação apropriada de recursos (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2015; PÉREZ-LOSADA; ARENAS; CASTRO-NALLAR, et al., 2018).

Métodos moleculares distintos para caracterização epidemiológica de isolados bacterianos foram desenvolvidos, movidos pela preocupação acerca da diversidade genética percebida nos patógenos humanos, uma vez que a identificação precisa e eficiente da cepa também é essencial para a vigilância epidemiológica e o subsequente desenho de estratégias de controle de saúde pública (PÉREZ-LOSADA; ARENAS; CASTRO-NALLAR, et al., 2018).

Sendo muitos métodos de tipagem molecular baseados na Reação em cadeia da polimerase (PCR), técnicas eletroforéticas, sequenciamento total ou de parte do genoma bacteriano, contudo a escolha do teste é determinante no sucesso da análise (PEIXOTO, 2001; NEOH et al., 2010)

O *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) é um método de tipagem onde há formação de fragmentos de DNA através de restrição com endonucleases as quais são separados por eletroforese em “campo pulsado” em um gel de agarose, com alternância periódica do campo elétrico, e formação de um padrão de bandas computacionalmente analisados (NEOH et al., 2010).

Este método tem sido considerado “Padrão ouro” entre os métodos de tipagem molecular para uma variedade de bactérias clinicamente importantes, principalmente devido ao seu excelente poder discriminatório e alta concordância epidemiológica. Além disso, é uma abordagem relativamente barata, quando comparada ao sequenciamento do genoma total e reprodutibilidade intra-laboratorial, devido ao seu protocolo estar muito bem estabelecido internacionalmente (SABAT et al, 2013; NEOH et al., 2010).

O *Multilocus sequence typing* ou MLST é uma técnica molecular que foi desenvolvida inicialmente como intuito de monitorar eventos epidêmicos locais e globais, mas que em função de sua elevada reprodutibilidade e portabilidade, acabou se tornando um método amplamente utilizado na caracterização molecular de patógenos bacterianos (MAIDEN, 2006).

Consistindo esta ferramenta molecular no sequenciamento e análise de sequências que abrigam múltiplos loci gênicos que são utilizadas como unidade de comparação com outros organismos da mesma espécie ou não, na qual cada alteração alélica é considerada um evento genético isolado; diferentemente de outras técnicas de sequenciamento total de genoma, que definem variações em sequências de nucleotídeos de forma independente do número de polimorfismos existentes no gene estudado (MAIDEN et al., 2013).

E devido à unidade comparativa entre cepas ser sequências multigênicas, e não sequências de nucleotídeos, que o MLST permite com grande precisão caracterizar e determinar cepas patogênicas de bactérias envolvidas em epidemias, analisar a história evolucionária de bactérias com distante relação filogenética, mas portadoras de mesmos grupos gênicos oriundos de transferência horizontal ou vertical de genes, e detecção de mutações em linhagens clonais; que são eventos que conferem variabilidade genética as bactérias (MAIDEN et al., 2013; BLEIDORN; GERTH, 2017), que ocorrem de forma imprevisível em função do fitness biológico que tais genes possam conferir à bactéria (ANDERSSON, 2006; ANDERSSON; HUGHES, 2011).

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, p. 279-285, 1999. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(99\)90059-6](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(99)90059-6)

AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C.; COLLIGNON, P. Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 6, p. 733-750, 2008. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.733>

AL-MEBAIRIK, N. F.; NADA, F.; EL-KERSH, T. A.; AL-SHEIKH, Y. A.; MARIE, M. A. M. A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 50-56, 2016. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000067>

ANDERSSON, D. I. The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 461-465, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.07.002>

ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 901-911, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00289.x>.

ANGULO, F.J.; COLLIGNON, P.; POWERS, J. H.; CHILLER, T. M.; AIDARA-KANE, A.; AARESTROP, F. M. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 1, p. 132-141, 2009. <https://doi.org/10.1086/599374>

APPELBAUM, P. C.; HUNTER, P. A. The fluoroquinolones antibacterials: past, presente and future perspectives. **Internatinal Journal of Antimicrobial Agents**. v. 16, p. 5-15, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00192-8)

ASSEFA, A.; ABUNNA, F. Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. **Veterinary Medicine International**, v. 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>

BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. monografia (Dissertação de Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa. 2013. 42p.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 260-265, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>

BENES, J. Review and categorization of quinolone antibiotics. **Klinická mikrobiologie a infekční lékařství**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2005.

BERENDONK, T. U., MANAIA, C. M., MERLIN, C. M., FATTA-KASSINOS, D., CYTRYN, E., WALSH, F., BÜRGMANN, H., SØRUM, H., NORSTRÖM, M., PONS, M.N., KREUZINGER, N., HUOVINEN, P., STEFANI, S., SCHWARTZ, T., KISAND, V., BAQUERO, F., MARTINEZ, J.L. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 310-317, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>

BERENDONK, T. U., MANAIA, C. M., MERLIN, C. M., FATTA-KASSINOS, D., CYTRYN, E., WALSH, F., BÜRGMANN, H., SØRUM, H., NORSTRÖM, M., PONS, M.N., KREUZINGER, N., HUOVINEN, P., STEFANI, S., SCHWARTZ, T., KISAND, V., BAQUERO, F., MARTINEZ, J.L. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 310-317, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>

BLAIR, J.M.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42-51, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>

BLEIDORN, C.; GERTH, M. A critical re-evaluation of multilocus sequence typing (MLST) efforts in *Wolbachia*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 94, n. 1, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix163>

BONELLI, R. R.; MOREIRA, B. M.; PICÃO, R. C. Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America : History , current dissemination status and associated socioeconomic factors. **Drug Resistance Updates**, v. 17, n. 1-2, p. 24-36, 2014

BRASIL. Instrução Normativa no 45, de 22 de novembro de 2016. Diário Oficial da União. Seção 1, Nº 229, quarta-feira, 30 de novembro de 2016. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GSA/Produtos_veterinarios/Legislacao_Especificada/2016_IN_45_Proibe_Colistina_alimentacao_animal.pdf> Acessado em: 28 maio 2018.

BROADERS, E.; GAHAN, C. G. M.; MARSHESI, J. R. Mobile genetics elements of the human gastrointestinal tract-potential for spread of antibiotic resistance genes. **Gut microbes**, v. 4, p. 271-280, 2013. <https://doi.org/>

BUSH, K.; JACOBY, G. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 39, p. 1211-1233, 1995. <https://doi.org/>

CABELLO, F. C.; GODFREY, H. P.; BUSCHMANN, A. H.; DÖLZ, H. J. Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalization of antimicrobial resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 1-9, 2016.

CABELLO, F. C.; GODFREY, H. P.; TOMOVA, A.; IVANOVA, L.; DOLZ, A. M.; BUSCHMANN, A. H. Antimicrobial use in aquaculture re-examined: 1 its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 1917-1942, 2013. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12134>.

CAMPOS, L.C.; FRANZOLIN, M.R.; TRABULSI, L.R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional Enteropathogenic *E. coli* O serogroups - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 545-552, 2004.

CASTRO-ESCARPULLI, G.; ALONSO-AGUILAR, N.M.; SÁNCHEZ, G.R.; BOCANEGRA-GARCIA, V.; GUO, X.; JUÁREZ-ERÍQUE, S.R.; LUNA-HERRERA, J.; MARTÍNEZ, C.M.; GUADALUPE, A.A.M. Identification and typing methods for the study of bacterial infections: a brief review and mycobacterial as case of study. **Archives of Clinical Microbiology**, v. 7, n. 1, 2015.

CONTE, D.; PALMEIRO, J. K.; NOGUEIRA, K. S.; LIMA, T. M. R.; CARDOSO, M. A.; PONTAROLO, R.; PONTESE, F. L. D.; DALLA-COSTA, L. M. Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 136, p. 62-69, 2017.

COSTA, A. L. P.; NETO, O. A. R.; SILVA-JUNIOR, A. C. S. Conditioners of the infectious diseases dynamics. **Estação Científica**, v. 8, n3, p. 9-23, 2018. <http://dx.doi.org/10.18468/estcien.2018v8n3.p09-23>

COURA, F.M.; LAGE, A.P.; HEINEMANN, M.B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 34, n. 9, p. 811-818, 2014.

COUTO, C.M.C.; MONTENEGRO, C.B.S.M.; REIS, S. Complexação da tetraciclina, da oxitetraciclina e da clortetraciclina com o catião cobre (II). Estudo potenciométrico. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 457-460, 2000.

CROSS, A.S. What is a virulence factor? **Critical care**, v.12, n, 6, p.1-2, 2008.

DA COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45, 2017.

EISENBERG, J.N.S.; GOLDSTICK, J.; CEVALLOS, W.; TRUEBA, G.; LEVY, K.; SCOTT, J.; PERCHA, B.; SEGOVIA, R.; PONCE, K.; HUBBARD, A.; MARRS, C.; FOXMAN, B.; SMITH, D.L.; TROSTLE, J. In roads to the spread of antibiotic resistance: Regional patterns of microbial transmission in northern Ecuador. **Journal of the royal society Interface**, v. 2012, n.9, p. 1029-1039, 2011.

EISENREICH, W.; DANDEKAR, T.; HEESEMANN, J.; GOEBEL, W. Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p. 401-412, 2010.

EWERS, C.; BETHE, A.; SEMMLER, T.; GUENTHER, S.; WIELLER, L. H. Extended spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, p. 646-655, 2012.

FAO (2016). Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all**. Rome. 200 pp. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>> Acessado em: 08 maio 2018.

FDA. **Food and Drug Administration**. Approved drugs for use in aquaculture, 2011.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; JINNEMAN, K. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: Chapter 4A, **Bacteriological Analytical Manual online**. Food and Drug Administration – FDA/CFSAN, 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070080.htm>> Acessado em: maio 2016.

FIORENTINO, G.; BROSSI, L.; AMELONG, I.; CAMPANATTI, C. As oito grandes tendências de crescimento até 2020, [S.l.]: **Equipe Editorial Global**. p. 01-54, 2012.

GEISSEN, V.; MOL, H.; KLUMP, E.; UMFAUF, G.; NADAL, M.; PLOEG, N.V.D.; ZEE, S.E.A.T.M.; RITSEMA, C.J.; Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v.3, n.1, p. 57-65, 2015.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAMMERUM, A. M.; LARSEN, J.; ANDERSEN, V. D.; LESTER, C. H.; SKOVGAARD SKYTTE, T. S.; HANSEN, F.; OLSEN, S. S.; MORDHORST, H.; SKOV, R. L.; AARESTRUP, F. M. Characterisation of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 2650-7, 2014.

HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1, p. 12-31, 2015.

HUIJBERS, P. M.; BLAAK, H.; DE JONG, M. C.; GRAAT, E. A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; HUSMAN, A. M. Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. **Environmental Science & Technology**. v. 49, n. 20, p. 1993-2004, 2015. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.5b02566>.

IREDELL, J.; BROWN, J.; TAGG, K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: Mechanisms and clinical implications. **BMJ** (online), v. 351, 2016. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 711p, 2005.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, n. 2, p. 123-40, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

KIRBIS, A.; KRIZMAN, M. Spread of antibiotic resistant bacteria from food of animal origin to humans and vice versa. **Procedia Food Science**, v.5, p. 148-151, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.043>

KUBEČKA, J.; KUBEČKA, D. S.; BOUKAL, M.; ČECH, P.; HICKLEY, J. F.; KITCHELL, D.; RICARD, L.; RUDSTAM, K.; SOUKALOVÁ, R. W. Ecology and ecological quality of fish in lakes and reservoirs, **Fisheries Research**, v. 173, n. 1, p. 1-3, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2015.10.022>.

LAZARUS, B.; PATERSON, D. L.; MOLLINGER, J. L.; ROGERS, B. A. Do human extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 3, 439-52, 2015. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu785>

LEVERSTEIN-van HALL, M. A.; DIERIKX, C. M.; STUART, J. C.; VOETS, G. M.; van DEN MUNCKHOF, M. P.; van ESSEN-ZANDBERGEN. A.; PLATTEEL, T.; FLUIT, A. C.; van de SANDE-BRUINSMA, N.; SCHARINGA, J. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 873-80, 2011.

LEVY, S. B.; BONNIE, M. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses, **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. 122-129, 2004.

LIVERMORE, D. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. Korean. **Journal International Medical** v. 27, p.128-42, 2012.

LIVERMORE, D.M. Bacterial resistance: Origins, epidemiology and impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, s.1, p. 11-23, 2003.

MAIDEN, M. C. J. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. **Annual reviews of microbiology**, v. 60, p. 561-588, 2006.

MAIDEN, M. C. J.; VAN RENSBURG, M. J. J.; BRAY, J. E.; EARLE, S. G.; FORD, S. A.; JOALLEY, K. A.; MCCARTHY, N. D.; MLST revisited: the genebygene approach to bacterial genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 728-736, 2013.

MAINIL, J.; *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 152, n. 1-2, p. 2-12, 2013.

MANAIA, C. M. Antibiotic resistance in wastewater: origins, fate, and risks. **Präv Gesundheitsf**, v. 9, n. 3, p. 180, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11553-014-0452-3>

MANAIA, C. M. et al. Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1543–1557, 2016

MARTINÉZ, J. L.; BAQUERO, F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. **Ups Journal Medicine Science**, v. 119, n. 2, p. 68–77, 2014.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug resistant Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, 2015.

MELO, D. B.; MENEZES, A. P. O.; REIS, J. N.; GUIMARÃES, A. G. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from humans and foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1165-1170, 2015. <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v46n4/1678-4405-bjm-1517838246420130874>

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D. D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p.687-693, 2008.

MOREIRA, N. M. Estudo sobre *Salmonella* sp. e seus mecanismos de resistência a antibióticos. p. 39, 2012.

NAKAZATO, G.; CAMPOS, T.A.; STEHLING, E.G.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W.D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)1. **Pesquisa veterinária brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479-496, 2009.

NEOH, H.M.; TAN, X.E.; SAPRI, H.F.; TAN, T.L. Pulse-field gel electrophoreses (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. **Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**. v. 10, n.7, p. 866-875, 2010.

NEPOMUCENO, L. L.; MACIEL, K. A.; SANTOS, H. D.; FLORESTA, A. C.; BAUM, C.; DIAS, F. E. F.; NEPOMUCENO, L. C. L.; REIS, M. R.; NASCIMENTO, C. A.; ALEXANDRINO, B.; MINHARRO, S. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de aves condenadas por colibacilose. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.10, n.1, p.1-8, 2016.

NGUYEN, F.; STAROSTA, A.L.; AREN, S.; SOHMEN, D.; Dönhöfer, A. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. **Biological Chemistry**, v. 396, n. 5, 2014.

OLIPHANT, C.M.; GREEN, G.M. Quinolones: A comprehensive review. **American family physician**, v. 65, n. 3, p. 455-465, 2002.

OLIVEIRA, F.A. **Características de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos em estirpes de *Escherichia coli* uropatogênica**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, 2011.

OLIVEIRA, N. I. S. A piscicultura no município de Porto Grande, estado do Amapá: subsídios ao desenvolvimento local. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional, Macapá-Amapá, 2017.

ORÚS, P.; GOMES-PEREZ, L.; LERANOZ, S.; BERLANGA, M. Increasing antibiotic resistance in preservative-tolerant bacterial strains isolated from cosmetic products. **International Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 51–59, 2015.

PARK, H. R.; KIM, T. H.; BARK, K. M. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 443-460, 2002.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-86, 2015.

PEIXOTO, J.C.C. **Diferenças genéticas entre linhagens de *Escherichia coli* do sorogrupo O26 isoladas no Brasil e em outros países**. Dissertação (Mestrado). Universidade São Paulo, São Paulo, 2001.

PEÑA, M. E. V. Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos. **Medical Laboratory Journal**, v. 9, n. 7, p. 371–384, 2000.

PÉRES-LOSADA, M.; ARENAS, M.; CASTRO-NALLAR, E. Microbial sequence typing in the genomic era. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 63, p. 346-359, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.022>.

PETCHIAPPAN, A.; CHATTERJI, D. Antibiotic Resistance : Current Perspectives. **ACS Omega**, v. 2, p. 7400–7409, 2017.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **Lancet Infect Dis**. v. 8, n.3, p.159-66, 2008.

QUESADA, S.P.; PASCHOAL, J.A.; REYES, F.G. Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones - a review. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 9, p. 1321-1333, 2013.

RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. n. 60, v. 3, p. 470-82, 2007.

REDGRAVE, L. S.; SUTTON, S. B.; WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 8, 2014.

REZENDE, R. A. E. **Enrofloxacin na piscicultura: estudo da incorporação do fármaco na ração visando a redução da taxa de lixiviação na água**. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

RICO, A.; SATAPORNVANIT, K.; HAQUE, M. M.; BRINK, P. J. V. Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: A critical review. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, n. 2, p. 75–93, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01062.x>

ROCHA, T. M. **Fatores de virulência de *Escherichia coli* patogênica para aves**. f31. Tese -Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

SABAT, A. J.; BUDIMIR, A.; NASHEV, D.; SÁ-LEÃO, R.; VAN DIJL, J. M.; LAURENT, F.; GRUNDMANN, H.; FRIEDRICH, AW.; ESCMID, STUDY GROUP OF EPIDEMIOLOGICAL MARKERS. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. **Euro Surveillace**, v. 18, n. 4, 2013. <https://doi.org/10.2807/ese.18.04.20380-en>

SABRI, N. A.; SCHMITT, H.; Van Der ZAAAN, B.; GERRITSEN, H. W.; ZUIDEMA, T.; RIJNARTS, H. H. M.; LANGENHOFF, A. A. M. Prevalence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a wastewater effluent-receiving river in the Netherlands. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.004>

SALUTIS, S. Multirresistência bacteriana e a consequência do uso irracional dos antibióticos Bacterial multidrug resistance and the consequence of irrational antibiotic use. p. 1–8, 2019.

SAROWSKA, J.; FUTOMA-KOLOCH, B.; JAMA-KMIECIK, A.; FREJ-MADRZAK, M.; KSIAZCZYK, M.; BUGLA-PLOKONSKA, G.; CHOROSZY-KROL, I. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. **Gut pathogens**, v.11, n. 10, p.1-6, 2019.

SCHMIDT, A. S.; BRUUN, M. S.; DALSGAARD, I.; PEDERSEN, K.; LARSEN, J. L. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four danish rainbow trout farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4908-15, 2000. <https://doi.org/10.1128/aem.66.11.4908-4915.2000>

SHIVAKUMARASWAMY, S. K.; DEEKSHIT, V. K.; VITTAL, R. Phenotypic & genotypic study of antimicrobial profile of bacteria isolates from environmental samples. p. 232–239, 2019.

SILVA, R. M.; SILVA, R. C.; RIBEIRO, A. B. Resíduos de antibióticos em leite. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 1, p. 30–44, 2012.

SMITH, P. Antimicrobial resistance in aquaculture. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris)**, v. 27, n.1, 243-264, 2008.

STACY, A.; MCNALLY, L.; DARCH, S.E.; BROWN, S.P.; WHITELEY, M. The biogeography of polymicrobial infection. **Nature Reviews Microbiology**, v.16, p. 93-105, 2016. *Boletim ABLimno*. v. 41, n. 1, p. 08-14, 2015.

STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C.; ROBICSEK, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat clinical. **Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 664-689, 2009. <https://doi.org/10.1128/CMR.00016-09>

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. Beta-lactam Antibiotics. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

SULTAN, I.; RAHMAN, S.; JAN, A.T.; SIDDIQUI, M.T.; MONDAL, A.H.; HAQ, Q.M.R. Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018

TADESSE, D. A.; ZHAO, S.; TONG, E.; AYERS, S.; SINGH, A.; McDERMOTT, P. F. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 5, 2012.

TAVARES-DIAS, M. Piscicultura continental no Estado do Amapá: diagnóstico e perspectivas / Marcos Tavares-Dias. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Amapá**, 42 p. 2011.

TERRANCE M.; NORASAK, A.; KALCHAYANAND, J. M.; BOSILEVAC, D. M.; BRICHTA-HARHAY, S. D.; SHACKELFORD, J. L.; BONO, T. L.; WHEELER, M. K. Comparison of Effects of Antimicrobial Interventions on Multidrug-Resistant *Salmonella*, Susceptible *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7, **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 11, p. 2177-2181, 2008.

TERRANCE M.; NORASAK, A.; KALCHAYANAND, J. M.; BOSILEVAC, D. M.; BRICHTA-HARHAY, S. D.; SHACKELFORD, J. L.; BONO, T. L.; WHEELER, M. K. Comparison of Effects of Antimicrobial Interventions on Multidrug-Resistant *Salmonella*, Susceptible *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7, **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 11, p. 2177-2181, 2008.

van HOEKAHAM, STALENHOF JE, VAN DUIJKEREN E, FRANZ E. Comparative virulotyping of extended-spectrum cephalosporin-resistant *E. coli* isolated from broilers, humans on broiler farms and in the general population and UTI patients. **Veterinary Microbiology**. v. 194, p. 55–61, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.008>.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: causes and threats. **P & T journal**, v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015.

VOLKOVA, V. V.; KUKANICH, B.; RIVIERE, J. E. Exploring Post-Treatment Reversion of Antimicrobial Resistance in Enteric Bacteria of Food Animals as a Resistance Mitigation Strategy. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 11, p. 610–617, 2016. <http://doi.org/10.1089/fpd.2016.2152>

WANG J, GIBBONS JF, MCGRATH K, BAI L, LI F, LEONARD FC, STEPHAN R, FANNING S. Molecular characterization of *bla*ESBL-producing *Escherichia coli* cultured from pig farms in Ireland. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 71, p. 3062-5, 2016. <http://doi.org/10.1093/jac/dkw278>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Organisation for Animal Health (OIE). **Antimicrobial resistance: a manual for developing national action plans**. Genebra, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html> Acesso em: maio 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Organisation for Animal Health (OIE). **Antimicrobial resistance: a manual for developing national action plans**. Genebra, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html> Acesso em: maio 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/iris/handle/10665/112642>> Acessado em: 07 maio 2018.

RESPOSTAS CELULARES NA INFECÇÃO POR *Mycobacterium leprae*

Ainoã Lira de Sousa Gonçalves

Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI),
Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde
(IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: noalira@gmail.com

Marcos Jessé Abrahão Silva

Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI),
Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde
(IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: jesseabrahao10@gmail.com

Letícia Siqueira Moura

Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI),
Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde
(IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: leticiams.bio@gmail.com

Midiã Ester Santos de Carvalho

Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI),
Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde
(IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: santosester146@gmail.com

Karla Valéria Batista Lima

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI),
Instituto Evandro Chagas (IEC). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: karlalima@iec.gov.br

Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima

Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI),
Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde
(IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: luanalima@iec.gov.br

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença causada pela bactéria *Mycobacterium leprae* caracterizada como infecciosa, contagiosa, granulomatosa e crônica, constituída como uma enfermidade dermatoneurológica com progressão lenta, na qual predomina a via de transmissão respiratória. A doença se manifesta, principalmente, por lesões cutâneas com diminuição da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil em que o bacilo afeta a pele e os nervos periféricos, constituindo-se a principal causa de incapacidade física (WHO, 2017; SILVA, et al., 2017).

Está bem estabelecido que os sistemas endócrino, nervoso e imunológico estão envolvidos em múltiplas interações durante a resposta do hospedeiro aos estímulos de patógenos, buscando combater possíveis ameaças. A compreensão dos dispositivos de defesa imune contra os diversos patógenos traz maior esclarecimento sobre a fisiopatologia dos agentes infectoparasitários e as muitas formas de evasão do parasita frente ao hospedeiro (MACHADO, et al., 2004).

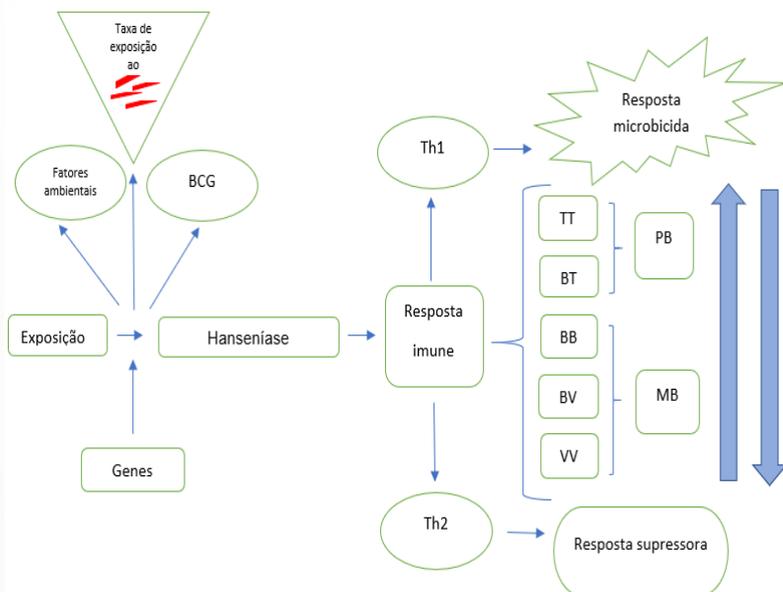
A resposta inata é ativada assim que o *M. leprae* invade as células. A primeira interação entre o hospedeiro e o bacilo, ocorre por meio de receptores como os *Toll-like*s (TLRs), pelas células dendríticas (DCs) (MENDONÇA, et al., 2008). Com o reconhecimento do bacilo, ocorre o processamento e apresentação de antígenos pelas DCs. As DCs atuam na fagocitose e apresentação de antígenos em infecções por *M. leprae* e, posteriormente, na formação do granuloma. As células langerhans (LCs) são DCs residentes localizadas na epiderme, que expressam as moléculas que apresentam lipídios (HUNGER, et al., 2004).

Os queratinócitos além de atuarem como células apresentadoras de antígenos do *M. leprae*, em granulomas de pacientes com hanseníase foram observados forte expressão de nitrotirosina e iNOS (atividade antimicrobiana) quando comparado com a pele normal. Adicionalmente são os queratinócitos, em vez macrófagos, que regulam a maior expressão da beta-defensina humana 2 e 3 em resposta a estimulação ao *M. leprae* e são também capazes de aumentar a expressão da catalecidina e TNF- α (LYRIO, et al., 2015).

O desenvolvimento da hanseníase exige susceptibilidade, contato próximo com um paciente não tratado e sofre influência dos fatores ambientais e nutricionais do indivíduo. Após a infecção a maioria dos indivíduos é resistente à hanseníase e para os suscetíveis, de acordo com a resposta imunológica, duas formas clínicas totalmente opostas podem se desenvolver: a Hanseníase Tuberculoide (TT) e a Hanseníase Vichorwiana (VV). Adicionalmente também pode desenvolver-se uma forma intermediária a esses polos, na qual os indivíduos apresentam respostas imunes que variam entre os extremos chamada de Hanseníase Dimorfa (HD) ou Borderline, classificada de acordo com as manifestações clínicas em três formas clínicas: a Hanseníase Borderline Tuberculóide (BT), a Borderline Virchowiana (BV) e a Borderline Borderline (BB).

Para facilitar o manejo dos pacientes, de seus contatos intradomiciliares e facilitar o tratamento as formas VV, BV e BB foram classificadas como multibacilares (MB) e as TT e BT como paucibacilares (PB), segundo a Organização Mundial de Saúde (Figura 01) (CARVALHO, et al., 2018, SANDHU e MITRA, 2018; FRANCHESCHI, et al., 2009; OMS, 1882).

Figura 01 - Esquema de resposta imune a hanseníase.



Fonte: Francheschi et al., (2009) e Sandhu e Mitra (2018).

O indivíduo sofre influência dos fatores ambientais, da taxa de exposição ao bacilo, de sua susceptibilidade genética e da ausência de vacinação pela vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), para desenvolver a hanseníase. Após a infecção, a doença pode caminhar para uma das 5 formas clínicas do espectro da hanseníase. O que define esse caminhar é o padrão de resposta imune apresentada pelo hospedeiro, que pode ser uma resposta microbicida (Th1), levando a doença para uma das duas formas clínicas PB ou pode ser uma resposta supressora (Th2), levando a doença para a manifestação de uma das 3 formas clínicas MB. Dessa forma, quanto mais intensa a resposta microbicida menor será a quantidade de bacilos (formas PB) e quanto menos intensa a resposta microbicida, maior a quantidade de bacilos nos pacientes (formas MB).

Nos pacientes TT, o *M. leprae* no interior dos macrófagos estimula uma resposta de contenção do bacilo que é caracterizada pelos linfócitos CD4+ em justaposição com os macrófagos no centro do granuloma e os linfócitos CD8+ restritos à periferia, caracterizando a formação de células epitelioides, células gigantes e consequentemente, formação do granuloma, representando assim uma reação de hipersensibilidade do tipo IV ou tardia. A proporção de linfócitos CD4+/CD8+ encontrada nas lesões de pacientes TT é de 1,9/1 (MASAKI, et al., 2014).

Nos pacientes VV os linfócitos T CD4+ são irresponsivos para o *M. leprae*, com aumento da carga bacilar, formação de infiltrado difuso, composto por histiócitos e macrófagos de aparência espumosa, também conhecido como células de Virchow. Observa-se uma inversão de linfócitos T, com predominância de CD8+ na proporção de CD4+ /CD8+ de 0,6/1. Essa diferença entre subtipos de linfócitos T é direcionada pelas citocinas produzidas no local da lesão (MASAKI, et al., 2014). Pacientes TT apresentam predominantemente citocinas IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α e IFN- γ da resposta celular do tipo Th1, enquanto pacientes VV apresentam predominantemente citocinas do padrão Th2: IL-4, IL-5 e IL-10 (GASCHIGNARD, et al., 2016; SILVA, et al., 2017).

CÉLULAS NATURAL KILLER T

As células *Natural Killer T* (NKT) são uma linhagem de células T especializadas com características funcionais únicas que expressam marcadores de superfícies característicos de células NKT (NK1.1/CD161, DX5 ou CD56) e um receptor de célula T (TCR) semi-invariante, que reconhece glicolipídios ligados a moléculas CD1d monomórficas. Porém, semelhante aos linfócitos T tradicionais, as NKT podem ser tanto CD4+, quanto CD4- CD8- (duplo negativas) (SANDHU, et al., 2018; ANDRADE, et al., 2005).

As NKT interligam a resposta imune inata com a adaptativa, e aquelas restritas ao reconhecimento via CD1d apresentam um papel importante nas respostas imunológicas às micobactérias. A apresentação da α -galactosilceramida (α -GalCer) por APCs que expressam CD1d, como DCs e células B, resulta na rápida ativação das células NKT e rápida produção de citocinas imunorreguladoras, como IL-4, IFN- γ e TNF- α após sua ativação (SANDHU, et al., 2018; ANDRADE, et al., 2005).

Estudos específicos na hanseníase mostraram que células NKT duplamente negativas, derivadas de lesão de pele de um paciente com hanseníase, responderam às frações de micobactérias na presença de APCs que expressavam CD1d. No entanto, a fração da parede celular solúvel depletada de lipoarabinomanano não induziu a detectáveis proliferações de células T. O reconhecimento de lipoarabinomanano purificado de *M. leprae* foi restringido por CD1d, e as células T lisaram monócitos apresentando lipoarabinomanano de maneira restrita a CD1d. O lipoarabinomanano também induziu essas células T a secretar grandes quantidades de IFN- γ . Ao examinar pacientes com hanseníase, eles encontraram poucas células CD1+ em lesões de hanseníase LL. Em contraste, lá foi uma forte supra regulação de células CD1+ na região granulomatosa de lesões de pacientes com hanseníase TT ou reação reversa. (ROSAT, et al., 1999; SIELING, et al., 1995)

Dessa forma na hanseníase, as NKT desempenham um papel determinante na regulação do tipo variado de respostas imunes devido a sua capacidade de produzir citocinas as quais direcionam a resposta para Th1 (IFN- γ) ou Th2 (IL4), podendo estar presentes nos dois tipos de respostas (Th1 ou Th2). (SANDHU, et al., 2018).

CÉLULAS TH1

As citocinas Th1 predominantes em pacientes tuberculóides são as IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α e IFN- γ . O IFN- γ e TNF- α influenciam na formação de mediadores de oxidação, como reativos intermediários do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI), de grande valia na atividade intramacrofágica que fazem com que o indivíduo tenha boa imunidade ao patógeno. As células de linfócitos Th1 expressam frequentemente receptores de quimiocina CCR5 e CXCR3 (ARNOLDI; GERDES; FLAD, 1990; MOURA, et al., 2007; SIELING; MODLIN, 1994a; YAMAMURA, et al., 1991).

O IFN- γ age ativando macrófago e causando aumento de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) Classe I e MHC Classe II, que contribuem para a apresentação de antígenos, além de aumentar expressão de HLA-DR (Antígeno Leucocitário Humano de Classe II, alelo DR) e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), que favorecem a interação da célula T. O TNF- α eleva o fator microbicida dos macrófagos e incide por meio de um mecanismo sinérgico cíclico. A IL-2 ativa os

receptores de linfócitos CD4+, estimula a formação de clones celulares, é responsável por manter a produção de citocinas e, ao mesmo tempo, estimula as células NK, que podem aumentar a produção de IFN- α (RODRIGUES, 2008).

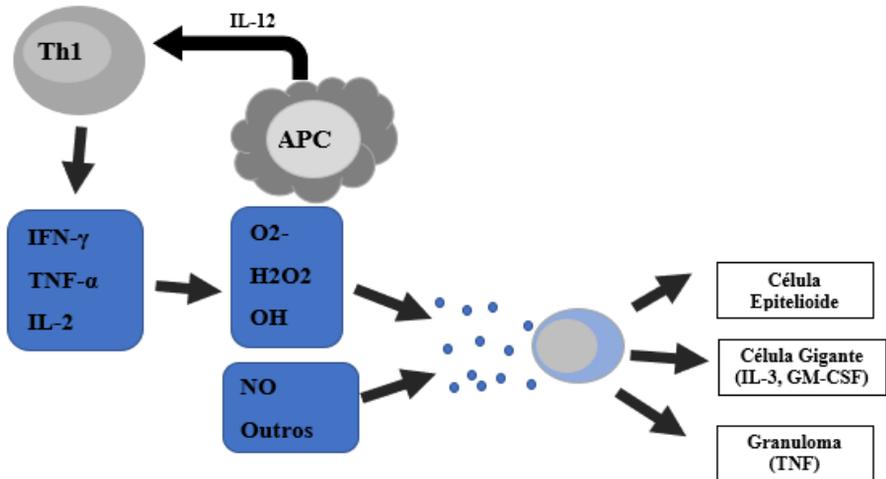
Na hanseníase, tanto o TNF- α quanto o IFN- γ atuam na alteração fenotípica dos macrófagos por meio de alteração do receptor celular deles de modo que passam de M0 para M1 (a macrófagos inflamatórios). O tipo M1 é responsável por síntese de citocinas e enzimas inflamatórias, como a Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS), a qual gera NO (óxido nítrico) e, por conseguinte, radicais livres que eliminam o bacilo (DE SOUSA; SOTTO; QUARESMA, 2017).

As APCs, em face do antígeno, fazem com que IL-12 seja forçada a conduzir células NK a liberar IFN- γ para produção de citocinas do perfil Th1 por meio de células T *naive*. Em modelos murinos, a IL-12 aumenta a resposta de citocinas Th1. Em hanseníase, a expressão de mRNA de IL-12 foi maior em lesões tuberculóides quando comparados às lesões virchowianas (SIELING; MODLIN, 1994b).

Dessa forma, a condução das células T em uma reação primária, no que tange a um padrão de citocinas Th1, deve-se à IL-12 que também é um dos principais fatores de crescimento dessas células. A IL-15 (interleucina 15) também é um potente fator de amadurecimento das células T e tem sido associado à hanseníase. Encontrou-se em lesões de pacientes tuberculóides comparada a lesões de virchowianos que a IL-15 recombinante (rIL-15) traz a expansão de células T com perfil CD56+ (células NK) encontradas em grande quantidade (BERNARDES GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

Assim, há pistas de que a IL-15 aumente a resposta das células T ao agente da doença. Além disso, a expressão de mRNA de IL-18 foi relatada em lesões de pacientes com a forma tuberculóide quando comparada à virchowiana. A resposta imune mediada por células tem como pontos cruciais a IL-18, que é fator indutor de IFN- γ (IGIF) e IL-12 na reação intramacrofágica que ainda é responsável por produzir mais citocinas (IL-3, interleucina-3 e GM-CSF, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) que tratam de várias funções, como a hematopoese para formação de mais células fagocíticas pela medula óssea (Figura 2) (BERNARDES GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

Figura 2 - Mecanismos das células Th1 sobre M0 em resposta ao *M. leprae*.

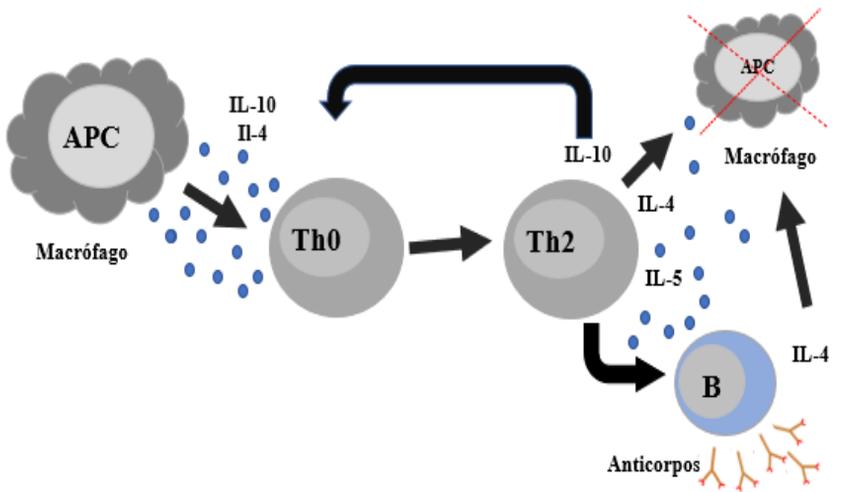


Fonte: Adaptado de BERNARDES GOULART; PENNA; CUNHA, 2002. Durante a forma tuberculóide, o macrófago ativado produz IL-12, que proporciona a expressão da subpopulação Th1 por meio de grande quantidade, principalmente, de IFN- γ , que é o principal responsável pela adição de radicais microbicidas (derivados do oxigênio e do nitrogênio). Esse macrófago é capaz de sintetizar TNF- α que é sustentador do granuloma.

CÉLULAS TH2

As células Th2 são uma das subdivisões dos linfócitos CD4+, as quais foram diferenciadas de Th0 devido a presença de citocinas como IL-4 e IL-10, produzidas por APCs, tais como os macrófagos (Figura 3) (HOLDSWORTH; KITCHING; TIPPING, 1999). As células Th2 produzem citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10. As citocinas IL-4 e IL-10 são supressoras das atividades dos macrófagos, agindo na inibição dessas células, concomitantemente, IL-4 irá estimular os linfócitos B que por sua vez vão produzir altos níveis de imunoglobinas e mastócitos, potencializando ainda mais a produção de IL-4, que terá o papel de incrementar a supressão macrófágica e mesmo com a alta produção de anticorpos, o bacilo não é desativado com a resposta Th2, pois trata-se de um antígeno intracelular (FOSS, 1997).

Figura 3 - Resposta imune Th2.



Fonte: Autores. Com a produção de citocinas como IL-10 e IL-4, pelas APCs, ocorre a diferenciação dos linfócitos Th0, em células CD4⁺ do tipo Th2, que por sua vez irá produzir mais IL-10, IL-4 e IL-5, que potencializa a diferenciação Th0 em Th2, aumentando assim a população de Th2, além de inibir a ação dos macrófagos e estimular o crescimento de células B e consequentemente a produção de anticorpos.

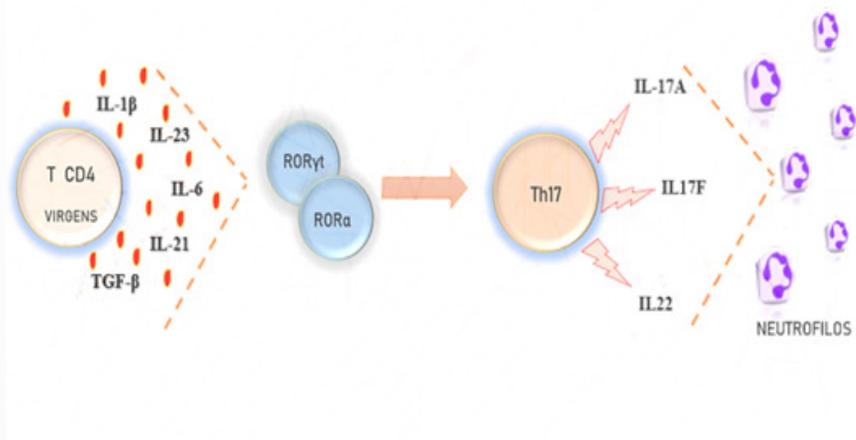
Relatos demonstram que citocinas produzidas nesse processo, IL-4 e IL-13, são responsáveis por inibir a ativação de macrófagos 1, e são capazes de induzir a polarização para macrófagos do tipo 2 (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2007). Os macrófagos 2 também são associados com a supressão da resposta Th1 através da secreção de IL-10 (CARVALHO, 2013). Sendo assim, é possível associar as respostas Th2 e a polarização dos macrófagos tipo 2.

CÉLULAS TH17

Um terceiro subconjunto de células auxiliares T, as células Th17, foi identificado com base em seu perfil de produção de citocinas. Essas células produzem IL-17A (IL-17), IL-17F e IL-22, citocinas envolvidas em neutrófilia, remodelação e reparação de tecidos e produção de proteínas antimicrobianas. As células Th17 são abundantes em interfaces mucosas, onde contêm infecção com bactérias patogênicas e fungos. São derivadas de células T CD4⁺ virgens, assim como Th1 e Th2. As células Th17

são expressas em meios com elevados índices de IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-23 e IL-21. Estas citocinas são induzidas por DCs e ativadas após o reconhecimento dos PAMPs, quando reconhecidos pelos TLR, elas atuarão nas células T CD4 virgens e irão induzir a expressão dos fatores de transcrição ROR γ t e ROR α , e estes, por sua vez, irão induzir a diferenciação em Th17 (Figura 4) (VAN, V et al., 2009, (SAINI, et al., 2017; SANDHU, et al., 2018).

Figura 4 - Polarização das células Th17



Fonte: Adaptado de Saini, et al., (2017) ; Sandhu, et al., (2018). As citocinas IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-23 e IL-21 atuarão sob as células T CD4 indiferenciadas, essas por sua vez irão induzir a expressão dos fatores de transcrição ROR γ t e ROR α , e estes irão induzir a diferenciação em Th17, a Th17 será responsável pela produção de IL-17A, IL-17F e IL22, e também no recrutamento de neutrófilos, cruciais na atividade pró-inflamatória.

O receptor da IL-17 (IL-17R) está presente em vários tecidos, como pulmão, rim, fígado e baço (MOSELEY, et al, 2003. LIN, RITCHEA, LOGAR, et al., 2009). A importância do papel destas células foi bem determinada em estudos com a síndrome de hiper-IgE. Nesta síndrome ocorre uma mutação no STAT3 e com isso a capacidade das respostas por Th17 é comprometida tornando os indivíduos mais suscetíveis a infecções recorrentes por *Cândida albicans* e *Staphylococcus aureus* na pele (MIOSSEC; KORN; KUCHROO, 2009).

As células Th17 apresentam função pró-inflamatória através recrutamento de neutrófilos, ativação de macrófagos e aprimoramento dos efeitos celulares Th1.

Acredita-se que grande parte dos danos inflamatórios anteriormente atribuídos à resposta Th1 depende da IL-17 e IL-23 (citocina responsável pelo suporte à resposta th17 in vivo) (SAINI, et al., 2017; SANDHU, et al., 2018).

Células CD4⁺ Th17 foram recentemente identificadas em pacientes com hanseníase. Um desequilíbrio entre a função celular Th17 e Treg pode ser crítico na imunopatênese de muitos estados da doença, o que é observado em um estudo, onde maior produção de IL-10 por células Treg em pacientes BV / LL se correlaciona significativamente com imunidade polarizada destacada por menor produção de IL-17 por células T CD4⁺, enquanto o bloqueio de IL-10 / TGF- β resultou na reversão da resposta imune efetora (IL-17) em BV / LL com maior frequência de células Th17. Isso indica que, negando a influência das citocinas supressivas, podemos obter com sucesso a resposta imunológica. A presença de citocinas Th17 (IL-6, IL-17 e IL-23) in vitro resulta na redução da expressão FoxP3 em Tregs simultaneamente, possivelmente levando ao aumento em células CD4⁺ produtoras de IL-17 em BL/LL. Isso sugere ainda que a geração de células Treg específicas de antígeno é muito dependente do ambiente de citocinas a que estão expostas. Assim, essas células podem ser alvo de reversão de resposta efetiva em pacientes com BL/LL que se mostram um importante modo de modulação imunológica nos hospedeiros imunocomprometidos para reviver a resposta imune (SAINI, et al., 2013; SADHU, et al., 2016)

Apesar de ainda existirem poucos estudos que elucidem claramente o papel das células Th17 na hanseníase, estudos indicam que a frequência dessas células em indivíduos paucibacilares e multibacilares apresenta diferença, nos multibacilares é relativamente menor do que em paucibacilares. Outro estudo realizado com contatos domiciliares saudáveis de pacientes com hanseníase mostraram maior frequência de células produtoras de IL-17, quando comparados a indivíduos doentes, o que sugere que esta citocina tem papel importante na resposta imune ao *M. leprae* (SAINI, et al., 2013).

As reações hansênicas são caracterizadas como um estado inflamatório agudo que ocorre por uma rápida mudança na resposta imunológica do hospedeiro contra os antígenos bacilares. Esta reação pode ocorrer em todas as formas clínicas da doença, antes, depois ou durante a poliquimioterapia, exceto na forma indeterminada. As reações hansênicas são subdivididas em tipo 1, que ocorre por uma exacerbada resposta da imunidade celular, e tipo 2, acredita-se que o aumento da IL-17 seja um dos principais responsáveis por essa resposta imune exacerbada e a causa de danos teciduais (MASTRANGELO; MARCER; CEGOLONE, et al., 2008).

As células Th17 e Treg são dois subconjuntos de células que apresentam efeitos de contrapeso, um desequilíbrio entre a função de um dos dois linfócitos pode

interferir drasticamente na imunidade e ser crítico para a fisiopatologia das doenças. Há um equilíbrio estável entre a ativação com Th17 e supressão com Treg da resposta imune. A expressão excessiva de Th17 por induzir a inflamação pode causar danos teciduais, por isso a polarização deste subconjunto de células T precisa ser estritamente regulada (SADHU, et al. 2016).

CÉLULAS Treg na hanseníase

Recentemente foi descrito uma outra resposta adaptativa na hanseníase, gerada por linfócitos T reguladores ou Treg. Essas células constituem cerca de 5 a 10% dos linfócitos CD4+ no sangue periférico, sendo caracterizado pela expressão de CD25+ e pelo fator de transcrição nuclear P3 (forkhead box P3 ou FoxP3) descritas tanto no sangue periférico como no local da lesão (CASTRO, 2018; LIMA, 2017). Com base em suas particularidades, dois subconjuntos principais de células Tregs foram identificados: um são as células Tregs CD4+ CD25+ de ocorrência natural (células Treg naturais), as quais se desenvolvem principalmente no timo e outras são as células Treg induzíveis, que se desenvolvem na periferia a partir de células T CD4+ convencionais após serem expostas a sinais como citocinas, drogas ou APCs (SANDHU, et al., 2018).

As células Tregs apresentam ações supressoras que incluem realizar a supressões por citocinas inibitórias, por citólise, por ruptura metabólica, por modulação e maturação de DCs, garantir a homeostase e limitar o desenvolvimento das doenças inflamatórias crônicas (SANDHU, et al., 2018). Dessa forma, anormalidades no número e na função das células Treg prejudicam o controle do mecanismo de regulação imune, podendo assim interferir no curso de doenças infecciosas crônicas (LIMA, 2017). Embora as Tregs desempenhem um papel de extrema importância na imunopatologia, a complexidade de sua ação nas diferentes doenças infecciosas ainda não está bem elucidada (LIMA, et al., 2019; LIMA, 2017).

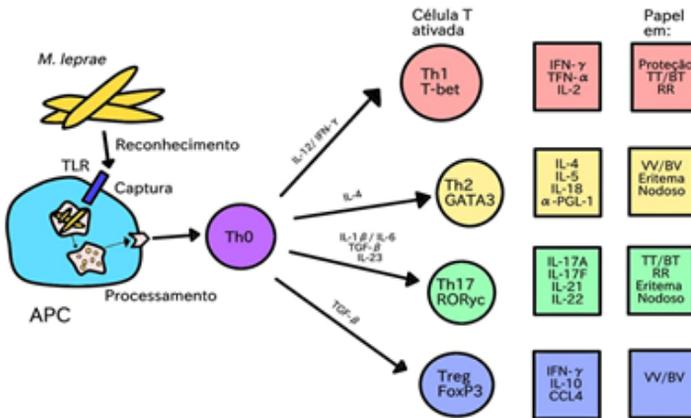
Na hanseníase, Abdallah (2014) aponta aumento das células Tregs circulantes em indivíduos com hanseníase PB, porém Rezende (2013) descreve a presença aumentada do marcador FoxP3 na forma MB e Saini (2014) e Bobosha (2014) vem com seus estudos reforçar os resultados que sugerem que as Tregs estão presentes em números aumentados em pacientes com a forma multibacilar.

Sandhu e Mitra (2018) também apontam que as células Tregs estão presentes em maior número em pacientes com a forma MB (VV), por conta de sua produção de citocinas imunossupressoras, que levam à regulação negativa das células T, encaminhando a resposta para via de Th2.

CONCLUSÃO

Os polos da hanseníase estão associados a um perfil imunológico celular ou humoral característico, nos quais a resposta mediada por células Th1 caracteriza a eliminação ou contenção do organismo em granulomas, realizando assim uma ação microbicida, enquanto a resposta mediada por células Th2 é ineficaz, permitindo a proliferação dos bacilos e doença sistêmica. Além dessas, outras linhagens de celulares T estão envolvidas. Como as células Th17 e a sua correlação com a forma tuberculóide (paubacilar), as células T reguladoras e o a forma virchowiana (multibacilar) (Figura 5). As células NKT estão diretamente responsáveis com o equilíbrio da resposta imune do hospedeiro e também podem direcionar para uma resposta Th1 ou Th2.

Figura 5- Esquema geral de resposta de células T envolvidas no desenvolvimento da hanseníase.



Fonte: Adaptado de Queiroz, 2019. O *M. leprae* é reconhecido pelo TLR-2, das APCs, capturado, processado e posteriormente apresentado para as células Th0, que iram se diferenciar em Th1, Th2, Th17 ou Treg, dependendo das citocinas envolvidas na resposta, a diferenciação dessas células está intimamente relacionadas a instalação e expressão da doença no hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- Abdallah, M., Attia, E. A. S., Saad, A. A., El-Khateeb, E. A., Lotfi, R. A., Abdallah, M., & El-Shennawy, D. (2014). Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy; correlation with circulating CD4+ CD25highFoxP3+ T-regs cells. **Experimental Dermatology**, 23(10), 742–747. <https://doi.org/10.1111/exd.12529>.
- ANDRADE, B. B.; MARTINS, M. J.; TELES, M. S.; & CAMPOS, R. A. Células T“Natural Killer”: Papel na Imunorregulação da Asma e Doenças Alérgicas. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.** – Vol. 28, Nº 3, 2005.
- ARNOLDI, J.; GERDES, J.; FLAD, H. D. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. **American Journal of Pathology**, v. 137, n. 4, p. 749–753, 1990.
- BERNARDES GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Immunopathology of leprosy: The complexity of the mechanisms of host immune response to Mycobacterium leprae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 365–375, 2002.
- Bobosha, K., Wilson, L., van Meijgaarden, K. E., Bekele, Y., Zewdie, M., van der Ploeg-van Schip, J. J., Abebe, M., Hussein, J., Khadge, S., Neupane, K. D., Hagge, D. A., Jordanova, E. S., Aseffa, A., Ottenhoff, T. H. M., & Geluk, A. (2014). T-Cell Regulation in Lepromatous Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 8(4), 2–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002773>
- CARVALHO, B. T. C.; NUDELMAN, V.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. **Mecanismos de defesa contra infecções. J. pediatr.** (Rio J), v. 74, n. sup.1, p. 3-S11, 1998.
- CARVALHO, F. M. Resposta imune celular Mycobacterium leprae-específica in vitro de contatos de pacientes com hanseníase multibacilar no início e durante o tratamento do caso índice. 2013.
- CARVALHO, R.S., FOSCHIANI, I.M., COSTA, M.R.S.N. *et al.* Early detection of *M. leprae* by qPCR in untreated patients and their contacts: results for nasal swab and palate mucosa scraping. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37, 1863–1867 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3320-9>
- CASTRO, K. K. G. DE. (2018). *Caracterização fenotípica e funcional de subpopulações de linfócitos t reguladores (treg) na reação tipo 2 (enl) da hanseníase. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro Março de 2018*

DE SOUSA, J. R.; SOTTO, M. N.; QUARESMA, J. A. S. Leprosy as a complex infection: Breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the immunopathogenesis of the disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, p. 18–21, 2017.

FOSS, N. T. Aspectos Imunológicos Da Hanseníase. *Medicina (Ribeirao Preto. Online)*, v. 30, n. 3, p. 335, 1997.

FOSS, N. T. Aspectos Imunológicos Da Hanseníase. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 30, n. 3, p. 335, 1997.

FRANCHESCHI, D.S.A., SACRAMENTO, W.S.DO, MAZINI, P.S., & VISENTAINER, J.E.L. (2009). Hanseníase no mundo moderno: O que sabemos sobre a influência genética do hospedeiro no seu controle? **Arquivos de Medicina**, 23(4), 159–165. http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-34132009000400004

Gaschignard, J., Grant, A. V., Thuc, N. Van, Orlova, M., Cobat, A., Huong, N. T., Ba, N. N., Thai, V. H., Abel, L., Schurr, E., & Alcaï, A. (2016). Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 10(5), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004345>

Grupo de Estudos da OMS sobre Programas de Quimioterapia da Hanseníase para Controle e Organização Mundial da Saúde. (1982). Quimioterapia da hanseníase para programas de controle: relatório de um grupo de estudos da OMS [reunião realizada em Genebra de 12 a 16 de outubro de 1981]. Organização Mundial de Saúde. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/38984>

HOLDSWORTH, S. R.; KITCHING, A. R.; TIPPING, P. G. Th1 and th2 T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis. **Kidney International**, v. 55, n. 4, p. 1198–1216, 1999.

Hunger, R. E., Porcelli, S. A., Modlin, R. L., Hunger, R. E., Sieling, P. A., Ochoa, M. T., Sugaya, M., Burdick, A. E., Rea, T. H., Brennan, P. J., Belisle, J. T., Blauvelt, A., Porcelli, S. A., & Modlin, R. L. (2004). Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells Find the latest version : Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. **The Journal of Clinical Investigation**, 113(5), 701–708. <https://doi.org/10.1172/JCI200419655>.The

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 cells. **Annual Review of Immunology**, 27, 485–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>.

Lima, C. P., Costa, E. M., & Sampaio, L. F. (2019). **Expressão de FoxP3 em diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas**. *55(4)*, 438–441.

LIN Y.; RITCHEA S.; LOGAR A.; SLIGHT S.; MESSMER M.; RANGEL-MORENO J.; GUGLANI L.; ALCORN J.F.; STRAWBRIDGE H.; PARK S.M.; ONISHI R.; NYUGEN N.; WALTER M.J.; POCIASK D.; RANDALL T.D.; GAFFEN S.L.; IWAKURA Y.; KOLLS J.K.; KHADER S.A. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity*. v.31, n.5, p. 799-810, 2009

Lyrio, E. C. D., Campos-Souza, I. C., Corrêa, L. C.D., Lechuga, G. C., Verícimo, M., Castro, H. C., Bourguignon, S. C., Côte-Real, S., Ratcliffé, N., Declercq, W. S., Dilvani O. (2015). Interaction of *Mycobacterium leprae* with the HaCaT human keratinocyte cell line: New frontiers in the cellular immunology of leprosy. *Experimental Dermatology*. *Experimental Dermatology*. 24 (7), 536-542. [https://doi.org/ 10.1111/exd.12714](https://doi.org/10.1111/exd.12714).

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–662, 2004.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 1, p. 14–16, 2007.

Masaki, T., Mcglinchey, A., & Cholewa-waclaw, J. (2014). *Innate Immune Response Precedes Mycobacterium leprae – Induced Reprogramming of Adult Schwann Cells*. 16(1). <https://doi.org/10.1089/cell.2013.0064>

MASTRANGELO G.; MARCER G.; CEGOLON L.; BUJA A.; FADDA E.; SCOIZZATO L.; PAVANELLO S. How to prevent immunological reactions in leprosy patients and interrupt transmission of *Mycobacterium leprae* to healthy subjects: Two hypotheses. **Medical Hypotheses**, v.71, n.4, p.551-563, 2008.

MENDONÇA, V. A. et al. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 4, p. 343–350, 2008.

mondiale de la Santé, O., & Organization, W. H. (2017). Global leprosy update, 2016: accelerating reduction of disease burden–Situation de la lèpre dans le monde, 2016: accélération de la réduction de la charge de morbidité. *Weekly Epidemiological Record=Relevé Épidémiologique Hebdomadaire*, 92(35), 501–519.

MOSELEY, T.A., HAUDENSCHILD, D.R., ROSE, L., REDDI, A.H. Interleukin 17 family and IL-17 receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 14, p. 155-174, 2003.

MOURA, D. F. et al. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: A new model to study Mycobacterium leprae-human cell interaction. **British Journal of Dermatology**, 2007.

QUEIROZ, E. A. DE. (2019). Expressão diferencial de biomarcadores imunológicos de infecção subclínica em casos multibacilares de hanseníase e seus contatos domiciliares TT - Differential expression of immunological biomarkers of subclinical infection in multibacillary leprosy case. 127. <http://hdl.handle.net/1843/30789>

REZENDE, D. V. P. (2013). Estudo da expressão imunohistoquímica de linfócitos T-reg em pacientes com formas polares de hanseníase e reações hansênicas. *Universidade federal do ceará, Faculdade de medicina, departamento de patologia e medicina legal. Programa de pós-graduação em Patologia.*, 66(2013), 37–39.

RIDLEY D.S., JOPLING W.H. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. **International Journal of Leprosy**. 34:255-273, 1966.

RODRIGUES, A. G. ESTUDO DO POLIMORFISMO C2029T NO GENE DO RECEPTOR tool-like TIPO 2 E DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM PACIENTES COM HANSENÍASE. p. 107, 2008.

Sadhu, S., & Mitra, D. K. (2018). Emerging concepts of adaptive immunity in leprosy. **Frontiers in Immunology**, 9(APR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00604>

Sadhu, S., Khaitan, B. K., Joshi, B., Sengupta, U., Nautiyal, A. K., & Mitra, D. K. (2016). Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004338>.

Saini C, Ramesh V, Nath I (2013) CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS Negl Trop Dis** 7(7): e2338. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002338>.

Saini, C., Ramesh, V., & Nath, I. (2013). CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002338>.

Saini, C., Ramesh, V., & Nath, I. (2014). Increase in TGF- β Secreting CD4+CD25+ FOXP3+ TRegulatory Cells in Anergic Lepromatous Leprosy Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 8(1), 23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002639>

Saini, C., Tarique, M., Rai, R., Siddiqui, A., Khanna, N., & Sharma, A. (2017). T helper cells in leprosy: An update. **Immunology Letters**, **184**(February), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.02.013>

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–381, 2006.

SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Cytokine Patterns at the Site of Mycobacterial Infection. **Immunobiology**, 1994a.

SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Regulation of Cytokine Patterns in Leprosy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1994b.

Silva, A. R., Queiroz, M. F. A., Ishikawa, E. A. Y., Silvestre, M. D. P. S. A., & Xavier, M. B. (2017). Evaluation of agreement between tests for the diagnosis of leprosy. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, *53*(2), 100–107. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20170014>

Stricto, P. D. E. P., Em, S., & Aplicadas, C. (2017). *CAMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS Células T reguladoras em diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas Células T reguladoras em diferentes formas de hanseníase e reações hansênicas.*

YAMAMURA, M. et al. Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, 1991.

ZELANTE, T., DE, L.A., BONIFAZI, P., MONTAGNOLI, C., BOZZA, S., MORETTI, S., BELLADONNA, M.L., VACCA, C., CONTE, C., MOSCI, P., BISTONI, F., PUC CETTI, P., KASTELEIN, R.A., KOPF, M., ROMANI, L. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, p. 2695-2706, 2007.

O VÍRUS T-LINFOTRÓPICO HUMANO (HTLV): Um inimigo silencioso

Cássia Cristine Costa Pereira

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical (NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

e-mail: cassiaccpereira@gmail.com

Macy Kamila Queiroz Rolim

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará (UFPA).

Belém, Pará, Brasil.

e-mail: macy1camila@gmail.com

Debora Glenda Lima de La-Roque

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

e-mail: debora.laroque@gmail.com

Ingrid Christiane Silva

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical (NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

e-mail: ingridchristiane22@gmail.com

Valéria Gabriele Caldas Nascimento

Faculdade de Enfermagem (FAENF), Universidade Federal do Pará (UFPA).

Belém, Pará, Brasil.

e-mail: valerianascimento5@gmail.com

Louise de Souza Canto Covre

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical (NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

e-mail: louisecanto12@yahoo.com.br

Taylana Formigosa Cabral

Faculdade de Biomedicina, Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA),
Belém, Pará, Brasil.

e-mail: taylana.formigosa@gmail.com

Dânia Cardoso Paysan

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical
(NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

e-mail: daniapaysan@yahoo.com.br

Lyzandra Patrícia Maria dos Santos

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo (USP).
Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

e-mail: lyzandrapmsantos@gmail.com

Rosilma dos Santos Albuquerque

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical
(NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

e-mail: rose.rosilma@gmail.com

Luana Maria de Oliveira Lima

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará (UFPA).
Belém, Pará, Brasil.

e-mail: luanamlima3@gmail.com

Ericka Bechara Ferreira

Faculdade de Biomedicina, Faculdade Integrada Brasil Amazônia (FIBRA),
Belém, Pará, Brasil.

e-mail: erickabechara09@gmail.com

Izabela Mendonça de Assis

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical
(NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

e-mail: izabela_stm@hotmail.com

Wanderson Santiago de Azevedo Junior

Faculdade de Enfermagem (FAENF), Universidade Federal do Pará (UFPA),
Belém, Pará, Brasil.

e-mail: wanderson_santiago12@hotmail.com

Josele de Jesus Quaresma Trindade

Faculdade de Enfermagem (FAENF), Universidade Federal do Pará (UFPA),
Belém, Pará, Brasil.

e-mail: joselly_trindade@hotmail.com

Leonardo Miranda dos Santos

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical
(NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

e-mail: leonn_bio20@yahoo.com.br

Maísa Silva de Sousa

Laboratório de Biologia Molecular e Celular. Núcleo de Medicina Tropical
(NMT), Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, Pará, Brasil.

e-mail: maisaufpa@gmail.com

Introdução

O Vírus T-linfotrópico Humano (HTLV) foi identificado pela primeira vez na década de 1980, e prontamente relacionado a patologias descritas previamente. Atualmente, existem 4 (quatro) tipos de HTLV descritos na literatura, contudo, apenas a infecção pelo HTLV-1 apresenta associação comprovada com manifestações clínicas e doenças debilitantes. Embora se tenha conhecimento destas enfermidades, a maioria dos portadores permanece assintomática, o que os torna potenciais transmissores do vírus. Os fatores relacionados à ausência de patologias associadas às infecções pelos outros tipos de HTLV, e a maioria dos portadores permanecer assintomática, permanecem desconhecidos e necessitam de melhor investigação. As rotas de transmissão do vírus podem ser: contato sexual, transfusão sanguínea e compartilhamento de perfurocortantes contaminados; e da mãe para o filho, via transplacentária, mas, principalmente, pelo aleitamento materno. O diagnóstico da infecção é baseado na detecção de anticorpos anti-HTLV, pesquisa das proteínas virais

e amplificação e/ou detecção do genoma proviral. Até o momento, não existe cura nem vacina para o HTLV. A ausência de sintomas na maioria dos casos, associada à falta de conhecimento acerca do HTLV pela população em geral e, até mesmo por profissionais de saúde, colaboram para a característica negligenciada da infecção. É necessária uma disseminação de informações sobre a doença, para que possamos, assim, ter a conscientização sobre essa infecção silenciosa.

O que é o HTLV?

O termo “HTLV” (do inglês, *human T-lymphotrophic virus*) representa um grupo de vírus conhecidos há pelo menos 40 anos. Sendo o tipo 1 (HTLV-1) o primeiro retrovírus a ser descrito na história, com sua identificação realizada em 1980, nos Estados Unidos, a partir de linhagem celular obtida de um caso de linfoma cutâneo de células T (POIESZ et al., 1980). Dois anos depois, em 1982, um segundo tipo, denominado HTLV-2, foi isolado a partir de linfócitos de um paciente que apresentou leucemia de células pilosas (KALYANARAMAN et al., 1982). Anos mais tarde, identificaram-se os HTLV-3 e HTLV4, em indivíduos assintomáticos com histórico de exposição ao sangue e a fluidos corporais de primatas não humanos em uma região florestal do continente Africano. Estes últimos encontram-se restritos a esta área até hoje (WOLFE et al., 2005). Após sua descoberta, o HTLV-1 foi identificado como agente etiológico da Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (ATL) e da Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1 (TSP/HAM) (YOSHIDA, MIYOSHI, HINUMA, 1982).

Os portadores assintomáticos se estabelecem como a maior parte dos infectados (90% a 95%). No entanto, a evolução de assintomático para sintomático ainda não se discorre com exatidão, desse modo, não se entende os determinantes da história natural da infecção (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002).

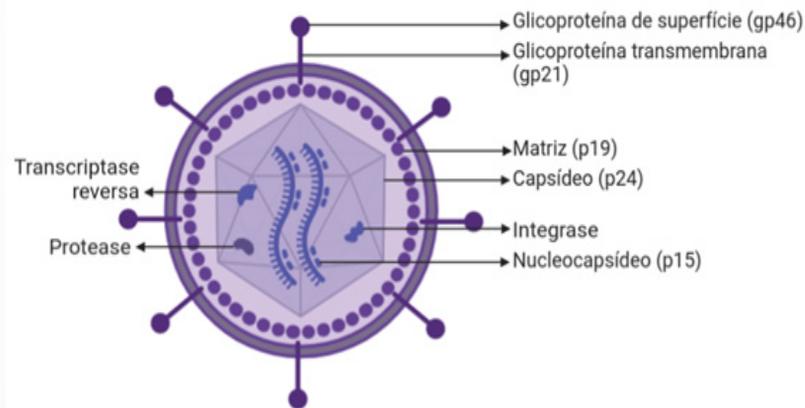
O HTLV é um vírus relativamente recente, mostrando-se ainda a necessidade de pesquisas mais avançadas e contínuas de trocas de informações sobre todo seu processo e desenvolvimento. A falta de conhecimento acerca do vírus pela população e profissionais de saúde é o principal motivo do acesso negligenciado aos serviços de saúde, na adesão ao tratamento e na busca por direitos. Mostrando assim, a necessidade de políticas públicas para desmistificar todo esse processo de saúde-doença e assegurar o direito de indivíduos em situação de vulnerabilidade pelo HTLV viverem com qualidade.

Características moleculares e ciclo replicativo

Os HTLV, juntamente com os STLV (do inglês, *simianT-lymphotropic viruses*) compõem o grupo dos PTLV (do inglês, *primate T-lymphotropic viruses*), pertencentes à família dos retrovírus. Trata-se de um vírus pertencente ao gênero *Deltaretrovirus* e família *Retroviridae*, onde o HTLV-1 e o HTLV-2 apresentam cerca de 60% de similaridade nos genomas, mas com tropismo por células T CD4+ e T CD8+ respectivamente (COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA VIRAL, 2011).

Os retrovírus apresentam a habilidade única de incorporar o seu genoma ao genoma da célula, o que garante a perpetuação da infecção no hospedeiro. Para tanto, o HTLV, assim como os demais retrovírus, apresenta a enzima transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral em DNA complementar. Além desta, as enzimas virais integrase e protease também auxiliam na infecção de células saudáveis, atuando na integração do DNA complementar ao genoma da célula hospedeira. Nos vírions (como se denomina a partícula viável para infectar uma nova célula) de HTLV, estas enzimas encontram-se encapsuladas juntamente com o genoma viral, composto por duas fitas simples de RNA, idênticas, de polaridade positiva. O capsídeo de simetria icosaédrica é formado por subunidades idênticas da proteína p24 e é envelopado por uma bicamada lipídica oriunda da célula hospedeira, que garante a estrutura esférica e pleomórfica apresentada por estes vírions, com diâmetro de 80 a 100 nanômetros (Figura 1)(MARTIN et al., 2016).

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do HTLV.

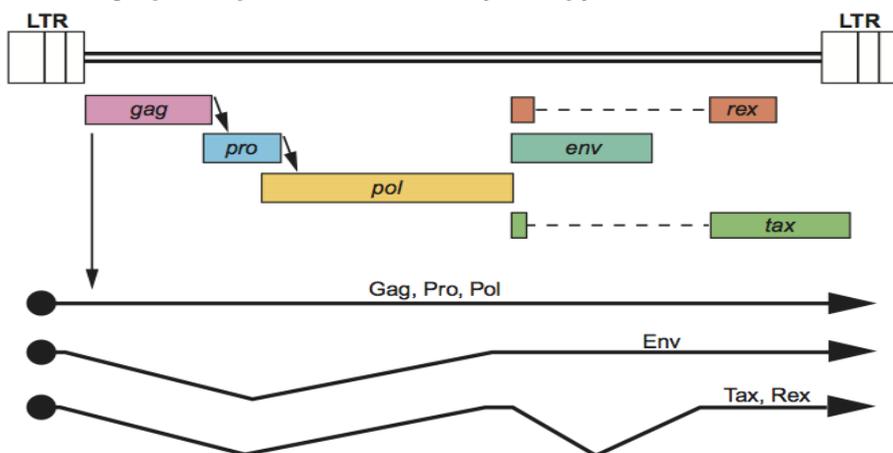


Fonte: Os autores

O genoma do HTLV apresenta quatro principais genes que codificam proteínas estruturais comuns aos retrovírus: 5'-gag-pro-pol-env-3', além das regiões *pX* e LTR (do inglês, *long terminal repeats*), envolvidas na síntese de proteínas reguladoras e na incorporação do genoma viral ao DNA do hospedeiro, respectivamente (Figura 2) (MARTIN et al., 2016).

Figura 2: Ilustração do genoma do HTLV-1. Na imagem observa-se o DNA proviral flanqueado por duas regiões LTR, as regiões codificadoras de proteínas *gag*, *pro*, *pol*, *env*, *tax* e *rex*, e os três RNAs mensageiro geradas a partir da leitura do provírus.

Human T-lymphotropic virus 1, HTLV-1 (8.7 kbp)



Fonte: COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA VIRAL (2011).

A proteína *gag* é precursora de três outras proteínas da matriz (p19), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo (p15), e é clivada pela ação da protease, codificada por um desvio de leitura dos genes *Gag* e *Pol* (região *pro*). Esta enzima também é responsável pela clivagem das demais cadeias poliproteicas geradas, atuando na maturação das proteínas estruturais. A proteína *pol* é separada de *gag* e clivada para gerar as enzimas transcriptase reversa, integrase e RNase H. Por sua vez, a proteína gp62, codificada por *Env*, é clivada em seus produtos maduros gp46 e gp21, que correspondem a glicoproteínas de superfície e transmembrana (MARTIN et al., 2016).

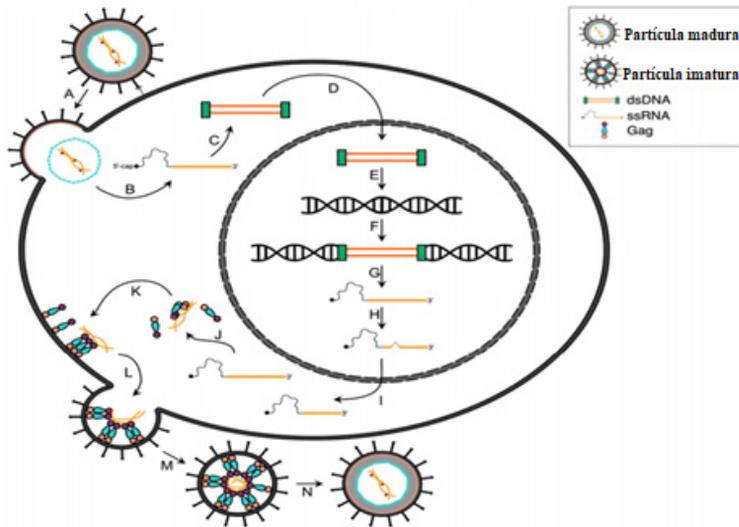
Além das proteínas estruturais, o HTLV apresenta proteínas regulatórias e acessórias geradas a partir de códons de iniciação internos somados ao mecanismo de *splicing* alternativo. Os códons de iniciação internos estão localizados entre os genes

Env e 3' LTR, na chamada região *Px*. Nesta encontram-se quatro ORFs (do inglês, *open reading frames*) que codificam os genes *Tax*, *Rex*, *P12*, *P13*, *P30* e *HBZ* (do inglês, *HTLV basic leucine zipper factor*). Tais genes regulam mecanismos de transcrição de genes virais e de proliferação das células infectadas, e são associados aos processos de oncogênese e neuroinflamação observados em parte dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2005).

O HTLV apresenta tropismo por células do sistema imunológico, mais especificamente os linfócitos T CD4 e CD8 positivos, podendo ser encontrado também em células dendríticas, monócitos e linfócitos B. Isto acontece pois os receptores responsáveis por facilitar a entrada da partícula viral na célula saudável estão presentes em maior quantidade na superfície de linfócitos. O ciclo replicativo (Figura 3) é iniciado quando a partícula viral madura interage com receptores de superfície da célula alvo (A). O RNA genômico viral (gRNA) estruturado no núcleo da célula, se dispõe no citoplasma da célula hospedeira (B), onde ocorrerá, pela ação da enzima transcriptase reversa, a conversão de gRNA em DNA de fita dupla (ssDNA) (C). Este será introduzido ao núcleo hospedeiro (D), sendo incluído no genoma acolhedor e originando o provírus (E, F), que será transcrito pela mRNA polimerase II (G) e sofrerá modificações pós transcricionais (H). Posteriormente, o gRNA será expelido do núcleo celular (I). No citoplasma, as enzimas virais (no exemplo, *gag*) são traduzidas (J), seguem transportadas para a membrana plasmática associadas a duas cópias do gRNA (K) e formam uma estrutura que ao longo da membrana plasmática será despreendida por brotamento, originando uma partícula viral imatura (L). Desse modo, após a liberação da partícula da superfície da membrana (M), ocorre a clivagem de suas poliproteínas promovendo a formação de uma partícula viral madura e infecciosa (N) (FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2005; MARTIN et al., 2016).

Contudo, sabe-se que os vírions livres de HTLV possuem baixo poder de infecção. O processo de infecção ocorre majoritariamente pelo contato célula-célula mediado pelo vírus e pela expansão clonal das células infectadas, o que reduz o uso da transcriptase reversa e garante maior estabilidade genética ao HTLV. Consequentemente, para que ocorra a transmissão da infecção de um indivíduo para o outro, é necessário que ocorra a transmissão de células infectadas (FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2005; MARTIN et al., 2016).

Figura 3. Ciclo replicativo do HTLV.



Fonte: Adaptado de MARTIN et al., 2016.

Doenças associadas

O Vírus T-linfotrófico Humano (HTLV) foi o primeiro retrovírus humano descrito associado a oncogênese e a doenças inflamatórias crônicas como a Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATL) e a Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia associada ao HTLV-1 (TSP/HAM), respectivamente. Outras manifestações como uveíte, dermatite infecciosa, polimiosite, síndrome de Sjögren, tireoidite de Hashimoto, miosite, artrite, embora de menor gravidade também são associadas ao HTLV-1 devido a sua maior patogenicidade (GRANT et al., 2002). Apesar de este vírus ser considerado de baixa morbidade devido à baixa prevalência de doenças como a ATL e a TSP/HAM, que acometem cerca de 5% dos infectados, estudos apontam uma alta incidência de sintomas neurológicos (HALL, 1994). Um grupo de pesquisadores observou alterações no exame físico em mais de 56% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 acompanhados em ambulatório, mesmo considerando uma baixa taxa de TSP/HAM (5 pacientes) em seu estudo, o que indica um curto espaço de tempo no desenvolvimento de sintomas neurológicos em uma parcela significativa de pacientes. Em uma meta-análise que buscou associar o HTLV-1 com efeitos adversos à saúde, constatou-se uma

gama de doenças estudadas em associação com o HTLV-1, porém, o risco de morte entre pessoas com HTLV-1 não é esclarecido pelos estudos disponíveis de morbidade. Assim, o ônus da doença associada ao vírus pode ser mais amplo do que é reconhecido (KALYANARAMAN et al., 1982).

Outras síndromes neurológicas podem estar associadas à TSP/HAM ou isoladas no indivíduo infectado pelo HTLV-1, como disfunção cognitiva, encefalopatia, bexiga neurogênica, doença do neurônio motor, miopatias inflamatórias, polineuropatia e disautonomia. A força da associação entre o HTLV-1 e as doenças baseia-se em estudos epidemiológicos, assim como em dados virológicos e moleculares, modelos animais e pesquisas clínicas. Aspectos multifatoriais explicam esta associação, tais como idade, via de infecção e fatores imunológicos e genéticos da interação vírus-hospedeiro. O HTLV-2, apesar de não ser o agente etiológico de doenças graves como as causadas pelo HTLV-1, tem relatos de manifestações neurológicas e mielopatia em sujeitos infectados por este tipo viral (GRANT et al., 2002; HALL, 1994).

Patogênese

O vírus utiliza como mecanismo principal para aumento da sua carga viral, a proliferação clonal dos linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ infectados. Com a proliferação clonal estimulada, alterações genéticas podem ocorrer nos genes da célula infectada que regulam a apoptose e o ciclo celular. As alterações acumuladas com o passar do tempo podem levar a transformação neoplásica da célula, logo, com a proliferação exacerbada desse clone neoplásico (monoclonal), a ATL é desenvolvida (FUTSCH, MAHIEUX, DUTARTRE, 2017). O gene *Tax*, presente na região *Px* do HTLV-1, é um dos principais responsáveis pela proliferação de células infectadas, pois interfere no ciclo celular e nas vias do fator nuclear (NF-κB). Apesar dessa característica pró-oncogênica, a *Tax* é um dos alvos de células T CD8⁺ específicas para HTLV-1, que a detectam e impossibilitam sua manifestação, ou seja, seu papel é importante na fase inicial do processo neoplásico, perdendo sua expressão posteriormente. Isso explica por que o gene é detectado em apenas 40% dos pacientes com ATL (GARCIA, HENNINGTON, 2019). Posteriormente foi descoberto o gene *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)* também tem papel fundamental na proliferação celular durante as fases tardias. Este gene não é alvo de células T CD8⁺ e não prejudica a sobrevivência da célula infectada. A expressão do gene *HBZ* pode ser detectada em 95-100% dos pacientes com ATL nas fases agudas e crônicas (MELAMED et al., 2005).

A proliferação clonal de células T infectadas com HTLV-1 pode induzir respostas imunes mediadas por células e citocinas pró-inflamatórias, causando danos neurais, o que desempenharia um papel central no desenvolvimento de TSP/HAM.

Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel desses mecanismos na patogênese de TSP/HAM. Essas respostas inflamatórias também podem estar ligadas às manifestações dermatológicas que acometem alguns pacientes infectados com HTLV-1 (NOZUMA KUBOTA, JACOBSON, 2020).

Transmissão

Os mecanismos de transmissão do HTLV podem ocorrer por via sexual, parenteral – por transfusão sanguínea e uso de agulhas e seringas contaminadas e transmissão vertical da mãe para a criança, principalmente, por amamentação. Entre parceiros sexuais fixos a transmissão ocorre com maior frequência do homem portador para a mulher – taxa de risco de 61% em 10 anos, enquanto o contrário é mais raro – taxa de risco de 0,4% em 10 anos. A infecção via transfusional é decorrente da recepção de componentes sanguíneos contaminados. Por este motivo, em 1993 se tornou obrigatória a implementação do processo de triagem laboratorial em hemocentros, que resultou na detecção de doadores de sangue portadores de HTLV e, conseqüentemente, na redução da transmissão por esta via. É importante salientar que o aumento do risco de transmissão do HTLV-2 está associado ao uso de drogas intravenosas (ROMANELLI, CARAMELLI, PROIETTI, 2010).

A transmissão através da amamentação se dá pela presença de linfócitos infectados no leite materno, que passam para a criança. Quanto maior o tempo de aleitamento materno maior será a probabilidade de infecção, ocorrendo entre 10-25% dos lactentes. Além disso, portadores de HTLV-1 infectados durante a infância têm maior propensão ao desenvolvimento de Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (ATL). Também já foram relatos casos de transmissão por via transplacentária, entretanto, menos frequente (RIZKALLAH et al., 2017).

Diferentemente do HIV, existe pouca ou nenhuma partícula do HTLV livre no plasma, de modo que a medida da carga viral na infecção pelo HTLV é chamada carga proviral, que consiste no número de cópias de DNA do provírus por um determinado número de células. Denomina-se DNA proviral o genoma resultante da fusão do genoma do vírus ao do hospedeiro, estratégia adotada pelo vírus para utilizar a maquinaria celular. O nível de carga proviral do HTLV é importante na eficácia de transmissão, além do tempo de exposição ao fator de risco (PRENDERGAST et al., 2019).

Modelos recentes de estudos vêm propondo que o desencadeamento ou não de doença dependeria da porta de entrada do vírus. Na transmissão via mucosa, como o aleitamento materno, a população-alvo serão células apresentadoras de antígeno (APC); nessas, a expressão de genes virais ocorreria em baixos níveis. Caso a porta de

entrada seja o sangue periférico, a população-alvo de infecção será composta pelas células T CD4+ e CD8+, e essas células permitem altos níveis de expressão de genes virais e uma forte resposta imune (FUTSCH, MAHIEUX, DUTARTRE, 2017).

Deve-se ressaltar a importância da transmissão intrafamiliar na propagação do HTLV. Esta se desenvolve quando um componente familiar portador de HTLV, geralmente assintomático e sem diagnóstico, transmite o vírus para outro familiar, geralmente por via sexual ou vertical. Uma pesquisa realizada em pacientes HTLV positivos e seus familiares, na região metropolitana de Belém - PA demonstrou que a prevalência da infecção pelo vírus é maior em familiares do gênero feminino do que no masculino; resultados positivos na sorologia aumentaram proporcionalmente conforme o aumento da idade; além disso, as infecções entre familiares de casos índice tanto de HTLV-1 quanto de HTLV-2 ocorreram em conformidade (COSTA et al., 2013; SILVA et al., 2018).

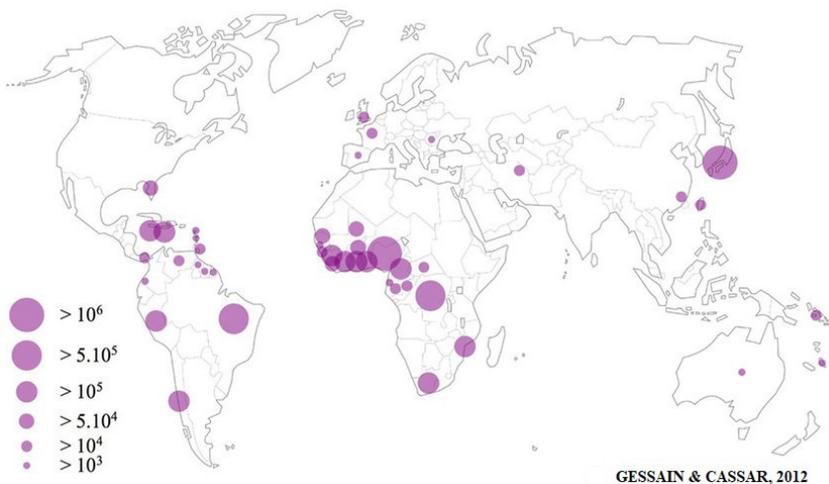
Até o momento não há vacina para o HTLV, dessa forma, a realização dos métodos de prevenção são indispensáveis. Tais procedimentos de prevenção são semelhantes aos do HIV, sendo eles: usar preservativos em todas as relações sexuais, impreterivelmente quando um dos parceiros está infectado; não compartilhar objetos perfurocortantes como agulhas e seringas; triar gestantes durante o pré-natal e após o nascimento do bebê; orientar mães soropositivas sobre o risco de infectar seu filho durante a amamentação natural, logo, é fundamental que políticas de saúde pública atuem de forma direta sugerindo a inclusão de alimentação alternativa para esse grupo (BRASIL, 2013).

Epidemiologia

O HTLV no mundo

A distribuição geográfica da infecção por HTLV no mundo não é homogênea. Há relatos de ocorrência do HTLV em todos os continentes, com diferentes prevalências. Atualmente, é estimado que 5 a 10 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o planeta (GESSAIN A, CASSAR, 2012; SANTOS, LIMA, 2005). A disposição da infecção acontece em áreas endêmicas no planeta, que pode ser conceituada como a ocorrência de uma doença em uma região restrita. Deste modo, podem ser consideradas áreas endêmicas para a infecção pelo HTLV, as regiões da Ásia (prevalentemente no sudoeste do Japão), ilhas do Caribe, América Central e do Sul, África Central, ilhas da Melanésia na Bacia do Pacífico e em população aborígenes da Austrália. O mapa abaixo (Figura 4) ilustra as diferentes prevalências do HTLV em diversas partes do mundo (GOTUZZO et al., 2007; NICOLÁS et al., 2015; ROUCOUX et al., 2005).

Figura 4: Áreas endêmicas para infecção por HTLV no mundo.



Fonte: GESSAIN & CASSAR, 2012.

O HTLV no Brasil

No Brasil, estudos já demonstraram a presença do HTLV em todos os estados, com prevalências variadas. Estima-se que aproximadamente 2,5 milhões de brasileiros estejam infectados por HTLV-1, o que torna o país o maior em número absoluto de casos em todo o mundo (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002). O HTLV-2 também está presente no país, porém a sua prevalência é mais significativa entre populações indígenas (MORAIS et al., 2017; VALLINOTO et al., 2006).

De maneira geral, a prevalência nacional da infecção pelo HTLV-1/HTLV-2 não é totalmente conhecida por falta de estudos de base populacional, e a principal maneira de aferição tem sido por meio da triagem sorológica em bancos de sangue.

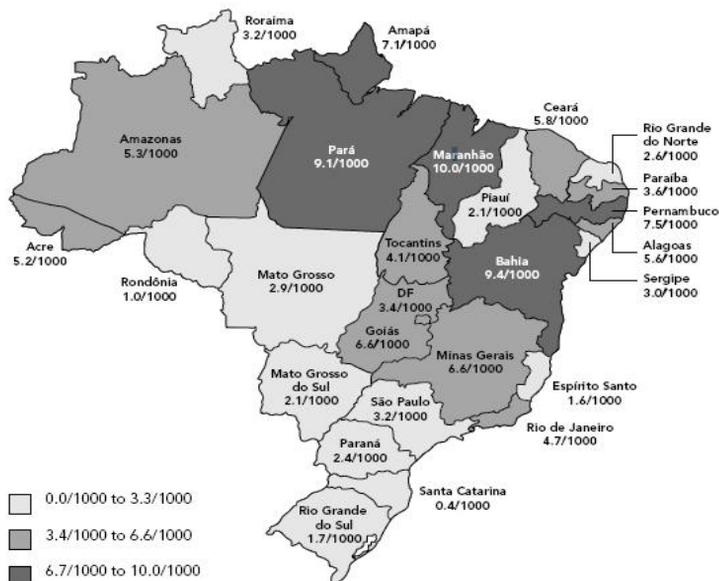
Dados oriundos de 27 hemocentros, localizados em áreas metropolitanas de todos os estados brasileiros e do Distrito Federal, abrangendo um total de 6.218.617 testes sorológicos, verificaram resultados de uma distribuição heterogênea nas regiões. A taxa média de soroprevalência variou entre 0,4/1000 em Florianópolis (SC) e 10/1000 em São Luiz (MA), caracterizando menor prevalência da infecção nas regiões metropolitanas do Sul, ao contrário das regiões Nordeste e Norte que apresentaram as maiores taxas de reatividade sorológica para HTLV-1/HTLV-2 (Figura 5) (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002; CATALAN-SOARES, PROIETTI, PROIETTI, 2005).

Um estudo de base populacional realizado em Salvador-BA, através de pesquisa sorológica de anticorpos anti-HTLV-1/2 (EIA), com 1385 indivíduos aleatoriamente selecionados em 30 áreas sentinelas da capital baiana, revelou uma prevalência global foi 1,76 % (23/1385). As taxas de infecção foram de 1,2% no sexo masculino e 2% para o feminino (DOURADO et al., 2003).

Prevalências de, 0,07% (65/88.330) na cidade de São Paulo (Pinto et al., 2016) e 0,15% (561/365.564) no estado do Maranhão (Viana et al., 2014) são exemplos de resultados mais recentes encontrados no Brasil sobre a prevalência de HTLV em doadores de sangue.

Segundo o Guia de Manejo Clínico do Ministério da Saúde do Brasil (2013) um estudo utilizando metodologia única de coleta, transporte e testes de 5.842 amostras para o HTLV-1/HTLV-2 detectou uma prevalência média brasileira de 0,41% com a seguinte soropositividade nas capitais: Manaus, 0,08%; Recife, 0,33%; Salvador, 1,35%; Rio de Janeiro, 0,33% e Florianópolis 0,08%. Na figura abaixo é possível visualizar uma ilustração da soroprevalência de HTLV-1/HTLV-2 entre doadores de sangue entre os anos de 1995 e 2000 em todos os estados brasileiros (DOURADO et al., 2003; PINTO et al., 2016; VIANA et al., 2014).

Figura 5: Taxas de prevalência para HTLV-1/2 nos principais hemocentros do Brasil de 1995 a 2000.



O HTLV na Amazônia

Na região amazônica brasileira, maior área geográfica do país e de extensa distribuição do HTLV, pesquisadores vêm demonstrando a dinâmica epidemiológica do vírus ao longo dos anos, embora ainda não se conheça o perfil de prevalência viral em toda a região. Os primeiros registros da infecção pelo vírus na Amazônia são amplamente conhecidos e correspondem a imigrantes japoneses no estado do Mato Grosso do Sul, na década de 80. Outros estudos envolvendo diferentes grupos populacionais revelaram a elevada prevalência do HTLV na região amazônica, dentre eles, podemos citar as pesquisas realizadas com povos indígenas das tribos Kaiapó, Kraho, Tiriyo, Mundukuru, Arara do Laranjal, Shindo e Waiampi, que caracterizaram a endemicidade geográfica em diferentes comunidades indígenas da região (ISHAK et al., 2020).

No norte do Brasil, o estado do Pará que integra parte da Amazônia oriental tem apresentado prevalência e forte disseminação do vírus, na capital do estado e região metropolitana, com taxas de infecção significativas em grupos de familiares de portadores, hemodoadores, gestantes, comunidades urbanas e ribeirinhas, ameríndios, remanescentes de quilombos e usuários de drogas injetáveis (SILVA et al., 2018). As taxas mais recentes da prevalência da infecção por HTLV, tipos 1 e 2, no estado do Pará variam entre 0,29 e 5,32% em diferentes populações do estado. Apesar dos esforços na investigação da infecção pelo HTLV na área amazônica do país, os dados epidemiológicos são relativamente escassos e até conflituosos, devido em sua maioria serem restritos à descrição da prevalência em populações específicas da região.

Diagnóstico

O Ministério da Saúde, em sua portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993, tornou obrigatória a realização da pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2 em bancos de sangue do Brasil, atualmente prevalece a Resolução RDC 34 de 11 de junho de 2014. O protocolo para diagnóstico segue o seguinte fluxo: Testes de triagem sorológica – Realização de testes que visam a detecção de anticorpos. Caso ocorra a detecção de anticorpos, ou resultado indeterminado, são realizados Testes confirmatórios – *Western blot* (detecção de proteínas virais) e/ou PCR (detecção do genoma proviral) (BRASIL, 1993).

O teste de ELISA se baseia na reação antígeno-anticorpo por meio de reações enzimáticas. O teste consiste em uma placa de poliestireno com diversos poços, nestes, contém antígenos aderidos (fase sólida). Em seguida, adiciona-se o soro do paciente e,

caso a amostra seja reagente, anticorpos específicos se ligam aos antígenos da fase sólida. Em seguida, um segundo anticorpo é adicionado à placa contra as imunoglobulinas da espécie, que é ligado à peroxidase (conjugado). Ao adicionar-se o substrato apropriado para a enzima, ocorre a reação de coloração. Os poços onde aconteceu a reação antígeno-anticorpo apresentam uma coloração. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de anticorpos na amostra de soro (COSTA et al., 2009).

O *Western Blot* é um método utilizado para detecção de proteínas virais que consiste em uma membrana de nitrocelulose adicionada com pequenas quantidades de proteínas. Assim, após o contato com o anticorpo específico, o anticorpo fica retido na membrana que apresenta o polipeptídeo específico. Em seguida, esse anticorpo que ficou aderido à membrana, é detectado por meio de um anti-soro (um anti-anticorpo ou conjugado). Sendo assim, com auxílio de substratos sintéticos é possível visualizar a região da membrana onde está localizado o polipeptídeo (BRASIL, 2016; COSTA et al., 2009).

O método considerado “padrão ouro” para a detecção do genoma provírus é a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) seja a convencional, *nested-PCR* (Uma PCR utilizando o produto de outra PCR) ou em tempo real (qPCR). Estes métodos detectam segmentos do genoma proviral (diz-se do genoma do vírus quando integrado ao genoma do hospedeiro), utilizando-se do DNA extraído de células da camada de leucócitos do sangue periférico, uma vez que a replicação viral não produz viremia plasmática significativa para o diagnóstico da infecção. Deste modo, utilizando iniciadores sintéticos específicos para a região do genoma que se objetiva amplificar (*primers*), enzimas e reagentes necessários para o processo de amplificação e um termociclador (equipamento que realiza oscilações controladas de temperatura), é possível amplificar uma pequena quantidade de cópias do genoma em milhões de cópias. Após essa etapa é realizada uma detecção do produto amplificado com corantes específicos.

Tratamento

Até o momento, não existe cura nem vacina contra a infecção por HTLV. Existem alguns testes que utilizam Inibidores de Transcriptase Reversa (ITR) *in vitro*, objetivando a supressão da replicação viral. Quando administrados *in vivo* são capazes de causar pequena supressão na replicação, entretanto, se administrado em período superior a uma semana após a exposição ao patógeno, não apresenta eficácia (FUTSCH et al., 2017; GARCIA, I.; HENNINGTON, 2019). Tendo consciência do certo grau de inviabilidade da administração desses ITR, recomenda-se o acompanhamento do portador por equipe multiprofissional para o monitoramento das possíveis patologias que podem acometer o indivíduo. Com o diagnóstico precoce da infecção e

acompanhamento adequados é possível contribuir para a redução da morbimortalidade e aumento da qualidade de vida dos portadores desta infecção.

REFERÊNCIAS

BISWAS, H.; ENGSTROM, J.; KAIDAROVA, Z. et al. Neurologic abnormalities in HTLV-I- and HTLV-II-infected individuals without overt myelopathy. **Neurology, Hagerstown**. 73(10): 781-789, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde Relatório de Recomendação Western Blot e PCR em tempo real em pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto associado ao HTLV-1: **Ministério da Saúde**. Brasília – DF, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. Guia do manejo clínico do HTLV. **Ministério da Saúde**, 77 p. Normas e Manuais Técnicos – (Série Manuais; n.4 – CN-DST e Aids); 2013.

BRASIL. Portaria nº 1.376 de 19 de novembro de 1993. Brasília: **Ministério da Saúde**; 1993.

BRASIL. Resolução RDC 34 de 11 de junho de 2014. Brasília: **Agência Nacional de vigilância Sanitária**, 2014.

CARNEIRO-PROIETTI, A.; RIBAS, J.; CATALAN-SOARES, B.; et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 35 (5):499-508, 2002.

CATALAN-SOARES, B.; PROIETTI, A.; PROIETTI, F. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-1/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cad. Saúde Pública**. 21(3), 2005.

COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA VIRAL. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Leiden: ICTV, 2011.

COSTA, C.; FURTADO, K.; FERREIRA, L.; et al. Familial Transmission of Human T-cell Lymphotropic Virus: Silent Dissemination of an Emerging but Neglected Infection. **PLoS Negl Trop Dis**. 7(6): e2272, 2013.

COSTA, E.; JACOB, F.; FELICIANO, R.; et al. Falha na implantação de um novo algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população de risco. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** 68(2), 2009.

DOURADO, I.; ALCANTARA, L.; BARRETO, M.; et al. HTLV- I in the General Population of Salvador, Brazil: A City With African Ethnic and Sociodemographic Characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** 34 (5), 2003.

FUNDAÇÃO HEMOMINAS. Cadernos Hemominas – HTLV. Volume XVI. 6º ed. atualizada e aumentada. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2015.

FUTSCH, N; MAHIEUX, R; DUTARTRE, H. HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment. **Viruses.** 10(1): 1, 2017

GARCIA, I.; HENNINGTON, E. HTLV: uma infecção estigmatizante? Cad. Saúde Pública. 35 (11), 2019.

GESSAIN A, CASSAR O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Front Microbiol.** 3(388): 1-23, 2012.

GOTUZZO, E.; MOODY, J.; VERDONCK, K.; et al. Frequent HTLV-I infection in the offspring of Peruvian women with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis or strongyloidiasis. **Rev. Panam. Salud Publica.** 4 (22): 223-30, 2007.

GRANT, C.; BARMAK, K.; ALEFANTS, T.; et al. Human T-cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. **J. Cell Physiol.** 190 (2): 133-159, 2002.

HALL, W. Human T cell lymphotropic virus type I and cutaneous T cell leukemia/lymphoma. **J Exp Med.** 180 (5): 1581-1585, 1994.

HALL, W.; KUBO, T.; IJICHI, S.; et al. Human T-cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. **Semin Virol.** 5(2):165-178, 1994.

ISHAK, R.; ISHAK; M.; VALLINOTO, A. The challenge of describing the epidemiology of HTLV in the Amazon region of Brazil. **Retrovirology.** 17:4, 2020.

KALYANARAMAN, V.; SARNGADHARAN, M.; et al. ROBERT-GUROFF, M. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. 218 (4572): 571-573, 1982.

MARTIN, L.; MALDONADO, J.; MUELLER, J. et al. Molecular studies of HTLV-1 replication: An update. **Viruses**, 8(2):31, 2016.

MELAMED, A.; WITKOVER, A.; LAYDON, D. et al. Clonality of HTLV-2 in Natural Infection. **PLOS Pathogens**. 10 (3): 1-9, 2014. GRASSMAN, R.; ABOUND, M.; JEANG, K. T. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-I Tax. **Oncogene**. 24:5976-5985, 2005.

MORAIS, M.; GATO, C.; MACIEL, L.; et al. Prevalence of Human T-lymphotropic virus type 1 and 2 among blood donors in Manaus, Amazonas State, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 59: e 80, 2017.

NICOLÁS, D.; AMBROSIONI, J.; PAREDES, R; et al. Infection with human retroviruses other than HIV-1: HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 and HTLV-4. **Expert Rev Anti Infect Ther**. 13(8):947-963, 2015.

NOZUMA, S.; KUBOTA, R.; JACOBSON, S. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and cellular immune response in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J. Neurovirol**. 26, 652-663. 2020.

PINTO, M.; SLAVOV, S.; VALENTE, V.; et al. Evaluation of human T-lymphotropic virus prevalence/co-infection rates for four-year period in a non-metropolitan blood center in Southeast. **Rev Soc Bras Med Trop**. 49(2): 232-236, 2016.

POIESZ, B.; RUSCETTI, F.; GAZDAR, A.; et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci**. 77(12):7415-7419.1980.

PRENDERGAST, A.; GOGA, A.; WAITT, C; et al. Transmission of CMV, HTLV-1, and HIV through breastmilk. **The Lancet Child & Adolescent Health**. 3(4): 264-273, 2019.

RIZKALLAH, G; ALAIS, S; FUTSCH, N; et al. Dendritic cell maturation, but not type I interferon exposure, restricts infection by HTLV-1, and viral transmission to T-cells. **PLOS Pathogens**. 13(4): e1006353-, 2017.

ROMANELLI, L.; CARAMELLI, P.; PROIETTI, A. Vírus linfotrópico de células t humanos tipo 1 (HTLV-1): quando suspeitar da infecção? **Rev. Assoc. Med. Bras**. 56(3): 340-347, 2010.

ROUCOUX, D.; WANG, B.; SMITH, D.; et al. HTLV Outcomes Study Investigators. A prospective study of sexual transmission of human T Lymphotropic virus HTLV -I and HTLV-II. **J. Infect. Dis.** 191(9):1490-1497, 2005.

SANTOS, F.; LIMA, F. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** 41(2). 2005.

SILVA, I.; PINHEIRO, B.; NOBRE, A.; et al. Moderada endemicidade da infecção pelo vírus linfotrópico-T humano na região metropolitana de Belém, Pará, Brasil. **Rev. bras. epidemiol.** 21: e180018. 2018

VALLINOTO, A.; PONTES, G.; MUTO, N.; et al. Identification of human T-cell lymphotropic virus infection in a semiisolated Afro-Brazilian quilombo located in the Marajó Island (Pará, Brazil). **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 101(1): 103-5. 2006.

VIANA, G.; NASCIMENTO, M.; DE OLIVEIRA, R.; et al. Seroprevalence of HTLV-1/2 among blood donors in the state of Maranhão, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter.** 3 (1): 50-3, 2014.

WOLFE, N.; HENEINE, W.; CARR, J; et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc Natl Acad Sci.** 102(22): 7994-7999, 2005.

YOSHIDA M, MIYOSHI I, HINUMA Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proc Natl Acad Sci.** 79(6):2031-2035.1982.

INFECÇÃO POR SARS-COV-2

Marcelo Cleiton da Silva Vieira

Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA),
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará
(UEPA). Belém, Pará, Brasil.

e-mail: marcelocleiton14@hotmail.com

Daniele Melo Sardinha

Programa de Pós-graduação em Epidemiologia e Vigilância em Saúde
(PPGEVS), Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério
da Saúde (IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

e-mail: danielle-vianna20@hotmail.com

Marcos Jessé Abrahão Silva

Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia
(SABMI), Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério
da Saúde (IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

e-mail: jesseabrahao10@gmail.com

Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima

Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia
(SABMI), Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério
da Saúde (IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

e-mail: luanalima@iec.gov.br

Karla Valéria Batista Lima

Laboratório de Biologia Molecular, Seção de Bacteriologia e Micologia
(SABMI), Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério
da Saúde (IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

e-mail: karlalima@iec.gov.br

INTRODUÇÃO

O coronavírus descoberto no fim do segundo semestre de 2019 (2019-nCoV) demonstrou uma alta taxa de infectividade, atingindo milhares de pessoas em um curto período de tempo. A acelerada dispersão foi suficiente para que em menos de 5 meses após a descoberta do vírus a Organização mundial da saúde (OMS) declarasse status de pandemia (ASTUTI & YSRAFIL, 2020).

A doença causada pelo 2019-nCoV apresenta um espectro de sintomas e órgãos afetados bastante variado. A maioria dos infectados desenvolveu resfriados com sintomas simples a moderados, contudo na minoria que demonstrou sintomas severos foram observadas condições imunológicas complexas relacionadas ao processo inflamatório e ao funcionamento anormal de múltiplos tecidos e órgãos (ROBBA et al., 2020).

Outro importante aspecto que tem sido observado e proposto é que quanto maior a exposição ao vírus maiores serão as chances de infecção e desenvolvimento da forma severa da doença (CHEN *et al.*, 2020b). Logo, profissionais da saúde que trabalham em centros de saúde de tratamento para COVID-19, os quais lidam diariamente com pacientes doentes e/ou materiais infectantes, e indivíduos que habitam em áreas com elevado número de casos estão expostos constantemente a um risco maior que a população em geral.

EPIDEMIOLOGIA E HISTÓRICO

Os Coronavírus (CoVs) compõem um grupo de vírus de RNA de fita simples envelopados, considerados não letais e amplamente distribuídos entre hospedeiros mamíferos e pássaros. São responsáveis por causar uma série de problemas de saúde que variam desde infecções simples e leves a infecções severas, agudas e persistentes, afetando as vias respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas (DI MAURO *et al.*, 2020; YIN & WUNDERINK, 2018).

Atualmente os CoVs estão divididos em quatro gêneros: alfa-, beta-, gama- e delta-corona vírus. Os CoVs conhecidos pela sua capacidade de infectar humanos (HCoV), relacionados principalmente a ocorrências de complicações do trato respiratório, incluem seis variantes, todas pertencem aos gêneros alfa- e beta-CoVs, são elas: os alfa-CoVs NL63 e 229E, e os beta-CoVs OC43, HKU1, CoV associado à síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e CoV associado a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (YIN & WUNDERINK, 2018).

Embora tenham sido descobertos e agrupados há mais de 50 anos, somente nos últimos 20 anos que se percebeu a importância clínica e epidemiológica dos HCoV. A primeira epidemia de HCoV registrada teve origem em um mercado de carne no sul da China, ocorreu entre 2002 e 2003 e afetou 8.096 pessoas, causando 774 mortes (letalidade de aprox. 9,5%) em 29 países. A principal causa de agravamento do quadro e morte era a insuficiência respiratória resultante da síndrome respiratória aguda grave (SRAG), que deu nome ao vírus (do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome- SARS*) (HUANG *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2020; YIN & WUNDERINK, 2018).

Após esta primeira epidemia, em 2012 a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi notificada da ocorrência de casos confirmados em laboratório de infecção por um HCoV. Como os primeiros casos de SRAG resultantes da infecção viral foram reportados de países do Oriente Médio, o vírus foi denominado *Middle East Respiratory Síndrome- CoV* (MERS-CoV). Entre 2012 e 27 de agosto de 2017 houveram pelo menos 2.494 casos e 858 mortes (letalidade de aprox. 34%) distribuídas nos 27 países afetados, sendo a Arábia Saudita o mais atingido, com mais de 80% dos casos de doença (HUANG *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2020; YIN & WUNDERINK, 2018).

Em dezembro de 2019 um número incomum de pacientes deu entrada em hospitais de Wuhan, na província de Hubei (China), com um quadro semelhante de pneumonia. Após investigação dos fluidos do trato respiratório dos pacientes foi identificada como causa um beta-coronavírus ainda desconhecido, denominado então 2019-nCoV (GUO *et al.*, 2020; TIAN *et al.*, 2020). A doença causada pelo CoV recém descoberto foi chamada de CoV doença-19, e por ser homólogo ao SARS-CoV o vírus passou a ser chamado de SARS-CoV-2 (LI *et al.*, 2020a; LIMA *et al.*, 2020).

Devido a rápida disseminação viral, no dia 11 de março de 2020 a OMS declarou status de pandemia por SARS-CoV-2. Em 12 de abril de 2020 mais de 1,8 milhões de pessoas já haviam sido diagnosticadas com testes laboratoriais confirmando o resultado positivo para COVID-19, registrando-se também cerca de 114 mil mortes ocasionadas pela doença ao redor do mundo (ASTUTI & YSRASIL, 2020).

No Brasil, antes da confirmação do primeiro caso, foi declarada a Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) em 3 de fevereiro de 2020. 23 dias depois, o primeiro caso importado foi confirmado no estado de São Paulo, e a partir daí diversos planos e ações foram implementados visando desacelerar e diminuir o avanço da doença. O primeiro registro de óbito por COVID-19 ocorreu em 17 de março, também no estado de São Paulo. Em 20 de março, foi decretada transmissão comunitária em todo o território nacional (CAVALCANTE *et al.*, 2020). Até o dia 22 de setembro de 2020 haviam 4.544.629 casos e 136.895 óbitos confirmados, colocando o Brasil no ranque de segundo país com o maior número de mortes por COVID-19 do mundo (WHO, 2020).

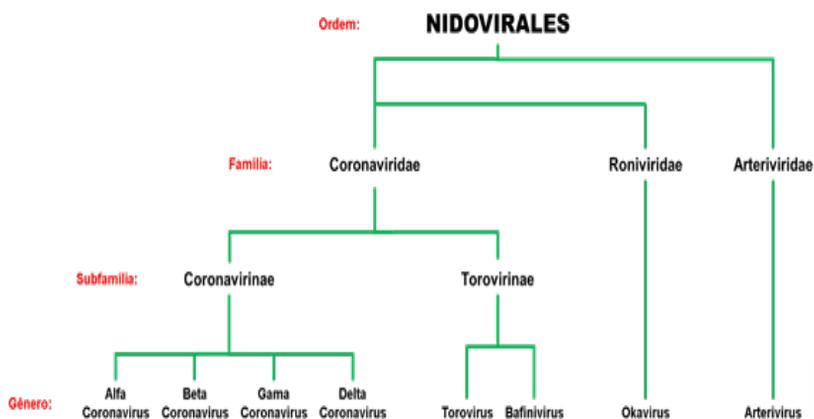
Acredita-se que características epidemiológicas como a rápida e constante dispersão viral, as baixas taxas de letalidade e altas frequências de indivíduos assintomáticos e paucissintomáticos, frequências estas que influenciaram subestimando o número de infectados, tenham contribuído fundamentalmente para um status pandêmico global alarmante (LAI et al., 2020).

3. CORONAVÍRUS

3.1. Classificação

Atualmente, a ordem *Nidovirales* abriga 3 famílias: *Arteviridae*, *Roniviridae* e *Coronaviridae*. Há ainda duas subfamílias que compõem a família *Coronaviridae*, são elas: *Coronavirinae* e *Torovirinae*. Dentro da subfamília *Coronavirinae* estão os gêneros de CoVs conhecidos como: Alfa-, Beta-, Gamma-, e Delta- Coronavirus, como ilustrado na Figura 1. MERS-CoV, SARS-CoV e, portanto, SARS-CoV-2 são exemplos de beta-coronavirus, com uma ampla gama de hospedeiros mamíferos, incluindo humanos (HUANG et al., 2020).

Figura 1: Taxonomia da ordem *Nidovirales*.



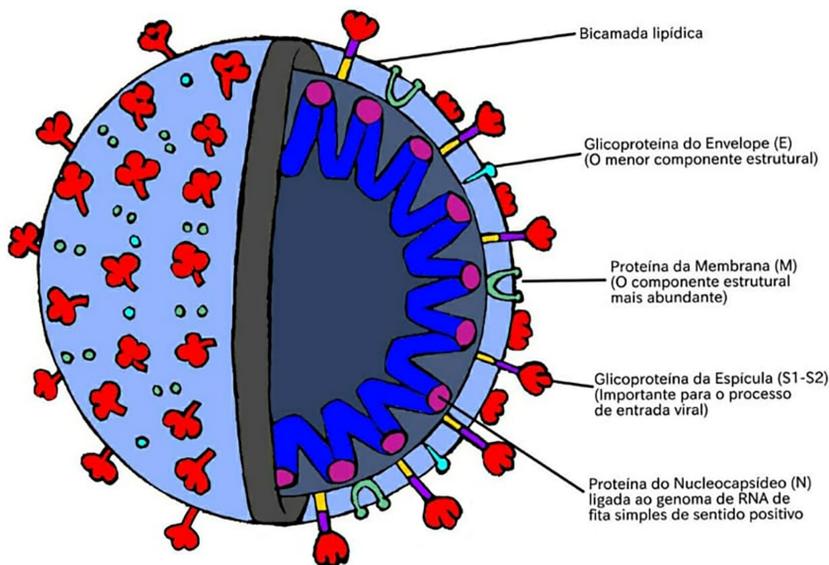
Fonte: Masters & Perlman (Fields Virology – 2013).

3.2. Morfologia e genoma

A característica mais notável dos CoVs foi revelada através da microscopia eletrônica. Uma franja circular espaçada ao redor do vírion, com espículas em formato

de bastão que se projetam da superfície viral, assemelhando-se a uma coroa solar (Figura 2). O nome do grupo viral foi adotado considerando-se esta particularidade, em latim corona significa coroa (SHEREEN *et al.*, 2020).

Figura 2: Ilustração esquemática da morfologia e principais componentes estruturais dos coronavírus.



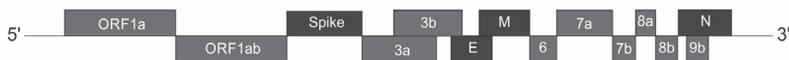
Fonte: Elaborado pelos autores, 2020.

Os CoVs são vírus de RNA de polaridade positiva, não-segmentados e que medem entre 65 nm a 125 nm de diâmetro. São compostos por quatro importantes proteínas estruturais: *spike* (S), *membrane* (M), *envelope* (E) e *nucleocapsid* (N) (Figura 2). A glicoproteína S compõe as espículas virais e são indispensáveis para o processo de entrada nas células do hospedeiro. Contudo, a mais abundante proteína encontrada no vírion é a proteína M, que além de estar relacionada ao formato definitivo do envelope viral, se liga ao nucleocapsídeo e age como um organizador central, desempenhando um papel molecular importante na montagem dos vírions (DHAMA *et al.*, 2020; MASTERS & PERLMAN, 2013).

A proteína E, componente do envelope viral, é um pequeno polipeptídeo de membrana que desempenha múltiplos papéis na patogênese, montagem e liberação do vírus, além disso sabe-se que também funciona como uma viroporina (canal iônico). A proteína N tem múltiplas funções, dentre elas podemos destacar sua ligação ao genoma viral formando um complexo ácido nucleico-proteína; a interação com a proteína M, necessária durante a fase de montagem do vírion; e o aumento na eficiência da transcrição viral (FARAG *et al.*, 2020).

Após entrada, o SARS-CoV-2 libera no citoplasma celular seu material genômico, uma fita de RNA mensageiro (mRNA) pronta para ser traduzida que varia entre 29.8 kb a 29.9 kb. O genoma viral possui por volta de 14 quadros de leitura aberta (do inglês *Open Readingframes*- ORF), cada um deles codificando uma ampla variedade de proteínas estruturais e acessórias (Figura 3). O arranjo de genes do SARS-CoV-2 é: 5'UTR- replicase (*orf1a* e *orf1ab*)- Spike (S)- *orf3a*- *orf3b*- Envelope (E)- Membrane (M)- *orf6*- *orf7a*- *orf7b*- *orf8a*- *orf8b*- Nucleocapsid (N)- *orf9b*- 3'UTR (Figura 3) (ASTUTI & YSRAFIL, 2020; LIMA *et al.*, 2020).

Figura 3: Esquematização do genoma do SARS-COV-2.



Fonte: ASTUTI & YSRAFIL, 2020

A capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros e a grande variabilidade genética encontrada nos isolados sequenciados ao redor do mundo parecem estar relacionadas a alta frequência de mutações que ocorrem nos CoVs. Mutações estas que são ocasionadas devido à instabilidade das RNA polimerases dependentes de RNA combinadas as altas taxas de recombinação de RNAs homólogos (ASTUTI & YSRAFIL, 2020; FEHR & PERLMAN, 2015).

4. SARS-COV-2

4.1. Proteínas estruturais e não estruturais

Como mostrado anteriormente, o SARS-CoV-2 apresenta 4 proteínas estruturais: S, M, E e N, que além de comporem a estrutura viral, desempenham papéis

importante na patogenia e ciclo de vida viral. Além das proteínas estruturais, há um grupo de pelo menos 16 proteínas chamado de proteínas não estruturais (do inglês *nonstructural proteins*- nsp) que são codificadas em diferentes regiões do genoma viral e contribuem de maneira específica individualmente e coletivamente no contexto da infecção (DHAMA *et al.*, 2020). Estas proteínas e suas respectivas funções estão ilustradas na Tabela 1.

Tabela 1: Funções das proteínas não estruturais dos CoVs.

Proteína não estrutural (nsp)	Função
nsp 1 & 3	Bloqueio da resposta imune inata do hospedeiro através da promoção da degradação celular, inibição da via de sinalização do IFN e interferência na tradução do mRNA do hospedeiro.
nsp 2	Liga-se a proteína de proibição
nsp 3 & 5	Induzem a expressão de citocinas e a clivagem de poliproteínas virais
nsp 4 & 6	Contribuem na estruturação de vesículas de dupla membrana (formação) como proteínas transmembranares <i>scaffold</i>
Complexo nsp 7/8	Grupo de processabilidade para RNA polimerases através de “braços estruturais” formados por um complexo hexadecamérico
nsp 9	Proteína fosfatase ligante de RNA
nsp 10, 16 & 14	Estimulo da atividade do domínio ExoN e da metiltransferase 2'-O -MT
nsp 12	RNA-polimerase dependente de RNA (enzima de replicação)
nsp 13	RNA-helicase, 5' trifosfatase
nsp 14	Revisão do genoma viral
nsp 15	Endoribonuclease e protease semelhante a quimotripsina virais
nsp 16	Evasão do reconhecimento pelo receptor MDA5 e inibição da regulação da imunidade inata

Fonte: ASTUTI & YSRAFIL, 2020; FEHR & PERLMAN, 2015.

4.2. Formas de entrada

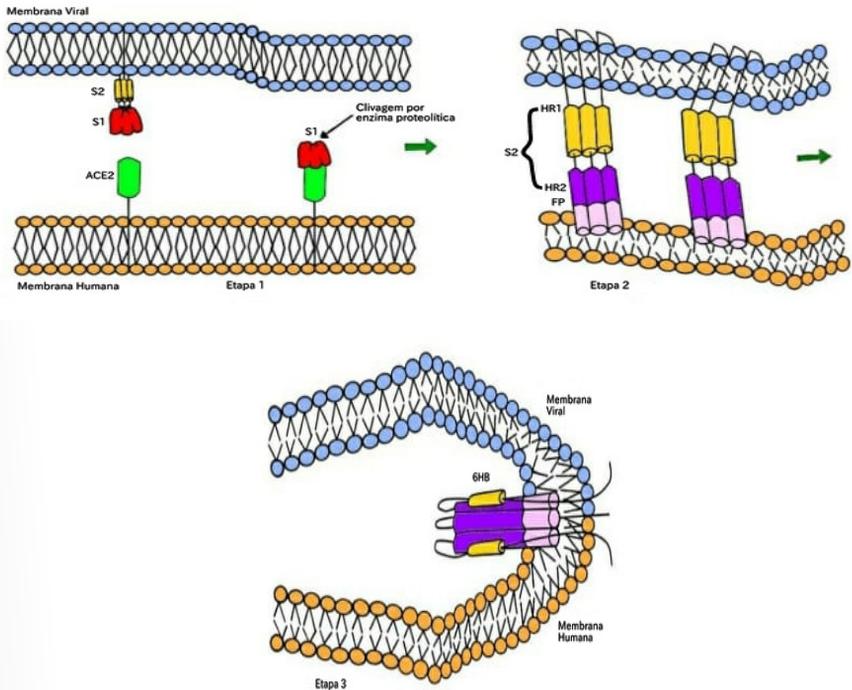
A entrada do vírus na célula hospedeira é um mecanismo indispensável para o sucesso da replicação e patogenicidade. Ele inicia com a ancoragem do vírion na superfície celular, através da interação entre a proteína S, que compõe a espícula viral, e o receptor de membrana celular enzima conversora da angiotensina 2 (do inglês *Angiotensin-converting enzyme 2* – ACE2) (WU *et al.*, 2020).

A proteína S é composta por duas subunidades, S1 e S2. S1 é responsável pela ancoragem viral, ela se liga ao domínio peptidase do receptor celular ACE2, resultando na conformação trimérica ACE2-S1-S2. A formação deste complexo induz a liberação de enzimas proteolíticas pela célula hospedeira. Dentre as enzimas liberadas, especificamente, a serina protease transmembranar do tipo II (do inglês *type II transmembrane serine protease* - TMPRSS2) clivará a subunidade S1, resultando na ativação viral e indução a entrada (ZHANG *et al.*, 2020).

A entrada pode ocorrer através da formação de endossomos ou por fusão da membrana plasmática, sendo mediada em ambos os casos pela ligação a ACE2 (LIMA *et al.*, 2020). No primeiro, após a formação do complexo ACE2-S1-S2 as partículas virais são absorvida por endossomos e a subunidade S1 é clivada pela enzima catepsina-L, levando a fusão da membrana viral a membrana do endossomo. No segundo caso, ainda na superfície externa da célula hospedeira, a TMPRSS2 clivará a subunidade S1, resultando na fusão da membrana viral a membrana plasmática celular (LIU *et al.*, 2020a).

A subunidade S2 desempenha um papel chave no processo de invasão viral. Ela contém, dentre outros, um peptídeo de fusão hidrofóbico (FP), um domínio heptad repeat 1 (HR1) e um domínio heptad repeat 2 (HR2). Após a clivagem e liberação de S1, o peptídeo FP se insere na membrana celular ou endossomal e os domínios HR1 e HR2 sofrem modificações conformacionais, resultando em uma estrutura em feixes de seis hélices (6HB), que aproxima intimamente as membranas lipídicas permitindo sua fusão, como ilustrado na Figura 4 (LIMA *et al.*, 2020; WRAPP *et al.*, 2020; WU, *et al.*, 2020).

Figura 4: Ilustração das etapas do processo de invasão viral. Na etapa 1 as subunidades S1 da proteína S do CoV se liga ao receptor ACE2 da célula hospedeira. S1 é clivado por enzimas proteolíticas (TMPRSS2 ou catepsina-L), expondo a região do peptídeo de fusão (FP). Na etapa 2, FP se liga a membrana do hospedeiro e aos domínios HR1 e HR2 sofrem modificações na sua estrutura terciária. Caracterizado na etapa 3, há a formação do feixe de seis hélices (6HB), que traz em estreita aproximação a membrana viral e da célula hospedeira, permitindo sua fusão.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2020.

Há ainda um outro possível mecanismo de invasão viral, através da interação do vírus com as porfirinas. As porfirinas são moléculas do grupamento heme sem átomo de ferro ligado ao centro, com uma alta capacidade de penetração nas membranas celulares (LIMA *et al.*, 2020). O grupamento heme compõe as subunidades alfa e beta das hemoglobinas, que estão presentes nas hemácias e são indispensáveis para o processo de trocas gasosas.

Em um estudo de acoplamento molecular, modelagem de homologia e análise de domínios conservados realizado por Wenzhong & Hualan (2020), verificou-se que as proteínas E, N e ORF3a apresentavam sítios de ligação ao ferro do heme, podendo a ORF3a dissociar o átomo de ferro e formar porfirinas. As proteínas E2 e E do SARS-CoV-2 por sua vez podem se ligar as porfirinas, sugerindo uma outra forma de invasão da célula hospedeira (LIMA *et al.*, 2020).

4.3. Ciclo de vida

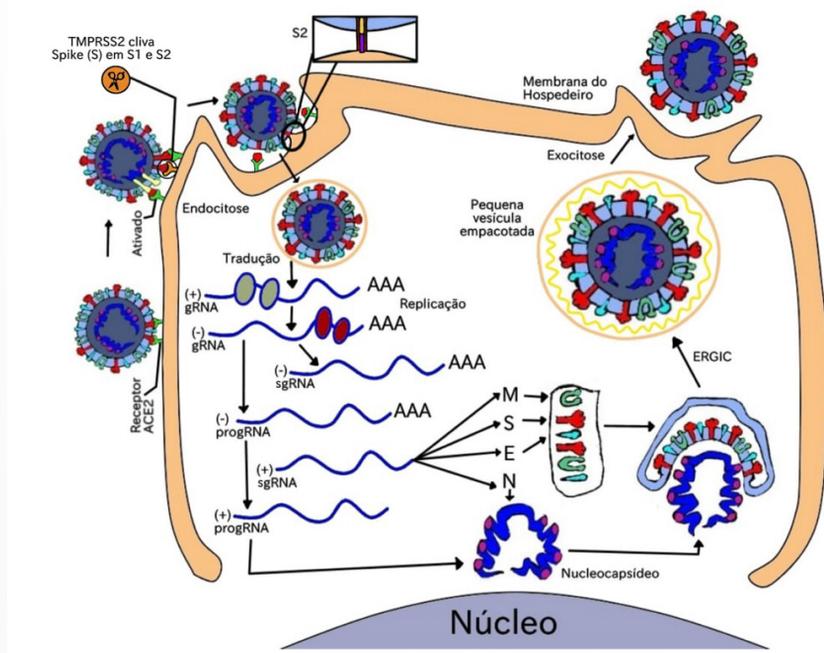
Uma vez inserido no citoplasma da célula hospedeira o SARS-CoV-2 liberará seu genoma, que compreende-se em um mRNA de sentido positivo pronto para tradução pela maquinaria molecular da célula invadida. Nesta fase, os primeiros segmentos gênicos a serem traduzidos são a ORF1a e ORF1ab, sintetizando duas grandes poliproteínas não estruturais sobrepostas, pp1a e pp1ab, através do evento de mudança de matriz de leitura ribossomal (MASTERS, 2006).

A poliproteína pp1a contém as nsps 1 a 11, enquanto que a pp1ab contém as nsps 1 a 16. Estas poliproteínas são clivadas em snps individuais por enzimas denominadas proteases semelhantes a papaína (Do inglês *papain-like protease*- PLpro) e uma protease do tipo serina (Mpro) chamada de protease semelhante a quimotripsina (Do inglês *chymotrypsin-like protease*- 3CLpro), codificadas nas regiões nsp3 e nsp5. Após a clivagem de pp1a nos nsps 1 a 11 e pp1ab nos nsps 1 a 16 várias destas proteínas comporão o complexo replicase-transcriptase (RTC) (ASTUTI & YSRAFIL, 2020).

O RTC é montado dentro de vesículas de dupla membrana, e são formados por RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e subunidades que contém helicase, que são o domínio canônico da RdRp onde se encontra o nsp 12. Inicialmente, o RTC transcreve um modelo do RNA endógeno, resultante da entrada viral, para genes de sentido negativo tanto do genoma progenitor quanto do RNA subgenômico como produtos intermediários, segue-se então a transcrição, mediada principalmente pela RdRp, de mRNAs de sentido positivo (CHEN & LIU & GUO, 2020)

Em seguida, os genes do RNA subgenômico são traduzidos em proteínas acessórias e estruturais, tais como as proteínas M, S e E, que são isoladas no retículo endoplasmático e então movidas para o compartimento intermediário golgi-retículo endoplasmático (ERGIC). Enquanto isso o genoma previamente replicado pode ligar-se diretamente as proteínas N do nucleocapsídeo e delocarem-se para o ERGIC. É neste local que as proteínas do nucleocapsídeo ligadas ao RNA se juntam a diversas outras proteínas estruturais e formam pequenas vesículas, que serão exportadas para o meio extracelular através da exocitose (Figura 5) (ASTUTI & YSRAFIL, 2020).

Figura 5: Mecanismo de entrada e ciclo de vida do coronavírus.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2020.

5. RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS DO HOSPEDEIRO HUMANO A INFECÇÃO VIRAL

5.1. Resposta imune inata

A entrada de qualquer organismo estranho ao corpo humano desencadeia, primeiramente, um estímulo a resposta imune inata do hospedeiro. As células apresentadoras de antígenos (APC) tem receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que incluem receptores *Toll-like* (TLRs), receptores *NOD-like* (NLRs), receptores *RIG-I-like* (RLRs) e muitas outras moléculas presentes na membrana plasmática, lisossomos, endossomos, endocitolisossomos e citosol. Os PRRs reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que podem ser ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas ou sacarídeos.

Cada PRR estimulado pode desencadear a ativação de vias imunológicas diferentes. A resposta inicial principal contra infecções virais é a produção de citocinas pró-inflamatórias, e adicionalmente, nos casos de COVID-19 detectou-se a ativação do inflamassoma citoplasmático membro da família dos receptores Nod-like contendo domínio de pirina 3 (NLRP3). O inflamassoma é um complexo proteico que quando ativado conduz a um aumento na secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, contribuindo para um quadro de inflamação patológica e interferindo na severidade dos sintomas da COVID-19 (ASTUTI & YSRAFIL, 2020; AZKUR *et al.*, 2020).

5.1.1. Inflamassoma

Tem-se observado que a tempestade de citocinas e o inflamassoma NLRP3 tem um papel chave na patogênese da COVID-19. O inflamassoma NLRP3 atua na ativação do sistema imune inato para o reconhecimento de patógenos, incluindo virais. Na infecção por SARS-CoV-2, a proteína 3a é a responsável pela ativação em macrófagos do inflamassoma NLRP3, levando-os a secreção de IL-6 e IL-1 β (FREEMAN & SWARTZ, 2020).

Sabe-se que a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) resultante da COVID-19 não é uma complicação causada pela replicação viral ou infecção, mas é o resultado de um estímulo inflamatório desregulado em resposta a infecção viral. Uma das características desta patologia é a intensa e rápida ativação do inflamassoma NLRP3, que atua na produção de citocinas pró-inflamatórias e ativa a via de transcrição NF- κ B, podendo promover ainda a piroptose celular (FREEMAN & SWARTZ, 2020).

5.1.2. Receptores do tipo Toll

O receptor do tipo Toll 4 (TLR-4) pode reconhecer componentes externos do CoV, como a proteína S. Através da sua interação com a proteína MyD88, o TLR-4 desencadeará a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e a via das proteínas quinases patógeno-ativadas (MAPKs), induzindo a produção de proteínas pró-inflamatórias (LI *et al.*, 2020b).

Receptores endossomais ativados como TLR-3 e TLR podem reconhecer genomas de RNA ou de DNA de dupla fita de CoVs, desencadeando o recrutamento da proteína adaptadora TRIF diretamente. Subsequentemente, TRIF ativará IRF3 e fatores de transcrição NF- κ B que induzirão a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IFN- α e TNF- β . Essa secreção de citocinas é a reposta inicial na primeira linha de combate a infecções virais, porém, o estímulo à secreção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pelas células imunes efetoras podem resultar em um agravamento do quadro clínico (LI *et al.*, 2020c).

5.2. Resposta imune adaptativa

As APCs apresentam antígenos do SARS-CoV-2 aos linfócitos T auxiliares (Th) CD4+ através do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) de classe II, isso leva a secreção de IL-12, que aumenta o estímulo à ativação de células Th1 e em associação com o IFN- α , aumenta a expressão de MHC de classe I e a ativação de células *natural killer* (NK), elevando a atividade da via de sinalização NF- κ B, que induz a produção de mais citocinas pró-inflamatórias, como a IL-17. O papel destas citocinas é recrutar neutrófilos e monócitos para o sítio de infecção, ativar e induzir a produção de várias outras citocinas e quimiocinas, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-21, TNF- β , e MCP-1 (RABI *et al.*, 2020).

A principal responsável pelo agravamento dos casos de COVID-19 é a estimulação excessiva de células efetoras na produção de citocinas como IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-33, TNF- α , TGF- β , e quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL-10 que causam uma hiperinflamação e conduzem a um quadro de SARA (ASTUTI & YSRAFIL, 2020).

A ação de células T CD8+ pode ser induzida pela ativação de células Th1 ou pela apresentação de antígenos pelas APCs, através do MHC de classe I. Ao serem ativadas, estas células sofrem expansão clonal, produzindo mais células T efetoras e de memória. Os linfócitos T CD8+ compõem um grupo específico de células T efetoras, que marcam e lisam células infectadas pelo SARS-CoV-2 através de múltiplos mecanismos, incluindo perforinas e granzimas (AZKUR *et al.*, 2020).

As células Th1 estimulam também a resposta imune humoral, através da produção de anticorpos específicos via células B dependentes de células T. A infecção por SARS-CoV-2 leva a produção de imunoglobulinas de cadeia M (IgM) específicas que podem ser observadas logo na primeira semana do início dos sintomas (fase aguda), durando até 12 semanas. Após uma média de 14 dias ocorrerá a soroconversão de anticorpos IgG, que permanecem detectáveis por períodos maiores (LI *et al.*, 2020c).

Embora os períodos de tempo médios para produção de IgM e IgG já tenham sido estabelecidos, há frequentemente casos de COVID-19 que não seguem esse padrão, com uma nova ocorrência de IgM após o surgimento de IgG, junto com IgG ou mesmo sem sinal de ocorrência (BAUER, 2020).

5.2.1. Tempestade de citocinas

A COVID-19 apresenta uma característica peculiar em comum com SARS e MERS, a tempestade de citocinas. A maioria dos pacientes infectados por SARS-CoV-2 se recuperam de doenças leves e moderadas em uma semana, porém alguns desenvolvem pneumonia, seguida de tempestade de citocinas, SARA, falência múltipla

dos órgãos logo na segunda semana e coagulação intravascular disseminada (DIC) na terceira semana, em quase todos os casos evoluindo a óbito. Essa condição inflamatória patológica tem sido associada diretamente a taxa de mortalidade (RUAN *et al.*, 2020).

A tempestade de citocinas é uma complexa rede de interações entre moléculas de importância imunológica e eventos moleculares unificados em um fenótipo clínico de inflamação sistêmica, falência múltipla dos órgãos e hiperferritinemia. Este quadro é resultante da ativação de várias células do sistema imune, como linfócitos T e B, células NK, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, monócitos e células residentes dos tecidos, tais como células epiteliais e endoteliais, que liberam uma grande volume de citocinas pró-inflamatórias (AZKUR *et al.*, 2020).

Durante a tempestade de citocinas haverá uma alteração nos níveis de secreção de moléculas de crucial importância, entre elas estão as proteínas do sistema complemento, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, IL-17 e TNF- α (CHEN *et al.*, 2020a). Atuando em conjunto e de maneira hiperestimulada essas substâncias causam um desequilíbrio na atividade do sistema imune do hospedeiro, contribuindo para o agravamento e manutenção da severidade dos casos.

A IL-17 (ou IL-17A) é um membro da família das citocinas multifuncionais. Sua função dependerá do que desencadeará sua secreção e em que tecido será expressa. Esses dois fatores definirão se o efeito desta citocina será protetivo ou se levará a um estado de hiper-inflamação. A severidade da COVID-19 está positivamente relacionada com os níveis de IL-17 e outras citocinas pró-inflamatórias secretadas pelos linfócitos Th 17, tais como IL-1, IL-6, IL-15, TNF e IFN- γ (LIU *et al.*, 2020b).

A ocorrência de altos níveis de IL-17 em pacientes com SARS-CoV-2 tem sido reportadas como parte da tempestade de citocinas, estando associada a carga viral e a severidade da doença (LIU *et al.*, 2020b). Um estudo mostrou que camundongos geneticamente deficientes em IL-17 ou que tenham recebido anticorpos contra IL-17 demonstraram melhores taxas de sobrevivência, menores níveis de infiltração celular no pulmão e melhores escores de patologia pulmonar após o contato com um antígeno (HUI *et al.*, 2020).

A IL-4 está envolvida em processos da imunidade adaptativa, desempenhando um papel crucial na sua regulação via linfócitos Th. Sua ação envolve a ativação de células Th2; a ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B; e a indução a produção de IgE. Tem sido proposto que esta interleucina desempenha atividades anti-inflamatórias que são específicas para o tecido na qual foi apresentada. Pacientes com COVID-19 tem demonstrado níveis altos de IL-4, como parte da tempestade de citocinas (COSTELA-RUIZ *et al.*, 2020).

5.3. Imunoevasão viral

Uma das estratégias deste vírus para evitar o reconhecimento da partícula viral por integrantes do sistema imune do hospedeiro é a formação de vesículas de dupla membrana. Estas vesículas impedem o reconhecimento do RNA de fita dupla, produto intermediário da replicação viral, pelos PRRs do citosol (LI et al., 2020b)

Além das vesículas, este vírus possui 8 proteínas que podem bloquear o IFN. Nsp1 representa um grupo de proteínas capazes de suprimir a atividade de IFN β através da inativação da maquinaria molecular de tradução, degradação do DNA do hospedeiro e inibição da fosforilação do STAT1. Este mecanismo pode levar a falha do IFN β , induzindo a replicação e disseminação dos vírus nos estágios iniciais e resultar no aumento da severidade da doença (ASTUTI & YSRAFIL, 2020).

Outro mecanismo de evasão envolve o cap 5' de RNA. O genoma do SARS-CoV apresenta um cap 5' a menos que o RNA das células humanas, o que o torna de fácil reconhecimento pelos PRRs intracelulares. Deste modo, de maneira a evitar esse reconhecimento o vírus mimetiza a maquinaria molecular de adição de cap ao RNA. Este processo envolve duas nsps: a nsp 14 e a nsp 16. A primeira inicia a formação do cap enquanto que a segunda modifica o cap do RNA viral de maneira que ele se assemelhe ao cap de RNA da célula hospedeira, evitando assim o reconhecimento (TOTURA & BARIC, 2012).

6. DOENÇAS RELACIONADAS A INFECÇÃO POR SARS-COV-2

Até o ano de 2020 sabe-se da existência de sete CoVs com a capacidade de infectar humanos, são eles os HCoVs: 229E, NL63, OC43, HKU1, SARS-CoV, SARS-CoV-2 e MERS-CoV. Embora o SARS-CoV e o MERS-CoV tenham provocado surtos com altas taxas de mortalidade, os outros vírus são frequentemente associados a doenças do trato respiratório leves (DHAMA *et al.*, 2020)

Apesar da infecção por SARS-CoV-2 ser constantemente relacionada a complicações do trato respiratório, isto está ligado ao tropismo viral por células que expressem o receptor ACE2. Segundo Xu e cols. (2020) as células com as mais altas taxas de expressão deste receptor são: as células alveolares do tipo II (AT2) dos pulmões, células epiteliais da porção superior do esôfago, enterócitos de absorção do íleo e cólon, colangiócitos, células do miocárdio, células dos túbulos proximais dos rins e células uroteliais da bexiga.

Devido esta característica viral, é possível observar pacientes infectados apresentando não apenas complicações no trato respiratório, como uma pneumonia

que pode evoluir para o quadro de SARA, mas também doenças no coração, rins, bexiga e trato digestivo (ASTUTI & YSRAFIL, 2020).

6.1. Alterações laboratoriais em pacientes com COVID-19

Proteínas reagentes de fase aguda são potenciais marcadores de diagnóstico e preditores do resultado em modelos humanos e animais de infecção. A análise de reagentes de fase aguda em pacientes com COVID-19 verificou uma relação entre os altos níveis destes marcadores com a severidade da doença e a taxa mortalidade (Quadro 1) (AZKUR *et al.*, 2020)

Quadro 1: Alterações em proteínas de fase aguda e bioquímica do soro na COVID-19.

Reagentes de fase aguda e bioquímica do soro	Alterações em COVID-19	Referências
Proteína C reativa	↑	
Taxa de sedimentação do eritrócito	↑	CHEN <i>et al.</i> , 2020c
Procalcitonina	↑	
Interleucina 6	↑	GAO <i>et al.</i> , 2020
Nitrogênio ureico no sangue	↑	
Creatinina	↑	
Alanina transaminase	↑	
Aspartato aminotransferase	↑	
Albumina	↓	CHEN <i>et al.</i> , 2020c
Lactato desidrogenase	↑	
Ferritina	↑	
Fibrinogênio	↑	
D-dímero	↑	
Amilóide A sérico	↑	ZHANG <i>et al.</i> , 2020
Troponina I cardíaca	↑	
Tempo de protrombina	↑	
Tempo de protromboplastina parcial ativado	↑	CHEN <i>et al.</i> , 2020c

Há alterações marcantes em exames hematológicos e bioquímicos de pacientes com COVID-19. Diminuição da hemoglobina, aumento nos valores de velocidade de hemossedimentação (VHS), ferritina sérica, proteína C reativa, lactato desidrogenase, D-dímero, tempo de protrombina e outros. Isto sugere alterações na capacidade de coagulação sanguínea e aumento do processo inflamatório através do acúmulo de íons de ferro no sangue, uma vez que a contagem de hemácias diminui e o heme aumenta. Em resposta, as células produzem abundantemente o agente quelante ferritina, para se ligar aos íons de ferro livres e evitar seu acúmulo, diminuindo assim os danos e o processo inflamatório (LIMA *et al.*, 2020).

REFERÊNCIAS

ASTUTI, I.; YSRAFIL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. **Diabetes Metab Syndr**, v. 14, n. 4, p. 407-412, 2020.

AZKUR, A.K. *et al.* Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1564-1581, 2020.

BAUER, G. The variability of the serological response to SARS-corona virus-2: Potential resolution of ambiguity through determination of avidity (functional affinity). **Journal of Medical Virology**, 2020. [publicado online para impressão em 7 de julho 2020]

CAVALCANTE, J.R. *et al.* COVID-19 no Brasil: evolução da epidemia até a semana epidemiológica 20 de 2020. **Epidemiol. Serv. Saude**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 2020376, 2020.

CHEN, C. *et al.* Advances in the research of cytokine storm mechanism induced by Corona Virus Disease 2019 and the corresponding immunotherapies. **Zhonghua Shao Shang Za Zhi**, v. 36, p. 005, 2020a.

CHEN, D. *et al.* Exposure to SARS-CoV-2 in a high transmission setting increases the risk of severe COVID-19 compared with exposure to a low transmission setting? **J Travel Med**, v. 27, n. 5, p. 094, 2020b.

CHEN, T. *et al.* Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. **BMJ**, v. 368, p. 1091, 2020c.

CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. **J Med Virol**, 2020.

COSTELA-RUIZ, V.J. *et al.* SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 54, p. 62-75, 2020.

DHAMA, K. *et al.* Coronavirus Disease 2019-COVID-19. **Clin Microbiol Rev**, v. 33, n. 4, p. 20- 28, 2020.

DI MAURO, G. *et al.* SARS-Cov-2 infection: Response of human immune system and possible implications for the rapid test and treatment. **Int Immunopharmacol**, v. 84, p.106519, 2020.

FARAG, N.S. *et al.* Viroporins and inflammasomes: A key to understand virus-induced inflammation. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 122, p. 105738, 2020.

FEHR, A.R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. In: MAIER H., BICKERTON E., BRITTON P. (Eds) **Coronaviruses. Methods in Molecular Biology**, vol. 1282. Humana Press, New York, NY, 2015.

FREEMAN, T.L.; SWARTZ, T.H. Targeting the NLRP3 Inflammasome in Severe COVID-19. **Front Immunol**, v. 11, p. 1518, 2020.

GAO, Y. *et al.* Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. **J Med Virol**, v. 92, n. 7, p. 791-796, 2020.

GUO, Y.R. *et al.* The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak an update on the status. **Military Medical Research**, v. 7, p 1-10, 2020.

HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet**, v. 395, p. 497-506, 2020.

HUI, D.S. *et al.* The continuing 2019-nCoV epidemic threat of novel coronaviruses to global health - the latest 2019 novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. **Int. J. Infect. Dis**, v. 91 p. 264–266, 2020.

LAI, C.C. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. **Int J Antimicrob Agents**, v. 55, n. 3, 2020.

LI, Q. *et al.* Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus infected pneumonia. **N Engl J Med**, v.382, p.1199-1207, 2020a.

LI, G. *et al.* Coronavirus infections and immune responses. **J Med Virol**, v. 92, p. 424-432, 2020b.

LI, X. *et al.* Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **J Pharm Anal**, 2020c.

LIMA, L.N.G.C.; SOUSA, M.S.; LIMA, K.V.B. As descobertas genômicas do SARS-CoV-2 e suas implicações na pandemia de COVID-19. **J. Health Biol. Sci.** (Online), v. 8, n. 1, 2020.

LIU, Y. *et al.* Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. **Sci China Life Sci**, v. 63, n. 3, p. 364-374, 2020a.

LIU, Y. *et al.* 2019-novel Coronavirus (2019-nCoV) Infections Trigger an Exaggerated Cytokine Response Aggravating Lung Injury. [publicado em <http://www.chinaxiv.org/abs/202002.00018>] (acesso em 25 de Agosto de 2020), 2020b.

MASTERS, P.S. The molecular biology of coronaviruses. **Adv Virus Res**, v. 66, p.193-292, 2006.

MASTERS, P.S.; PERLMAN, S. Coronaviridae. In: KNIPE, David M; HOWLEY, Peter M. (Ed). **Fields virology**. 6th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 825-858, 2013.

RABI, F.A. *et al.* SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: what we know so far. **Pathogens**, v. 9, p. 231, 2020.

ROBBA, C. *et al.* Multiple organ dysfunction in SARS-CoV-2: MODS-CoV-2. **Expert Rev Respir Med**, v. 14, n. 9, p. 865-868, 2020.

RUAN, Q. *et al.* Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. **Intensive Care Med**, v. 46, n. 5, p. 846-848, 2020.

SHEREEN, M.A. *et al.* COVID-19 infection: origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **J Adv Res**, v. 24, p. 91-98, 2020.

TOTURA, A.L.; BARIC, R.S. SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon. **Curr Opin Virol**, v. 2, p. 264-275, 2012.

TIAN, X. *et al.* Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody. **Emerg Microb Infect**, v. 9, p. 382-385, 2020.

XU, H. *et al.* High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. **Int J Oral Sci**, v. 12, p. 1-5, 2020.

WENZHONG, L.; HUALAN, L. COVID-19: Attacks the 1-Beta Chain of Hemoglobin and Captures the Porphyrin to Inhibit Human Heme Metabolism. **ChemRxiv**, v. 9, 2020.

World Health Organization (WHO), **COVID-19 Explorer**. Geneva: World Health Organization, 2020. Disponível em: <https://covid19.who.int/2020> [Acesso em 22 de setembro de 2020]

WRAPP, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 2020.

WU, J. *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: From Gene Structure to Pathogenic Mechanisms and Potential Therapy. **Front Microbiol**, v. 11, p. 1576, 2020.

YIN, Y.; WUNDERINK, R.G. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. **Respirology**, v. 23, n. 2, p. 130–137, 2018.

ZHANG, J.J. *et al.* Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. **Allergy**, v. 75, n. 7, p. 1730-1741, 2020.

HANTAVIROSE

Renato Lemos Pereira

Hospital Veterinário da Academia Militar das Agulhas Negras, Academia Militar das Agulhas Negras, Exército Brasileiro, Resende, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: renato.pereira@eb.mil.br; renatocigs@gmail.com

Otávio Augusto Brioschi Soares

Grupo de Pesquisa em Saúde Militar, Escola de Saúde do Exército (EsSEx), Exército Brasileiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: augusto.soares@eb.mil.br

Fernanda Vieira Costa Orlandini

Grupo de Pesquisa em Saúde Militar, Escola de Saúde do Exército (EsSEx), Exército Brasileiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: vieiraf.1986@gmail.com

Bárbara Batista Salgado

Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fiocruz Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil

E-mail: barbara.salgado@fiocruz.br; barbarasalgadob@gmail.com

Pritesh Jaychand Lalwani

Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fiocruz Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil

E-mail: pritesh.lalwani@fiocruz.br ; lalwanipritesh@yahoo.com

INTRODUÇÃO

A Hantavirose é uma antropozoonose emergente causada por vírus, de grande importância em saúde pública e com ampla distribuição pelo mundo, tendo roedores como principais reservatórios e transmissores.

Na América do sul, países como Bolívia, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Peru, e Venezuela, todos com o bioma Amazônico presente em seus territórios, têm registrado casos de hantavirose, demonstrando a circulação do vírus nesses locais (ALVES MORAIS et al., 2016; DE THOISY et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2014; FIRTH et al., 2012; HJELLE; TORRES-PÉREZ, 2010; MATHEUS et al., 2006; MONTGOMERY et al., 2012; MONTOYA-RUIZ; DIAZ; RODAS, 2014). O Brasil tem registro de casos em todas as regiões. A região Norte, em grande parte coberta pelo bioma Amazônico, possui poucos registros, com casos registrados nos estados do Amazonas, Maranhão, Mato Grosso e Pará (FIGUEIREDO et al., 2014; PINTO JUNIOR et al., 2014). Existem dados de registro entre 1995 até 2019 (BRASIL, 2019).

A região amazônica é endêmica para doenças com manifestações clínicas semelhantes à hantavirose e de difícil diagnóstico diferencial, como Leptospirose, Influenza, doenças hemorrágicas (Dengue, Febre Amarela, Arenavirus), Riquetisioses, pneumonias e febres atípicas. A compreensão da epidemiologia da Hantavirose é relevante para o atendimento de pessoas infectadas pelo vírus e com manifestações graves, além do estabelecimento de ações de prevenção para a doença (FIGUEIREDO, 2006; PINTO JUNIOR et al., 2014; MATTAR; GUZMÁN; FIGUEIREDO, 2015).

Agente etiológico

O gênero *Orthohantavirus* pertence à família *Hantaviridae*, Ordem *Bunyavirales*, e possui um grande número de espécies dispersas mundialmente. Seus hospedeiros são pequenos mamíferos, como roedores e outros insetívoros (JONSSON et al., 2010; ADAMS et al., 2017).

O agente causador da hantavirose é um vírus RNA, envelopado, com 80 a 120 nm de tamanho, que apresenta aproximadamente 12.000 nucleotídeos, divididos em três fragmentos de polaridade negativa. Possui três segmentos do genoma que são divididos conforme o tamanho e codificam as seguintes proteínas: segmento S (Small) que codifica a proteína do nucleocapsídeo (N); segmento M (Medium) que codifica as glicoproteínas do envelope (Gn e Gc); e segmento L (Large) que codifica a proteína RNA-polimerase dependente do RNA (RpRd). Cada segmento de RNA (S, M e L) é envolvido pela proteína N, formando moléculas circulares de nucleocapsídeo (FIGUEIREDO et al., 2014; YOSHIMATSU; ARIKAWA, 2014; FIGUEIREDO et al., 2008).

Muito sorotipos foram identificados, representando mais de 80 formas genéticas (OLIVEIRA et al., 2014). No entanto, o Comitê Internacional de Taxonomia

de Vírus (ICTV) reconhece 41 espécies e estabelece critérios para classificação de novos vírus dentro do gênero *Orthohantavírus* (FIGUEIREDO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014) (ABUDUREXIT et al., 2019; ADAMS et al., 2017). Os vírus deste gênero apresentam alta similaridade na organização da sequência dos segmentos de RNA e ciclos de vida semelhantes (JONSSON et al; 2010). A nomenclatura adotada para os vírus, geralmente, tem sido o nome da região onde uma nova variante é identificada pela primeira vez (PINTO JUNIOR et al, 2014). Embora existam esses critérios classificatórios, algumas publicações descrevem regularmente, desde a década de 80, a evidência de novos genótipos, cepas, espécies e linhagens por meio de uma variedade de determinações que não são padronizadas e não estão em conformidade com as propostas pela ICTV (LEVIS et al, 1998; ROSA et al, 2005; CHU et al, 2009; MAES, et al, 2009).

O vírus também é classificado conforme a distribuição geográfica dos reservatórios roedores: Velho Mundo e Novo Mundo. Ou é classificado pelo tipo de manifestação clínica observada em humanos: Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR) e Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (SCH). Alguns autores propõe a unificação das síndromes clínicas, com a denominação de Doença por Hantavírus, pois acreditam que a divisão é meramente didática (FIGUEIREDO et al., 2014; CLEMENT et al, 2012;).

Replicação viral

O hantavírus infecta células através da ligação das proteínas virais G1/G2 com receptores de superfície presente nas células do hospedeiro. Esse processo ocorre principalmente nas células endoteliais, epiteliais, dendríticas foliculares, além de macrófagos e linfócitos. As integrinas $\beta 1$ são utilizadas por hantavírus considerados apatogênicos. As integrinas $\beta 3$ são as responsáveis pela ligação entre células e vírus patogênicos, mais especificamente a $\alpha v\beta 3$ integrina, presente em células epiteliais e plaquetas (JONSSON et al, 2010). Os receptores do complemento CR3 (formado pela associação das integrinas $\beta 2$ e αM) e CR4 (associação das integrinas $\beta 2$ e αX) são outros receptores de entrada utilizados pelo Hantavírus que estão ativados na infecção (RAFTERY et al., 2014).

Outras estruturas que não são integrinas interagem com o hantavírus como cofatores da infecção, como a DAF (Fator de declínio da aceleração) (KRAUTKRÄMER; ZEIER, 2008), uma glicosfosfatidilinositol (GPI) ancorada a proteína do sistema regulatório do complemento e o receptor do domínio da cabeça globular do complemento (gC1qR) (CHOI et al., 2008).

Após a ligação, ocorre a endocitose do vírus, via clatrina, e a liberação do material nucleico para dentro do citosol na fusão do envelope com o endossomo. A R_pRd auxilia a transcrição do mRNA dos segmentos S, M e L. A tradução do mRNA em proteínas virais ocorre em estruturas do maquinário celular. Os mRNA dos segmentos S e L são traduzidos nos ribossomos livres no citoplasma e o mRNA do segmento M é traduzido nos ribossomos ligados à membrana do retículo endoplasmático rugoso. Após a tradução das proteínas virais, a polimerase viral troca o processo de transcrição pelo processo de replicação dos genomas virais, que junto das proteínas já produzidas, vão compor os novos vírions. A proteína N é produzida em grande quantidade logo no início da infecção e tem um papel importante no ciclo de vida viral. Esta proteína interage e modula a resposta do sistema imunológico. A proteína N formará um envoltório nos segmentos dos RNA replicados. Finalizando o processo com a montagem e liberação dos novos vírions pelas células. (JONSSON et al., 2010; YOSHIMATSU; ARIKAWA, 2014a, 2014b; ZEIER et al., 2005).

No processo de replicação viral, mutações podem ocorrer permitindo a adaptação do vírus a novos hospedeiros e podendo tornar o vírus um patógeno emergente. A RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) pode realizar trocas pontuais nos nucleotídeos no momento da tradução podendo gerar mutantes. Em infecções com duas ou mais espécies de Hantavírus pode ocorrer o ressortimento, gerando novos rearranjos dos segmentos virais (FIGUEIREDO et al., 2014; SOUZA et al., 2014).

Epidemiologia

A relação do hantavírus com o seu reservatório natural, os roedores, tem um papel importante na transmissão (KHAIBOULLINA et al., 2005). A distribuição, a história natural e o comportamento dos reservatórios determinam as áreas de transmissão do vírus e a distribuição geográfica dos casos de Hantavirose (FIRTH et al., 2012; HU et al., 2014; JONSSON et al., 2010).

O ciclo de transmissão do vírus entre os reservatórios roedores, principais transmissores, ocorre horizontalmente. A relação social e a flutuação do tamanho de uma população auxiliam na disseminação no vírus entre os reservatórios. O contato com fluídos corporais e aerossóis são as principais formas de transmissão que ocorrem em combates (mordidas e agressões), em disputas territoriais e reprodutivas, ou pela convivência social, como o comportamento de limpeza entre membros de um grupo (OLIVEIRA et al., 2014; MILLS et al., 1999). A transmissão do vírus para humanos ocorre através do contato direto com reservatórios infectados ou pela inalação de aerossóis dos dejetos e líquidos corporais (saliva, sangue e fezes). O contato dos humanos

a. Fatores ligados aos hospedeiros

O hospedeiro definitivo ou reservatório tem um papel relevante na manutenção do vírus no ambiente. Análises filogenéticas demonstram a longa co-divergência evolucionária entre as espécies de hantavírus sendo acompanhada pelo tipo de reservatório, geralmente, possibilitando correlacionar que espécie de vírus determinado reservatório pode transmitir (GUO et al., 2013). Essa relação vírus-reservatório possibilita estimar as possíveis áreas de circulação de vírus transmitidos por determinadas espécies de roedores, baseado no conhecimento sobre a dispersão e a área de ocorrência dos roedores reservatórios (GUO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014).

A capacidade de adaptação dos reservatórios a ambientes preservados e com interferência humana determinam as áreas de ocorrência e dispersão do vírus (OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014). A dispersão da hantavirose também é influenciada pelo aumento no adensamento populacional dos roedores, elemento primordial para o surgimento de epidemias do Hantavírus (ENGELTHALER *et al.*, 1999). O tamanho populacional das espécies de roedores é determinado pelo uso do ambiente pelo homem, mudanças climáticas ou variações cíclicas normais que afetam as espécies, e que podem ameaçar a saúde humana (SCHMALJOHN; NICHOL, 2001). Esses fatores influenciam a reprodução, a disponibilidade de alimentos e a presença de predadores (ENGELTHALER et al., 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Roedores vivem em colônias e o comportamento competitivo, reprodutivo e alimentar auxiliam na manutenção da circulação do vírus entre os roedores do grupo (OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014).

O homem é o hospedeiro acidental deste ciclo e se infecta ao entrar em contato com roedores infectados ou ao inalar aerossóis dos dejetos destes roedores quando divide o mesmo espaço com esses animais. Isso ocorre quando o hospedeiro acidental invade a área de ocorrência de roedores (atividades de desmatamento, expansão imobiliária, atividades de lazer em áreas de ocorrência do reservatório, treinamento militar, etc.) ou quando atrai animais infectados para próximo das habitações (residências próximas a áreas de mata, atividades agropecuárias, armazéns para estocagem de alimentos, etc.). A perturbação antrópica a comunidades de roedores instaladas em áreas preservadas pode ser um fator direcionador para a emergência de casos. (JONSSON; 2010; OLIVEIRA et al., 2013; ZEIER et al., 2005; ENGELTHALER et al., 1999;).

b. Fatores ligados ao ambiente

Espécies de roedores evoluíram em milhões de anos dentro de biomas específicos. As alterações ambientais promovidas pelo processo de ocupação do

homem na terra fizeram com que biomas sofressem mudanças, modificando a dinâmica populacional desse grupo de animais. Algumas espécies de roedores têm maior capacidade de se adaptar à novos ambientes ou à ambientes degradados. São chamadas de espécies generalistas ou oportunistas. Essas espécies se proliferam com mais facilidade quando o ambiente lhes é favorável, sendo potenciais reservatórios dispersores do hantavírus. A disponibilidade de alimentos, regime de chuvas, flutuações climáticas sazonais, fenômenos climáticos atmosférico-oceânicos são outros fatores que ajudam a influenciar as populações de roedores (ZEIER et al., 2005; JONSSON et al., 2010; DEARING; DIZNEY, 2010; HEYMAN et al., 2012)

Alterações ambientais resultantes da destruição, fragmentação, degradação do habitat, superexploração das espécies, introdução de espécies exóticas e aumento da ocorrência de doenças têm grande impacto na diversidade biológica (PRIMACK; RODRIGUES, 2001). Essas alterações favorecem a emergência de doenças. Em habitat fragmentados, por exemplo, pode ocorrer um aumento temporário da relação animal/área, favorecendo a transmissão de doenças entre indivíduos de um mesma espécie. Outro efeito indireto da destruição e degradação ambiental é o aumento da susceptibilidade de organismos a doenças em razão da deteriorização da qualidade do habitat e da diminuição da disponibilidade de alimentos. Além disso, o incremento no contato entre diferentes espécies pode favorecer o contato e a transmissão de doenças, podendo afetar espécies ameaçadas ou favorecer o “spillover” de patógenos entre diferentes espécies. (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; DEARING; DIZNEY, 2010; WITKOWSKI et al., 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Um exemplo da influência do clima no ambiente ocorreu no surto de Four Corner, nos EUA, em 1993, e teve relação com o fenômeno do El Niño ocorrido no mesmo ano. A elevação da precipitação ocorrida na região aumentou a disponibilidade de alimentos e, por consequência, as populações de roedores reservatórios do hantavírus, elevando o risco de transmissão da doença (ENGELTHALER et al., 1999).

No Brasil, as alterações no ambiente podem ter favorecido o aumento populacional de algumas espécies de roedores incrementando a transmissão do Hantavírus. As espécies *Bolomys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes* são as principais responsáveis pela transmissão do Hantavírus no Brasil. A espécie *B. lasiurus* é encontrada em áreas alteradas pela expansão agrícola e urbana e a flutuação anual dessa população parece ter relação com a disponibilidade de alimentos, influenciada pelo regime de chuvas. A espécie *O. nigripes* ocupa matas de galeria e matas secundárias. Os fatores temperatura e precipitação parecem influenciar a distribuição desta espécie pelo país (OLIVEIRA et al., 2013).

Na Amazônia, alterações ambientais como desmatamento (DOS SANTOS et al., 2006), extrativismo, construção de estradas, avanço das áreas de urbanização e

da agropecuária favorecem o contato entre humanos e reservatórios possibilitando o surgimento de novos casos (MEDEIROS et al., 2010).

c. Fatores ligados ao vírus

Os fatores ligados ao vírus são o tempo que o vírus permanece sendo eliminando pelo hospedeiro, o tempo que resiste no ambiente, e a capacidade do vírus de infectar o reservatório sem debilitá-lo. Cada espécie de Hantavírus parece estar bem adaptada a uma espécie de reservatório. O hospedeiro definitivo ou reservatório quando infectado não demonstra alterações clínicas apesar de estar cronicamente infectado. Esses animais apresentam altos níveis de anticorpos neutralizantes, no entanto, permanecem longos períodos em viremia, eliminando vírus no ambiente. Os vírus são secretados no ambiente através da saliva, urina, fezes e sangue (JONSSON et al., 2010). Estudo realizado demonstrou que o roedor *Myodes glareolus*, reservatório do vírus PUUV, ao ser infectado, permaneceu 80 dias eliminando o vírus na saliva (KALLIO et al., 2007).

Hospedeiros

Desde a descoberta do agente viral causador do Hantavírus e da identificação do reservatório roedor na década de 70, diversas espécies de vírus e de reservatórios roedores foram identificadas pelo mundo. Os principais hospedeiros e transmissores da doença são da ordem Rodentia. No entanto, outras ordens foram identificadas alojando o vírus como a Chiroptera (morcegos) e a Soricomorpha (mussaranhos e toupeiras) (DE ARAUJO et al., 2012; GUO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; SOUZA et al., 2014; WITKOWSKI et al., 2014); .

A ordem Rodentia possui aproximadamente 2200 espécies identificadas no mundo, o que representa 42% das espécies de mamíferos existentes. Está presente em diversos biomas do planeta, em razão da sua grande capacidade de adaptação ecológica e fisiológica a ambientes (OLIVEIRA et al., 2014). Apesar da grande variedade, as espécies de roedores identificadas como transmissoras do Hantavírus pertencem às famílias Cricetidae (Subfamílias Arvicolinae, Neotominae e Sigmodontinae) e Muridae (subfamília Murinae) e estão distribuídas da seguinte forma pelo mundo (SOUZA et al., 2014):

a. Família Cricetidae:

- Subfamília Arvicolinae: Encontrada na Europa, Ásia e América do Norte;
- Subfamília Neotominae e Sigmodontinae: Encontradas no continente Americano (Novo Mundo).

b. Família Muridae:

- Subfamília Murinae: Encontrada na Europa e Ásia (Velho Mundo) e mais recentemente na África;

As espécies responsáveis pela transmissão da doença na América do Sul pertencem à subfamília Sigmodontinae. No Brasil, os gêneros desta subfamília identificados como reservatórios são Akodon, Calomys, Holochilus, Necromys e Oligoryzomys (ROSA et al., 2005; JONSSON et al., 2010; FIRTH et al., 2012; OLIVEIRA et al. 2013; OLIVEIRA et al., 2014; MONTOYA-RUIZ et al, 2014;).

As espécies da subfamília Sigmodontinae são silvestres e são encontradas em todos os biomas existentes no Brasil (amazônico, mata atlântica, cerrado, pantanal, pampas e caatinga) (OLIVEIRA et al., 2014). As espécies *Bolomys Lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes* são os principais reservatórios do vírus nos biomas cerrado e mata atlântica. No entanto, seu potencial de transmissão se estende por todo o país, exceto na área do bioma amazônico. Este bioma, que ocupa uma área bastante extensa, necessita de mais registros de dados sobre os reservatórios do Hantavírus. Além disso, a Amazônia ultrapassa as fronteiras de vários países na América do Sul, sendo relevante o acompanhamento da ocorrência de casos nestes locais. No norte do Brasil existem poucos estudos sobre os reservatórios e sua área de ocorrência dentro dos estados (OLIVEIRA et al., 2013). A tabela 1 apresenta os principais reservatórios já identificados e o Hantavírus correlacionado na região amazônica.

Tabela 1. Principais reservatórios, área de ocorrência dos reservatórios na região amazônica e genótipos de Hantavírus identificados nos reservatórios.

RESERVATÓRIO	ÁREA DE OCORRÊNCIA NA REGIÃO AMAZÔNICA	GENÓTIPOS	REF.
<i>Oligoryzomys fomesi</i>	Mato Grosso, Oeste do Maranhão	Anajatuba	BONVICINO <i>et al</i> (2008); FIRTH <i>et al.</i> (2012); OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014); SANDOVAL <i>et al.</i> (2010)
<i>O. utiaritensis</i>	Amazonas, Pará, Centro-Oeste do Brasil	Castelo dos Sonhos (CASV)	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2013); OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)

<i>O. moojeni</i>	Amazonas, Pará, Rondônia e Mato Grosso	Castelo dos sonhos	FIGUEIREDO <i>et al.</i> (2014)
<i>O. microtis</i>	Bolívia, Peru, Norte do Brasil	Rio Mamoré (RIOMV)	BONVICINO <i>et al.</i> (2008); FIRTH <i>et al.</i> (2012); OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014).
<i>O. delicatus</i>	Venezuela	<i>Maporal orthohantavirus</i> (MAPV)*	DE THOISY <i>et al.</i> (2014)
<i>O. fulvescens</i>	Guiana Francesa	Maripa	DE THOISY <i>et al.</i> (2014)
<i>Holochilus sciureus</i>	Norte do Brasil, Bolívia, Peru, Colômbia, Equador, Venezuela, Suriname, Guiana e Guiana Francesa	Rio Mearin (RIMEV)	FIRTH <i>et al.</i> (2012); OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)
<i>Calomys callosus</i>	Bolívia	<i>Laguna Negra orthohantavirus</i> * (LANV)	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)
<i>C. callidus</i>	Centro-Oeste do Brasil	<i>Laguna Negra orthohantavirus</i> *	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)
<i>Bolomys lasiurus</i>	Leste do estado do Pará, Maranhão, Sudoeste de Rondônia, Mato Grosso, Tocantins	Araraquara (ARAV)	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)
<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Colômbia e Guiana Francesa	Calabazo (Colômbia) e Maripa (G. Francesa)	DE THOISY <i>et al.</i> (2014)
<i>Zygodontomys brevicauda cherriei</i>	Colômbia	<i>Necocli orthohantavirus</i> * (NECV)	(MONTROYA-RUIZ; DIAZ; RODAS, 2014)
<i>Sigmodon alstoni</i>	Venezuela	<i>Caño Delgadito orthohantavirus</i> * (CADV)	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)

<i>S. hispidus</i>	Venezuela e Peru	<i>Black Creek Canal orthohantavirus*</i> (BCCV)	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)
?	Bolívia	Tunari	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2014)
<i>Neacomys spinosus</i>	Norte do Brasil, Peru, Colômbia, Bolívia e equador	<i>Andes orthohantavirus*</i> (ANDV)	(RAZURI <i>et al.</i> , 2014)

*Espécies de vírus reconhecidas pelo ICTV (Comitê internacional de Taxonomia Viral). /Alguns genótipos da tabela são variantes de espécies reconhecidas como: Castelo dos Sonhos (Variantes do *Andes orthohantavirus*); Rio Mamoré e Maripa (Variantes do *Laguna Negra orthohantavirus*) (ABUDUREXIT ET AL., 2019; ADAMS *et al.*, 2017; MULL *et al.*, 2020)

Região amazônica

Tendo em vista que a área de ocorrência de casos de Hantavirose está interligada com a área de ocorrência do reservatório, é importante que os estudos deem atenção aos biomas onde ocorrem as espécies de reservatórios e os nichos ecológicos aos quais estão inseridas. As áreas desses biomas ultrapassam limites de estados e fronteiras de países (MEDEIROS *et al.*, 2010; FIRTH *et al.*, 2012; FIGUEIREDO *et al.*, 2014; MONTOYA-RUIZ, DIAZ & RODAS, 2014; PINTO JUNIOR *et al.*, 2014).

Os países que possuem o bioma amazônico em seus territórios são: Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela. Não há registro de casos de Hantavirose na Guiana, Suriname e Equador. Os sorotipos identificados na Amazônia nos países com registro do hantavírus estão identificados na figura 2.

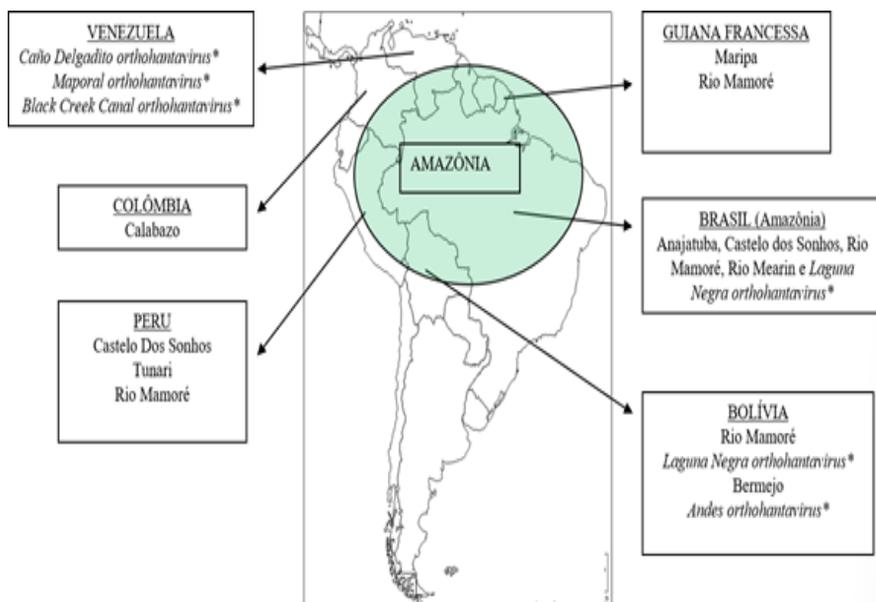


Figura 2. Países que possuem o Bioma amazônico em seu território e os genótipos registrados. **Fonte:** DE THOISY et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2014; MONTOYA-RUIZ; DIAZ; RODAS, 2014; PINTO JUNIOR, et al, 2014; MONTGOMERY et al., 2012; HJELLE & TORRES-PÉREZ, 2010; DOS SANTOS et al., 2006; ROSA et al., 2005.

No Brasil, os estados que fazem parte da Amazônia Legal e que tem registro de casos de hantavirose são Amazonas, Mato Grosso, Maranhão, Pará e Rondônia. No período de 1993 a 2019 foram registrados 475 casos (MS/SVS, 2019), conforme tabela 2:

Tabela 2. Registro de casos confirmados de Hantavirose no Sistema de Informação de Agravos Notificados entre os anos de 1993 e 2019.

UF/ ANO	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
AM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0
MA	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	4	0	0	2
MT	0	0	0	0	0	0	3	2	10	12	5	9	49	29
PA	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	2	2	9	15
RO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Total	0	0	1	0	0	0	3	4	13	12	11	15	59	46

UF/ ANO	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	Total
AM	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	6
MA	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	12
MT	22	22	26	48	8	17	23	16	18	4	6	5	0	334
PA	9	17	15	4	11	4	4	3	3	2	2	10	1	116
RO	1	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	6
Total	32	41	42	53	21	21	30	19	21	6	8	16	1	475

Fonte: Ministério da Saúde/SVS, 2019.

As regiões do Pará e Mato grosso são as principais áreas de ocorrências de casos. Estudos demonstram a sobreposição de mapas de dispersão espacial de casos notificados na Amazônia e das áreas com intensa atividade antrópica na região Norte. Municípios dessa região aparecem como de risco para o surgimento de novos casos devido ao conjunto de fatores que podem favorecer a transmissão. Um exemplo é a presença de solos abundantes em matéria orgânica vegetal que levam a uma transição humana descontrolada para áreas rurais em busca do uso e da exploração de recursos naturais, propiciando um desequilíbrio ambiental (FIGUEIREDO et al., 2014; DONALÍSIO et al., 2008; SANTOS et al., 2012). É o caso também da área de abrangência das estradas BR 163 e 230. O que se observa nessa região é o avanço da ocupação humana com atividades extrativistas e agropecuárias, no chamado arco do

desmatamento, principalmente no Pará e Mato grosso, onde ocorreu o maior número de registros na região Norte (Tabela 2) e registros em artigos (MEDEIROS et al., 2010).

Outras localidades da Amazônia Legal brasileira devem receber destaque pelos registros de casos e de prevalência, como Rondônia e Maranhão (FIRTH et al., 2012). Este fato aumenta a necessidade de estudos mais aprofundados para melhor entendimento da distribuição, da dinâmica e das áreas de risco.

No Amazonas, nos municípios próximos à Itacoatiara, onde ocorreram as últimas notificações, observa-se um incremento das atividades extrativistas e agropecuárias (MEDEIROS et al., 2010; SANTOS et al, 2012). A primeira referência da circulação do vírus no estado do Amazonas ocorreu em 1991, em um inquérito sorológico com familiares e vizinhos de pacientes que morreram com febre hemorrágica sem diagnóstico (VASCONCELOS et al, 1992). Desde então, alguns episódios foram relatados: O Primeiro relato ocorreu no ano de 2004, em Itacoatiara, onde três indivíduos de uma mesma família foram infectados, com confirmação por exames laboratoriais. Um quarto indivíduo da mesma família morreu, porém não houve confirmação laboratorial. Este último caso não é contabilizado pelo Ministério da Saúde como caso confirmado da doença. Na investigação epidemiológica, nove roedores da espécie *Oligoryzomys microtis* foram capturados sendo quatro foram positivos para anticorpos IgG contra o Hantavírus (DOS SANTOS et al., 2006). A variante RIOMV – 3 foi identificada em estudo posterior de uma das amostras dos quatro roedores positivos (FIRTH et al., 2012). O segundo relato foi no município de Maués, no ano de 2005 (TEIXEIRA et al., 2006; GIMAQUE et al., 2012). O terceiro relato ocorreu no município de Careiro da Várzea, no ano de 2011, com dois casos confirmados. Um dos pacientes faleceu e amostras do sangue foram coletadas. O vírus identificado foi o RIOMV. Nas investigações epidemiológicas dos casos, o inquérito sorológico identificou três pessoas positivas para IgG contra o Hantavírus (DE OLIVEIRA et al., 2014). Segundo FIRTH et al., (2012) mais três casos (um no ano de 2008 e dois no ano de 2009) ocorreram. No entanto, não existe registro na base de dados do Ministério da Saúde (SINAN WEB). Um Levantamento sorológico em humanos realizado em quatro municípios do estado do Amazonas (Itacoatiara, Lábrea, Careiro Castanho e Atalaia do Norte) obteve resultados de soroprevalência do Hantavírus de 0,2%, 0,9%, 0,4% e 0,8%, respectivamente (GIMAQUE et al, 2012). Outros dois levantamentos sorológicos demonstraram evidências da circulação do vírus pela população testando presença de anticorpos em militares, pessoas de comunidades rurais e de área urbana (PEREIRA, 2016; SALGADO, 2016). Foram encontradas as prevalências de 7,03% em militares que atuam na região amazônica e 7,86 % na população civil de Manaus (PEREIRA, 2016) e no estudo comparativo entre municípios, a prevalência de 6,6% (Manaus), 16% (Coari) e 17% (Itacoatiara).

Enfermidade clínica

As hantavirose são doenças agudas virais cujas infecções em humanos variam de assintomáticas a severas. Podem evoluir de doença aguda febril inespecífica e autolimitada até quadros mais graves, conhecidos como as formas clássicas de Febre Hemorrágica com Síndrome Renal na Ásia e Europa, e Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus nas Américas (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2013). Embora essas duas formas clínicas apresentem quadro de patogenia semelhantes, diferem muito em nível de desenvolvimento clínico e taxas de fatalidade (MANIGOLD & VIAL, 2014).

Em ambas as entidades clínicas, a patogênese da Hantavirose inicia-se nas células endoteliais da microvascularização dos pulmões, seguidas pela disseminação do vírus por via linfo-hemática para todo o corpo. Em geral, compreende alterações na coagulação sanguínea, vasodilatação e falhas na função da barreira endotelial proporcionada pelos vasos capilares, resultando, assim, no extravasamento de sangue; e resposta imune exacerbada, com liberação de citocinas, aumento da permeabilidade vascular e diversos processos inflamatórios nos órgãos-específicos afetados (VOGEL et al., 2007; BRASIL, 2013; KRUGER et al., 2015).

O período de incubação consiste em torno de 2 a 3 semanas, apresentando os primeiros sinais da doença após esse período de exposição. Esse tempo pode variar entre três dias até aproximadamente dois meses, dependendo da síndrome causadora. A sintomatologia inicial da infecção ou fase prodrômica é indiscriminável em comparação a outras doenças relacionadas a eventos agudos febris e geralmente cursa com febre, mialgia, artralgia, cefaleia, dor abdominal, indisposição, bem como fenômenos neurológicos, cardiovasculares e gastrointestinais (náusea, vômito e diarreia). Então, nesses casos, são de suma relevância o levantamento e a análise dos aspectos epidemiológicos para diagnóstico diferencial (YOUNG et al., 2000; CAMPOS et al., 2009; BRASIL, 2013).

Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR)

No geral, a FHSR apresenta sinais de trombocitopenia, diátese hemorrágica e insuficiência renal (VOGEL et al., 2007). Essa síndrome ocorre na região da Europa e Ásia. A princípio, após fase inicial e febril inespecífica, além de sintomas oculares e eventos hemorrágicos, os pacientes apresentam derrame vascular em virtude da trombocitopenia e choque ocasional (10 a 15% dos casos), adentrando em fase hipotensiva. A fase seguinte denominada oligúrica é determinante na evolução do indivíduo, pois há grande risco de ocorrência de hipertensão, edema pulmonar

e insuficiência renal, sendo essas complicações as principais responsáveis por aproximadamente 50% dos casos fatais por FHRS. Posteriormente a fase diurética subsequente, procede-se a convalescença (LEE et al., 1979; NIKLASSON et al., 1987; MUSTONEN et al., 1998; LUNDKVIST et al., 1998; MANIGOLD; VIAL, 2014).

Síndrome Cardiopulmonar por Hantavírus (SCPH)

Assim como para FHRS, os casos de SCPH manifestam inicialmente as mesmas características febris inespecíficas, trombocitopenia e leucocitose, contudo, apresentam, por conseguinte, insuficiência respiratória de etiologia desconhecida e podem evoluir para quadros pulmonares fatais (WILLEMANN; OLIVEIRA, 2014). A ocorrência desta síndrome está localizada nas Américas. A severidade da fase cardiopulmonar ocorre após sete dias do estágio prodrômico e é caracterizada pelo início de tosse seca, todavia, em alguns casos, pode ser produtiva, acompanhada por taquicardia, taquidispneia, hipoxemia, edema pulmonar não-cardiogênico, hipotensão e colapso circulatório (FERREIRA et al., 2000.; BRASIL, 2013).

Diagnóstico da Hantavirose (Sorológico e Molecular)

O diagnóstico de infecções por hantavírus em humanos é baseado nas informações clínico-epidemiológicas, além dos testes laboratoriais. Estes devem ser utilizados principalmente em casos leves e moderados. Os critérios clínicos para a suspeita de casos e para a realização dos testes laboratoriais devem ser para pacientes com febres inespecíficas, severa mialgia, trombocitopenia, falência renal e/ou desconforto respiratório; oriundos de regiões endêmicas para a doença; que desenvolveram atividades que possam se expor aos vírus, seus dejetos e/ou líquidos corporais (trabalhadores rurais, madeireiros, militares, pessoas que desenvolveram atividades recreativas em áreas endêmicas). Os métodos diagnósticos mais empregados são: Sorológicos, Moleculares (transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase - RT-PCR), por cultura viral e Imunohistoquímicos (GUTERRES et al., 2015; MATTAR; GUZMÁN; FIGUEIREDO, 2015), 2015).

Os métodos de diagnóstico sorológicos são os mais comuns para o diagnóstico de Hantavirose. O ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA - Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) é o mais utilizado para a detecção de anticorpos IgG e IgM contra o vírus, na fase aguda da doença (5 - 14 dias após o início dos sinais clínicos). Muitos desses ensaios utilizam proteínas recombinantes derivadas da própria estrutura viral como antígenos para a captação de anticorpos. Essas proteínas recombinantes

são manipuladas em laboratório, podendo ser sintetizadas a partir de sistemas de expressão, eucarioto ou procarioto, e purificadas antes de serem empregadas em quaisquer metodologias.

O antígeno mais usado nos testes sorológicos para Hantavirose é a proteína do nucleocapsídeo (N) do vírus, uma vez que é produzida em grande quantidade logo no início da infecção. Esta proteína possui na sua estrutura regiões conservadas que interagem com o sistema imunológico, modulando a resposta para a produção de anticorpos contra o vírus. Isso permite a detecção de anticorpos em pacientes em casos agudos e em pacientes convalescentes (FIGUEIREDO et al., 2010; GUTERRES et al., 2015; KARIWA et al., 1992; SCHMIDT et al., 2006).

O diagnóstico molecular é largamente utilizado, nos estágios iniciais da doença ou para diagnóstico post-mortem. A transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) é bem específica para hantavírus. Produtos do PCR podem ser sequenciados para a identificação dos genótipos virais e para a condução da análise filogenética. A detecção do RNA viral é essencial para o diagnóstico precoce de Hantavirose. É necessária a seleção de *primers* que sejam complementares às regiões conservadas do gene e a sequência deve ser conservada entre diferentes genótipos virais relacionados com as espécies e regiões de ocorrência. No entanto, testes moleculares são viáveis somente em estágios iniciais da doença quando os pacientes estão em viremia (7-10 dias após o início dos sintomas). Diversas técnicas moleculares para melhorar a detecção do RNA podem ser utilizadas (ex: Real time RT-PCR, Nested e hemi-Nested PCR)(GUTERRES et al., 2015; MATTAR; GUZMÁN; FIGUEIREDO, 2015).

Outra metodologia possível é o isolamento viral em culturas de células Vero E6, seguida da identificação de células infectadas pelo vírus por imunofluorescência. É possível também a detecção de anticorpos contra hantavírus pelo teste de neutralização por redução de placa (PRNT - Plaque Reduction Neutralization Test). No entanto, esses testes devem ser executados em laboratórios com condições de biossegurança nível 3, pelo elevado risco de contaminação. Além disso, essas técnicas são pouco utilizadas pela dificuldade da replicação viral em cultura de células (GUTERRES et al., 2015; MATTAR; GUZMÁN; FIGUEIREDO, 2015).

Conclusão

A Hantavirose é uma antropozoonose negligenciada e emergente na Amazônia que merece atenção das autoridades de saúde. A geografia de ocorrência da doença, relacionada com o comportamento e a distribuição dos reservatórios roedores e o contato com hospedeiros acidentais (homem) tornam o monitoramento bastante complexo. Redes de vigilância em saúde e ambientais, com caráter multidisciplinar, devem ser implementadas e/ou reforçadas para o monitoramento de novos casos e o entendimento da soroprevalência da doença na população. Outras formas de monitoramento podem ser utilizadas como uso de sentinelas (animais domésticos, animais selvagens e profissionais de risco para contaminação) e captura de roedores.

As alterações antrópicas a áreas preservadas e as mudanças nas fronteiras agrícolas são fatores que modificam a dinâmica da doença. Esse cenário gera um alerta para a emergência de surtos. Além disso, as dificuldades logísticas para ter acesso a regiões longínquas da Amazônia e identificação de novos casos impõem desafios ainda maiores para os profissionais da saúde e da vigilância. A complexidade de todos estes fatores envolvidos no ciclo da Hantavirose mostra a importância de se adquirir mais conhecimento e manter uma constante investigação para maior entendimento da doença na região.

REFERÊNCIAS

ABUDUREXIT ET AL. HHS Public Access. **Arch Virol.**, n. 1, p. 164(7), 2019.

ADAMS, M. J. et al. **Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017)**. [s.l: s.n.]. v. 162

ALVES MORAIS, F. et al. Serological survey of hantavirus in inhabitants from tropical and subtropical areas of Brazil. **Advances in Virology**, v. 2016, 2016.

ARAUJO, D. et al. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8 ed. rev. – (Série B. Textos básicos em saúde) – **Brasília : Ministério da Saúde**, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância, prevenção e controle das hantavírose / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2013.**

BRASIL. Casos confirmados de hantavírose no Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1993 a 2019. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 2016.**

BONVICINO, C. R., OLIVEIRA, J.A., & D'ANDREA, P. S. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. **Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008.**

CAMPOS, G.M.; BORGES, A.A.; BADRA, S.J.; FIGUEIREDO, G.G.; SOUZA, R.L.; MORELI, M.L.; FIGUEIREDO, L.T. Pulmonary and cardiovascular syndrome due to hantavirus: clinical aspects of an emerging disease in southeastern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42 (3), 282–289. 2009.

CHOI, Y. et al. A hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome requires gC1qR/p32 for efficient cell binding and infection. ***Virology***, v. 381, n. 2, p. 178–183, 2008.

CHU, Y.K.; GOODIN, D.; OWEN, R.D.; KOCH, D.; JONSSON, C.B. Sympatry of 2 hantavirus strains, Paraguay, 2003–2007. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1977– 1980. 2009.

CLEMENT, J. et al. A unifying hypothesis and a single name for a complex globally emerging infection: Hantavirus disease. ***European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases***, v. 31, p. 1–5, 2012.

DE ARAUJO, J. et al. Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. ***BMC research notes***, v. 5, n. 1, p. 690, 2012.

DE OLIVEIRA, R. C. et al. Rio Mamoré Virus and Hantavirus Pulmonary. ***Emerging Infections Diseases***, v. 20, n. 9, 2014.

DE THOISY, B. et al. Short report: Maripa Hantavirus in French Guiana: Phylogenetic position and predicted spatial distribution of rodent hosts. ***American Journal of Tropical Medicine and Hygiene***, v. 90, n. 6, p. 988–992, 2014.

DEARING, M. D.; DIZNEY, L. Ecology of hantavirus in a changing world. ***Annals of the New York Academy of Sciences***, v. 1195, p. 99–112, 2010.

DONALÍSIO, M.R. et al. Aspectos climáticos em áreas de transmissão de hantavirose no estado de São Paulo, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. p. 1141-1150, 2008.

DOS SANTOS, M. C. et al. Human hantavirus infection, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 7, p. 1165–7, jul. 2006.

ENGELTHALER, D. M. et al. Climatic and environmental patterns associated with hantavirus pulmonary syndrome, Four Corners region, United States. **Emerging infectious diseases**, v. 5, n. 1, p. 87–94, 1999.

FERREIRA, M.; NISHIOKA, S.A.; SANTOS, T.L.; SANTOS, R.P.; SANTOS, P.S.; ROCHA, A. Hantavirus pulmonary syndrome in Brazil: Clinical aspects of three new cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42:41-46, 2000.

FIGUEIREDO, G. G. DE et al. Diagnosis of hantavirus infection in humans and rodents in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 348–354, 2010.

FIGUEIREDO, L. T. M. Febres hemorrágicas por vírus no Brasil Viral hemorrhagic fevers in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 2, p. 203–210, 2006.

FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Expression of a hantavirus N protein and its efficacy as antigen in immune assays. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 596–599, 2008.

FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Hantaviruses and cardiopulmonary syndrome in South America. **Virus research**, p. 1–12, 5 fev. 2014.

FIRTH, C. et al. Diversity and Distribution of Hantaviruses in South America. **Journal of Virology**, v. 86, n. 24, p. 13756–13766, 2012.

FORBES, K. M.; SIRONEN, T.; PLYUSNIN, A. Hantavirus maintenance and transmission in reservoir host populations. **Current Opinion in Virology**, v. 28, p. 1–6, 2018.

GIMAQUE, J. B. L. et al. Serological evidence of hantavirus infection in rural and urban regions in the state of Amazonas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 1, p. 135–7, fev. 2012.

GUO, W.P. et al. Phylogeny and Origins of Hantaviruses Harbored by Bats, Insectivores, and Rodents. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 2, 2013.

GUTERRES, A. et al. Detection of different South American hantaviruses. **Virus Research**, v. 210, p. 106–113, 2015.

HEYMAN, P. et al. In search for factors that drive hantavirus epidemics. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. July, p. 1–23, 2012.

HJELLE, B.; TORRES-PÉREZ, F. Hantaviruses in the Americas and their role as emerging pathogens. **Viruses**, v. 2, n. 12, p. 2559–2586, 2010.

HU, X. Q. et al. Diversity and distribution of host animal species of hantavirus and risk to human health in jiuhua mountain area, china. **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 27, n. 11, p. 849–57, nov. 2014.

JONSSON, C. B.; FIGUEIREDO, L. T. M.; VAPALAHTI, O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 412–41, abr. 2010.

KALLIO, E. R. et al. Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. **Ecology**, v. 88, n. 8, p. 1911–1916, 2007.

KARIWA, H. et al. Development and application of protein G antibody assay for the detection of antibody to hantavirus. **J Virol Methods**, v. 37, n. 3, p. 345–354, 1992.

KHAIBOULLINA, S. F.; MORZUNOV, S. P.; ST JEOR, S. C. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis. **Current molecular medicine**, v. 5, n. 8, p. 773–790, 2005.

KRAUTKRÄMER, E.; ZEIER, M. Hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome enters from the apical surface and requires decay-accelerating factor (DAF/CD55). **Journal of virology**, v. 82, n. 9, p. 4257–64, 2008.

KRUGER, D. H.; FIGUEIREDO, L.T.M.; SONG, J.W.; KLEMPA, B. Hantaviruses—Globally emerging pathogens. *Journal of Clinical Virology* 64, 128–136, 2015.

LEE, H.W.; LEE, P.W.; LÄHDEVIRTA, J.; BRUMMER-KORVENTKONTIO, M. Aetiological relation between Korean haemorrhagic fever and nephropathia epidemica. *Lancet*. Jan 27;1(8109):186-7, 1979.

LEVIS, S.; MORZUNOV, S.; ROWE, J.E. et al. Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *J. Infect. Dis.* 177:529–538. 1998.

LUNDKVIST, A.; WIGER, D.; HÖRLING, J.; SJÖLANDER, K.B.; PLYUSNINA, A.; MEHL, R.; VAHERI, A.; PLYUSNIN, A. Isolation and characterization of Puumala hantavirus from Norway: evidence for a distinct phylogenetic sublineage. *J Gen Virol*. Nov;79 (Pt11):2603-14, 1998.

MAES, P., et al. A proposal for new criteria for the classification of hantaviruses, based on S and M segment protein sequences. *Infect. Genet. Evol.* 9:813-820. 2009.

MANIGOLD, T. & VIAL, P. Human hantavirus infections: epidemiology, clinical features, pathogenesis and immunology. *Swiss Medical Weekly. The European Journal of Medical Sciences* 144:w13937, 2014.

MATHEUS, S. et al. New world hantavirus in humans, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1294-1295, 2006.

MATTAR, S.; GUZMÁN, C.; FIGUEIREDO, L. T. Diagnosis of hantavirus infection in humans. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. July, p. 1-8, 2015.

MEDEIROS, D. B. A et al. Circulation of hantaviruses in the influence area of the Cuiabá-Santarém Highway. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 5, p. 665-671, 2010.

MILLS, J. N. et al. Long-Term Studies of Hantavirus Reservoir Populations in the Southwestern United States : Rationale , Potential , and Methods. **Emerging Infections Diseases**, v. 5, n. 1, p. 95-101, 1999.

MONTGOMERY, J. M. et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Santa Cruz, Bolivia: outbreak investigation and antibody prevalence study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 10, p. e1840, jan. 2012.

MONTOYA-RUIZ, C.; DIAZ, F. J.; RODAS, J. D. Recent evidence of hantavirus circulation in the american tropic. **Viruses**, v. 6, n. 3, p. 1274-93, jan. 2014.

MULL, N. et al. Ecology of neglected rodent-borne american orthohantaviruses. **Pathogens**, v. 9, n. 5, 2020.

MUSTONEN, J.; VAPALAHTI, O.; HENTTONEN, H.; PASTERNAK, A.; VAHERI, A. Epidemiology of hantavirus infections in Europe. *Nephrol Dial Transplant*. Nov;13(11):2729-31, 1998.

NIKLASSON, B.; LeDUC, J.W. Epidemiology of nephropathia epidemica in Sweden. *J Infect Dis*. Feb;155(2):269-76, 1987.

OLIVEIRA, R. C. DE et al. Hantavirus Reservoirs: Current Status with an Emphasis on Data from Brazil. **Viruses**, p. 1929–1973, 2014.

OLIVEIRA, S. V. et al. Potential geographic distribution of hantavirus reservoirs in Brazil. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e85137, jan. 2013.

PEREIRA, R. L. Soroprevalência da hantavirose em militares e civis no município de Manaus. 2016. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018. <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/6890> acessado em: 05/06/2021.

PINTO JUNIOR, ET AL. Twenty years of hantavirus pulmonary syndrome in Brazil: a review of epidemiological and clinical aspects. **The Journal of Infection in Developing Countries**, p. 4–9, 2014.

PRIMACK, R. B. e RODRIGUES, E. Biologia da Conservação. Rio de Janeiro: Vozes, 2001. 327 p.

RAFTERY, M. J. et al. Release of Neutrophil Extracellular Traps. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 7, p. 1485–1497, 2014.

RAZURI, H. et al. Andes hantavirus variant in rodents, Southern Amazon Basin, Peru. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 257–260, 2014.

ROSA, E. S. T. et al. Newly Recognized Hantaviruses Associated with Hantavirus Pulmonary Syndrome in Northern Brazil: Partial Genetic Characterization of Viruses and Serologic Implication of Likely Reservoirs. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5, n. 1, 2005.

SANTOS, JANDURY PEREIRA; LAVOCAT, MARÍLIA NUNES; MACHADO, ROSÂNGELA ROSA; STEINKE, VALDIR ADILSON; STEINKE, E. T. A dinâmica do uso da terra e a hantavirose na amazônia legal-brasil dynamics of land use and hantavirus in the legal amazon-brazil. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 163, n. 15, p. 33–43, 2012.

SALGADO, B. B. Soroprevalência de infecção por Hantavírus em indivíduos residentes de municípios do estado do Amazonas. 2016. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016. <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/7586> acessado em: 05/06/2021.

SCHMALJOHN, C. S.; NICHOL, S. T. **Hantaviruses**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.

SCHMIDT, J. et al. Serological Assays for the Detection of Human Andes Hantavirus Infections Based on Its Yeast-Expressed Nucleocapsid Protein. **Intervirology**, p. 173–184, 2006.

SOUZA, W. M. et al. Phylogeography and evolutionary history of rodent-borne hantaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 198–204, 2014.

TEIXEIRA, K. DA G. et al. **Boletim Eletrônico EpidemiológicoMS/SVS - Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde**. [s.l.: s.n.].

VASCONCELOS, P.F.C.; TRAVASSOS DA ROSA, E.S.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A.; TRANVASSOS DA ROSA, J. F. S. Evidence of circulating hantaviruses in Brazilian Amazônia through high prevalence of antibodies in residents of Manaus, Brazil. **Journal of Brazilian association for the advancement of science**, v. 44, p. 162–163, 1992.

VOGEL, F. S. P; SILVA, M. S. Bunyaviridae In: FLORES, E. F. *Virologia veterinária*. Ed. da UFSM – Santa Maria, cap 29, p. 755-768. 2007.

WITKOWSKI, P. T. et al. Hantaviruses in Africa. **Virus Research**, v. 187, p. 34–42, 2014.

YOSHIMATSU, K.; ARIKAWA, J. Serological diagnosis with recombinant N antigen for hantavirus infection. **Virus Research**, v. 187, p. 77–83, 2014a.

YOSHIMATSU, K.; ARIKAWA, J. Antigenic Properties of N Protein of Hantavirus. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 3097–3109, 13 jan. 2014b.

YOUNG, J.C.; HANSEN, G.R.; GRAVES, T.K.; DEASY, M.P.; HUMPHREYS, J.G.; FRITZ, C.L.; GORHAM, K.L.; KHAN, A.S.; KSIAZEK, T.G.; METZGER, K.B.; PETERS, C.J. The incubation period of hantavirus pulmonary syndrome. *Am J Trop Med Hyg*. Jun;62(6):714-7, 2000.

ZEIER, M. et al. New ecological aspects of hantavirus infection: a change of a paradigm and a challenge of prevention--a review. **Virus genes**, v. 30, n. 2, p. 157–80, mar. 2005.

INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi* - DOENÇA DE CHAGAS

Andreza Ozela de Vilhena

Escola de Enfermagem Magalhães Barata, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará (UEPA). Belém, Pará, Brasil.

e-mail: aozelav@gmail.com

Milene Silveira Ferreira

Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas (SAARB), Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (IEC/SVS/MS).

Ananindeua, Pará, Brasil.

e-mail: milenesf@hotmail.com

Paulo Fernando Lauria Fonseca

Associação Brasileira de Odontologia / Pará (ABO-PA). Belém, Pará, Brasil.

e-mail: paulolauria@outlook.com

Waltair Maria Martins Pereira

Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal do Pará (UFPA).

Belém, Pará, Brasil.

e-mail: vweapaz@gmail.com

ASPECTOS HISTÓRICOS

A doença de Chagas (DC) é uma enzootia transmitida ao homem de forma acidental quando este invade os ecótopos silvestres (COURA, 2007). A história da DC, no mundo segue cinco períodos epidemiológicos distintos. O primeiro período, denominado de pré-hominídeo, já demonstrava uma condição enzoótica para o adoecimento (STEVERDING, 2014; WHO, 2015a). O segundo período, denominado de epidemiológico, se inicia com a chegada dos seres humanos nas Américas, há cerca de 12.000 a 26.000 anos atrás, quando foi encontrada situação enzoótica que tinha estado lá por 10 milhões de anos, estendendo-se territorialmente desde os EUA

até a Argentina e o Chile, quando foi iniciado, nesses territórios, a identificação das primeiras infecções acidentais (STEVERDING, 2014; WHO, 2015b). O terceiro período começou com os assentamentos agrícolas pelos humanos, há cerca de 10.000 anos atrás, tendo sido possível identificar que uma doença primária de animais poderia ser transmitida aos seres humanos. A partir do século XVI, houve aumento da pressão antroponótica sobre o ambiente natural, levando o homem adentrar no nicho ecológico do vetor transmissor da doença, para a realização do desmatamento visando à implantação das atividades agrícolas e pecuárias. (COURA, 2014, WHO, 2015b).

O século XX foi marcado pela descoberta de uma nova doença infecciosa humana, por Carlos Chagas (1909), a tripanossomíase americana, identificação do vetor de transmissão do gênero *Triatoma*, do agente etiológico que é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, bem como descreveu a apresentação clínica do novo agravo, que passou a ser denominada de doença de Chagas (DC) (REGALADO, 2010; COURA, 2015).

Ainda no século XX, iniciou o quarto período epidemiológico o qual foi realizado o primeiro estudo sobre a DC, tendo sido elaborada a concepção e implementação para o controle da interrupção da transmissão da infecção, assim como foram elaborados e elencados os cuidados que deveriam ser dispensados às populações afetadas pela doença. As rotas do tráfego aéreo impuseram uma velocidade e uma quantidade de movimentações populacionais globais que associadas à urbanização e ao intercâmbio intercontinental das populações, tornaram-se mais significativas para a transmissão de doenças infecciosas, entre elas a DC (WHO, 2010). O quinto período coincide com o final do século XX que é caracterizado por desafios remanescentes dos períodos anteriores, somando-se a novos desafios do controle que foram fomentados pelas transformações sociais que ocorreram em muitos países (BRICEÑO-LEÓN, 1996).

No século XXI, a DC figura como doença negligenciada nas intenções de indústrias farmacêuticas, nos programas assistenciais, nos núcleos universitários e nos órgãos financiadores, o que levou a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incluí-la entre as 17 doenças infecciosas e parasitárias crônicas, classificadas como doenças tropicais negligenciadas (DTN). As DTN afetam principalmente, mas não exclusivamente, populações pobres nas regiões mais vulneráveis e miseráveis do planeta, impondo-lhes limitações sérias com um panorama de enfermidade, sofrimento, incapacidade e morte, repercutindo graves consequências sociais, econômicas e psicológicas para os afetados e para a sociedade como um todo (OPAS & OMS, 2012; 2018).

O vetor, o agente etiológico, os reservatórios e a transmissão da doença

O vetor

O vetor natural do agente de infecção é o Triatomíneo, um inseto que pertence à ordem Hemiptera, família *Reduviidae* da subfamília *Triatominae*, vulgarmente conhecido no Brasil por barbeiro e chupão. Nos países de língua espanhola é conhecido como vinchuca, chinche e nos Estados Unidos da América (EUA) de *kissing-bug*, *cone-nosed bug* (RASSI & RASSI Jr, 2013).

Os triatomíneos distribuem-se amplamente no Continente Americano, desde o Sul dos EUA até a Patagônia. Mais de 130 espécies já foram identificadas, todas potencialmente transmissoras, porém, as mais importantes epidemiologicamente, são: *Panstrongylus megitus* e *P. geniculatus*; *Triatoma infestans*; *Triatoma brasiliensis*; *Triatoma sordida* e *Triatoma dimidiata*; *Rhodnius prolixus*; *Rhodnius neglectus*. Existem várias outras espécies descritas na Ásia, na África e na Oceania, mas nenhuma foi encontrada naturalmente infectada. No Brasil, já foram identificadas 45 espécies potencialmente transmissoras (RASSI & RASSI Jr, 2013).

Os Triatomíneos apresentam porte variando entre 7,00 milímetros a 38,00 milímetros, são hematófagos restritos, eventualmente realizam canibalismo e a coprofagia, podendo assim transmitir o agente etiológico da doença de vetor a vetor. As fêmeas são ovíparas tendo um período de 3 a 4 meses de oviposição e produzem de 100 a 200 ovos por ano. Os ovos rompem-se de 10 a 20 dias após a copulação. O número de ovos varia de acordo com a espécie e com os fatores externos como: alimento, temperatura e umidade do ambiente. Há cinco estádios ninfais e todos são hematófagos estritos. O ciclo de vida completo pode variar de 90 dias até 02 anos. A maioria das espécies é silvestre, possuem hábitos noturnos, tendem a voar pouco, sendo que as fêmeas são mais ativas que os machos, possuindo dessa forma maior capacidade de dispersão e longevidade (LENT & WYGODZINSKY, 1979).

A subfamília *Triatominae* divide-se em cinco tribos, incluindo 18 gêneros e 148 espécies. A maioria destas ocorre apenas na região neotropical e algumas poucas podem ser encontradas nos EUA, no centro-sul da África, no sudeste da Ásia e no norte da Austrália. No Brasil, foram registradas, até o momento, 64 espécies, sendo que cerca de dez são epidemiologicamente mais importantes devido às características comportamentais, destacando-se os *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*,

Panstrongylus megistus e *Rhodnius robustus* (GALVÃO *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2006; COSTA & FELIX, 2007; JURBERG *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2012).

Na Amazônia Brasileira foram registradas 16 espécies de triatomíneos, essencialmente silvestres, entretanto mesmo sendo considerados potenciais vetores apenas algumas espécies oferecem risco para a população, sendo elas: *Rhodnius pictipes*, *Rhodnius robustus*, *Panstrongylus geniculatus*, *Panstrongylus herreri* e *Triatoma maculata* (VALENTE, 1999, 2009; BRASIL, 2005b; AGUILAR *et al.*, 1999; PATTERSON *et al.*, 2009).

O agente etiológico

O agente etiológico da DC é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que é caracterizado por apresentar uma estrutura populacional multiclonal com elevado grau de variabilidade genética intraespecífica. Esta variabilidade é resultante tanto da longa evolução clonal e antiguidade da enzootia, como da grande diversidade de hospedeiros e vetores assim como dos raros eventos de fluxo já observado. Um mesmo hospedeiro ou vetor pode abrigar simultaneamente diferentes subpopulações ou clones de *T. cruzi*. Esses clones podem competir entre si, favorecendo a seleção de dadas subpopulações em detrimento de outras, nos diversos nichos ecológicos, hospedeiros e áreas geográficas específicas (OCAÑA-MAYORGA *et al.*, 2010; CARRASCO *et al.*, 1994; GAUNT *et al.*, 2003).

O protozoário *T. cruzi*, da ordem *Kinetoplastidea*, família *Trypanosomatidae*, apresenta como principal característica um flagelo e uma mitocôndria modificada, denominada cinetoplasto. O ciclo de vida deste parasita é caracterizado pela presença de diferentes formas encontradas nos dois hospedeiros obrigatórios, o invertebrado (insetos triatomíneos) e vertebrado (mamíferos) (SHINKANAY-YASUDA & CARVALHO, 2012; WHO, 2015b).

Os reservatórios

Muitas espécies de mamíferos, tanto silvestres como domésticos, são considerados reservatórios, entre eles os quatis, os gambás e os tatus, bem como algumas espécies de morcegos, por compartilharem ambientes comuns ao homem e animais domésticos (BRASIL, 2017b). O reservatório do *T. Cruzii* é um sistema ecológico, no qual o parasita é transmitido na natureza e nesta se mantém. Dessa forma, uma mesma espécie de mamífero pode ter importância como reservatório em uma região, mas não em outra. A competência do reservatório é garantida pela presença de parasitas

no sangue periférico em quantidade suficiente para infectar o vetor. Em outros casos, animais infectados por *T. cruzi*, mas com parasitemia insuficiente para atuarem como reservatórios podem ser considerados sentinelas, por indicarem a presença de um ciclo de transmissão do *T. cruzi* acontecendo nas proximidades (BRASIL, 2017b).

A transmissão da doença

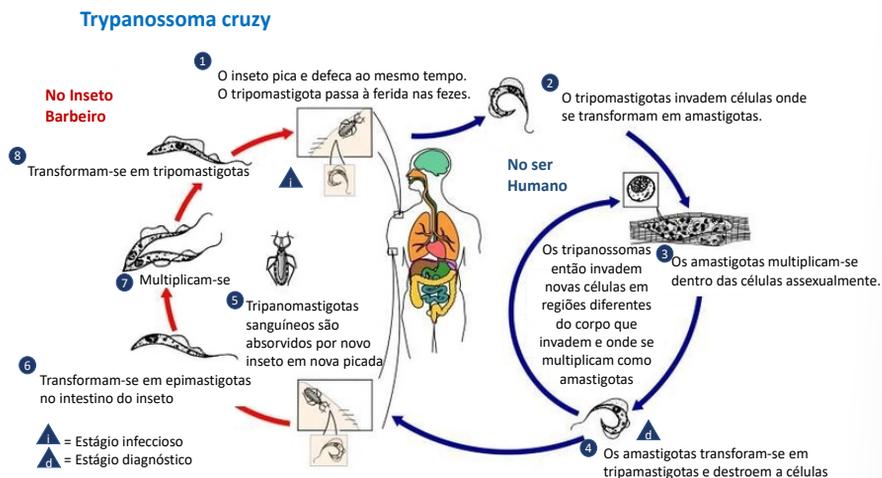
A DC apresenta um ciclo enzootico bem estabelecido, entre mamíferos e triatomíneos silvestres. O homem se envolve nessa cadeia de transmissão a partir de alterações no ambiente silvestre, como os desmatamentos que passaram a ser comuns na Amazônia (CORTEZ *et al.*, 2012). Nesta condição, com a diminuição dos animais silvestres para o repasto dos vetores, insetos estritamente hematófagos, os humanos e os animais domésticos passaram a ser a fonte de alimentação, favorecendo a domiciliação e colonização desses insetos (ZETUN *et al.*, 2014).

O triatomíneo ao realizar o repasto em mamíferos infectados com elevadas taxas de *T. cruzi*, pode ser infectado e pode infecta outro mamífero ao fazer um novo repasto, incluindo neste ciclo o homem (BRASIL, 2002; 2017b; ROBBINS & COTRAN, 2010).

As formas habituais de transmissão do *T. cruzi*, para o homem, são:

- ✓ **Vetorial** – acontece pelo contato do homem suscetível com as excretas contaminadas dos triatomíneos, que, ao picarem os vertebrados, costumam defecar após o repasto, eliminando formas infectantes do parasita, que penetram pelo orifício da picada, mucosas ou por solução de continuidade deixada pelo ato de coçar (Figura1).

Figura 1 – Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* envolvendo o vetor e o homem.



Fonte: Domínio público

- ✓ **Vertical** – ocorre, principalmente, pela via transplacentária e pode ser em qualquer fase da doença (aguda ou crônica). A transmissão pode se dar durante a gestação ou no momento do parto. Há possibilidade de transmissão também pelo leite materno, durante a fase aguda da doença. Já em nutrizes que estejam na fase crônica, a transmissão durante a amamentação pode ocorrer em casos de sangramento por fissura mamária e não propriamente pelo leite;
- ✓ **Via Oral** – devido à ingestão de alimentos contaminados acidentalmente com o parasita, seja o prório triatomíneo ou suas as fezes. Também pode ocorrer por meio da ingestão de carne crua ou mal cozida de caça, ou ainda por alimentos contaminados pela secreção das glândulas anais de marsupiais infectados. Ocorre em locais definidos, em um determinado tempo, por diferentes tipos de alimentos. Geralmente são encontrados vetores ou reservatórios infectados nas imediações da área de produção, manuseio ou utilização do alimento contaminado. É o tipo de transmissão que geralmente está associada aos surtos de doença de Chagas aguda (DCA). Em grande parte dos casos, tem como possível fundamentação o consumo de alimentos contaminados pela não adoção de boas práticas de higiene na manipulação dos alimentos e pela invasão humana de habitat silvestres, que aumenta os riscos associados à proximidade de vetores e reservatórios silvestres;

- ✓ **Transfusional** – também representa importante via de propagação da doença nos centros urbanos, sendo considerada a principal forma de transmissão em países não endêmicos (Canadá, Espanha, EUA) e em países latino-americanos que estejam em processo de controle da transmissão vetorial. No Brasil, devido à efetividade do controle dos serviços de hemoterapia e, conseqüentemente, maior qualidade do sangue e hemoderivados para transfusão, tem-se alcançado significativo impacto no controle da transmissão transfusional do *T. Cruzi*;

- ✓ **Transplante de Órgãos** – Como os receptores de órgãos são submetidos à terapia imunossupressora, a fragilidade do sistema imunológico contribui para que o órgão transplantado, se o doador estiver na fase aguda da doença, que a mesma se apresente de forma mais grave. Para esses casos a confirmação do diagnóstico deve ser baseada no isolamento do agente de infecção, no sangue ou em biópsias de pele, e/ou ainda pela soroconversão;

- ✓ **Acidentes Laboratoriais** – acidentes laboratoriais também podem ocorrer devido contato com culturas de *T. cruzi*, exposição às fezes de triatomíneos contaminadas ou sangue (de casos humanos ou de animais) contendo formas infectantes do parasita.

A Doença

Período de Incubação

É variável o período de incubação, dependendo da forma de transmissão. A literatura referencia os seguintes períodos (BRASIL, 2017a):

- ✓ **Transmissão vetorial** – 4 a 15 dias.

- ✓ **Transmissão oral** – de 3 a 22 dias.

- ✓ **Transmissão transfusional** – 30 a 40 dias ou mais.

- ✓ **Transmissão por acidentes laboratoriais** – até 20 dias após exposição.

- ✓ **Outras formas de transmissão** – não existem períodos de incubação definidos.

Período de transmissibilidade

A maioria dos indivíduos com infecção por *T. cruzi* alberga o parasita no sangue, nos tecidos e nos órgãos, durante toda a vida.

Manifestação Clínica

Fase Aguda

A doença que pode ser assintomática ou oligossintomática que caracteriza-se pela detecção da parasitemia elevada no sangue, através de exame laboratorial. Os sintomas surgem entre o primeiro e quinto anos de doença (BRASIL, 2017c) que é caracterizada por febre constante, inicialmente elevada, entre 38,5°C a 39°C, que pode por vezes apresentar picos vespertinos ocasionais, podendo persistir por até 12 semanas. Esta fase, quando não diagnosticada e, portanto, não tratada, pode evoluir com o desaparecimento espontâneo da febre e da maior parte das manifestações clínicas, cursando para a fase crônica da doença. Em alguns casos, com quadro clínico mais grave, evolui ao óbito (BRASIL, 2017b).

O parasitismo intenso, característico da fase aguda, é controlado pela resposta imune Th1, principalmente IFN- γ , TNF- α , contra o *T. cruzi* estabelecendo uma infecção crônica com baixa parasitemia. Essa resposta não atinge, porém, a eliminação definitiva do parasita, o que é conhecido como “imunidade não estéril” (BERN *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2007). Os anticorpos indicadores de infecção recente, imunoglobulina M (IgM), são detectados no período entre a 4^a à 6^a semana de infecção e após esse período ocorre o aumento gradual de anticorpos de memória, imunoglobulina G (IgG) (BRASIL, 2017c).

A sintomatologia inespecífica nesta fase clínica é composta por prostração, diarreia, vômitos, inapetência, cefaleia, mialgias, linfadenopatias, exantema cutâneo de localização variável, com ou sem prurido e de aparecimento fugaz; irritação em crianças menores, que apresentam frequentemente choro fácil e copioso. A sintomatologia específica se caracteriza por miocardite difusa com vários graus de gravidade; sinais de pericardite, derrame pericárdico, tamponamento cardíaco; manifestações sindrômicas de insuficiência cardíaca, derrame pleural; edema de face, de membros inferiores ou

generalizado; tosse, dispneia, dor torácica, palpitações, arritmias; hepatomegalia e/ou esplenomegalia, de leve a moderada intensidade (BRASIL, 2017c).

Na transmissão vetorial, é comum observar o sinal de Romaña (edema bpalpebral unilateral por reação inflamatória à penetração do parasita, na conjuntiva e adjacências) ou o chagoma de inoculação, caracterizado por lesões furunculoides, não supurativas, em membros, tronco e face, por reação inflamatória à penetração do parasita, que se mostram descamativas após duas ou três semanas (BRASIL, 2017c). Além disso, a picada do triatomíneo pode causar reações alérgicas locais ou sistêmicas, sem que isso signifique necessariamente infecção por *T. cruzi* (BRASIL, 2017c). No caso de maior gravidade pode ser observada meningoencefalite, especialmente em lactente ou em casos de reativação comuns em pessoas com comprometimento imunológico (BRASIL, 2017c).

Na transmissão oral, há indicativo de diferenças na evolução clínica considerando que foram relatados sintomas como exantema cutâneo, hemorragia digestiva (hematêmese, hematoquezia ou melena), icterícia, aumento das aminotransferases, além de quadros mais frequentes e mais graves de insuficiência cardíaca. Fenômenos de enterite, abdome agudo, sangramento fecal, choque, hepatite focal, que podem ocorrer e têm significação prognóstica variada, devendo ser rotineiramente pesquisados e monitorados. Observa-se que a morbimortalidade na forma clínica aguda, por transmissão oral, é mais elevada do que a observada nos casos agudos por transmissão vetorial (BRASIL, 2017b).

A forma congênita, quando há a transmissão vertical, pode passar despercebida em torno de 60% dos casos, no entanto pode favorecer a prematuridade, o baixo peso, a hepatoesplenomegalia e a febre do recém nascido (DIAS, 2009). Os casos devem receber tratamento antiparasitário independentemente do diagnóstico ter sido realizado por métodos parasitológicos nas primeiras semanas ou por meio de testes sorológicos convencionais nove meses após o nascimento (BRASIL, 2005a; DIAS, *et al.*, 2016). A variabilidade de manifestações clínicas da DC e as diferenças geográficas na morbi-mortalidade podem ser uma resultante da interação entre o pool genético do hospedeiro, as respostas imunes, o ambiente e principalmente a composição das subpopulações do parasita no momento do inóculo (MANOEL-CAETANO, 2007).

Fase Crônica

Após a fase aguda, seja aparente ou inaparente, há a redução da parasitemia e o paciente tende a evoluir para as formas clínicas a seguir especificadas (BRASIL, 2017c).

i) Forma indeterminada: é a forma mais frequente. Pode manter-se desse modo o resto

da vida ou ainda, após cerca de 10 anos, pode evoluir para outra forma crônica; ii) Forma cardíaca: causa o maior número de óbito e importante causa de limitação do chagásico crônico, podendo haver sintomas ou não apesar das alterações eletrocardiográficas; iii) Forma digestiva: pode haver alterações ao longo do trato digestivo sobre a motilidade e a morfologia, sendo o megaesôfago e megacólon as formas mais comuns; iv) Forma associada ou mista: (cardiodigestiva): é a ocorrência concomitante de lesões compatíveis com as formas cardíacas e digestivas.

Tratamento

Os casos em fase aguda têm indicação de tratamento específico imediato e seguimento em longo prazo, para fins de identificação da cura através de exame sorológico (SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012; PINTO, *et al.*, 2015; PINTO, *et al.*, 2009). O fármaco de escolha disponível é o benznidazol que é assegurado pelo Sistema único de saúde (SUS). O nifurtimox pode ser utilizado como alternativa em casos de intolerância ou que não respondam ao tratamento com benznidazol. O tratamento específico é eficaz na maioria dos casos agudos (>60%) e congênitos (>95%), e em 50% a 60% em casos crônicos recentes. O tratamento medicamentoso específico tem como objetivos curar a infecção, prevenir as lesões orgânicas ou sua evolução e a diminuir a possibilidade de transmissão de *T. Cruzi*. O medicamento é recomendado na dosagem de 05 a 07mg/Kg de peso corporal, devendo ser dividido em duas tomadas, sendo uma após café da manhã e outra após jantar, com intervalo aproximando de 12h entre as doses, por 60 dias sem interrupção (BRASIL, 2015; 2017c).

Esse esquema de tratamento é indicado também para os pacientes na fase crônica, na forma indeterminada, especialmente em crianças e adultos jovens (BRASIL, 2015; 2017c). O tratamento dos casos leves, sem complicações, e das formas indeterminadas pode ser feito em unidade ambulatorial como Unidade Básica de Saúde (UBS), Estratégia Saúde da Família (eSF) e Ambulatórios Especializados, por médico generalista que conheça as particularidades do medicamento e da DC, caso seja necessário devem referenciar os pacientes para Unidades de Saúde (US) de maior complexidade devido as possíveis complicações, como cardiopatia aguda grave, sangramento digestivo, intolerância ou reações adversas ao benznidazol, como dermatopatia grave, neuropatia, lesões em mucosa, hipoplasia medular (BRASIL, 2015; 2017c).

Em que pese à eficácia medicamentosa específica, não existem critérios clínicos que possibilitem definir com exatidão a cura de pacientes com DCA. Segundo o critério sorológico, a cura é a negatificação sorológica. Para os casos agudos, é recomendada a

realização de exames sorológicos convencionais (IgG) anualmente, por um período de 5 anos, devendo-se encerrar a pesquisa quando dois exames sucessivos forem não reagentes. Para monitoramento de cura em pessoas na fase crônica da DC, é possível utilizar a Proteína C-reativa (PCR) para o controle da parasitemia pós-tratamento, por ser mais exequível que os métodos parasitológicos de enriquecimento (BRASIL, 2017b).

EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

Doença de Chagas no Mundo

No ano de 2010, foram realizadas estimativas que apontavam que 5.742.167 pessoas foram infectadas com *T. cruzi* e que residiam em 21 países da América Latina, dos quais 3.581.423 infectados (62,4%) eram dos países do Cone Sul. Os quatro países com as maiores estimativas de infectados eram a Argentina (1.505.235), o Brasil (1.156.821), o México (876.458) e a Bolívia (607.186). Na região Andina das 958.453 pessoas infectadas 437.960 (45,7%) eram da Colômbia. Chile e Paraguai na sub-região do Cone Sul; a Venezuela, o Equador e o Peru na sub-região Andina e a Guatemala na América Central, apresentavam estimativas que compreendiam entre 100.000 a 200.000 pessoas infectadas (WHO, 2015b).

Dos novos casos devido à transmissão vetorial, a Bolívia apresentou o maior número de casos estimados (8.087), seguido pelo México com 6.135 casos e Colômbia com 5.274 casos. Em 07 países: Peru, Equador, Guatemala, Argentina, El Salvador, Honduras e Venezuela foram notificados entre 2.055 a 850 casos. A Bolívia foi responsável por 92,6% de todos os novos casos estimados no Sub-região do Cone Sul. A Argentina e a Bolívia, juntos, representaram 30,62% dos novos casos estimados para a América Latina (WHO, 2015b).

A Colômbia, o Equador, o Peru e a Venezuela, da sub-região andina, registraram 34,23% dos novos casos daquela Região. Da América Central, a Guatemala, o El Salvador e a Honduras foram responsáveis por 84,62% dos novos casos estimados (WHO, 2015b). Cerca de 13% da população latino-americana encontra-se em risco para adoecer por infecção pelo *T. cruzi*, devido à existência de domicílios infestados ou ainda devido a transmissão ativa nos países. Os maiores percentuais da população sob o risco para adoecimento da seguinte forma: Equador (28,99%), Guiana Francesa, Guiana e Suriname juntos (25,12%), México (20,87%), Paraguai (19,65%), Honduras (14,66%), El Salvador (14,65%), Brasil (13,35%), Panamá (13,12%) e Nicarágua (11,47%). O risco de transmissão foi zero, no Uruguai e no Chile devido à interrupção

da transmissão vetorial ocorridas nos anos 1997 e 1999, respectivamente (WHO, 2015b).

Estes dados são apresentados em outras estimativas realizadas por diferentes grupos de pesquisa e métodos para definição de infecção por *T. Cruzi* em vários países, o que dificulta o estabelecimento exato da prevalência da DC nas Américas. No entanto, corroboram que o número de infectados é ainda muito expressivo no contexto sanitário e social do Continente, requerendo prioridade e atenção por parte dos países (COGO *et al.*, 2014).

Doença de Chagas no Brasil

A DC ainda é uma importante infecção parasitária na América Latina (do México à Patagônia), 25% de toda a população da América Latina foi estimada sobre risco de infecção nos anos 1980 e 17,4 milhões estavam infectadas em 18 países endêmicos entre 1980 a 1985. A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), no ano de 2005, estimou que 20% da população da América Latina estaria sob-risco de infecção pelo *T. cruzi*, ou seja, 109 milhões de pessoas das Américas, dentre estes 7,7 milhões nos países endêmicos (WHO, 2002; LÓPEZ-CESPEDES *et al.*, 2012).

No Brasil, a incidência de DC por transmissão vetorial teve redução acentuadíssima nas três últimas décadas, devido às medidas profiláticas desenvolvidas pelo Programa de Controle da DC do Ministério da Saúde que se iniciaram a partir de 1982. Essas medidas incluíram desinsetização e substituição de moradias que se apresentassem propícias à colonização de triatomíneos por casas de boas condições higiênicas, sendo que, essas últimas, infelizmente, ainda não foram realizadas na extensão necessária. Como consequência desse Programa, houve redução progressiva da densidade triatomínica nas habitações rurais coincidindo com expressiva queda na prevalência de reações sorológicas positivas em população de baixa idade das zonas endêmicas, marcador seguro para afirmar sobre a redução da incidência da infecção (MARTINS, 2010).

Em 2005, foram gastos pelo Sistema Público de Saúde brasileiro, oito milhões de reais com 2.392 hospitalizações de doentes crônicos com DC (BRASIL, 2005b). Esta doença é considerada pela epidemiologia das doenças infecciosas e parasitárias (DIP), como a terceira doença infecciosa mais negligenciada, por afetar populações de baixo poder econômico-social e cultural, gerando na fase inicial da infecção gasto com seguridade social por afastamento dos indivíduos afetados, tanto na fase aguda quanto crônica da doença (HOTEZ *et al.*, 2007).

Pesquisa realizada no distrito de Serra Azul, Mateus Leme, centro-oeste do Estado de Minas Gerais, apontou que a maior prevalência de casos foi encontrada entre lavradores sendo que 93% tinham apenas o ensino fundamental incompleto (DIAS, *et al.*, 2016).

Doença de Chagas no Pará

A região da Amazônia brasileira é considerada endêmica para DC humana, com emergência de casos isolados, assim como, surtos em forma de microepidemias familiares, e com elevada frequência em áreas urbanas (SOUZA & MONTEIRO, 2013). No estado do Pará, no período de 2006 a 2012, foram notificados 926 casos de DCA. Desse total, 75,8% (702/926) concentraram-se em 12 municípios, sendo grande parte dos casos 25,7% (238/926) provenientes da região metropolitana de Belém que envolve os municípios de Belém, Ananindeua, Marituba, Benevides e Santa Izabel do Pará. Em Abaetetuba, município nas proximidades de Belém, a proporção de notificações foi de 20,2% (187/926) casos. O arquipélago do Marajó foi outra região do Estado com expressiva frequência de casos tendo registrado 26,5% (245/926) do total de casos do Estado. No arquipélago do Marajó o município de Breves foi o de maior notificação da doença com 8,40% das notificações. Dos 16 municípios que compõem este arquipélago, apenas três municípios - Chaves, Santa Cruz do Arari e Soure não notificaram casos (SOUZA & MONTEIRO, 2013).

Estudos anteriores a este realizados no Estado do Pará, nos municípios de Barcarena e de Abaetetuba, apontaram que a maior frequência de casos ocorreu em pessoas com baixa escolaridade, e residentes em áreas urbanas (SOUZA JR *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2012).

De acordo com Vilhena (2020), os municípios de Abaetetuba, Belém e Breves apresentaram 696 casos confirmados de DCA, sendo a maior proporção de casos no gênero masculino nos municípios de Abaetetuba e Breves com 51,61% e 56,36%, respectivamente. A maior prevalência ocorreu na faixa etária de 30 a 59 anos, anos nos municípios de Abaetetuba e Belém com 35,89% e 53,71%, respectivamente, enquanto que no município de Breves a faixa etária de maior frequência foi a de 0 a 14 anos, com 32,73%. A prevalência de pessoas que declararam ter cor da pele parda foi de 78,23% em Abaetetuba, 68,90% em Belém e 89,70% em Breves. A frequência de baixa escolaridade (ensino fundamental incompleto) foi maior no município de Abaetetuba (42,74%) e de Breves (63,64%), enquanto que em Belém prevaleceram às pessoas que tinham ensino médio (17,67%), como de maior frequência. Chamou a atenção o alto percentual de sub-registro dessa variável no município de Belém com 34,63% de casos

que se ignorava a escolaridade. A morbi-mortalidade da DC vem se mostrando de maneira crescente no Estado do Pará, que na Amazônia apresenta o maior número de notificações de casos agudos por provável transmissão por via oral devido a alimentos contaminados (PINTO, 2007; PARÁ, 2011).

CONTEXTO SÓCIO-AMBIENTAL NACIONAL E AMAZÔNICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Passados 100 anos da descoberta da DC, muitos aspectos relacionados a doença ainda precisam de esclarecimentos. A doença, apresenta importantes aspectos sócio-culturais, político-econômicos e ambientais que envolvem questões de iniquidade e pobreza (MALAFAIA & RODRIGUES, 2010). A saúde pública e o ambiente estão intrinsecamente influenciados pelos padrões de ocupação do espaço. Não basta descrever as características das populações, mas é necessário localizar o mais precisamente possível onde estão acontecendo os agravos, que serviços à população está necessitando, o local de potencial risco ambiental e as áreas em que se concentram situações sociais vulneráveis (CARVALHO *et al.*, 2003).

As relações entre saúde e ambiente podem ser evidenciadas através da análise de características epidemiológicas das áreas próximas às fontes de contaminação e pela identificação de fatores ambientais adversos em locais em que há concentração de agravos à saúde. Frequentemente, por estratégia de sobrevivência, as populações marginalizadas são obrigadas a realizar modificações ambientais, como desmatamentos, e a apresentar comportamentos que acarretam riscos individuais e coletivos e essas ações tem trazido prejuízos para a saúde das populações (CARVALHO *et al.*, 2003).

A percepção de que a redução da cobertura florestal amplia o risco de contágio das doenças infecciosas e parasitárias nas populações próximas à floresta, existe há muito tempo e isso vem sendo investigado por pesquisadores em todo o mundo (PNUD *et al.*, 2013). Apesar dos avanços sociais da última década, as condições de vida nas favelas urbanas criaram um cenário ideal para a manutenção da transmissão de muitas doenças parasitárias e infecciosas entre elas a DC. Iniciativas como o Programa de Aceleração do Crescimento (PAC) foram implantadas para proporcionar, a essas áreas mal atendidas, esgoto adequado, água encanada, escolas e unidades de saúde do SUS (PINTO *et al.*, 2008).

Importância Nacional e Amazônica da Doença de Chagas Aguda Transmitida por via Oral

O sucesso do controle da transmissão vetorial da DC, proporcionado pelas extensas ações do Ministério da Saúde em conjunto com os estados e municípios nos últimos 40 anos, promoveu redução na prevalência dos casos crônicos do agravo. No entanto, tornou-se evidente a ocorrência de casos da doença na sua forma aguda em especial a partir do surto por transmissão oral ocorrido no município de Navegantes no estado de Santa Catarina, uma área considerada sem risco para a transmissão (BRASIL, 2005b).

A ocorrência de DCA por transmissão oral, relacionada ao consumo de alimentos, até o ano de 2004 constituía um evento pouco conhecido ou investigado, havendo casos notificados, na maioria pelo Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS), de surtos localizados na região Amazônica. Em 2005, outro surto relacionado ao consumo de caldo de cana foi detectado no Estado de Santa Catarina, com 24 pessoas infectadas e uma letalidade de 12,5% (três óbitos) (MARTINS, 2010).

A DC se tornou emergente na região amazônica no ano de 1968 com a identificação de três casos em pessoas residentes no bairro de Canudos, no município de Belém. Posteriormente novos casos foram surgindo em forma de microepidemias associadas majoritariamente ao consumo de suco de açaí e outros alimentos (MONTEIRO *et al.*, 2012). Com o desmatamento que vem ocorrendo a décadas no Estado do Pará devido ao processo de utilização da madeira de lei, pelas madeiras, assim como para a implantação de projetos de agropecuária, o desequilíbrio ecológico foi sentido e observado através da diminuição do habitat de animais silvestres, que atuam como reservatório natural do *T. cruzi*. Esse desmatamento causou a aproximação do homem com os reservatórios, facilitando a transmissão do protozoário pelo vetor e a contaminação de alimentos que não são processados obedecendo às boas práticas de manipulação dos mesmos (RASSI & RASSI JR, 2013).

A ocorrência da doença de Chagas humana transcende em muito o fato basicamente biológico da presença do protozoário no indivíduo infectado, mostrando-se a doença com elementos e fatores de risco políticos e sociais marcantes, como a habitação, os fatores de produção, o sistema de saúde, a educação e as ligações políticas (BRICEÑO-LEÓN, 1996). O crescimento descontrolado dos municípios com habitações precárias e a falta de educação sanitária e de saneamento básico têm favorecido a precarização das condições socioeconômicas e de saúde das populações, fatores facilitadores da ocorrência de doenças (SOUZA & MONTEIRO, 2013).

Uma revisão de casos identificados pelo IEC no período de 1968 a 2005 demonstrou a ocorrência de 442 casos autóctones, sendo 437 agudos (11 óbitos).

A distribuição de casos por unidade federativa foi: 302 (68%) no Pará, 98 (22%) no Amapá, 25 (6%) no Amazonas, 09 (2%) no Maranhão e 08 (2%) no Acre. Dos 437 casos de DCA, 311 (71%), estavam relacionados às 62 microepidemias com provável transmissão associadas à ingestão de açaí consumido nesses Estados (VALENTE *et al.*, 2011; BRASIL, 2009b).

No Estado do Pará, a DC vem apresentando registros crescentes de casos isolados e surtos agudos, na forma de microepidemias familiares, obedecendo ao período de sazonalidade quando o índice pluviométrico é menor, a autonomia de voo do vetor é maior e a safra do açaí é elevada determinando maior consumo do suco devido o mesmo fazer parte do cardápio alimentar dos paraenses (SOUZA & MONTEIRO, 2013). Os casos recentes DCA notificados no Brasil estão relacionados ao consumo do suco de açaí fresco, frutas e vegetais, as carne crua, o sangue de mamíferos e o leite cru. A contaminação dos alimentos à base de vegetais in natura com *T. cruzi* é acidental e pode ocorrer durante a colheita, armazenamento, transporte ou até mesmo na etapa de preparação destes (BARBOSA *et al.*, 2015).

A ocorrência da DCA na região amazônica e as microepidemias são citadas como sendo associadas majoritariamente ao consumo de suco de açaí. Não há ainda estratégias de controle da transmissão do *T. cruzi* neste bioma de características ecoepidemiológicas próprias (WHO, 2015a).

Casos de doença de Chagas notificados na área rural do Estado do Ceará apontaram que a maior proporcionalidade era de agricultores com escolaridade fundamental incompleto (50,25%) e renda familiar de um salário mínimo (42,46%) (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A distribuição geográfica de casos de DCA, no município de Belém, aponta muito alta densidade em setores censitários localizados nos Bairros do Jurunas, do Benguí e do Parque Verde. Com média densidade de casos encontram-se setores censitários dos bairros do Telégrafo, do Guamá, da Pedreira e do Tenoné. Chama a atenção na distribuição geográfica que a média densidade forma um arco de vulnerabilidade em torno da orla de Belém em bairros periféricos da cidade com o maior número de casos de contaminação por via oral (VILHENA, 2019).

REFERÊNCIAS

AGUILAR H MV, ABAD-FRANCH F, RACINES VJ, PAUCAR CA. Epidemiology of Chagas' disease in Ecuador. A brief review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94 (supl. 1): 387-393, 1999.

ARAUJO, F.F.; GOMES, J.A.; ROCHA, M.O.; WILLIAMS-BLANGERO, S.; PINHEIRO, V.M.; MORATO, M.J.; CORREA-OLIVEIRA, R. Potential Role of CD4+CD25HIGH Regulatory T Cells in Morbidity in Chagas Disease. **Front. Biosci.** **1** (12): 2797-2806, 2007. Disponível em: <<https://www.bioscience.org/2007/v12/af/2273/fulltext.htm>> Acesso em: 20/12/2015.

BARBOSA, M.G.V.; FERREIRA, J.M.B.B.; ARCANJO, A.R.L.; SANTANA, R.A.G.; MAGALHÃES, L.K.C.; MAGALHÃES, L.K.C.; MOTA, D.T.; FÉ, N.F.; MONTEIRO, M.; SILVEIRA, H.; GUERRA, J.A.O. Chagas Disease in the State of Amazonas: History, Epidemiological Evolution, Risks of Endemicity and Future Perspectives. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **48** (suppl.1): 27-33, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v48s1/0037-8682-rsbmt-48-s1-00027.pdf>> Acesso em: 15/06/2016.

BERN, C.; MARTIN, D.L.; GILMAN, R.H. Acute and Congenital Chagas Disease. **Adv Parasitol.** **75**: 19-47, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21820550>> Acesso em: 08/03/2016.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Cidades e Estados do Brasil. Área, população e dados básicos dos municípios. Brasília: IBGE, 2017a. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias-novoportal/organizacao-do-territorio/estrutura-territorial/15761-areas-dos-municipios.tml?t=destaque&c=1501402>> Acesso em: 08/08/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Municípios de residência de casos agudos confirmados no SINAN no período de 2007 a 2016*. Brasília: MS, 6p., 2017b. Disponível em: <<http://portalsms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica>> Acesso em: 10/12/2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 218 - Regulamento Técnico de Procedimentos Higiénico-Sanitários para Manipulação de Alimentos e Bebidas Preparados com Vegetais. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2005a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388704/RDC_218.pdf> Acesso em: 20/06/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Política Nacional de Promoção a Saúde. Brasília: MS, 60p., 2002. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_promocao_saude_3ed.pdf> Acesso em: 03/09/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **38** (suppl.III): 1-29, 2005b. Disponível em: <<https://telelab.aids.gov.br>> Acesso em: 19/04/2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Bol. Epidemiol.** **46** (21): 1-9, 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020..pdf>> Acesso em: 09/10/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde: volume único. Brasília: MS, 2017c. p. 441 - 461. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf>> Acesso em: 24/07/2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Departamento de Vigilância Epidemiológica, 816p., 2009b. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf> Acesso em: 06/05/2017.

BRICEÑO-LEÓN, R. Siete tesis sobre la educación sanitaria para la participación comunitaria. **Cad. Saude. Publica.** **12** (1): 7-30, 1996. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/csp/v12n1/1594.pdf>> Acesso em: 18/10/2018..

CARRASCO, H.A.; PARADA, H.; GUERRERO, L.; DUQUE, M.; DURAN, D.; MOLINA, C. Prognostic implications of clinical, electrocardiographic and hemodynamic findings in chronic Chagas' disease. **Int. J. Cardiol.** **43** (1): 27-38, 1994. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8175216>> Acesso em: 20/06/2017.

CARVALHO, M.E.; SILVA, R.A.; BARATA, J.M.; DOMINGOS, M.F.; CIARAVOLO, R.M.; ZACHARIAS, F. Chagas' disease in the southern coastal region of Brazil. **Rev. Saúde Pública.** **37** (1): 49-58, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v37n1/13544.pdf>> Acesso em: 25/12/2015.

COGO, J.P.; FOLETTO, A.; MONTEIRO, J.B.; PEREIRA, K.N.; RIBEIRO, M.C.P.; SEGALA, Z.; SIQUEIRA, F.; BECK, S.T. Perfil Epidemiológico de Doadores de Sangue Soropositivos para Doença de Chagas na Região Sul. **Rev. Saúde (Santa Maria).** **40** (1): 125-32, 2014. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/revistasaude/article/view/10789/pdf>> Acesso em: 10/06/2016.

COSTA JM, ARGOLO AM, Felix M 2006. **Redescription of *Triatoma melanica* Neiva & Lent, 1941, new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae).** *Zootaxa* 1385: 47-52.

COSTA J, FELIX M 2007. ***Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia, Northeastern Brazil (Hemiptera:Reduviidae: Triatominae).** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 87-90.

CORTEZ, J, et al. A expressão global da doença de Chagas – Oportunidades emergentes e impacto em Portugal; **Acta Med Port**, Sep-Oct, vol. 25(5): 332-339, 2012.

COURA, J.R. Chagas Disease: What Is Known And What Is Needed – A Background Article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **102** (suppl.1): 113-122, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v102s1/cd_18.pdf> Acesso em: 07/04/2020.

COURA, J.R. The Main Sceneries of Chagas Disease Transmission. The Vectors, Blood and Oral Transmissions - A Comprehensive Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **110** (3): 277-282, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v110n3/0074-0276-mioc-0074-0276140362.pdf>> Acesso em: 20/09/2016.

COURA, J.R.; VIÑAS, P.A.; JUNQUEIRA, A.C. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **109** (7): 856-862, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v109n7/0074-0276-mioc-0074-0276140236.pdf>> Acesso em: 26/07/2017.

DIAS, J.C.P. Elimination of Chagas Disease Transmission: Perspectives. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **104** (suppl.1): 41-45, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v104s1/07.pdf>> Acesso em: 24/02/2018.

DIAS, J.C.P.; RAMOS Jr., A.N.; GONTIJO, E.D.; LUQUETTI, A.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; COURA, J.R.; TORRES, R.M.; MELO, J.R.C.; ALMEIDA, E.A.; OLIVEIRA Jr., W.; SILVEIRA, A.C.; REZENDE, J.M.; PINTO, F.S.; FERREIRA, A.W.; RASSI, A.; FRAGATA FILHO, A.A.; SOUSA, A.S.; CORREIA FILHO, D.; JANSEN, A.M.; ANDRADE, G.M.Q.; BRITTO, C.F.P.C.; PINTO, A.Y.N.; RASSI Jr., A.; CAMPOS, D.E.; ABAD-FRANCH, F.; SANTOS, S.E.; CHIARI, E.; HASSLOCHER-MORENO, A.M.; MOREIRA, E.F.; MARQUES, D.S.O.; SILVA, E.L.; MARINNETO, J.A.; GALVÃO, L.M.C.; XAVIER, S.S.; VALENTE, S.A.S.; CARVALHO, N.B.; CARDOSO, A.V.; SILVA, R.A.; COSTA, V.M.; VIVALDINI, S.M.; OLIVEIRA, S.M.; VALENTE; V.C.; LIMA, M.M.; ALVES, R.V. II Consensus on Chagas Disease, 2015. **Epidemiol. Serv. Saúde.** **25** (núm. esp.): 7-86, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ress/v25nspe/2237-9622-ress-25-esp-00007.pdf>> Acesso em: 15/09/2017.

GAUNT, M. W., YEO, M., FRAME, I. A., STOHARD, J. R., CARRASCO, H. J., TAYLOR, M. C., MENA, S. S., VEAZEY, P., MILES, G. A. J., ACOSTA, N., ARIAS, A. R., MILES, M. (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature** 421, 936-939.

GALVÃO C, CARCAVALLO R, ROCHA DS, JURBERG J 2003. **A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geographical distribution with nomenclatural and taxonomic notes.** *Zootaxa* 202: 1-36.

GONÇALVES RG, GALVÃO C, MENDONÇA J, COSTA NETO, EM. **Guia de triatomíneos da Bahia.** Feira de Santana: UEFS Editora, 2012.

HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. Control of Neglected Tropical Diseases. **N Engl J Med.** **357**: 1018-1027, 2007. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra064142>> Acesso em: 12/06/2017.

JURBERG, J.; CUNHA, V.; CAILLEAUX, S.; RAIGORODSCHI, R.; LIMA, M.S.; ROCHA, D.S.; MOREIRA, F.F.F. *Triatoma pintodiasi* sp. nov. do subcomplexo *T. rubrovaria* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). **Rev. Pan-Amaz. Saude.** 4 (1): 43-56, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822012000600009> Acesso em: 25/03/2018.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P.W. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and Their Significance as Vectors of Chagas' Disease. **Bulletin of the AMNH.** **163**: 13-520, 1979. Disponível em: <<http://digitallibrary.amnh.org/handle/2246/1282>> Acesso em: 31/04/2015.

LÓPEZ-CESPEDES A, LONGONI SS, SAURI-ARCEO CH, RODRÍGUES-VIVAS RI, VILLEGAS N, ESCOBEDO-ORTEGO J, BARRERA-PEREZ MA, SANCHEZ-MORENO M, BOLIO GONZALEZ ME, MARIM C. **Seroprevalence of Antibodies Against the Excreted Antigen Superoxide Dismutase by Trypanosoma cruzi in Dogs From the Yucatan Peninsula (Mexico).** *Zoonoses and Public Health.* 2012.

MALAFIA A G; RODRIGUES A S. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.43 no.5 Uberaba Sept./Oct. 2010

MANOEL-CAETANO FS, SILVA AE. Implicações da variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi* na patogênese da doença de Chagas. **Cad Saúde Pública** 2007;23(10):2263-74.

MARTINS, E.C. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Doença de Chagas: Situação Epidemiológica Atual.** Brasília: MS, 2010. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/pidc/media/Doenca%20de%20Chagas%202010.pdf>> Acesso em: 20/11/2017.

MONTEIRO, W.M.; MAGALHÃES, L.K.C.; SÁ, A.R.N.; GOMES, M.L.; TOLEDO, M.J.O.; BORGES, L.; PIRES, I.; GUERRA, J.A.O.; SILVEIRA, H.; BARBOSA, M.G.V. *Trypanosoma cruzi* IV Causing Outbreaks of Acute Chagas Disease and Infections by Different Haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. **PLoS One.** **7** (7): e41284, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405119/pdf/pone.0041284.pdf>> Acesso em: 01/10/2017.

OCAÑA-MAYORGA, S.; LLEWELLYN, M.S.; COSTALES, J.A.; MILES, M.A.; GRIJALVA, M.J. Sex, Subdivision, and Domestic Dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador. **PLoS Negl. Trop. Dis.** **4** (12): e915, 2010. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0000915&type=printable>> Acesso em: 14/09/2016.

OLIVEIRA, F.A.S.; BICALHO, G.V.C.; SOUZA FILHO, L.D.; SILVA M.J.; GOMES FILHO, Z.C.G. Características epidemiológicas dos pacientes com Doença de Chagas. **Rev. Bras. Med. Fam. e Com.** **2** (6): 107-113, 2016. Disponível em: <<https://www.rbmf.org.br/rbmfc/article/view/34/11>> Acesso em: 28/06/2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS); ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Avanços para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas: Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas. Brasília: OPAS, 2012. 184p. Disponível em: <<https://www.paho.org>> Acesso em: 05/10/2017.

ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE (OPAS); ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Relatório da situação nas Américas. 1.ed. Brasília, 2018. Disponível em: <<https://www.paho.org>> Acesso em: 23/01/2019.

PARÁ. Secretaria de Estado da Saúde Pública. Programa Estadual de Controle de Doença de Chagas. Divisão de Endemias. Relatório Epidemiológico. Belém: SESPA, 2011. Disponível em: <> Acesso em: 30/05/2018.

PATTERSON JS, BARBOSA SE, FELICIANGELI MD . On the genus *Panstrongylus* Berg 1879: Evolution, ecology and epidemiological significance. **Acta Trop** **110**: 187-199. 2009.

PINTO AY, SANTOS JE, MACIEL RF, FERNANDES, AS, GUERREIRO JF, VALENTE VC, et al. Dupla abordagem de infecções por *Trypanosoma cruzi* e/ou *Plasmodium* spp. aplicada ao diagnóstico de doença de Chagas e exposição vetorial triatomínica na Amazônia brasileira. **Rev Pan-Amaz Saúde** **2015**; **6**(1): 35-43.

PINTO, A.Y.N.; FARIAS, J.R.; MARÇAL, A.S.; GALÚCIO, A.L.; COSTI, R.R.; VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.S. Doença de Chagas Aguda Grave Autóctone da Amazônia Brasileira. **Rev. Para. Med.** **21** (2): 7-12, 2007. Disponível em: <<http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpm/v21n2/v21n2a02.pdf>> Acesso em: 11/02/2018.

PINTO, A.Y.N.; VALENTE, S.A.; VALENTE, V.C.; JUNIOR, A.G.F.; COURA J.R. Fase Aguda da doença de Chagas na Amazônia Brasileira. Estudo de 233 Casos do Pará, Amapá e Maranhão Observados Entre 1988 e 2005. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **41** (6): 602-614, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v41n6/v41n6a11.pdf>> Acesso em: 21/08/2016.

PINTO AYN, FERREIRA JÚNIOR AG, VALENTE VC, HARADA GS, VALENTE SAS. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Rev Panam Salud Publica.** 2009 Jan;25(1):77-83.

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO - PNUD; INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA E APLICADA - IPEA; FUNDAÇÃO JOÃO PINHEIRO. Atlas de desenvolvimento humano do Brasil de 2013. 2013. Disponível em: <<http://atlasbrasil.org.br/2013/>> Acesso em: 10/02/2018.

RASSI, A.; RASSI JUNIOR, Doença de Chagas Aguda. In: **Programa de Atualização em Medicina de Urgência e Emergência (PROURGEM)**. A.C. Lopes, H.P. Guimarães, R.D. Lopes & L.S. Vendrame. Porto Alegre: Artmed/Panamericana, 2013.p. 41-85. Disponível em: <> Acesso em: 05/09/2018.

REGALADO, A. Brazilian Science: Riding a Gusher. **Science.** **330**: 1306-1312, 2010. Disponível em: <[http://www.iats.com.br/panel/uploads/files/1306%20full%20\(2\).pdf](http://www.iats.com.br/panel/uploads/files/1306%20full%20(2).pdf)> Acesso em: 15/04/2017.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças.** 8ª ed. São Paulo, Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010. 1440p.

SANTOS, L.; ANDRADE, L.O.M. Acesso às ações e aos serviços de saúde: uma visão polissêmica. **Ciênc. Saúde Coletiva.** **17**(11): 2876-2878, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232012001100003&lng=en&nrm=iso> Acesso em: 04/08/2015.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; CARVALHO, N.B. Oral Transmission of Chagas Disease. **Clin. Infect Dis.** **54** (6): 845-852, 2012. Disponível em: <<https://watermark.silverchair.com/>> Acesso em: 01/08/2018.

SOUSA Jr., A.S.; PALÁCIOS, V.R.C.M.; MIRANDA, C.S.; COSTA, R.J.F.; CATETE, C.P.; CHAGASTELES, E.J.; PEREIRA, A.L.R.R.; GONÇALVES, N.V. Análise espaço-temporal da doença de Chagas e seus fatores de risco ambientais e demográficos no município de Barcarena, Pará, Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.** **20** (4): 742-755, 2017. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v20n4/1980-5497-rbepid-20-04-742.pdf>> Acesso em: 22/04/2018.

SOUZA, D.S.M.; MONTEIRO, R.C.C. **Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Seguimento Ambulatorial de Portadores de doença de Chagas.** 1ª ed. Belém: As Autoras, 2013. 50p.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites & Vectors.** **7**: 317, 2014. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1756-3305-7-317>> Acesso em:

VALENTE, V.C. **Estudo genotípico de Trypanosoma cruzi: epidemiologia e caracterização molecular de isolados do homem, triatomíneos e mamíferos silvestres do Pará, Amapá e Maranhão.** Tese (Doutorado da Universidade Federal do Pará) - Belém, Universidade Federal do Pará, 2011. 160p. Disponível em: <<http://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/4755>> Acesso em: 11/06/2018.

VALENTE SAS, VALENTE CV, PINTO AYN, CÉSAR MJR, DOS SANTOS MP, MIRANDA COS, CUERVO P, FERNANDES O 2009. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **103**: 291-297.

VALENTE SAS, VALENTE VC, FRAIHA NETO H. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **94** (Suppl. I): 395-398.1999.

VILHENA AO; PEREIRA WMM; OLIVEIRA SS; FONSECA PFL; FERREIRA MS; OLIVEIRA TNC; ADAMI M; LIMA PDL. Doença de Chagas aguda no estado do Pará, Brasil: série histórica de aspectos clínicos e epidemiológico em três municípios, no período de 2007 a 2015. **Rev. Pan Amazônica de Saúde – IEC**, V11. 2020.

VILHENA AO. A EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA NOS MUNICÍPIOS DE ABAETETUBA, BELÉM E BREVES NO ESTADO DO PARÁ. **Tese de Doutorado**, Belém- Pará, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas disease: second report of the WHO Expert Committee.** Geneva: World Health Organization; 2002. (WHO Technical report series, 905).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases.** Geneva: World Health Organization; 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas Disease (*American trypanosomiasis*). WHO - Geneva. 2015a. Disponível em: <<https://www.who.int/>> Acesso em: 26/02/2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas Disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. WHO - Wkly Epidemiol Rec. 90 (6): 33-44, 2015b. Disponível em: <<https://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1>> Acesso em: 12/01/2017.

ZETUN, C.B.; LUCHEIS, S.B.; TRONCARELLI, M.Z.; LANGONI, H. Infecção Por Trypanosoma cruzi em Animais Silvestres Procedentes de Zoológicos do Estado de São Paulo. **Vet. e Zootec.** **21** (1): 139-147, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/>> Acesso em: 20/11/2016.

INFECÇÕES POR *Plasmodium spp.* – MALÁRIA

Thalyta Mariany Rêgo Lopes Ueno

Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA),
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará
(UEPA). Belém, Pará, Brasil.

E-mail: thalyta_mlopes@hotmail.com

Karla Valéria Batista Lima

Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Bacteriologia e Micologia
(SABMI), Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério
da Saúde (IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: karlalima@iec.gov.br

Ana Maria Revorêdo da Silva Ventura

Seção de Parasitologia (SAPAR), Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de
Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

E-mail: ana_mariaventura@hotmail.com

ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA

A malária é conhecida como paludismo, febre palustre, impaludismo, maleita ou sezão (FONTES, 2015). Desde a mais remota antiguidade, há descrições de indivíduos acometidos por malária. Essa doença surgiu provavelmente na África com disseminação para as áreas tropicais e subtropicais do mundo. Na China, há quase 5.000 anos, escrituras fazem referências sobre “febre, com calafrios, tremores, delírios, que retornavam em dias sucessivos” e, entre 3.500 e 4.000 anos, os egípcios e sumerianos relatam febres intermitentes com esplenomegalia (ALBUQUERQUE et al., 2013).

Por volta de 500 anos a.C., surgiram os primeiros relatos gregos sobre malária, que relaciona a doença com o cultivo agrícola. Hipócrates (460 a 377 a.C.) atribui a origem da doença aos “gases de maus odores” emanados dos pântanos, daí a designação de malária – “mal ar”. No final do século XV, com a descoberta do novo mundo, a doença atingiu o Caribe, América Central e do Sul e, no século XVIII, o Canadá e os Estados Unidos (ALBUQUERQUE et al., 2013).

Em 1880, Charles Alphonse Laveran, visualizou ao microscópio em uma amostra de sangue de um paciente com malária “organismos movimentando-se ativamente”, tendo assim descoberto o agente etiológico da doença. Quatro anos mais tarde (1884) supôs que esses parasitos poderiam ser transmitidos por mosquitos, e nesse mesmo ano, Gerhart comprovou ser o agente da malária um hemoparasito. Em 1885, Marchiafava e Celli criaram o gênero *Plasmodium* para designar esses agentes da doença. Em 1891, Romanowsky ao criar um método de coloração em lâminas, descreveu a morfologia desses parasitos sanguíneos. Entre 1898 e 1899, Grassi, Bastianelli e Bignami, descobriram o ciclo completo das espécies de plasmódio em fêmeas de anofelinos (BRAGA; FONTES, 2016).

ETIOLOGIA E NOSOLOGIA DA MALÁRIA

Agente etiológico

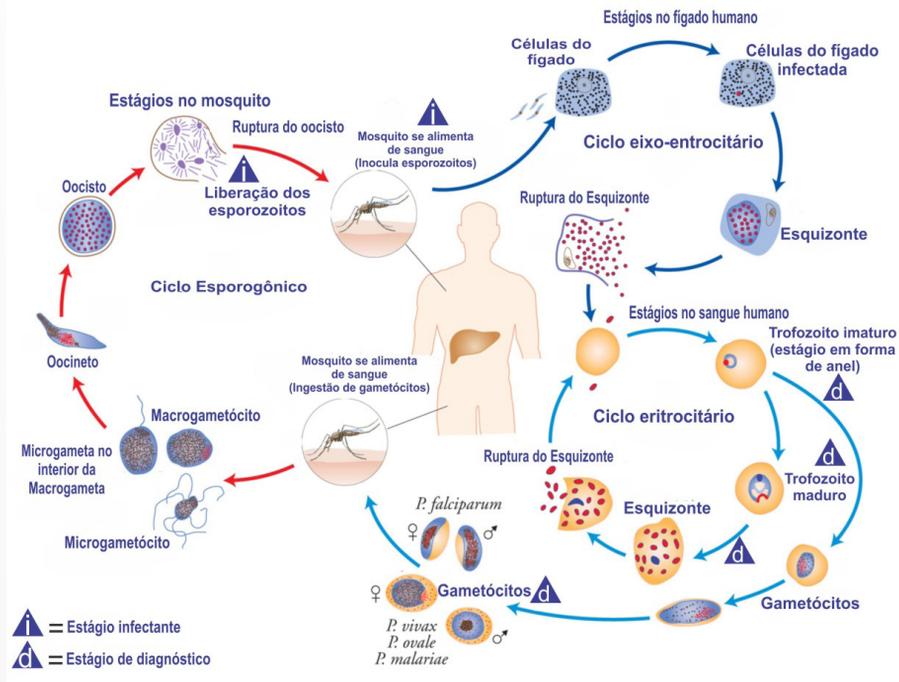
Os parasitas causadores de malária são protozoários que pertencem ao filo *Apicomplexa*, família *Plasmodiidae* e ao gênero *Plasmodium* (FONTES, 2015). O gênero *Plasmodium* inclui mais de 125 espécies de parasitos que infectam répteis, pássaros e mamíferos (ALBUQUERQUE et al., 2013). Dessas, seis causam malária no homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale wallickeri*, *P. ovale curtisi* e *P. knowlesi* (MILNER, 2018).

No Brasil, três espécies estão associadas à malária: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (FONTES, 2015). Não há registro de infecções por *P. ovale*, senão àquelas notificadas como casos importados da África (BRASIL, 2003a). Quanto ao *P. knowlesi* as infecções são raras, os casos registrados no sudeste asiático, predominantemente em áreas da Malásia e da Indonésia (FERREIRA, 2015).

Ciclo Biológico

O plasmódio apresenta um ciclo assexuado denominado esquizogônico, que ocorre no hospedeiro intermediário vertebrado, e um ciclo sexuado, denominado esporogônico, que se passa no hospedeiro definitivo do parasita, o mosquito *Anopheles* (figura 1) (CDC, 2020).

Figura 1- Ciclo de vida do plasmódio no homem e no mosquito.



Fonte: Adaptado do CDC, 2020.

No homem, o ciclo assexuado se inicia pela inoculação dos esporozoítos, por ocasião da picada do mosquito *Anopheles*, para repasto sanguíneo. Essas formas migram para o fígado onde ocorre o chamado ciclo exo-eritrocítico. Nas células hepáticas, os protozoários sofrem diferenciação e passam para a forma arredondada de criptozoítos, que se diferenciam em merozoítos, que se multiplicam (até 40.000) e promovem a ruptura dos hepatócitos. Na corrente circulatória, essas formas migram para a corrente sanguínea, onde iniciam o ciclo eritrocitário, ao invadirem as hemácias (CDC, 2020). Nos eritrócitos, os merozoítos se diferenciam em trofozoítas jovens, maduros e esquizontes que ao romperem as células vermelhas, liberam merozoítos, que irão infectar novos eritrócitos. Nesse momento do ciclo, parte dos merozoítos se diferenciam para gametócitos masculino e feminino (macro e microgametócito, respectivamente), formas sexuadas, que serão ingeridos pelos mosquitos durante o repasto sanguíneo (CDC, 2020).

No estômago do mosquito, o microgameta ao se unir ao macrogameta inicia o ciclo sexuado. Dessa união, forma-se o zigoto, que se torna móvel e alongado (oocineto)

e invade o epitélio gástrico, originando o oocisto. Esse sofre ruptura e libera numerosos esporozoítos, os quais migram para as glândulas salivares do inseto e durante o repasto serão inoculados no homem, constituindo assim as formas infectantes (ciclo esquizogônico) (CDC, 2020; FERREIRA, 2015).

As espécies de plasmódio apesar de pertencerem ao mesmo gênero (*Plasmodium*) apresentam distintas características e especificidades:

- a) A periodicidade da esquizogonia sanguínea é variável, de acordo com as características de cada espécie de *Plasmodium*, em média de 48 horas para o *P. vivax* e o *P. ovale*, 72 horas para o *P. malariae*, 36 a 48 horas para o *P. falciparum* e de 24 horas para o *P. knowlesi* (CDC, 2020). Na prática clínica, entretanto, nem sempre é possível observar a periodicidade do paroxismo febril e, aguardar sua ocorrência pode ser um fator de atraso para o diagnóstico e consequentemente para instituição de tratamento (CDC, 2020).
- b) O *P. falciparum* tem potencial para causar hiperparastemia que constitui um dos fatores intimamente relacionados à gravidade da infecção, devido a menor duração do seu ciclo tecidual, a maior produção de merozoítos durante as esquizogonias tecidual e eritrocitária e por possuir tropismo para hemácias jovens, maduras e senescentes (CDC, 2020).
- c) No ciclo exoeritrocítico das infecções por *P. vivax* e por *P. ovale*, alguns esporozoítos permanecem sob a forma de hipnozoítos, em estado de latência no fígado e depois de algum tempo (meses a até mesmo anos), por razões até então não bem esclarecidas (CDC, 2020) se reativam e se multiplicam até a fase de merozoítos, rompem os hepatócitos e caem na corrente sanguínea, iniciando o ciclo eritrocítico, determinando assim as recaídas da doença (CDC, 2020).

Vetor

São insetos da ordem Diptera, da família *Culicidae* e do gênero *Anopheles*, que possuem em seu ciclo de vida as fases de ovo, larva e pupa (fases aquáticas) e adulto. Dentre a grande variedade de espécies, apenas um pequeno número tem importância na transmissão da malária em humanos, sendo as fêmeas responsáveis por esta transmissão pois somente elas realizam o repasto sanguíneo (ALBUQUERQUE et al., 2013).

Os *Anopheles* que vivem em média de 1 a 2 semanas na natureza pertencem a dois subgêneros: *Nyssorhynchus* - vetores que se criam em águas localizadas no solo, e *Kerteszia* - vetores que têm como criadouros as águas coletadas em folhas de bromeliáceas (BRAGA; FONTES, 2016). Aproximadamente 80 espécies podem

transmitir o *Plasmodium* ao homem e 45 delas são consideradas vetores potenciais, com ampla distribuição geográfica: na África, predominam o *A. gambiae* e o *A. funestus*; no norte do planalto mexicano, são mais prevalentes o *A. quadrimaculatus* e *A. pseudopunctipennis* e nos países da América Central e Antilhas, o *A. albimanus*. Na maior parte do continente sul-americano, observa-se maior frequência de *A. darlingi* (ALBUQUERQUE et al., 2013).

No Brasil, em ordem de frequência, as cinco principais espécies transmissoras são: *A. (N.) darlingi*, *A. (N.) aquasalis*, *A. (N.) albicans*, *A. (K.) bellator* e *A. (K.) cruzii* (FONTES et al., 2015). O *A. darlingi* é mais frequente no domicílio devido a sua acentuada antropofilia, domesticidade e suscetibilidade ao plasmódio. Pode picar fora das habitações, mas prefere fazê-lo intradomicílio ao crepúsculo vespertino e matutino. O contato do homem com esse vetor também é favorecido pelo desmatamento e por atividades de garimpo (BRAGA; FONTES, 2016; LACERDA et al., 2015).

Ecótopo

Os locais de reprodução dos anofelinos variam muito com relação à espécie, alguns preferem água limpa, outras extensas coberturas vegetais (REZENDE, 2013). Os criadouros desses anofelinos podem ser águas profundas, limpas, pouco turvas e ensolaradas ou parcialmente sombreadas, onde suas larvas e pupas habitam as margens, escondidas entre a vegetação emergente ou flutuante e os detritos vegetais caídos na superfície líquida. Contudo, durante a estação chuvosa, o *A. darlingi*, principal vetor no Brasil, pode estar presente em grande variedade de coleções líquidas de tamanho e profundidades menores. Esses criadouros são utilizados durante todo o ano e, por serem permanentes, funcionam como focos de resistência durante a estação mais seca (FERRETE et al, 2005).

O *A. darlingi* tem como criadouros naturais as grandes coleções hídricas, como rios, lagos e igarapés, atualmente ampliadas e potencializadas pela atividade predatória da natureza pelo homem o que favorece a formação desses criadouros (ALBUQUERQUE et al., 2013).

O *A. aquasalis* tem preferência por águas com certa salinidade e por isso são mais comuns no litoral. Os criadouros são coleções de águas paradas e salobras, de tamanhos pequenos ou médios, transitórios ou semipermanentes, ensolaradas ou parcialmente sombreadas que ocorrem nas áreas de baixadas litorâneas (BRASIL, 2003b).

O *A. bellator* é encontrado apenas no litoral brasileiro com distribuição estendida, desde o Rio Grande do Sul até a Paraíba. Esse vetor difere dos demais por preferir bromélias rupestres, epífitas ou terrestres, porém expostas ao sol, tais como os gravatás que permitem o acúmulo de maior quantidade de água nas axilas de suas folhas (BRASIL, 2003b).

No Brasil, o *A. cruzii* ocorre nos estados de Pernambuco, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Está presente na Mata Atlântica e tem preferência para bromélias da espécie *Phytelmata*. Desempenha importante papel como vetor de malária autóctone na extra - Amazônia (LORENZ et al., 2015).

A espécie antes conhecida como *A. albitarsis*, atualmente é considerada um conjunto de quatro espécies, com diferentes capacidades vectoriais: *A. (N.) marajoara*, *A. (N.) deaneorum*, *A. (N.) albitarsis sensu strictu* e outra ainda não descrita, mas reconhecida por técnica da reação em cadeia da polimerase amplificada. A espécie *A. (N.) marajoara* é encontrada no interior do Brasil e no seu litoral, é um vetor com hábitos domésticos e no Amapá já foram encontradas espécimes naturalmente infectados pelo plasmódio. O *A. (N.) deaneorum* foi observado nos estados do Acre e Rondônia e o *A. (N.) albitarsis sensu strictu* foi observada no Maranhão (TAIUL, 2015).

Transmissão

O tripé do desenvolvimento e transmissão da malária se faz a partir de três elementos: o agente etiológico, o homem como reservatório e hospedeiro suscetível e o vetor, mosquito do gênero *Anopheles* (ALBUQUERQUE et al., 2013). Outros fatores influenciam na dinâmica dessa ocorrência, direta ou indiretamente, tais como fenômenos da natureza - temperatura da atmosfera, índice pluviométricos, umidade relativa do ar, altitude, cobertura vegetal e aqueles relacionadas à população - hábitos, condições de vida, moradia e trabalho (TAIUL, 2015).

A transmissão da malária não ocorre em temperaturas inferiores a 16°C ou acima de 33°C, ou em altitudes superiores a 2.000m. A alta umidade relativa do ar (acima de 60%) e as temperaturas entre 20° e 30 °C são fatores que favorecem a sobrevivência do vetor, e que também concorrem para um menor tempo de esporogonia nesses insetos, ao receberem as formas sexuadas do parasita durante o repasto sanguíneo (FONTES, 2015).

Outras formas menos frequentes de transmissão de malária são por transfusões de sangue (acidental) ou por via congênita ou perinatal (TAIUL, 2015).

EPIDEMIOLOGIA

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa que representa um grave problema de saúde pública no mundo e está presente em 90 países/territórios (OPAS, 2019a). Cerca de 2,5 bilhões de pessoas estão em risco de adquirir malária (MILNER, 2018) A doença ocorre em regiões tropicais e subtropicais e é uma das doenças

parasitárias de maior preocupação, devido ao seu elevado índice de morbidade e mortalidade (WHO, 2019).

Em 2018, o número global de casos de malária atingiu 228 milhões, dos quais 93% ocorreram na Região Africana, seguido pelo sudeste asiático (3,4%) e região do Mediterrâneo Oriental (2,1%). Essa realidade está agregada a milhões de pessoas que ainda não possuem acesso aos serviços de prevenção e tratamento para malária (WHO, 2019).

Apesar da elevada ocorrência de malária que ainda acontece no mundo, a taxa de incidência da doença diminuiu globalmente entre 2010 a 2018, de 71 para 57 casos/1.000 na população de risco. No sudeste Asiático, a taxa de incidência decresceu de 17 casos/1.000 habitantes para 5 casos/1.000 habitantes (redução de 70%) e na **África, os níveis de incidência também foram menores (294 casos/1.000 habitantes para 229 casos/1.000 habitantes), entre 2010 e 2018, com redução de 22%. Entretanto, na** região das Américas houve aumento do número de casos, em grande parte devido ao controle inadequado da transmissão da malária na República Bolivariana da Venezuela como consequência da situação social econômica e política que este país atualmente enfrenta (WHO, 2019).

Entre 2000 a 2015, a Venezuela apresentou um aumento de 359% nos casos de malária, seguido de um aumento de 71% em 2017. O Brasil, nessa perspectiva, relatou um aumento de 1.538 para 3.129 de casos de malária importados da Venezuela entre 2014 a 2017, inclusive casos de malária por *P. falciparum*, o que caracteriza a denominada malária de fronteiras. Esse aumento foi observado sobretudo no Amazonas e Roraima, os estados brasileiros que fazem fronteira com esse país (GRILLET et al., 2019).

Na América Latina e no Caribe, a malária permanece endêmica em 21 países, onde 120 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção. A transmissão tem distribuição heterogênea na América Latina e em nove países e territórios, do norte ao sul da América: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela, que em conjunto representam 93,2% dos casos de malária da região (FERREIRA; CASTRO, 2019).

Corder et al. (2020) relatam que a incidência de malária nas Américas (em que 76% dos casos são devido ao *P. vivax*) diminuiu drasticamente nas últimas duas décadas, mas bolsões de transmissão residuais persistem na Amazônia e desafiam os atuais esforços de eliminação.

A malária residual refere-se à transmissão que persiste apesar do alcance de alta cobertura de medidas efetivas de controle, como o uso de mosquiteiros tratados com inseticida e a pulverização residual nos domicílios e nesse contexto, também

como importante medida de controle pode estar indicada a pesquisa do parasita em indivíduos assintomáticos que residam na mesma localidade de pacientes com diagnóstico de malária em áreas endêmicas, pois este grupo representa potencial transmissor das formas infectantes do plasmódio.

No Brasil, a quase totalidade dos casos (99%) ocorre na Amazônia brasileira (estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) que é considerada uma área endêmica da doença em virtude do meio ambiente - chuva, temperatura e umidade do ar - fatores fundamentais na manutenção do ciclo de vida dos vetores com impacto na ocorrência e na transmissão da doença, além do regime hidrológico e condições socioculturais, ou seja, uma dinâmica socioambiental que caracteriza a complexidade da malária, com forte influência na relação entre o vetor e o homem (SADOINE et al., 2018; MBOUNA et al., 2019).

O clima tropical da Amazônia determina pouca variação da temperatura, o que favorece a transmissão ininterrupta da malária em todo o ano embora haja meses (junho - novembro) em que a doença tem maior prevalência, na dependência da densidade vetorial (SAÉZ-SAÉZ et al., 2007; LOPES, 2017).

Dentre as características da sociedade amazônica que estão relacionadas à prevalência da malária dentre outras endemias regionais, destacam-se o alto índice de desenvolvimento por migração nas últimas três décadas, o crescimento urbano desordenado sem o acompanhamento de infraestrutura sanitária, o desmatamento de extensas áreas, o uso inadequado do solo, o desmatamento de extensas áreas, as construções de hidrelétricas, e o aparecimento de garimpos (CONFALONIERI, 2005; CANELAS et al., 2019).

O Ministério da Saúde do Brasil (2019b) assegura que 41 municípios da Amazônia representam 80% das notificações de casos de malária (predomínio do *P. vivax*) e que dentre estes, 16 são responsáveis por 80% dos casos determinados por *P. falciparum*. A Região extra-Amazônica, composta por 17 Estados e o Distrito Federal, responde por apenas 1% dos casos notificados, que ocorrem geralmente em área de Mata Atlântica (BRASIL, 2020a; TAIUL, 2015).

A Tabela 1 Contribuição de três estados da Amazônia legal em número de casos de malária, no período de 2015 a 2019.

Tabela 1 - Contribuição de três estados da Amazônia legal em número de casos de malária, no período de 2015 a 2019.

Ano					
Estado	2015	2016	2017	2018	2019
Pará	9.584	14.785	37.103	46.371	32.752
Amazonas	74.387	49.955	82.766	73.433	65.127
Acre	26.685	34.382	36.009	25.785	12.770

Fonte: dados do BRASIL (2020b)

Em 2019, o Brasil registrou 155.168 casos de malária, com a seguinte distribuição do percentual de casos de malária segundo o local provável de infecção na região Amazônica: **área rural (55%), área indígena (25%), área urbana (10%), área de assentamento (6%), área de garimpo (4%)** (Brasil, 2020b).

No ano de 2019, o Pará foi o segundo Estado com maior número de casos da doença de malária (32.752 casos, o que correspondeu a aproximadamente 21% do total) com 75,5% na área rural, 13% na área de garimpo, 8,1% na área indígena, 2,7% na área urbana, 0,65% na área de assentamento e 0,05% em área de acampamento (BRASIL, 2020b).

As peculiaridades geográficas, ecológicas, biológicas e socioeconômicas justificam a importante notificação de casos de malária no estado do Pará, que é o segundo maior estado em extensão territorial (1.247.689.515 km²) da região Amazônica. Possui fauna e vegetação marcadas pela diversidade de espécies, inúmeros e caudalosos rios, igarapés, lagos, furos e paranás, clima quente e úmido, variando em períodos de muita chuva e outros de menor pluviosidade (OLIVEIRA-FILHO; MARTINELLI, 2009)

A partir das décadas de 1970 e 1980 com a política de ocupação da Amazônia (intensa e desordenada ocupação de terras ao longo dos rios e das rodovias) dirigida pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA) (OLIVEIRA-FILHO; MARTINELLI, 2009), o Pará vivencia um acelerado processo de devastação da floresta movido por processos econômicos (interesses madeireiros e agropecuários) com avanço de grandes núcleos urbanos sobre a vegetação, o que favorece o aparecimento e a manutenção de casos de malária, pela interação entre hospedeiro suscetível, o homem e o vetor, infectado pelo plasmódio (PARENTE et al., 2012; SADOINE et al., 2018).

As ações de controle implementadas pela Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária em conjunto com as Secretarias de Saúde dos

respectivos estados para reduzir ou eliminar a transmissão da doença lograram êxito na redução dos casos de malária nos 3 principais estados da Amazônia Legal, em 2019 (tabela 1). Estas ações estabelecidas foram baseadas nas diretrizes da OMS: diagnóstico precoce seguido de tratamento com medicamentos efetivos, distribuição de mosquiteiros tratados com inseticidas de longa duração (MILD) e borrifação residual intradomiciliar (WHO, 2019; LAPOUBLE, 2015).

No controle e até mesmo na erradicação da malária em algumas localidades, o Ministério da Saúde do Brasil estabelece a conduta quanto à notificação da doença: notificação compulsória e imediata para os casos adquiridos na extra-Amazônia e notificação regular, de até sete dias, para aqueles adquiridos na Amazônia mediante preenchimento da ficha de notificação do Serviço de Vigilância Epidemiológica em Malária (SIVEP_Malária) (BRASIL, 2015a).

Permanecem os desafios para o controle da malária no Brasil e em toda a América do Sul tais como o aumento significativo nos casos da doença nos últimos anos na Venezuela (como já mencionado), evidências de infecções submicroscópicas e assintomáticas; malária periurbana; malária relacionada à mineração de ouro; malária na gravidez; contraindicação do uso da primaquina em indivíduos com deficiência de 6-fosfato desidrogenase (G6PD) e assim, ausência de abordagem terapêutica para as formas hipnozoíticas do *P. vivax* (responsável pelas recaídas) com implementação de rastreamento populacional para determinar a magnitude desse agravo na população de área endêmica para malária; melhoria na investigação das infecções pelo *P. malariae* (que aparenta estar subdiagnosticado) (RECHT et al., 2017).

Nas perspectivas de controle da malária, as geotecnologias constituem ferramentas para a avaliação de conjunto de dados demográficos de saúde a nível espacial. Desse modo, podem ser usadas para estimar a população em risco de malária, sendo um sistema fundamental de medição para auxiliar os gestores públicos na tomada de decisões a nível local e/ou regional na Amazônia (RECHT et al, 2017; LOPES, 2017; TEWARA et al, 2018).

Para fins epidemiológicos, segundo a OMS, o grau de esplenomegalia e/ou percentual de baços palpáveis em crianças entre 2 a 9 anos permite classificar a malária segundo sua intensidade de transmissão em malária hipoendêmica - **índice esplênico** < 10%), malária mesoendêmica - **índice esplênico** entre 11 e 50%), malária hiperendêmica - índice esplênico entre 50 e 75% e malária holoendêmica - índice esplênico >75% (WHO, 2013).

Quando os indivíduos estão constantemente expostos à malária, diz-se que a endemicidade da malária é estável. Se os indivíduos estão submetidos a uma transmissão de malária com largas flutuações temporais trata-se de malária instável. Malária epidêmica, caracteriza a forma extrema da malária instável com epidemias quando as

populações não imunes estão sujeitas a um incremento nas taxas de transmissão (WHO, 2013).

No Brasil, o Ministério da Saúde estima o risco de ocorrência de malária numa determinada população em uma região circunscrita, mediante o Índice Parasitário Anual - IPA. Este índice representa a divisão do número de casos de malária dividido pela população do território de referência e multiplicado pela base de população referencial de 1.000 habitantes. Com esse cálculo, identificam-se quatro estratos de risco com níveis endêmicos diferenciados: alto (IPA >50/1.000 habitantes), médio (IPA entre 10 – 49/1.000 habitantes), baixo (IPA < 10/1.000) e áreas sem transmissão de malária (BRASIL, 2010a).

O Pará, como um todo, está situado no estrato do IPA de baixo risco (3,8), contudo, possui dentre os seus municípios áreas de alto, médio e baixo risco para transmissão da malária, pela distribuição heterogênea da doença entre os seus 144 municípios (BRASIL, 2020b).

O município de Itaituba, por exemplo, cuja principal atividade econômica é a mineração, sempre teve um papel importante nos casos de malária no Estado do Pará, representando 10,29% (112.699 casos) do total registrado no Pará no período de 2004 a 2019 (BRASIL, 2020b).

Em 2019, Itaituba (IPA de médio risco, 36,1) registrou 3.651 casos de malária, sendo assim atualmente o terceiro município do Estado com os maiores registros de malária (BRASIL, 2020b). É conhecida como “cidade pepita” por sua intensa atividade garimpeira com vários garimpos (muitos clandestinos) – conhecidos como garimpos do Tapajós, polos críticos para transmissão de malária. Devido essa intensa atividade garimpeira, o município se destaca por possuir intenso movimento migratório, que aliado aos fatores ecológicos oferece condições propícias à transmissão da doença, em todos os meses do ano (SAÉZ-SAÉZ et al., 2007; LAPOUBLE et al., 2015).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A malária caracteriza-se por episódios de calafrio, febre elevada (de até 40^o) de duração variável (de até 6 a 12 horas) que pode vir acompanhada de calafrio e sudorese, que constituem a tríade malárica. Outros sinais e sintomas são cefaleia, mialgia, náuseas e vômitos.

O quadro clínico depende de fatores tais como a espécie do parasito (em geral, as formas graves são determinadas pelo *P. falciparum* embora haja relato de malária grave por *P. vivax*, inclusive com evolução para o óbito), da parasitemia (o *P. falciparum* costuma determinar maior número de parasitas na corrente sanguínea e

na microcirculação), do tempo da doença e do estágio de imunidade adquirida pelo indivíduo (BRASIL, 2020a).

A malária pode evoluir com complicações envolvendo o sistema nervoso central, os pulmões e os rins, ou até mesmo o indivíduo com a doença apresentar um quadro semelhante a sepses. No quadro 1 estão listadas as principais características clínicas e laboratoriais da malária complicada e grave.

Quadro 1 – Principais características clínicas e laboratoriais da malária complicada e grave.

Características clínicas
<ul style="list-style-type: none">• Dor abdominal intensa (ruptura de baço, mais frequente em <i>P. vivax</i>)• Mucosas amareladas, icterícia• Mucosas muito hipocoradas (avaliada fora do ataque paroxístico febril)• Insuficiência hepatorenal (<i>P.vivax</i>)• Choque (<i>P.vivax</i>)• Redução do volume de urina a menos de 400 mL em 24 horas• Hiperbilirrubinemia e hipotensão (<i>P. knowlesi</i>)• Vômitos persistentes que impeçam a tomada da medicação por via oral• Sangramento• Falta de ar (avaliado fora do ataque paroxístico febril)• Cianose• Aumento da frequência cardíaca (avaliar fora do acesso malárico)• Convulsão ou desorientação (não confundir com o ataque paroxístico febril)• Prostração (em crianças)• Comorbidades descompensadas
Características laboratoriais
<ul style="list-style-type: none">• Anemia grave• Hipoglicemia• Acidose metabólica• Insuficiência renal• Hiperlactatemia• Hiperparasitemia (> 250.000/mm³ para <i>P.falciparum</i>)

Fonte: adaptado de Brasil, 2020a

Os grupos de risco para apresentarem as formas graves de malária incluem crianças menores de 5 anos de idade (em área endêmica por não possuírem imunidade à doença), gestantes, idosos, esplenectomizados, pessoas com imunodeficiência ou com neoplasias em tratamento e transplantados (BRASIL, 2020a)

DIAGNÓSTICO

Em pessoas procedentes de área de transmissão de malária, o diagnóstico deve ser direcionado para indivíduos que apresentem febre de qualquer intensidade, duração e frequência; mal-estar, dor no corpo, dor nas articulações, fadiga, falta de apetite; síndrome febril hemorrágica; síndrome febril ictérica; síndrome febril neurológica; síndrome febril respiratória; síndrome febril com forte dor abdominal (sugestiva, por exemplo, de ruptura de baço).

O Ministério da Saúde do Brasil (2020a) estabelece a microscopia como padrão ouro para confirmação laboratorial do diagnóstico da malária. Outros métodos auxiliares de diagnóstico incluem o teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), o teste de imunofluorescência indireta, os testes imunocromatográficos rápidos e o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Diagnóstico microscópico

A pesquisa do plasmódio no sangue periférico pode ser realizada por duas técnicas: gota espessa e distendido (esfregaço) sanguíneo com sangue obtido preferencialmente por punção digital (maior facilidade de acesso) ou venosa.

Na gota espessa, como o próprio nome indica, há várias camadas de sangue o que permite com mais facilidade a visualização do plasmódio. A lâmina é corada pelo método de Walker de 20 a 30 minutos para posterior visualização, sendo um exame qualitativo e quantitativo, ao possibilitar a diferenciação de espécies do plasmódio e contagem de parasitas por campo. Pode - se ainda calcular a densidade da parasitemia em relação aos campos microscópicos examinados (Brasil, 2020a).

No distendido sanguíneo, há apenas uma camada de sangue, o que exige mais experiência do microscopista na detecção do parasita, para depois proceder a contagem de parasitos por campo. Por outro lado, nesta técnica, por não haver a ruptura da hemoglobina, o parasita é visualizado dentro da hemácia, o que facilita a identificação da espécie (BRASIL, 2020a).

O quadro 2 demonstra a equivalência entre a avaliação semiquantitativa e avaliação quantitativa da densidade parasitária pela microscopia

Quadro 2 - Avaliação semiquantitativa e quantitativa da densidade parasitária pela microscopia

Número de parasitos Contados/ campo	Parasitemia qualitativa	Parasitemia quantitativa (por mm ³)
40 a 60 por 100 campos	+/2	200-300
1 por campo	+	301-500
2-20 por campo	++	501-10.000
21-200 por campo	+++	10.001-100.000
200 ou mais por campo	++++	> 100.000

Fonte: Ministério da Saúde, 2009.

TRATAMENTO

Na malária, o objetivo do tratamento se baseia na i) interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção; ii) destruição de formas latentes do parasito no ciclo tecidual (hipnozoítos) das espécies *P. vivax* e *P. ovale*, evitando assim as recaídas; iii) e interrupção da transmissão do parasito, pelo uso de drogas que impeçam o desenvolvimento de formas sexuadas dos parasitos (gametócitos) (BRASIL, 2020a).

No quadro 3 do MS (Brasil 2020a) encontra-se o esquema de tratamento para malária não complicada

Quadro 3: Tratamento medicamentoso para malária não complicada.

<i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>	Malária Mista (<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i> ou <i>P. ovale</i>)
Em adultos, cloroquina por três dias (10 mg/kg no dia 1 e 7,5 mg/kg nos dias 2 e 3).	Cloroquina por três dias	Crianças > 6 meses e adultos até 120 kg:	Crianças > 6 meses e adultos até 120 kg:

<p>Primaquina, na dose de 0,5 mg/kg/dia, por sete dias</p> <p>Em gestantes, cloroquina por 3 dias e cloroquina profilática (5 mg/kg/dose) semanalmente até um mês de aleitamento.</p> <p>Crianças < 5 kg, usar artemeter/ lumefantrina ou Artesunato + Mefloquina, nos 3 primeiros dias.</p>		<p><u>Opção 1:</u> Artemeter + Lumefantrina, nos 3 primeiros dias e Primaquina, no primeiro dia à noite.</p> <p><u>Opção 2:</u> Artesunato + Mefloquina, nos 3 primeiros dias e Primaquina no primeiro dia e à noite.</p> <p>Em gestantes, Artemeter + Lumefantrina ou Artesunato + Mefloquina nos 3 primeiros dias.</p>	<p><u>Opção 1:</u> Artemeter + Lumefantrina, nos 3 primeiros dias e Primaquina, em 7 dias.</p> <p><u>Opção2:</u> Artesunato + Mefloquina, nos 3 primeiros dias e Primaquina em 7 dias.</p> <p>Em gestantes e crianças < 6 meses, deve ser tratada com artemisinina e gestantes devem fazer cloroquina profilática.</p>
---	--	---	--

Fonte: BRASIL, 2020a

O tratamento da malária grave deve ser uma emergência médica, avaliando-se a necessidade de internação em unidade de terapia intensiva, assim que haja suspeição diagnóstica. Indica-se a administração de artesunato intravenoso (IV) ou intramuscular (IM) em crianças, adultos ou gestantes, por ser um antimalárico de ação rápida e potente o que contribui para um declínio significativo da parasitemia, a qual deve ser controlada periodicamente mediante sucessivas coletas de sangue para realização de gota espessa. O artesunato deve ser usado no mínimo por 24 horas e suspenso tão logo o paciente possa receber medicação oral, quando então o tratamento deve ser completado, segundo a espécie parasitária – respeitando as restrições de uso da primaquina (JAURÉGUIBERRY 2019, BRASIL, 2020a)

O quadro 3 do MS do Brasil (2020a) orienta sobre os cuidados a serem prestados aos pacientes com malária grave

Quadro 3 – Cuidados aos pacientes com malária grave

- Garantir permeabilidade das vias aéreas e avaliar os parâmetros respiratórios e circulatórios;
- Aferir ou estimar o peso dos pacientes para facilitar os cálculos dos medicamentos administrados;
- Providenciar acesso venoso adequado;
- Realizar exames laboratoriais: glicemia, hemograma, quantificação da parasitemia (em caso de infecção por <i>P. falciparum</i>), gasometria arterial e exames de função renal e hepática;
- Realizar exame clínico-neurológico minucioso.

Fonte: BRASIL, 2020a.

REFERÊNCIAS

ALBURQUERQUE, B. C.; MARTINEZ- ESPINOSA, F.; SUÁREZ -MUTIS, M.C. Malária. In: **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. COURA, J.R. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.885 – 910, 2013.

BRAGA, E.M.; FONTES, C.J.F. Plasmodium – malária. In: **Parasitologia Humana**. NEVES, D. P. 13 ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária PNCM**. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2003a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Situação atual da doença**. Brasília (DF): 2003b. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/guia_epi/hm/doencas/malaria/situacaodadoenca.htm> Acesso em: 25/05/2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica: caderno 10 malária**. 7ª ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Malária: monitoramento dos casos de malária no Brasil em 2014**. Boletim Epidemiológico. vol. 46, n.25. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2020a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica – Malária, SIVEP. **Relatório: Boletim Epidemiológico**, 2020b. Disponível em:<http://200.214.130.44/sivep_malaria/>. Acesso: 22/03/2020.

CANELAS, T.; CASTILHO-SALGADO, C.; BAQUERO, O.S.; RIBEIRO, H. Environmental and socioeconomic analysis of malária transmission in the Brazilian Amazon, 2010–2015. **Rev Saude Publica** v.53, n. 49, p. 1 -10, 2019.

CDC - CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Malaria: Biology, 2020. Disponível em:**<<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>>. **Acesso em: 17/03/2020.**

CONFALONIERI, U.E. Saúde na Amazônia: um modelo conceitual para a análise de paisagens e doenças. **Estud.** v. 19, n. 53, p. 221-236, 2005.

CORDER, R.M.; FERREIRA, M.U.; GOMES, M.G.M. Model ling the epidemiology of residual *Plasmodium vivax* malaria in a heterogeneous host population: A case study in the Amazon Basin. **PLOS Computational Biology**, v.16, n. 3, p.1-18, 2020.

FERREIRA, M. S. Etiologia e ciclo evolutivo. In: **Tratado de Infectologia**. FOCACCIA, R. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. 1889 - 94p.

FERREIRA, M.U.; CASTRO, M.C. Malaria Situation in Latin America and the Caribbean: Residual and Resurgent Transmission and Challenges for Control and Elimination. **Methods Mol Biol**, v. 2013, p.57-70, 2019.

FERRETE, J.A.; LEMOS, J.C.; LIMA, S. Ecótopos encontrados em perfis topográficos traçados nas áreas de implantação das barragens das UHEs de Capim Branco I e II, na bacia do rio Araguari, no município de Uberlândia (MG). **Caminhos de geografia**. v.16, n.16, p. 172-189, 2005.

FONTES, C. J. F. Malária. In: **SMI: Série de Medicina Interna- doenças infecciosas**. PEDROSO, E. R. P. Rio de Janeiro: Rubio, p.399-424, 2015.

GRILLET, M.E.; HERNÁNDEZ-VILLENA, J.V.; LLEWELLYN, M.S et al. Venezuela’s humanitarian crisis, resurgence of vector-borne diseases, and implications for spillover in the region. **Lancet Infect Dis**. v.19, n.5, p.149-161, 2019. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30757-6.

JAURÉGUIBERRY, S. Accès palustre grave [Severe and complicated malaria]. **Rev Prat.** v.69, n.2, p.162-165, 2019.

LACERDA, M. V. G.; SIQUEIRA, A. M.; ALECRIM, M. G. C.; ALECRIM, W.D. Malária. IN: **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias.** TAVARES, W.; MARINHO, L.A.C. São Paulo: Atheneu, p.771- 784, 2015.

LAPOUBLE, O.M.M.; SANTELLI, A.C.F.S.; MUNIZJUNQUEIRA, M.I. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. **Rev PanamSalud Publica.** v.38, n. 4, p. 300-6, 2015.

LOPES, T. M. R. **Análise ecoepidemiológica da distribuição espaço – temporal da malária no município de Itaituba, Pará, no período de 2011 – 2015.** Dissertação (Mestrado do Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária da Amazônia) – Belém, Universidade do Estado do Pará – UEPA, Instituto de Evandro Chagas– ICE, 2017, 87p.

LORENZ, C.; PATANÉ, J. S. L.; SUESDEK, L. Morphogenetic characterisation, date of divergence, and evolutionary relationships of malaria vectors *Anopheles cruzii* and *Anopheles homunculus*. **Infection, Genetics and Evolution.** v.35, p. 144-152, 2015.

MBOUNA, A.D.; TOMPKINS, A.M.; LENOUE, A.; ASARE, E.O.; YAMBA, E.I. TCHAWOUA, C. Modelled and observed mean and seasonal relationships between climate, population density and malaria indicators in Cameroon. **Malar J,** v. 18, n. 359, p. 1-14, 2019.

MILNER, D. A. Jr. Malaria Pathogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v.8, n.1, 2018. doi: 10.1101/cshperspect.a025569. PMID: 28533315; PMCID: PMC5749143.

PARENTE, A.T.; SOUZA, E. B.; RIBEIRO, J.B.M. A ocorrência de malária em quatro municípios do Estado do Pará, 1988 a 2005, e sua relação com o desmatamento. **Acta Amaz.** v.42, n.1, p. 41-48, 2012.

OLIVEIRA-FILHO, A.B.; MARTINELLI, J.M. Casos notificados de malária no Estado do Pará, Amazônia Brasileira, de 1998 a 2006. **Epidemiol Serv Saude.** v.18, n.3, p. 277-84, 2009.

OPAS. Organização Pan- Americana de Saúde. Folha informativa – Malária 2019a. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5682:folha-informativa-malaria&Itemid=812. Acesso em: 20.03.2020.

RECHT, J., SIQUEIRA, A.M., MONTEIRO, W.M. et al. Malária no Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela: desafios atuais no controle e eliminação da malária. **Malar J** v.16, n.273, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1925-6>

REZENDE, F. O. **Anopheles (Nyssorhynchus) aquasalis, Curry 1932: estudo de contaminação por bacilo entomopatogênico em colônias mantidas em insetários, 2013.** Dissertação (Mestrado do Centro de Pesquisa René Rachou. Programação de Pós - Graduação em Ciências da Saúde) - Minas Gerais, Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, 2013. 72p.

SADOINE, M.L.; SMARGIASSI, A.; RIDDE, V.; TUSTING, L. S.; ZINSZER, K. The associations between malaria, interventions, and the environment: a systematic review and meta-analysis. **Malar J**, v.17, n. 73, p. 1-11, 2018.

SAÉZ-SAÉZ, V.; MARTÍNEZ, J.; RUBIO-PALIS, Y.; DELGADO, L. Evaluación semanal de La relación malaria, precipitación y temperatura del aire em La Península de Paria, estado Sucre, Venezuela. **B. Malarinol. Salud Amb.** v.47, n.2, p. 177-189, 2007.

TAUIL, P. L. Epidemiologia. In: **Tratado de Infectologia.** FOCACCIA, R. São Paulo: Editora Atheneu, p.1894 - 99, 2015.

TEWARA, M.A.; MBAH-FONGKIMEH, P.N.; DAYIMU, A. et al. Análise estatística espacial de pequenas áreas de grupos de malária e hotspots nos Camarões; 2000–2015. **BMC Infect Dis** v.18, n.636, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3534-6>

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. GLOBAL MALARIA PROGRAMME. **World Malaria Report 2013.** 2013. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/> Acesso em: 02/03/2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. GLOBAL MALARIA PROGRAMME. **World Malaria Report 2019.** 2019. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/252038/1/9789241511711-eng.pdf?ua=1>> Acesso em: 02/03/2020.

***Schistosoma mansoni*: ASPECTOS GERAIS, EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO**

Isabelle Helena Lima Dias

Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará (UEPA).
Belém, Pará, Brasil.

e-mail: isabelledias@hotmail.com

Álvaro Luan Santana Fonseca

Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará (UEPA).
Belém, Pará, Brasil.

e-mail: alvaroluan@hotmail.com

Sergei Rodrigo Magalhães de Sousa

Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia (PPGBPA), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Universidade do Estado do Pará (UEPA).
Belém, Pará, Brasil.

e-mail: rodrigo.bio.uepa@gmail.com

Martin Johannes Enk

Laboratório de Parasitoses Intestinais, Esquistossomose e Malacologia, Seção de Parasitologia (SAPAR), Instituto Evandro Chagas/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde (IEC/SVS/MS). Ananindeua, Pará, Brasil.

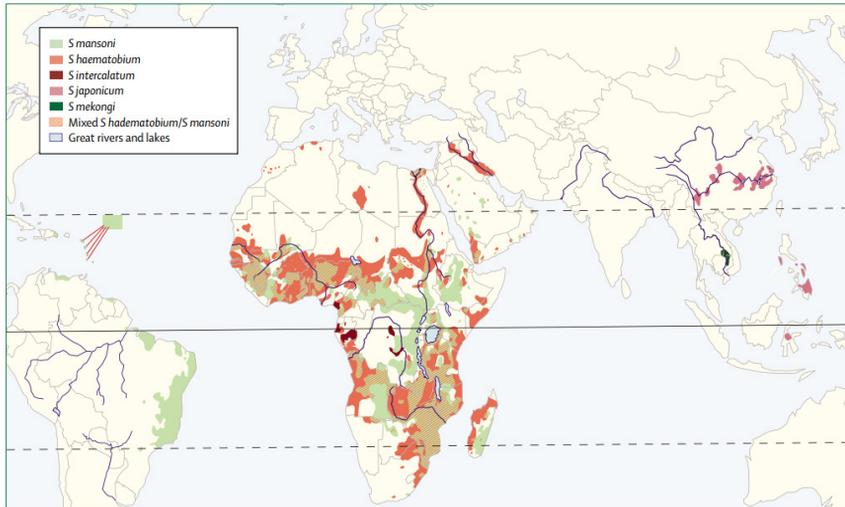
e-mail: marenk.iec@gmail.com

CONCEITO E DISTRIBUIÇÃO DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença infecto-parasitária crônica que afeta cerca de 230 milhões de pessoas mundialmente. Reportada em mais de 70 países (Figura 1), é classificada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada (WHO, 2020).

Esta parasitose pode ser causada por diferentes espécies do gênero *Schistosoma* (Weinland, 1858), sendo as de maior importância epidemiológica na medicina humana: *S. haematobium* (Bilharz, 1852); *S. japonicum* (Katsurada, 1904); *S. mekongi* (Voge, Brickner & Bruce, 1978); *S. intercalatum* (Fischer, 1934), e *S. mansoni* (Sambon, 1907) (WHO, 2020). Nas Américas a única espécie com ciclo de transmissão estabelecido é *S. mansoni* (CDC, 2019).

Figura 1: Distribuição global da esquistossomose.

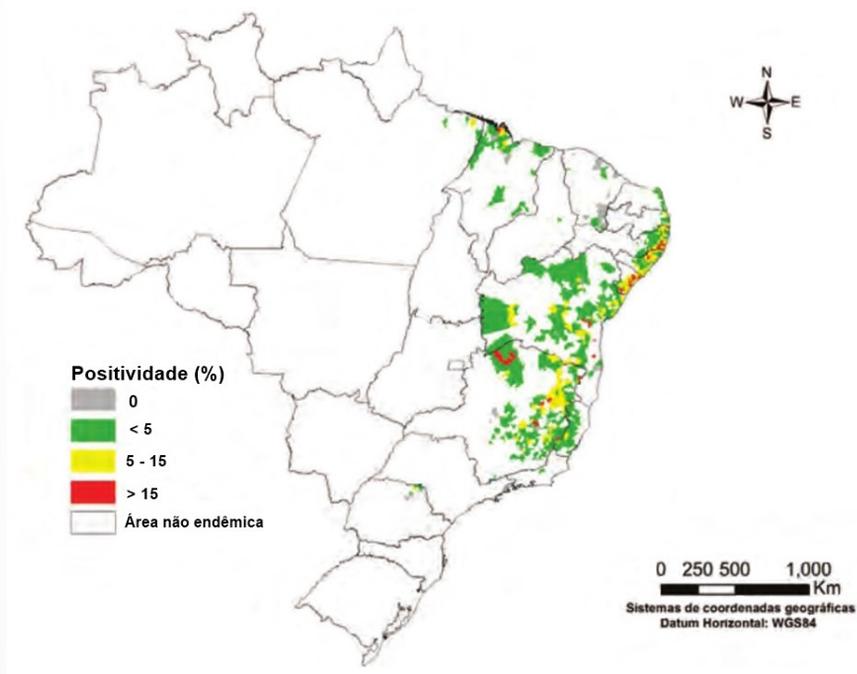


Fonte: Gryseels *et al.* (2006).

Nas Américas, o Brasil possui a maior área endêmica, com ocorrência da doença nas regiões Nordeste (Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe) e Sudeste (Espírito Santo e Minas Gerais), com focos nos estados do Maranhão, Ceará, Pará, Rio de Janeiro e São Paulo (Figura 2) (BRASIL, 2019; WHO, 2020).

Por ser uma doença de características crônicas, o que lhe confere baixa visibilidade e baixo impacto, é subestimada quando comparada a outras doenças como Malária, Dengue e a AIDS no que diz respeito a investimentos públicos e governamentais, carecendo assim de uma maior atenção das autoridades e por isso é tida como uma doença negligenciada (Hotez *et al.*, 2006).

Figura 2 – Distribuição da esquistossomose segundo percentual de positividade por município, Brasil, 2013-2017.



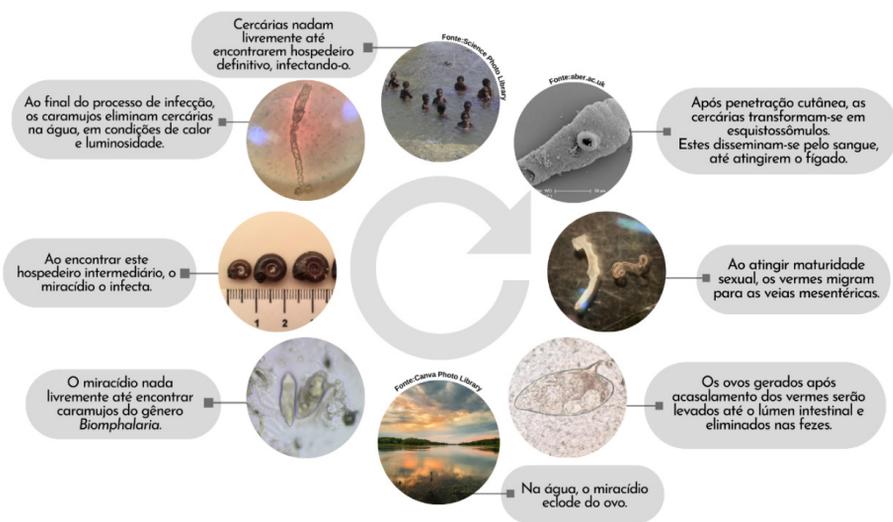
Fonte: BRASIL, 2019.

CICLO DE TRANSMISSÃO DO *S. mansoni*

O ciclo da esquistossomose (Figura 3), primeira vez descrito no Brasil por Pirajá da Silva (1908), para ser completo, requer passagem em dois hospedeiros: um intermediário, caramujos aquáticos do gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910) e um definitivo, humanos e mamíferos vertebrados. A infecção dos hospedeiros é de comum ocorrência em localidades sem ou com saneamento básico inadequado, através de água contaminada.

Os hospedeiros intermediários são infectados pelos miracídeos, forma larval que eclode do ovo presente nas fezes na água. Em até 48h o miracídio se desenvolverá para a fase de esporocisto primário e após cerca de duas semanas, dará origem à fase de esporocisto secundário, fase evolutiva na qual ocorre a reprodução assexuada culminando na liberação da cercária (Imagem 1), forma infectante para o hospedeiro definitivo. No ambiente aquático (rios, córregos, lagos, etc.), em condições de luminosidade e temperatura ideal (entre 25º e 30ºC em média) a cercária será liberada do caramujo.

Figura 3 – Ciclo da Esquistossomose.



Fonte: Acervo do Laboratório de Parasitoses Intestinais e Esquistossomose/Instituto Evandro Chagas/SVS/MS (2020).

No ser humano, a infecção é caracterizada pela penetração das cercárias na pele ou mucosas por ação lítica (glândulas de penetração) e mecânica (movimentos vibratórios). As cercárias se adaptam as condições fisiológicas do hospedeiro definitivo, perdendo sua cauda na penetração, transformando-se em esquistossômulos, invadindo o hospedeiro definitivo. Posteriormente migram pelo tecido subcutâneo e penetram nos vasos sanguíneos, onde são levados passivamente pela corrente sanguínea até os pulmões e coração. Após passar pelos pulmões, os esquistossômulos se dirigem ao sistema portal hepático por meio de duas vias: a via sanguínea (mais comum) e a via transtissular (através dos tecidos) chegando finalmente no sistema porta, sendo lá o local onde se inicia o acasalamento dos vermes já adultos, seguido pela migração para as veias mesentéricas, onde ocorre a deposição de ovos (Imagem 2).

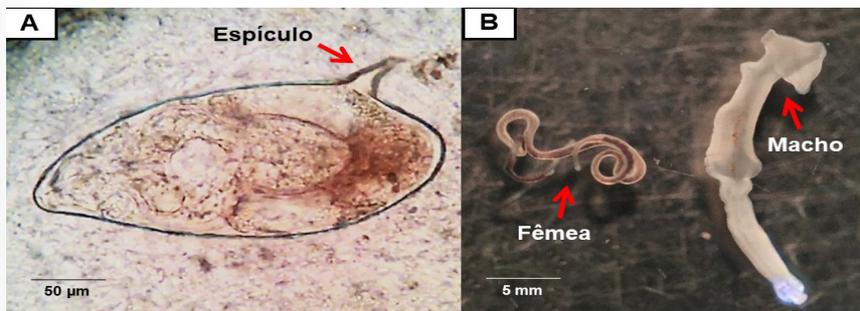
Imagem 1 – Cercária de *S. mansoni* observada em microscópio óptico, em objetiva de 40x.



Fonte: Acervo do Laboratório de Parasitoses Intestinais e Esquistossomose/Instituto Evandro Chagas/SVS/MS (2020).

Devido a reação imunológica desencadeada por enzimas histolíticas presentes nos ovos, estes passam através do parênquima intestinal, chegando assim no lúmen, sendo eliminados junto das fezes, fechando o ciclo (Sambon, 1907; Pirajá da Silva, 1908).

Imagem 2 – A: Ovo de *S. mansoni*, visto em microscopia óptica com destaque para espículo lateral; B: Verme de *S. mansoni*, em aumento de 2,5x, visto em lupa eletrônica, com destaque para macho e fêmea.



Fonte: Acervo do Laboratório de Parasitoses Intestinais e Esquistossomose/Instituto Evandro Chagas/SVS/MS (2020).

Biomphalaria glabrata: HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

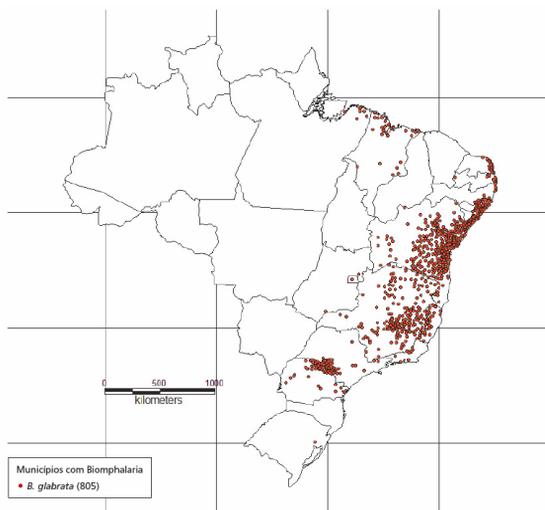
No Brasil, *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Imagem 3) é considerada a espécie mais importante em relação a ocorrência da esquistossomose, devido sua vasta distribuição geográfica (Figura 4) além de apresentar altas taxas de suscetibilidade à infecção pelo *S. mansoni*, participando ativamente como hospedeiro intermediário deste trematódeo, mantendo e possibilitando o estabelecimento de novos focos da doença e indicando áreas com risco de transmissão (Coimbra Jr. & Engel, 1982; Souza *et al.*, 2001; Carvalho & Caldeira, 2004; Goveia *et al.*, 2019).

Imagem 3 – Caramujos *Biomphalaria glabrata* (lado esquerdo do animal).



Fonte: Acervo do Laboratório de Parasitoses Intestinais e Esquistossomose/Instituto Evandro Chagas/SVS/MS (2020).

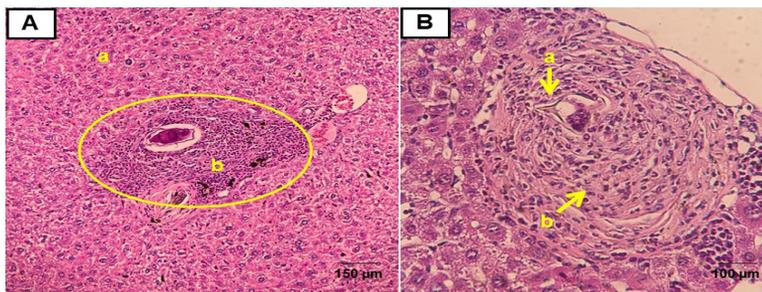
Figura 4 – Distribuição espacial da *B. glabrata* no Brasil.



ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOPATOLÓGICOS

Os vermes comumente não causam inflamação no hospedeiro definitivo por serem capazes de, por meio de células-tronco somáticas, camuflar seus antígenos, impedindo assim seu reconhecimento pelo organismo, evitando reações imunológicas de grande escala. Pelo contrário, os ovos liberados e a imunidade adaptativa dos indivíduos infectados darão a via de patologia a se desenvolver nos humanos. Alguns ovos são levados ao fígado pelo fluxo sanguíneo, desencadeando diferentes processos imunológicos de resposta inflamatória, por secretarem glicoproteínas antigênicas. Estas glicoproteínas induzem a ação de células como eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos, as quais atacam o tecido onde encontra-se o ovo, formando granulomas (Imagem 4) ao redor dos mesmos (McManus *et al.*, 2018).

Imagem 4 – Corte tecidual hepático de camundongo *Swiss* infectado por *S. mansoni*, com destaque em amarelo para: **A**: a: tecido normal e b: tecido granulomatoso; **B**: a: espículo lateral de ovo de *S. mansoni*; b: tecido granulomatoso.



Fonte: Acervo do Laboratório de Parasitoses Intestinais e Esquistossomose/Instituto Evandro Chagas/SVS/MS (2020).

A esquistossomose pode ser classificada em uma fase aguda, até 120 dias após infecção, e crônica, após 120 dias, sendo influenciadas pela duração da infecção e pela carga parasitária do indivíduo infectado (McManus *et al.*, 2018).

Clinicamente, a doença pode se apresentar na fase aguda, em uma forma assintomática, variando até a forma toxêmica, considerada mais grave. Já na fase crônica, a doença é dividida em forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica.

A cercária realiza penetração cutânea, em ambiente aquático, transformando-se em esquistossômulo. A dermatite cercariana geralmente ocorre logo após este contato, e é caracterizada por prurido devido parte das cercárias morrerem nos estratos iniciais

da pele, ocasionando reação inflamatória, geralmente com duração transitória (de 24 a 72 horas), porém ocorrem casos de duração por até 15 dias (Souza *et al.*, 2011).

Paralelamente a esta forma primária da infecção, componentes das vias da imunidade inata já são ativados, gerando um infiltrado de células polimorfonucleares, mononucleares e de Langerhans, juntamente com a produção de quimiocinas CCL3/MIP-1 α e citocinas (interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-12p40 e IL-10). Este cenário se estende por um período de 4 a 5 dias, podendo também haver a movimentação de linfócitos TCD4 e a produção de IL-12p40, IFN- γ e IL-4, os quais são reduzidos aproximadamente na segunda semana (Hogg *et al.*, 2003; Kourilová *et al.*, 2004).

A transformação dos esquistossômulos em vermes adultos dá início as manifestações agudas da esquistossomose. Esta fase pode ser dividida em dois períodos, pré-patente (anterior a oviposição) e pós-patente (após oviposição) (Cheever, Hoffmann & Wynn, 2000; Pearce, 2005; McManus *et al.*, 2018). Na fase pré-patente ainda não há a presença de ovos nas fezes, com resposta imunológica predominante do tipo TH-1. Na fase aguda pós-patente, tem-se início a postura de ovos, os quais são responsáveis pela inflamação tecidual, principalmente no fígado, causando ao longo do tempo as reações granulomatosas, resultando nas diferentes formas de morbidade da esquistossomose crônica, descrita anteriormente (Dunne & Pearce, 1999; De Jesus *et al.*, 2002; Pearce & Macdonald, 2002; Wynn *et al.*, 2004; Bartley *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2007).

Em estudos com camundongos foi observada reação predominantemente de TH1 nos estágios iniciais de infecção, evoluindo para um perfil TH2, coincidindo com a postura de ovos e a secreção de antígenos dos mesmos, induzindo uma mudança no perfil da resposta imunológica. É observado o aumento na produção das IL-4, IL-5 e IL-13, fundamentais para o desenvolvimento do granuloma (Rocha, 2015; Grzych *et al.*, 1991; Cheever, Hoffmann & Wynn, 2000; McManus *et al.*, 2018).

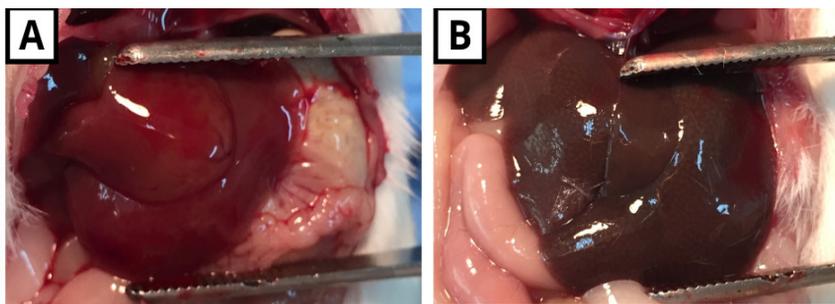
Na fase aguda, os sintomas em humanos são febre alta acompanhada de calafrios e sudorese, mal-estar, astenia (perda ou diminuição da força física), tosse não produtiva, anorexia, náuseas e vômitos intensos. Em alguns casos observa-se também mialgia (dor muscular) e cefaléia (dor de cabeça) (Inobaya *et al.*, 2014; McManus *et al.*, 2018).

A fase aguda é mais comum em indivíduos que não vivem em áreas endêmicas e são expostos pela primeira vez à infecção pelo *S. mansoni*, sendo pouco comum em pessoas de áreas endêmicas. Geralmente, estes indivíduos são assintomáticos e descobrem a doença ao realizar exames de rotina, pela detecção dos ovos do parasita nas fezes e/ou pela eosinofilia, quando acusada nos exames de sangue (Souza *et al.*, 2011; McManus *et al.*, 2018).

A fase crônica costuma ocorrer em pessoas infectadas em áreas endêmicas. Durante a fase intestinal, o indivíduo acometido apresenta sintomas como diarreia, dor

abdominal e sangue nas fezes. Mesmo sendo centro de eliminação de ovos, o intestino geralmente encontra-se pouco lesado. Já ao longo do tempo o fígado é mais afetado, aumentando de tamanho (Imagem 5) e chegando a ser palpável, até apresentando nódulos devido à fibrose decorrente da reação granulomatosa, assim caracterizando a forma hepatointestinal.

Imagem 5 – Fígado de camundongos: A: Fígado normal; B: Fígado comprometido após infecção por *S. mansoni*.



Fonte: Acervo do Laboratório de Parasitoses Intestinais e Esquistossomose/Instituto Evandro Chagas/SVS/MS (2020).

A forma hepatoesplênica da esquistossomose se demonstra pelo aumento do fígado e do baço, com hipertensão da veia porta. Em casos graves, a hipertensão da veia porta pode causar ascite (barriga d'água) e isquemia hepática. A hipertensão portal, ao longo do tempo, pode ocasionar rompimento de varizes esofagogástricas, causando hemorragia digestiva alta, com potencial do óbito do paciente por sangramento agudo. Nestes casos, exames de ultrasonografia podem averiguar as dimensões do fígado e do baço na forma avançada, além do espessamento da veia porta (De Cock, 1986; Machado *et al.*, 2002; BRASIL, 2014).

DIAGNÓSTICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Como a patologia e os aspectos clínicos da esquistossomose são bastante semelhantes a outras doenças infecciosas, os exames clínicos não são suficientes para um diagnóstico conciso (Sousa, 2015). A utilização de técnicas laboratoriais em conjunto com anamnese do paciente melhora o diagnóstico individual (Brasil, 2014).

Os métodos de diagnóstico laboratorial podem ser divididos em diretos e indiretos. Os exames diretos consistem na detecção de ovos de *S. mansoni* nas fezes

e tecidos, na identificação de antígenos circulantes e na amplificação do DNA do parasita. Já o diagnóstico indireto é baseado em testes imunológicos de reação antígeno-anticorpo (Zhu, 2005; Brasil, 2014; Sousa, 2015).

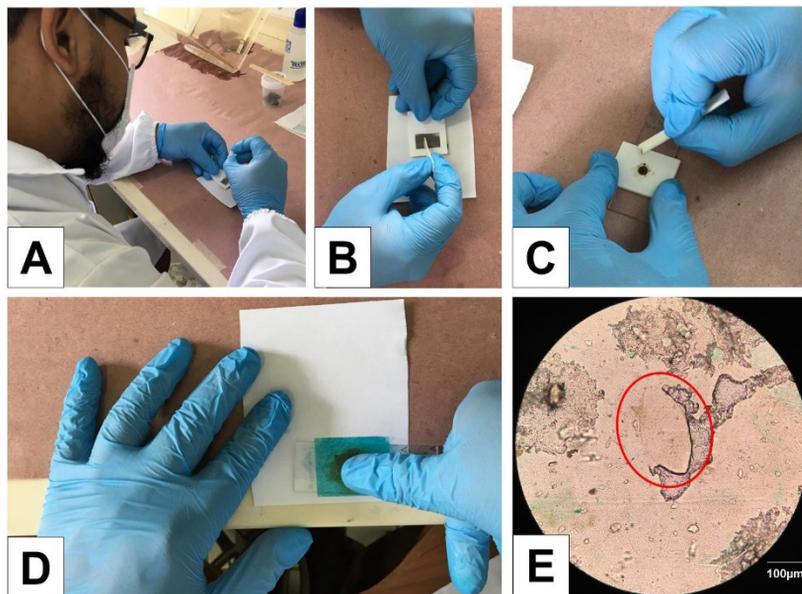
O diagnóstico recomendado pela Organização Mundial da Saúde como o principal método de detecção de ovos em indivíduos parasitados é a técnica quantitativa e qualitativa de Kato-Katz. Vale ressaltar que as técnicas coproscópicas, ou seja, que analisam fezes humanas para detecção de ovos de helmintos, apresentam resultados satisfatórios quando o indivíduo apresenta carga parasitária variando de moderada à elevada. O controle de cura por exames de fezes deve ser feito após três meses da administração da droga devendo-se considerar a possibilidade de reinfecções (WHO, 1994; Gryseels *et al.*, 2006).

Algumas das principais ferramentas diagnósticas da esquistossomose são: a técnica de Kato-Katz, o Método Helmintex[®], o *Point of Care Circulating Cathodic Antigen* (POC-CCA), a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), o *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP) e o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), descritas abaixo:

Técnica de Kato-Katz

A técnica de Kato-Katz (Imagem 6) descrito em 1960 por Kato, posteriormente aperfeiçoado por Katz, é um teste qualitativo e quantitativo, que permite determinar o número de ovos por grama de fezes de um indivíduo parasitado, assim como calcular a intensidade da infecção (Katz *et al.*, 1972). O método consiste na filtragem de uma pequena amostra de fezes através de uma tela de nylon, evitando detritos maiores. O material deve ser depositado com auxílio de espátula plástica em placa perfurada sobre uma lâmina de vidro, de forma a preencher todo o espaço. Em seguida, retira-se a placa perfurada, restando apenas o material fecal, e sobre este posiciona-se uma lamínula de celofane previamente embebida em solução de verde malaquita, pressionando de forma a espalhar uniformemente toda a amostra fecal na lâmina. A leitura deve ser realizada após 30 minutos, em microscópio óptico em objetivas de 10x para detecção dos ovos.

Imagem 6 – Processo de filtragem de fezes pelo método Kato Katz; **A:** Fezes posicionadas em papel; **B:** Compressão das fezes em malha de nylon; **C:** Preenchimento do orifício em placa perfurada; **D:** Posicionamento da lâmina de celofane sobre fezes; **E:** Espalhamento das fezes para análise posterior.



Fonte: Acervo do Laboratório de Parasitoses Intestinais e Esquistossomose/Instituto Evandro Chagas/SVS/MS (2020).

Esta técnica avalia a carga parasitária de indivíduos parasitados por meio da contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG) encontrados durante a leitura das lâminas. O número total de ovos encontrados em uma lâmina de Kato-Katz é multiplicado por 24, quantificando o OPG. Este cálculo é feito pois o orifício da placa perfurada equivale, em média, a 43,7 mg de fezes. Indivíduos que apresentem médias de 1 – 99 OPG são classificados como de carga parasitária baixa, indivíduos com médias de 100 – 399 OPG como de carga parasitária moderada e indivíduos com médias de OPG 400 ou superior como de alta carga parasitária (WHO, 2020).

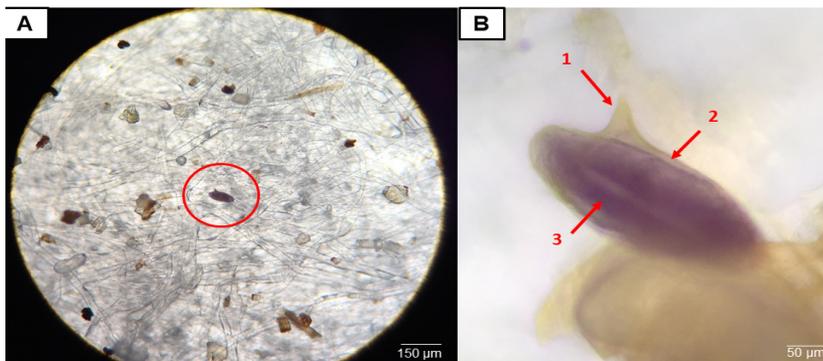
Entretanto, a técnica de Kato-Katz apresenta limitações na detecção de infecção entre indivíduos com baixa carga parasitária que vivem em áreas com baixa taxa de transmissão da doença (De Vlas & Gryseels, 1992; Gryseels & De Vlas, 1996; Enk

et al., 2008, Sousa *et al.*, 2017, Oliveira, 2018), podendo levar à falha na detecção de até 74% dos casos (Sousa *et al.*, 2017; 2019; 2020). Para tentar minimizar esta falha, recomenda-se a coleta de mais de uma amostra de fezes, em dias consecutivos, além de variação do número de lâminas confeccionadas para análise (De Vlas & Gryseels, 1992; Gryseels, 1996; Enk *et al.*, 2008, Sousa *et al.*, 2017).

O Método Helmintex®

Descrito por Teixeira e colaboradores (2007), o método parasitológico de Helmintex® utiliza 30 gramas de material fecal para análise de presença de ovos de *Schistosoma mansoni*. A técnica consiste primeiramente na sedimentação das fezes coletadas e posteriormente na atração de ovos de parasitos por meio de esferas paramagnéticas que geram um campo magnético. A visualização dos ovos deve ser feita em papel de filtro, seguindo critérios como: coloração em roxo, tamanho, forma e definição de espículo (Imagem 7) (Sousa *et al.*, 2019).

Imagem 7: Ovo de *S. mansoni* em lâmina de Helmintex; **A**: Lâmina de Helmintex com ovo de *S. mansoni* ao centro; **B**: Ovo de *S. mansoni*, com indicações de espículo lateral (1), casca do ovo definida (2) e miracídio corado em roxo (3).



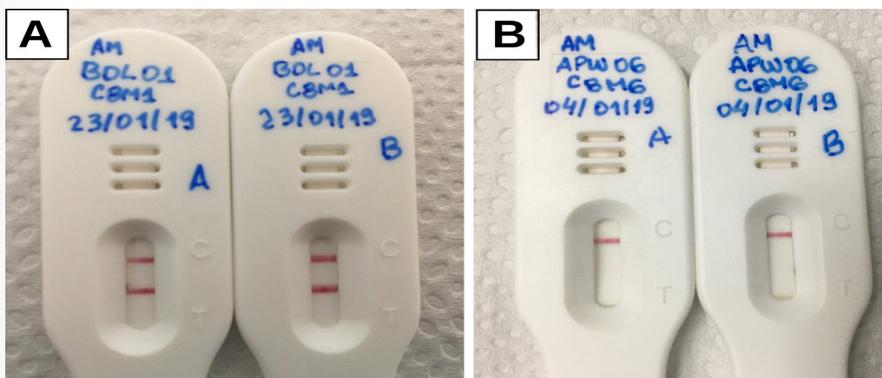
Fonte: Acervo do Laboratório de Parasitoses Intestinais e Esquistossomose/Instituto Evandro Chagas/SVS/MS (2020).

Atualizado em 2017, o Helmintex® vem demonstrando ser um método diagnóstico auxiliar para detecção de indivíduos infectados com baixo número de ovos presentes nas fezes, detectando um maior número de positivos. Apesar de ter sido desenvolvido especificamente para *S. mansoni*, este método capta também ovos de outros helmintos como *Ascaris lumbricoides*, Ancilostomídeos e *Tricuris trichiura* (Favero *et al.*, 2017).

Point of Care Circulating Cathodic Antigen (POC-CCA)

Este é um teste imunocromatográfico *Point of care*, destinado a detecção presuntiva qualitativa de uma infecção ativa por *S. mansoni* que tem como objetivo a detecção de antígenos CCA do verme na urina do indivíduo infectado (De Clercq *et al.* 1997). Para aplicação, coleta-se urina com uma pipeta e adiciona-se uma gota no orifício circular do teste, em seguida, aplica-se uma gota do reagente disponibilizado no kit para finalizar o teste. O antígeno CCA, se presente na amostra, se liga a anticorpos monoclonais marcados que se encontram imobilizados na membrana da amostra. A solução então corre sobre a tira onde o complexo antígeno-anticorpo se liga a outro anticorpo monoclonal imobilizado na linha de teste. Uma linha de coloração avermelhada se desenvolve, a segunda linha funciona como controle, devendo sempre aparecer para garantir que o teste funcione corretamente. A intensidade da linha é qualitativamente relacionada com a intensidade da infecção (Imagem 8).

Imagem 8 – Teste POC-CCA; **A**: Teste com detecção de positivo; **B**: Teste negativo.



Fonte: Acervo do Laboratório de Parasitoses Intestinais e Esquistossomose/Instituto Evandro Chagas/SVS/MS (2020).

Todos os testes devem ser lidos dentro de um período de 20 a 25 minutos após aplicação do reagente e qualquer resultado obtido fora deste período deve ser considerado inválido e deve ser repetido. Qualquer teste em que a linha controle permaneça azul também deve ser desconsiderado (Rapid Medical Diagnostics, 2015).

Estudos recentes vêm mostrando que o teste imunocromatográfico apresenta potencial como ferramenta auxiliar no diagnóstico da esquistossomose em áreas de média e alta prevalência (Coley *et al.*, 2013). Entretanto, a presença de resultados de falsos positivos e negativos do teste, especialmente em áreas de baixa prevalência, ainda é uma barreira para seu uso como método diagnóstico em larga escala (Sousa *et al.*, 2020).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

A PCR é uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, usada no diagnóstico de muitas doenças infecciosas. Sua alta sensibilidade para *S. mansoni* é atribuída aos 121 pares de base (bp) em repetição na sequência do DNA do trematódeo, abrangendo pelo menos 12% do seu genoma (Abdel-Hafeez *et al.*, 2015).

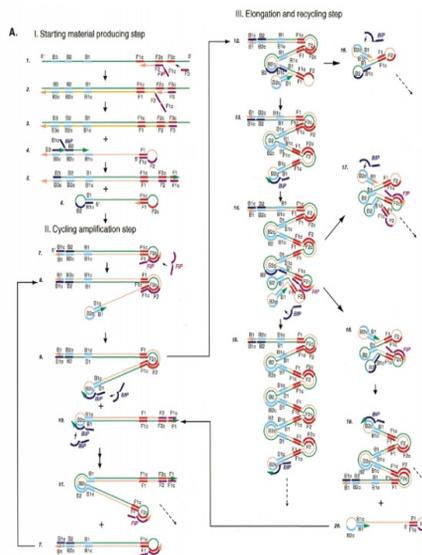
Estudos vem demonstrando alta sensibilidade da PCR em áreas com indivíduos de baixa carga parasitária (menos de 100 ovos por grama de fezes) (Pontes *et al.*, 2003; Wichmann *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2010; Bergquist *et al.*, 2015). A sensibilidade de detecção do DNA do parasita e a facilidade na utilização de diferentes amostras biológicas, como sangue, urina, fezes e biópsias são algumas das vantagens mais citadas (Pontes *et al.* 2003; Sandoval *et al.* 2006; Wichmann *et al.*, 2009; Kjetland, 2009). Entretanto, a aplicação em campo não é satisfatória por apresentar restrições como alto custo, dificuldades de extração de DNA no material biológico escolhido, a exemplo o caso das fezes, pois estas necessitam ter ovos para adequada extração do DNA e resultados de falsos negativos já foram relatados, especialmente devido a degradação da amostra biológica por manejo incorreto de transporte de campo (Engels *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2012, Ogongo *et al.*, 2018).

Diferente da PCR convencional que analisa apenas qualitativamente a presença de DNA no material biológico em análise, a PCR em tempo real é um método de diagnóstico parasitológico quantitativo e qualitativo, que reduz a contaminação e o tempo da reação, podendo chegar a resultados rápidos com diferentes amostras biológicas. Além disso, a detecção de positivos por PCR em tempo real tem superado os métodos coproscópicos, detectando de 13% a 15% de positivos a mais com apenas uma amostra (Oliveira *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2012; Meurs *et al.*, 2015).

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)

Este método tem a capacidade de amplificar a cadeia de DNA sob condições isotérmicas com alta especificidade, permitindo a visualização direta dos resultados através da coloração da amostra (Tomita *et al.*, 2008; Notomi *et al.*, 2000). Consiste no uso de DNA polimerase e mais quatro primers designados especialmente para reconhecer seis sequências distintas no DNA alvo. Os primers iniciais são denominados FIP (*forward inner primer*) e BIP (*backward inner primer*), cada um contendo sequências direta e reversa do DNA alvo, uma para o primeiro estágio e a outra para auto-replicação da sequência nos estágios finais. O primer iniciador dá o *start* no processo, resultando em um DNA de fita simples e servindo de modelo para a síntese iniciada pelos primers que se ligam à outra extremidade do alvo, produzindo uma estrutura de DNA *haste-loop*. Em sequência, um primer interno hibridiza com a haste e inicia a síntese de DNA por deslocamento, resultando no DNA original e um novo DNA haste duas vezes mais longo, com 10^9 cópias do DNA alvo em menos de uma hora. Ao final, serão produzidas várias cópias do DNA alvo em repetições invertidas, diversos tamanhos e em estruturas com diversas laçadas formadas por recozimento entre repetições alternadamente invertidas do alvo na mesma fita, com formato em “couve-flor” (Figura 5) (Notomi *et al.*, 2000).

Figura 5: Representação esquemática do mecanismo do LAMP, com passo a passo da reação.



Fonte: Notomi *et al.* (2000).

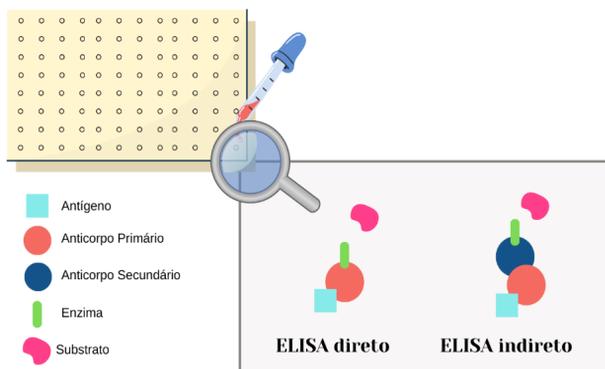
O LAMP é uma ferramenta diagnóstica que soma no campo dos testes *point-of-care* e, apesar de ainda possuir diversas limitações, vem mostrando bons resultados relacionados à esquistossomose mansônica, com testes aplicados em amostras de urina e fezes, demonstrando alta sensibilidade (Price *et al.*, 2019), o que pode abrir caminho para sua aplicação em campo, dando suporte à campanhas de controle e eliminação da esquistossomose mansônica (Mwangi *et al.*, 2018; Diego *et al.*, 2019).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O ELISA é uma técnica baseada na interação antígeno-anticorpo. O conceito foi descrito primeiramente por Miles & Hales, em 1968, entretanto o emprego de conjugados enzimáticos em imunoenaios foi relatado independentemente pelos grupos de Engvall, Johnson & Perlmann e Van Weemen & Schuurs, em 1971.

Os mais comuns tipos de ELISA são os testes direto e indireto (Figura 6). No ELISA direto, um antígeno pré-selecionado é fixado a uma microplaca (placas de ELISA). Em seguida, o soro a ser testado é adicionado aos poços da placa e, se os anticorpos alvo estiverem presentes no soro, estes se ligarão ao antígeno do poço. Por fim, é adicionado substrato que irá ligar-se à enzima ligada ao anticorpo, reagindo e formando a coloração (a qual varia de acordo com o substrato). Já no ELISA indireto, um segundo anticorpo é acrescentado, para só então o substrato ser adicionado à amostra. O substrato se liga à enzima conectada ao anticorpo secundário e reage, formando a cor (Engvall, Johnson & Perlmann, 1971).

Figura 6: Esquema da reação para o teste ELISA, exemplificando os testes direto e indireto.



Fonte: Acervo do Laboratório de Parasitoses Intestinais e Esquistossomose/Instituto Evandro Chagas/SVS/MS (2020).

Na esquistossomose, este teste é considerado como método diagnóstico direto, pois verifica a presença de antígeno circulante secretado pelo verme adulto. Ele utiliza anticorpos monoclonais do parasito e apresenta especificidade de 100%, sensibilidade variando de 75% a 90% (dependendo da prevalência) e eficiência diagnóstica de 92%. Nele são empregadas placas de poliestireno com antígenos solúveis adsorvidos para identificação de anticorpos IgG, IgM e IgA. O IgG pode permanecer detectável por longos períodos de tempo, mesmo após a cura parasitológica dos pacientes, o que o torna um método diagnóstico complementar (Oliveira *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2018).

NOVOS MÉTODOS DE ANÁLISE PARA *S. mansoni*: A ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA O RNA Seq

O transcriptoma pode ser definido como uma coleção de genes transcritos em um organismo, tecido ou célula. Este tem sido extremamente útil para a descoberta e elaboração de modelos de genes (Oliveira, 2007), assim como identificar suas funções e vias as quais respondem a estímulos externos, como estresse ambiental, por exemplo (Blumenberg *et al.*, 2019). A partir do transcriptoma é possível catalogar os RNAs transcritos, determinar a estrutura transcricional dos genes e quantificar os níveis de expressão de mudança de cada transcrição durante o desenvolvimento e sob diferentes condições, possibilitando a interpretação dos elementos funcionais do genoma assim como a compreensão dos processos moleculares ligados aos aspectos de resistência, desenvolvimento e fisiologia de uma espécie a doenças (Wang, Gerstein & Snyder, 2009; Kenny, García & Grande, 2016).

Para se estudar a expressão gênica e identificar novos tipos de RNA, a técnica de sequenciamento por RNA (RNA-Seq) oferece uma de faixa de detecção mais eficaz. O RNA-Seq revela diretamente a identidade da sequência, crucial para a análise de genes, permitindo entender como o perfil de expressão de um determinado organismo é alterado, por exemplo, ao ser submetido a uma determinada condição (Hrdlickova, Toloue & Tian, 2016).

Recentemente, estudos envolvendo a análise de RNA-Seq em espécies do gênero *Schistosoma*, em particular *S. mansoni* e *S. japonicum*, abordaram dados como padrões de expressão e características de genes dependentes do sexo, específicos do tecido e associados ao hospedeiro, permitindo visualizar mais a fundo a biologia do desenvolvimento do esquistossomo, das interações parasita-hospedeiro e da patogênese da esquistossomose (Mao *et al.*, 2019).

Um melhor entendimento sobre os mecanismos celulares envolvidos na interação parasito-hospedeiro do *S. mansoni* pode ser capaz de revelar pontos vulneráveis a serem utilizados como potenciais novas ferramentas de controle relacionadas à doença (Wangwiwatsin, *et al.*, 2020).

A detecção de genes específicos ligados a fatores como maturação, postura de ovos ou à fase de vida do trematódeo viabiliza meios para a criação de vacinas, por exemplo, que possam agir diretamente em vias metabólicas do parasito, almejando afetá-lo. Em áreas endêmicas onde o tratamento em massa é utilizado, métodos mais eficazes de controle da doença evitariam a disseminação da resistência medicamentosa, assim como a continuidade da disseminação de genes resistentes (Butterworth, 1993; Wang, Wang & Liang, 2012; Couto, 2014).

TRATAMENTO

Atualmente o medicamento utilizado para esquistossomose é o Praziquantel. Este foi introduzido na rotina do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) em 1996 e atualmente continua sendo o único medicamento utilizado para controle desta enfermidade. É apresentado na forma de comprimidos de 600mg que devem ser administrados por via oral, em dose única de 50mg/kg para adultos e de 60mg/kg para crianças, devendo ser ingeridos também após refeição. O Praziquantel é empregado em larga escala, com ampla margem de segurança e bons resultados, exceto nos casos com contraindicação formal. Os efeitos adversos costumam ser leves e transitórios, destacando-se: gosto metálico, dor abdominal, diarreia, astenia (fraqueza), cefaleia (dor de cabeça) e tonturas (Brasil, 2014; WHO, 2020).

PREVENÇÃO E CONTROLE

Na década de 1980, foi criado o Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) que tinha como objetivo diminuir as infecções por *S. mansoni* no Brasil, passando então a realizar exames coproscópicos pelo método de Kato-Katz como diagnóstico recomendado pela Organização Mundial da Saúde. Entretanto, dificuldades para o efetivo controle, como carência de saneamento adequado e falta de estratégias governamentais específicas para as populações em área de risco tem facilitado a continuidade da doença (Brasil, 2014).

Neste sentido, o controle a esquistossomose pode concentrar-se na redução das formas graves da doença a partir da detecção de indivíduos acometidos, assim como o tratamento periódico e em larga escala da população com o Praziquantel (Quadro 1). Entretanto, deve-se atentar também para modelos de diagnósticos mais eficazes, pois em áreas de baixa prevalência a maioria dos indivíduos infectados são assintomáticos, apresentando baixa carga parasitária, menos que 100 ovos por gramas de fezes, e, conseqüentemente, dificultando sua detecção com o método Kato-Katz, gerando falsos negativos (Sousa *et al.*, 2020). A vigilância deve ser mantida de dois em dois anos em média, priorizando localidades com taxa de positividade maior que 25% (Brasil 2014; WHO, 2020).

Quadro 1 – Estratégias de tratamento de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* segundo percentual de positividade.

Percentual de Positividade da População em Áreas de Risco para Esquistossomose	Estratégia de Tratamento
Menor de 15%	Tratar somente pacientes com exames de fezes positivos.
Entre 15 e 25%	Tratar pacientes com exames de fezes positivos e os conviventes.
Maior que 25%	Tratar toda a localidade.

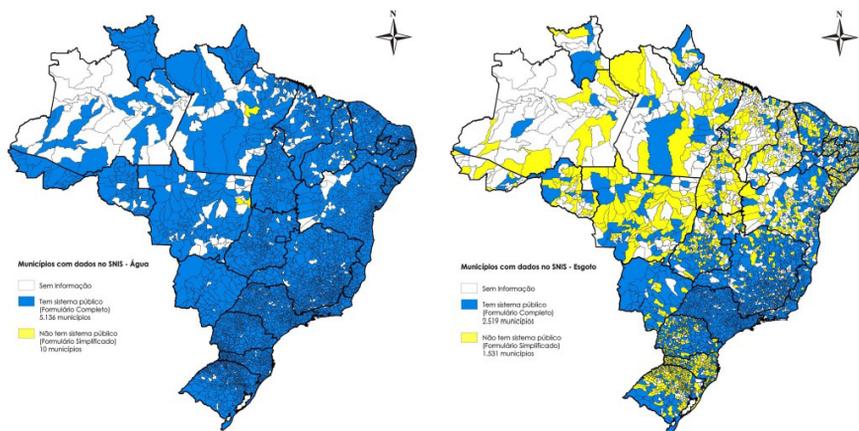
FONTE: Brasil, 2014, p. 83.

Além da administração de medicamentos e controle direto de hospedeiros intermediários através de medidas sanitárias, as ações de educação em saúde é um importante aliado na prevenção e controle da esquistossomose pois conscientizam a população a inserir no seu dia a dia cuidado e precaução, evitando contato com áreas contaminadas e a não contaminação do ambiente com fezes. O acesso a água potável e saneamento também são medidas imprescindíveis de saúde, as quais são de extrema importância não apenas para a esquistossomose, como para o controle de outros helmintos (Inobaya *et al.*, 2014).

A aplicação de moluscidas para o controle dos caramujos no Brasil não é utilizada em larga escala, levando em conta a agressão química à flora e fauna aquáticas (Brasil, 2014).

Em 2019 o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS) publicou um documento contendo informações sobre o diagnóstico dos serviços de água e esgoto em todo o território brasileiro, dentre as informações expostas, destaca-se a região sul, sudeste e centro-oeste com mais de 95% de taxa de atendimento de redes água por prestadores de serviços públicos, como companhias estaduais, empresas e autarquias municipais, empresas privadas e, em muitos casos, pelas próprias prefeituras. Já em relação a prestação de serviço de esgoto, somente a região sudeste destaca-se com 84% de taxa de atendimento. O tratamento deste esgoto gerado não chega a 47% em território nacional. Vale ressaltar que a região amazônica apresenta as menores taxas de dados coletados para abastecimento de água e esgoto (Figura 7).

Figura 7: Mapa da amostra de municípios cujos dados de abastecimento de água à esquerda e esgoto à direita estão presentes no SNIS em 2018, por tipo de formulário, segundo município.



Fonte: SNIS (2019).

O aperfeiçoamento e criação de métodos de detecção da esquistossomose capazes de unir alta sensibilidade e especificidade podem vir a ser de grande auxílio para o tratamento cada vez mais cedo do paciente, evitando a morbidade do mesmo e, o mais importante, em vista da possível futura eliminação da doença. Ainda não há um teste “padrão-ouro” estabelecido para esta ocasião.

LEITURA/MATERIAIS COMPLEMENTARES SOBRE A ESQUISTOSSOMOSE

Aspectos gerais:

1. https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab_1
2. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>
3. https://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/global_atlas/en/
4. <https://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/>

Controle e Tratamento

1. <https://www.who.int/schistosomiasis/strategy/en/>
2. <https://www.who.int/news/item/25-03-2020-schistosomiasis-elimination-refocusing-on-snail-control-to-sustain-progress>

3. <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9450>
4. <https://www.who.int/activities/reinforcing-snail-control-activities-for-schistosomiasis>
5. <https://www.who.int/activities/expanding-preventive-chemotherapy-to-all-in-need>
6. <https://www.who.int/news/item/14-12-2018-who-data-show-unprecedented-treatment-coverage-for-bilharzia-and-intestinal-worms>

Documentos e links sobre esquistossomose no mundo:

1. <https://www.who.int/schistosomiasis/resources/en/>
2. <https://www.who.int/schistosomiasis/resources/9789241503174/en/>
3. <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases>
4. https://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/global_atlas_maps/en/
5. https://www.who.int/schistosomiasis/epidemiology/Global_atlas_toc.pdf?ua=1
6. https://www.who.int/schistosomiasis/resources/by_year/en/

Esquistossomose no Museu de História Natural

1. <https://www.nhm.ac.uk/our-science/our-work/sustainability/schistosomiasis-collection.html>
2. <https://www.nhm.ac.uk/discover/parasites-in-motion-schistosomiasis.html>
3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3453491/>

Esquistossomose no Brasil

Aspectos gerais

1. <http://www.fiocruz.br/bibmang/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=92&sid=106>
2. <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2018-08/brasil-e-um-dos-paises-em-que-esquistossomose-permanece-endemica>
3. <https://portal.fiocruz.br/noticia/situacao-da-esquistossomose-no-brasil-e-investigada>
4. <https://www.campusvirtualsp.org/pt-br/esquistossomose-nas-americas-aspectos-multidisciplinares>
5. <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/publicacoes/ESQUISTOSSOMOSE.pdf>
6. <http://pide.cpqrr.fiocruz.br/index.php?pagina=1>

Inquérito Sobre esquistossomose no Brasil

1. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25662>

Diretrizes técnicas

1. http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_manoni_diretrizes_tecnicas.pdf

Guia de vigilância epidemiológica

1. <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2018/03/GUIA-DE-VIGILANCIA-EPIDEMIOLOGICA-ESQUISTOSSOMOSE-MANSICA.pdf>

Educação e saúde

1. http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/educacao_saude_controle_esquistossomose.pdf
2. <http://www.xistose.com/>

Sistema de Notificação

1. <http://portalsinan.saude.gov.br/esquistossomose>

OPAS Brasil Esquistossomose

1. https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=418:esquistossomose&Itemid=463
2. https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=list&format=html&layout=default&slug=esquistossomiase-979&Itemid=965
3. https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=document&layout=default&alias=902-obitos-por-esquistossomose-2&categoryslug=esquistossomiase-979&Itemid=965

Cursos gratuitos OPAS

1. https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5830:conheca-os-cursos-gratuitos-disponiveis-em-portugues-no-camp-us-virtual-de-saude-publica-da-opas&Itemid=844

Vídeos

1. LAMP: <https://www.youtube.com/watch?v=L5zi2P4lggw>
2. ELISA: <https://www.youtube.com/watch?v=RRbuz3VQ100>

REFERÊNCIAS

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Fact Sheets**. 2020. Disponível em <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>>. Acessado em: 08/12/2020.

CDC – Center For Disease Control. 2019. Disponível em <<https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/index.html>>. Acessado em: 08/12/2020.

GRYSEELS, B; POLMAN, K; CLERINX, J; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, 368: 1106–18, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância em Saúde no Brasil 2003|2019: Boletim Epidemiológico**. Brasília, 2019. Disponível em <<http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>. Acessado em 20/11/2020.

HOTEZ, P. J; MOLYNEUX, D. H; FENWICK, A; OTTESEN, E; SACHS, S. E; SACHS, J. D. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. **PLoS. Medicine**. 3(5): 576-584, 2006.

SAMBON, LW. Remarks on *Schistosomum mansoni*. *J Trop Med Hyg* 10: 303-304, 1907.

PIRAJÁ DA SILVA, MA. Contribuição para o estudo da Schistosomíase na Bahia. **Braz Med**; 22:281-282, 1908.

COIMBRA JR, CEA.; ENGEL, LA. Suscetibilidade de *Biomphalaria occidentalis* do Acre e Mato Grosso à infecção pelo *Schistosoma mansoni* e sua implicação na epidemiologia da esquistosomose na Amazônia Ocidental, Brasil. **Acta Amazônica**. 12 (4): 795-799, 1982.

SOUZA, CP; CALDEIRA, RL; DRUMMOND, SC; MELO, AL; GUIMARÃES, CT; SOARES, DM; CARVALHO, OS. Geographical Distribution of Biomphalaria Snails in the State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 96 (3): 293-302, 2001.

CARVALHO, OS; CALDEIRA, RL. **Identificação morfológica de *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni***. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz, 2004.

GOVEIA, CO; GUIMARÃES, RJPS; NUNES, MRT; DIAS, IHL; ENK, MJ. Schistosomiasis in the Amazon Region: malacological surveys of intermediate hosts for the identification of disease transmission areas in Belém, Pará, Brasil. **J. Pharm. Pharmacol.**, (7):51-60, 2019.

CARVALHO, OS; CALDEIRA, RL. **Identificação morfológica de *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni***. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz, 2004.

McMANUS, D.P; DUNNE, DW; SACKO, M; UTZINGER, J; VENNERVALD, BJ; ZHOU, X.-N. Schistosomiasis. **Nat. Rev. Dis. Primers**, 4(1). doi:10.1038/s41572-018-0013-8, 2018.

SOUZA, F. P. C; VITORINO, R. R; COSTA, A. P; FARIA JR, F. C; SANTANA, L. A; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica- aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Ver. Bras. Clin. Med.** 9 (4): 300-7, 2011.

HOGG, K. G; KUMBATE, S; ANDERSON, S; *et al.* Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c β and F4/80 β cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. **Infect. Immun.** 71(6):3563-71, 2003.

KOURILOVÁ, P; HOGG, K. G; KOLÁROVÁ, L; *et al.* Cercarial dermatitis caused by bird Schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions. **J. Immunol.** 172(6):3766-74, 2004.

CHEEVER, AW; HOFFMANN, KF; WYNN, TA. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol. Today.** [letter] 21: 465-466, 2000.

PEARCE, E. J. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasite. Immunol.** 27: 265-270, 2005.

DUNNE, DW; PEARCE, EJ. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. **Microbes Infectv**, 1: 533-560, 1999.

DE JESUS, AR; SILVA, A; SANTANA, LB; MAGALHAES, A; DE JESUS, AA; DE ALMEIDA, RP; REGO, MA; BURATTINI, MN; PEARCE, EJ; CARVALHO, EM. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J Infect Dis**, 185: 98-105, 2002.

PEARCE, EJ; MACDONALD, AS. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Rev. Immunol**, 2: 499-511, 2002.

WYNN, TA; THOMPSON, RW; CHEEVER, AW; MENTINK-KANE, MM. Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunol Rev**, 201: 156–167, 2004.

BARTLEY, PB; RAMM, GA; JONES, MK; RUDELL, RG; LI, Y; MCMANUS, DP. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. **Int J Parasitol**, 36: 993-1001, 2006.

WILSON, MS; MENTINK-KANE, MM; PESCE, JT; RAMALINGAM, TR; THOMPSON, R; WYNN, TA. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol**. 85(2):148–54, 2007.

ROCHA, IC. Participação de IL-33 na formação e modulação do granuloma hepático em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*. 141f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2015.

GRZYCH, JM; PEARCE, EJ; CHEEVER, A; CAULADA, ZA; CASPAR, P; HIENY, S; LEWIS, F; SHER, A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine Schistosomiasis mansoni. **J. Immunol**. 146:1322–1327, 1991.

INOBYA, MT; OLVEDA, RM; CHAU, TNP; OLVEDA, DU; ROSS, AGP. Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. **Res Rep Trop Med.**, (5): 65–75. doi:10.2147/RRTM.S44274, 2014.

DE COCK, KM. Hepatosplenic schistosomiasis: a clinical review. **Gut.**, 27(6):734-45. doi: 10.1136/gut.27.6.734, 1986.

MACHADO, MM; ROSA, ACF; OLIVEIRA, IRS; CERRI, GG. Aspectos ultrasonográficos da esquistossomose hepatoesplênica. **Radiol Bras**, 35(1):41–45, 2002.

SOUSA, MS. Up-Convertingphosphor-lateral flow CAA, KATO KATZ e POC-CAA: uma análise comparativa no diagnóstico da infecção por *Schistosoma mansoni* em uma área de baixa endemicidade. (Dissertação). Departamento de patologia e medicina legal. UFCE. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. Editora MS – 4ªed. Brasília, 2014.

ZHU, YC. Immunodiagnosis and its role in Schistosomiasis control in China: a review. **Acta Trop**. V. 96, p.130-136, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Bench Aids for the diagnosis of intestinal parasites**. 1994. Disponível em <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37323/9789241544764_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acessado em: 09/12/2020.

KATZ, N; CHAVES, A; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. **Rev Inst Med Trop**, **14**:397-400, 1972.

DE VLAS, SJ; GRYSEELS, B. Underestimation of *Shistosoma mansoni* Prevalences. **Parasitol. Today**. **8** (8), 1992.

GRYSEELS, B; DE VLAS, SJ. Worm burden in schistosome infection. **Parasitol Today**, **12**: 115-119, 1996.

ENK, MJ; LIMA, AC; MASSARA, CL; COELHO, PM; SCHALL, VT. A combined strategy to improve the control of *Schistosoma mansoni* in areas of low prevalence in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **78** (1): 140-6, 2008.

SOUSA, SRM; CARVALHO, AQ; CARDOSO, JFN; COELHO, PMZ; GEIGER, SM; ENK, MJ. Schistosomiasis In The Amazon Region: Is The Current Diagnostic Strategy Still Appropriate? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** doi:10.1590/0037-8682-0097-2017, 2017.

OLIVEIRA, WJ; MAGALHÃES, FC; ELIAS, AMS; CASTRO, VN; FAVERO, V; LINDHOLZ, CG; *et al.* Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic area with low parasite loads: Saline gradient, Helminthex, Kato-Katz and rapid urine test. **PLOS Negl. Trop. Dis.** doi: 10.1371/0006-232, 2018.

SOUSA, SRM; DIAS, IHL; FONSECA, ALS; CONTENTE, BR; NOGUEIRA, JFC; OLIVEIRA, TNC; GEIGER, SM; ENK, MJ. Concordance of the point-of-care circulating cathodic antigen test for the diagnosis of intestinal schistosomiasis in a low endemicity area. **Infect. Dis. Poverty**, 8:37, 2019.

SOUSA, SRM; NOGUEIRA, JFC; DIAS, IHL; FONSECA, ALS; FAVERO, V; GEIGER, SM; ENK, MJ. The use of the circulating cathodic antigen (CCA) urine cassette assay for the diagnosis and assessment of cure of *Schistosoma mansoni* infections in an endemic area of the Amazon region. **Rev Soc Bras Med Trop**, Vol.:53:(e20190562), 2020.

TEIXEIRA, CF; NEUHAUSS, E; BEN, R; ROMANZINI, J; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in faeces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. **PLoS Negl Trop Dis**, 1: e73, 2007.

SOUZA, RP; FAVERO, V; PASCOAL, VF; LINDHOLZ, C; BITTENCOURT, HR; TEIXEIRA, CG. Criteria for identification of *Schistosoma mansoni* eggs in faecal sediments prepared with the Helminx method and stained by ninhydrin. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. doi: e180529, 2019.

FAVERO, V; CANDIDO, RRF; VERISSIMO, CDM; JONES, MK; PIERRE, TGS; LINDHOLZ, CG; DA SILVA, VD; MORASSUTI, AL; GRAEFF-TEIXEIRA, C. Optimization of the Helminx method for schistosomiasis diagnosis. **Exp Parasitol**, doi: 10.1016/j.exppara.2017.04.001, 2017.

DE CLERCQ, D; SACKO, M; VERCRUYSSSE, J; BUSSCHE, VV; LANDOURÉ, A; DIARRA, A; GRYSEELS, B; DEELDER, A. Assessment of cure by detection of circulating antigens in serum and urine, following schistosomiasis mass treatment in two villages of the Office du Niger, Mali. **Acta Trop**. **68**: 339-346, 1997.

RAPID MEDICAL DIAGNOSTICS. For qualitative detection of: Bilharzia (Schistosomiasis). 2015.

COLLEY, DG; BINDER, S; CAMPBELL, C; KING, CH; TCHUENTÉ, LAT; N'GORAN, EK; ERKO, B; KARANJA, DMS; KABATEREINE, NB; LIESHOUT, LV; RATHBUN, S. A Five-Country Evaluation of a Point-of-Care Circulating Cathodic Antigen Urine Assay for the Prevalence of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **88** (3): 426-432, 2013.

ABDEL-HAFEEZ, EH; MOHAMED, RM; BELAL, US; ABDEL-RAHEEM, EM; NAOI, K; NOROSE, K. Polymerase Chain Reaction: A Better Method for Diagnosing Chronic *Schistosoma mansoni* Infections. *Trop Med and Health*, Vol. 43 No.4, 205-209, 2015.

PONTES, LA; OLIVEIRA, MC; KATZ, N; DIAS-NETO, E; RABELLO, A. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **68**(6), 652-656, 2003.

WICHMANN, D; PANNING, M; QUACK, T; KRAMME, S; BURCHARD, GD; GREVELDING, C; DROSTEN, C. Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma. **PLoS Negl Trop Dis**, **3**(4), e422, 2009.

OLIVEIRA, LM; SANTOS, HL; GONÇALVES, MM; BARRETO, MG; PERALTA, JM. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** **68**: 416-421, 2010.

BERGQUIST, R; YANG, GJ; KNOPP, S; UTZINGER, J; TANNER, M. Surveillance and response: Tools and approaches for the elimination stage of neglected tropical diseases. **Acta Trop**, 141:229–234, 2015.

SANDOVAL, N; SILES-LUCAS, M; ABAN, JL; PÉREZ-ARELLANO, JL; GÁRATE, T; MURO, A. *Schistosoma mansoni*: a diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. **Exp Parasitol**, 114(2), 84–88, 2006.

KJETLAND, EF; HOVE, RJ; GOMO, E; MIDZI, N; GWANZURA, L; MASON, P; *et al.* Schistosomiasis PCR in vaginal lavage as an indicator of genital *Schistosoma haematobium* infection in rural Zimbabwean women. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **81**: 1050–5, 2009.

ENGELS, D; SINZINKAYO, E; GRYSEELS, B. Day-to-day egg count fluctuation in *Schistosoma mansoni* infection and its operational implications. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **54**(4), 319–324, 1996.

CARVALHO, GC; MARQUES, LHS; GOMES, LI; RABELLO, A; RIBEIRO, LC; SCOPEL, KKG; TIBIRIÇÁ, SHC; COIMBRA, ES; ABRAMO, C. Polymerase chain reaction for the evaluation of *Schistosoma mansoni* infection in two low endemicity areas of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Vol. 107(7): 899-902, 2012.

OGONGO, P; KARIUKI, TM; WILSON, RA. Diagnosis of schistosomiasis mansoni: an evaluation of existing methods and research towards single worm pair detection. **Parasitology**, <https://doi.org/10.1017/S0031182018000240>, 2018.

MEURS, L; BRIENEN, E; MBOW, M; OCHOLA, EA; MBOUP, S; KARANJA, DMS; SECOR, WE; POLMAN, K; VAN LIESHOUT, L. Is PCR the next reference standard for the diagnosis of *Schistosoma* in stool? A comparison with microscopy in Senegal and Kenya. **PLoS Negl Trop Dis**, 9(7), e0003959, 2015.

TOMITA, N; MORI, Y; KANDA, H; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocols**, v3, n5, 2008.

NOTOMI, T; OKAYAMA, H; MASUBUCHI, H; YONEKAWA, T; WATANABE, K; AMINO, N; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v28, n12, 2000.

PRICE, M; CYRS, A; SIKASUNGE, CS; MWANSA, J; LODH, N. Testing the Infection Prevalence of *Schistosoma mansoni* after Mass Drug Administration by Comparing Sensitivity and Specificity of Species-Specific Repeat Fragment Amplification by PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 101(1), 78–83, 2019.

MWANGI, IN; AGOLA, EL; MUGAMBI, RM; SHIRAHU, EA; MKOJI, GM. Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of *Schistosoma mansoni* Infection in Faecal Samples. **J Parasitol Res**, 2018.

DIEGO, JGB; FERNANDEZ-SOTO, P; CREGO-VICENTE, B; ALONSO-CASTRILLEJO, S; FEBRER-SENDRA, B; GÓMEZ-SÁNCHEZ, A; VICENTE, B; LÓPEZ-ABÁN, J; MURO, A. Progress in loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Schistosoma mansoni* DNA: towards a ready-to-use test. **Nature Sci Rep**, 9:14744, 2019.

ENGVALL, EVA; JONSSON, K; PERLMANN, P. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY II. QUANTITATIVE ASSAY OF PROTEIN ANTIGEN, IMMUNOGLOBULIN G, BY MEANS OF ENZYME-LABELLED ANTIGEN AND ANTIBODY-COATED TUBES. **Biochim. Biophys. Acta**, 251, 427-434, 1971.

OLIVEIRA, EJ; KANAMURA, HY; DIAS, LCS; SOARES, LCB; LIMA, DMC; CIARAVOLHO, RMC. ELISA-IgM para diagnóstico da esquistossomose mansoni em área de baixa endemicidade. **Cad. Saúde Pública**, 19(1):255-261, 2003.

SONG, HB; KIM, J; JIN, Y; LEE, JS; JEOUNG, HG; LEE, YH; SAEED, AAW; HONG, ST. Comparison of ELISA and Urine Microscopy for Diagnosis of *Schistosoma haematobium* Infection. **J Korean Med Sci**, 13;33(33):e238, 2018.

OLIVEIRA, G. The *Schistosoma mansoni* transcriptome: An update. **Exp. Parasitol.** 117: 229-235, 2007.

BLUMENBERG, M. Transcriptome Analysis. Introductory Chapter: Transcriptome Analysis. **Intech Open**. DOI:10.5772/intechopen.85980, 2019.

WANG, Z; GERSTEIN, M; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat. Rev. Genet.**, 10:57-63, 2009.

KENNY, NJ; TRUCHADO-GARCIA, M; GRANDE, C. Deep, multi-stage transcriptome of the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata* provides platform for understanding molluscan disease-related pathways. **BMC Infect. Dis.**, 16:618, 2016.

HRDLICKOVA, R; TOLOUE, M; TIAN, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. **Wiley Periodicals**, 2016.

MAO, Y; HE, C; LI, H; LU, K; FU, Z; HONG, Y; JIN, Y; LIN, J; ZHANG, X; LIU, J. Comparative analysis of transcriptional profiles of *Schistosoma japonicum* adult worms derived from primary-infected and re-infected water buffaloes. **Parasite Vector.**, 12:340, 2019.

WANGWIWATSIN, A; PROTASIO, AV; WILSON, S; OWUSU, C; HOLROYD, NE; SANDERS, MJ; KEANE, J; DOENHOFF, MJ; RINALDI, G; BERRIMAN, M. Transcriptome of the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni* during intra-mammalian development. **PLoS Negl Trop Dis**, 14(5):e0007743, 2020.

BUTTERWORTH, AE. Immunology of schistosomiasis. In: Jordan P, Webbe G, Sturrock FS. Human schistosomiasis. **Wallingford: CAB International**, 331-66, 1993.

WANG, W; WANG, L; LIANG, Y-S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: A review. **Parasitol Research**, 111(5): 1871-7, 2012.

COUTO, FFB. Estudo da resistência do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 ao praziquantel. 78 f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) - Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2014.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Regional. Sistema Nacional de Informações Sobre Saneamento. Disponível em: < <http://www.snis.gov.br/painel-informacoes-saneamento-brasil/web/painel-setor-saneamento>>. Acessado em: 09/12/2020.

POSFÁCIO

Caros leitores, neste momento em que passam os olhos por esta página, eu espero que já tenham vasculhado este volume em busca de informações, as tenham encontrado e que estas tenham sido útil na vida clínica ou de pesquisa de vocês.

O livro foi pensado com o intuito de colaborar com as discussões mais recentes a cerca dos agentes infecciosos e parasitários no ambiente amazônico e o faz com extrema competência e elegância, pois foi escrito e produzido com esmero por pessoas que dedicaram muitos anos e esforços ao tema.

Fico feliz de participar da iniciativa e de poder colaborar com as discussões a cerca das particularidades da atenção à saúde na Amazônia, com todas as suas idiossincrasias e dificuldades. O livro também traz em seu subtexto a ideia de que apesar das dificuldades encontradas, o caminho para a resolução dos problemas em saúde passa pelo conhecimento científico, a competência e a colaboração entre pessoas e instituições. Nada mais verdadeiro.

Que venham os próximos volumes.

Otávio Augusto B. Soares

**Coordenador do Grupo de Pesquisa em Saúde Militar
Escola de Saúde do Exército, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.**