

Artigo original

Estudo descritivo: histopatologia e imuno-histoquímica para a detecção de patógenos em amostras de fauna selvagem recebidas pelo Instituto Adolfo Lutz, Brasil

Descriptive study: histopathology and immunohistochemistry for detection of pathogens in wild fauna samples received by Adolfo Lutz Institute, Brazil

Alessandra Loureiro Moraes dos Santos^{I,III*}, Filipe Onishi Nagamori^{*}, Isis Paixão de Jesus^I, Camila Santos da Silva Ferreira^I, Paloma Martins do Nascimento^I, Sandra Alves da Silva^I, Julia de Carvalho^I, Ticiania Martins Zwarg^{III}, Amanda Aparecida Cardoso Coimbra^{III}, Thais Sanches^{III}, Bruno Petri^{IV}, Líliliane Milanelo^{IV}, Rosângela Santos de Araújo^I, Silvana de Mello Pereira da Silva^I, Rodrigo Albergaria Ressio^I, Cinthya dos Santos Cirqueira^I, Cristina Takami Kanamura^I, Juliana Mariotti Guerra^I, Leila Del Castillo Saad^V, Roberta M. Fernandes Spinola^V, Gizelda Katz^V, Mariane Ingara de Moraes Costa^I, José Luiz Catão Dias^{II} e Natália Coelho Couto de Azevedo Fernandes^{III}.

^ICentro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças/ Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo. ^{II}Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens, Departamento de Patologia, FMVZ-USP, São Paulo. ^{III}Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestre (CeMaCAS), Divisão da Fauna Silvestre, da Prefeitura do Município de São Paulo, São Paulo. ^{IV}Centro de Triagem de Animais Silvestres, Parque Ecológico do Tietê, São Paulo. ^VCentro de Vigilância Epidemiológica Alexandre Vranjac, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado de Saúde, São Paulo. São Paulo, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Descrever a casuística de fauna selvagem avaliada no ano de 2019, em laboratório de referência do Estado de São Paulo, Brasil, por meio de análises histopatológicas e imuno-histoquímicas após a implantação de um programa piloto de vigilância laboratorial. **Métodos:** estudo descritivo, com levantamento de amostras de primatas não-humanos, aves e outros mamíferos, recebidas de dois centros de triagem do município de São Paulo. Para tal, foram revisadas as fichas de encaminhamento, relatórios histopatológicos e imuno-histoquímicos emitidos e os dados foram tabulados em planilhas e analisados por distribuição de frequências e porcentagens. **Resultados:** foram recebidos 233 animais, de 20 gêneros e/ou espécies distintas, sendo 191 (81,9%) primatas não-humanos, 25 aves (10,7%), e 17 outros mamíferos (7,3%); foram detectados patógenos zoonóticos diversos na população estudada, e houve prevalência de quadros bacterianos, dentre os casos conclusivos. **Conclusões:** a implantação de um programa piloto de vigilância laboratorial de fauna selvagem permitiu a detecção de patógenos de interesse em saúde pública de forma a contribuir com uma avaliação preliminar do estado sanitário das populações selvagens do município de São Paulo, Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: Saúde Pública. Saúde Única. Zoonoses. Patologia. Imuno-Histoquímica.

*Ambos compartilham primeira autoria.

Agências de fomento

1. Grupo de Apoio às Políticas de Prevenção e Proteção à Saúde/Fundo Especial de Saúde para Imunização em Massa e controle de Doenças/ Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP (40/19).

2. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo de mestrado à Alessandra (PROEX/ 88887.374652/2019-00).

Estudo descritivo: histopatologia e imuno-histoquímica para a detecção de patógenos em amostras de fauna selvagem recebidas pelo Instituto Adolfo Lutz, Brasil/Santos ALM et al.

ABSTRACT

Objective: describe wild fauna casuistry data evaluated in 2019, in a reference laboratory in the State of São Paulo, Brazil, through histopathological and immunohistochemical analysis after the implementation of a pilot project of wildlife disease laboratory surveillance. **Methods:** descriptive study with survey of samples of non-human primates, birds and other mammals, received from two screening centers in the city of São Paulo. For this purpose, the referral forms and the issued histological and immunohistochemical reports were reviewed and data was tabulated and analysed by frequency and percentage distribution. **Results:** 233 animals of 20 distinct genera and/or species were received, being 191 (81,9%) non-human primates, 25 birds (10,7%) and 17 other mammals (7,3%); zoonotic pathogens were detected among the studied population, with a prevalence of bacterial conditions among the conclusive cases. **Conclusion:** histological and immunohistochemical analysis of wild fauna samples due the implementation of a wildlife disease laboratory surveillance pilot program contributed to the detection of some pathogens of public health relevance in Sao Paulo city, Brazil.

KEYWORDS: Public Health. One Health. Zoonoses. Pathology. Immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

O Brasil detém uma das biodiversidades mais ricas do mundo e a fauna selvagem pode ser fonte direta de infecção por patógenos que afetam o homem, com importância em saúde pública. Há pelo menos 144 patógenos derivados da fauna selvagem que afetam o homem.¹ Dos 1407 patógenos identificados que podem acometer o ser humano, 58% são zoonóticos,² tornando o estudo das zoonoses fundamental para a saúde pública. Cerca de três quartos das doenças zoonóticas são circulantes em animais em vida livre e a incidência dessas doenças é crescente, principalmente devido ao aumento da interação do homem com animais selvagens.³ As modificações demográficas, populacionais e ambientais humanas propiciam a emergência (doenças novas ou recém-identificadas) e reemergência (doenças que sofrem modificação do padrão epidemiológico e voltam a representar risco) de diversas doenças infecciosas,⁴ muitas vezes

negligenciadas no contexto global de saúde pública.⁵

Levando em consideração a saúde pública, uma nova abordagem vem ganhando destaque, chamada “*One Health*”, ou Saúde Única, visão que busca o entendimento da integração e interligação entre as saúdes humana, animal e do meio ambiente para a predição e controle de doenças nessas diferentes interfaces,^{6,7} sendo necessária a colaboração de uma equipe multissetorial e transdisciplinar. É compromisso moral e ético da humanidade manter a diversidade biológica, conhecer o estado sanitário dos animais, impedir a extinção das espécies animais e proteger a população humana e de animais domésticos da introdução de doenças.⁸ Para tal, a estruturação de uma vigilância laboratorial, com diagnóstico ágil e preciso dos patógenos nas amostras animais torna-se importante.

A vigilância e o monitoramento podem ser realizados pela colheita “passiva” de amostras

ou, por um processo “ativo”. A vigilância passiva decorre da colheita de material para testes de diagnóstico como resultado da mortalidade natural em vida livre, durante a reabilitação, ou provocada pela população humana (acidentalmente ou incidentalmente), estabelecendo uma varredura da situação sanitária no local pesquisado. Já a vigilância ativa (ou direcionada) ocorre quando os animais são amostrados proativamente (vivos ou mortos), especificamente com o objetivo de examiná-los.⁹

A vigilância de fauna selvagem está prevista na portaria ministerial consolidada nº4 de 2017, a qual lista óbito de animais silvestres com causa desconhecida, como eventos de saúde pública, epizootias de notificação compulsória imediata.¹⁰ Doenças com potencial epidêmico, como por exemplo a Febre Amarela e a Febre do Nilo Ocidental, podem ser detectadas precocemente nas populações selvagens, permitindo adoção de medidas de prevenção e controle, antecipando ressurgimentos espaciais e temporais, atuando como uma ferramenta essencial para a proteção da saúde humana.

Patógenos podem disseminar-se para hospedeiros humanos (processo conhecido como *spillover*)¹¹ a partir de hospedeiros vertebrados selvagens. Como exemplo da importância da interligação entre os estudos de fauna selvagem e a saúde pública, vivemos, pela terceira vez no século XXI, a emergência de um coronavírus de origem zoonótica¹² (Sars-CoV-2), responsável por uma pandemia com grandes agravos à saúde da população humana e também à economia e política mundial.

Este estudo pretende descrever a casuística da fauna selvagem avaliada por meio de análises

histopatológicas e imuno-histoquímicas, no ano de 2019, após a implantação de um programa piloto de vigilância laboratorial passiva de fauna selvagem na cidade de São Paulo.

METODOLOGIA

Estabelecimento da vigilância laboratorial de fauna selvagem

Foi estabelecida, no ano de 2019, pelo Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, com apoio do Centro de Vigilância Epidemiológica “Alexandre Vranjac” e do Grupo de Apoio às Políticas de Prevenção e Proteção à Saúde (GAPS)/Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP, um programa piloto de vigilância laboratorial de fauna selvagem no município de São Paulo. O projeto consistia no recebimento e avaliação de amostras formolizadas de animais selvagens (de cativeiro ou vida livre) que evoluíram para óbito dentro dos limites do município de São Paulo, necropsiados em empreendimentos de fauna selecionados, suspeitos para doenças infecciosas, incluindo a expansão da investigação de patógenos para além do vírus da Febre Amarela em PNH recebidos do Estado. Há perspectiva de expansão futura para recebimento de animais selvagens (aves e mamíferos) de empreendimentos de fauna do restante do Estado de São Paulo. O Centro de Patologia (CPA) do Adolfo Lutz possui ampla experiência no uso da histopatologia como exame para distinção dos processos lesionais em amostras de necropsia, especialmente para direcionamento do diagnóstico etiológico de agentes infecciosos. Portanto, esta metodologia foi aplicada como método de triagem, complementada, quando necessário, pela imuno-histoquímica. O laboratório de

imuno-histoquímica do CPA é referência regional, macrorregional e nacional para a metodologia e possui dezenas de anticorpos para a detecção de patógenos de importância em Saúde Pública. Foram selecionados dois órgãos públicos de triagem de fauna selvagem locais, o Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres (CeMaCAS) e o Parque Ecológico do Tietê (PET), para encaminhamento de amostras formolizadas de animais de diferentes grupos taxonômicos. Todas as amostras foram encaminhadas juntamente com ficha de requisição proveniente da instituição de origem (centros de triagem), contendo informações básicas acerca do registro dos animais, como número do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), dados sobre sexo, espécie, idade e informações clínicas (quando animal de cativeiro ou tratado temporariamente em um dos centros de triagem). Todos os procedimentos foram aprovados pelo conselho técnico científico institucional. Segundo artigo 17 da instrução normativa nº 179, de 25 de junho de 2008 do Ibama, carcaças ou partes de animal da fauna selvagem deverão ser aproveitadas para fins científicos ou didáticos, em coleções ou órgãos da Agricultura ou Saúde, além da necessidade da notificação de óbitos de causa desconhecida em fauna selvagem (portaria MS consolidada nº4 de 2017).¹⁰ Os procedimentos foram aprovados na comissão de ética institucional (CEUA-IAL), sob número 03-2019.

Amostras

Trata-se de estudo descritivo, com amostras recebidas durante o ano de 2019 no Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz (CPA-IAL), de diferentes grupos taxonômicos de fauna

selvagem. As fichas de encaminhamento e os relatórios histopatológicos e imuno-histoquímicos emitidos no Sistema de Informação e Gestão Hospitalar (SIGH) foram revisados. Os dados foram tabulados em planilha Excel (Microsoft) e analisados por distribuição de frequências e porcentagens.

Primatas não humanos - PNH

Foram recebidas amostras de tecidos fixados em formalina de primatas não humanos neotropicais, de acordo com o Programa de Vigilância de Epizootias de Primatas não Humanos,¹³ encontrados mortos ou doentes.

Aves e outros mamíferos

Foram recebidas amostras de tecidos fixados em formalina de aves e outros mamíferos com causa de morte não esclarecida ou suspeita de doença infecciosa determinada no momento da necropsia, considerando (quando presente) dados de histórico, clínica e resultados de exames laboratoriais complementares.

Histopatologia

As amostras, fixadas em solução de formalina a 10% por mais de 48 horas, foram avaliadas macroscopicamente no momento da clivagem e submetidas ao processamento histológico convencional de acordo com os procedimentos operacionais padrão descritos no Programa de Gestão da Qualidade Laboratorial do Núcleo de Anatomia Patológica. Cortes de 3µm foram corados pelas técnicas histoquímicas de Hematoxilina e Eosina (HE) e outras colorações específicas julgadas necessárias de acordo com cada caso. As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico e descritas detalhadamente pelo

patologista. Dependendo do conjunto de alterações histológicas observadas, o caso pôde ser concluído como não suspeito para doenças infecciosas ou neoplásicas, sem necessidade de aplicação posterior de imuno-histoquímica. Na ocasião de alterações suspeitas para doenças infecciosas ou neoplásicas, dependendo do conjunto de achados, era selecionado painel de anticorpos caso a caso, visando a conclusão da etiologia.

Imuno-histoquímica

Para a avaliação imuno-histoquímica, cortes histológicos de 3µm em lâminas silanizadas foram desparafinizados, hidratados e, conforme o antígeno a ser pesquisado (Tabela 1), submetidos à recuperação antigênica em

panela de pressão (ác. cítrico 10 mM pH6,0) ou digestão enzimática com proteinase K a 0,2 mg/mL, seguido por bloqueio da peroxidase endógena (H₂O₂, solução de peróxido de hidrogênio a 3% 30min) e incubação *overnight* com anticorpos primários adequados para cada pesquisa, conforme descrito na tabela 1. Posteriormente, foi realizada a amplificação do sinal com micropolímeros conjugados com enzimas e revelação com cromógeno tetracloridrato de 3-3' diaminobenzidina (DAB) e contra coradas em Hematoxilina de Harris. Todas as reações foram acompanhadas conjuntamente de controles positivos (endógenos ou exógenos) e negativos, sendo que, nos últimos, ocorreu a omissão da etapa de incubação com anticorpos primários.

Tabela 1. Fauna silvestre - Painel imuno-histoquímico para determinação da origem de processos neoplásicos e agentes infecciosos, IAL/CCD/SES-SP, 2019

PROCESSOS NEOPLÁSICOS			
Anticorpo primário	Anticorpo específico	Diluição	Tipo de recuperação antigênica
AE1/AE3	Monoclonal, camundongo, Biocare	1:2000	Panela de pressão, pH 6
CD3	Policlonal, coelho, Dako	1:1000	Panela de pressão, pH 6
PAX5	Monoclonal, coelho, bc/24, Biocare	1:400	Panela de pressão, pH 6
Ki67	Monoclonal, coelho, sp6, Cell Marque	1:400	Panela de pressão, pH 6
CD138	Monoclonal, camundongo, mi15, Dako	1:1000	Panela de pressão, pH 6
Mum-1	Monoclonal, camundongo, mrq8, Cell Marque	1:1000	Panela de pressão, pH 9
Ciclina-D1	Monoclonal, coelho, sp4, Spring Bioscience	1:10	Panela de pressão, pH 9
CD23	Monoclonal, coelho, sp23, Zeta	1:100	Panela de pressão, pH 6
AGENTES INFECCIOSOS			
Anticorpo primário	Anticorpo específico	Diluição	Tipo de recuperação antigênica
Vírus da Febre amarela	Policlonal, camundongo, IAL (virologia)	1:20000	Panela de pressão, pH 6
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Monoclonal, camundongo, LGV1, Chemicon	1:500	Panela de pressão, pH 6
<i>Toxoplasma gondii</i>	Policlonal, coelho, Dako	1:1000	Panela de pressão, pH 6
Vírus do papiloma bovino	Policlonal, coelho, Dako	1:10000	Panela de pressão, pH 6
Vírus da Febre do Nilo Ocidental	Monoclonal, 3.91d, camundongo, Millipore	1:500	Proteinase K
Vírus da Raiva	Antissoro hiperimune, camundongo, IEC*	1:2000	Panela de pressão, pH 6
Herpes vírus I	Policlonal, coelho, Dako	1:20000	Sem recuperação
Herpes vírus II	Policlonal, coelho, Dako	1:20000	Sem recuperação
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Policlonal, coelho, Instituto Butantan	1:50000	Sem recuperação
<i>Rickettsia</i>	Policlonal, coelho, CDC	1:30000	Proteinase K
<i>Poxvirus</i>	Policlonal, coelho, UFRJ (instituto de biofísica)	1:4000	Panela de pressão, pH 9

RESULTADOS

Animais

Foram recebidas e avaliadas amostras de 233 animais selvagens: 191 (81,9%) PNH (175 CeMaCAS; 16 PET), 25 aves (10,7%) (17 CeMaCAS; 8 PET), e 17 outros mamíferos (7,3%) (15 CeMaCAS; 2 PET), compondo 20 gêneros e/ou espécies distintas, as quais estão identificadas no infográfico abaixo:

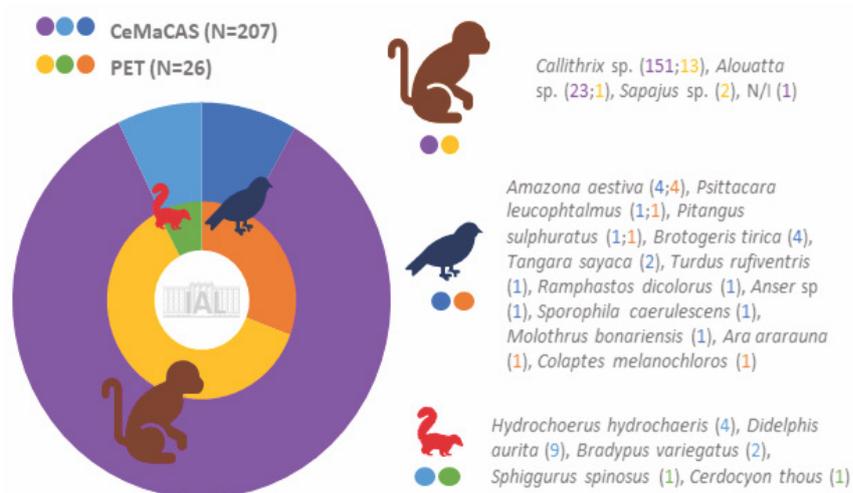


Figura 1. Fauna silvestre - Gêneros e/ou espécies avaliadas, São Paulo. São Paulo, 2019

Histopatologia e Imuno-histoquímica

A avaliação histopatológica, por vezes aliada à imuno-histoquímica (em casos em que a morfologia observada pela histopatologia fosse sugestiva de quadros infecciosos), foi conclusiva em 20,2% (N=47/233) dos casos. A maioria destes animais apresentou infecções bacterianas [48,9% (N=23/47)]; seguidos de 23,4% casos de infecções parasitárias (N=11/47), 14,9% casos de neoplasias (N=7/47) e, com menor frequência, 12,8% dos quadros foram sugestivos ou confirmados de infecções virais (N=6/47). Em 79,8% (N=186/233) dos casos não houve a possibilidade de se concluir a causa relacionada à morte dos animais,

devido à ausência de dados macroscópicos e/ou avançado estado de autólise das amostras. A tabela 2 elenca os principais achados histológicos encontrados nos animais que compõem esse estudo, e a figura 2 ilustra um caso de cada grupo:

Considerando os quadros neoplásicos, em relação aos PNH, um *Callithrix* spp. apresentou teratoma associado a leiomioma. Quanto às aves, um *Amazona aestiva* foi

diagnosticado com colangiocarcinoma, um *Brotogeris tirica* com adenocarcinoma, um *Anser* spp. apresentou leiomioma renal, e um *Tangara sayaca* apresentou papiloma associado a infecção viral por poxvírus. Quando analisamos os outros mamíferos, dois *Didelphis aurita* foram enquadrados como casos

neoplásicos: um com papilomatose viral, enquanto o outro com linfoma B de grandes células.

Quanto às doenças infecciosas diagnosticadas, três são consideradas zoonóticas, de acordo com a tabela 3.

Ainda, três primatas (2 *Callithrix* spp. e 1 *Alouatta* spp.) foram suspeitos para outros protozoários intestinais, dois para nematódeos intestinais (1 *Alouatta* spp. e 1 *Callithrix* spp.) e um *Alouatta* spp. suspeito para filariose. Em relação às aves, duas apresentaram quadro morfológico sugestivo de infecção por *Plasmodium* spp (*Turdus rufiventris* e *Tangara sayaca*) não zoonótico.

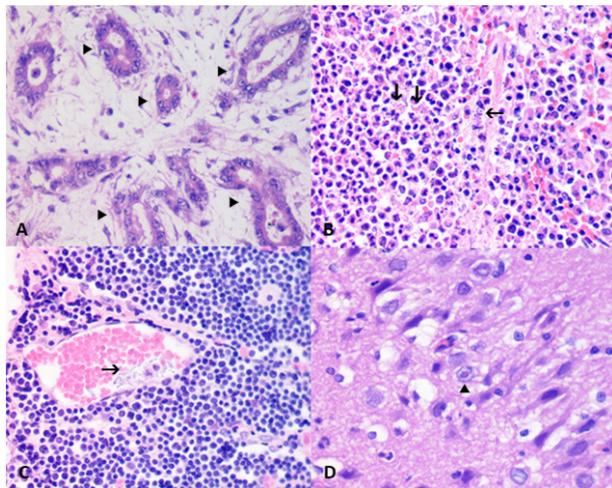
Tabela 2. Frequência dos sistemas histologicamente comprometidos pelos processos patogênicos, classificada por grupos de animais, São Paulo/SP, 2019

	Fígado	Baço	Respiratório	SNC	Coração	TGI	Pele	Reprodutor	Urinário	Sistêmico	Autólise	NDN	Total
Bacteriano	5	4	3	0	0	1	0	0	0	10	0	0	23
Aves	1	0	1	0	0	1(*)	0	0	0	3	0	0	6
PNH	4	4	2 (**)	0	0	0	0	0	0	6	0	0	16
Outros mamíferos (placentários)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Outros mamíferos (marsupiais)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Viral	4	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	6
Aves	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
PNH	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Outros mamíferos (placentários)	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Outros mamíferos (marsupiais)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Parasitário	2	0	1	0	0	8	0	0	0	0	0	0	11
Aves	0	0	0	0	0	2(**)	0	0	0	0	0	0	2
PNH	2	0	1	0	0	5	0	0	0	0	0	0	8
Outros mamíferos (placentários)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Outros mamíferos (marsupiais)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Neoplásico	1	0	0	0	0	0	5	1	1	0	0	0	7
Aves	1	0	0	0	0	0	2(*)	0	1	0	0	0	4
PNH	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Outros mamíferos (placentários)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Outros mamíferos (marsupiais)	0	0	0	0	0	0	2(*)	0	0	0	0	0	2
Indeterminado	43	7	46	20	7	17	0	0	15	0	15	15	186
Aves	5	0	0	0	1	2	0	0	1	0	1	2	12
PNH	35	4	44	20	6	14	0	0	14	0	12	13	162
Outros mamíferos (placentários)	1	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	6
Outros mamíferos (marsupiais)	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	6

Casos diversos:

(*) Pelo menos um dos casos é suspeito ou confirmado de infecção viral concomitante;

(**) Pelo menos um dos casos apresenta-se associado com infecção fúngica.



A. Neoplásico – Fígado. Colangiocarcinoma em Papagaio-verdadeiro. Pontas-de-seta apontando para proliferação neoplásica de ductos distorcidos; B. Parasitário – Baço. Toxoplasmose em Bugio. Setas apontando para pseudocistos parasitários; C – Bacteriano – Timo. Sepse em Sagui. Seta evidenciando bactérias bacilares intravasculares; D. Viral – Cerebelo. Herpesvírus em Sagui. Ponta-de-seta evidenciando inclusão viral (corpúsculo) intranuclear.

FIGURA 2. Grupos de processos patogênicos classificados pela histopatologia, IAL/CCD/SES-SP, 2019

Tabela 3. Relação de achados clínicos, epidemiológicos e patógenos distribuídos por grupos de animais e relevância zoonótica, São Paulo/SP, 2019

Grupo	Sexo	Idade	Ambiente (cativo ou vida livre)	Classificação da doença zoonótica ou potencialmente zoonótica	Patógenos confirmados por IHQ
PNH (191)	86 fêmeas, 83 machos, 22 N/I	1 recém-nascido, 32 filhotes, 28 jovens, 112 adultos, 18 N/I	37 cativo, 151 vida livre, 3 N/I	Zooantroponose	Herpesvírus simplex (3 <i>Callithrix</i> sp.)
				Anfixenose	<i>T. gondii</i> (2 <i>Alouatta</i> sp.)
				Antropozoonose	<i>Chlamydia</i> spp. (1 <i>Brotogeris</i> tirica e 1 <i>Amazona aestiva</i>)
Aves (25)	8 fêmeas, 9 machos, 8 N/I	3 filhotes, 4 jovens, 10 adultos, 8 N/I	10 cativo, 12 vida livre, 3 N/I	Não-zoonótico	Herpesvírus/Doença de Pacheco (1 <i>Amazona aestiva</i>);
				Desconhecido	Poxvírus (1 <i>Tangara sayaca</i>)
				Desconhecido	Poxvírus (1 <i>Sphiggurus spinosus</i> – reação não validada);
Outros mamíferos - placentários (8)	5 fêmeas, 1 machos, 2 N/I	3 filhotes, 1 jovem, 2 adultos, 2 N/I	0 cativo, 8 vida livre	Desconhecido	Papilomavírus (1 <i>Didelphis aurita</i>).
Outros mamíferos - marsupiais (9)	6 fêmeas, 3 machos	2 jovens, 7 adultos	0 cativo, 9 vida livre	Não-zoonótico	

DISCUSSÃO

Este trabalho descreveu a casuística, achados anatomopatológicos e imuno-histoquímicos em amostras de fauna selvagem, recebidos por um programa piloto de vigilância laboratorial de fauna selvagem instituído em um Laboratório de Referência do Estado de São Paulo, o Instituto Adolfo Lutz. Este programa piloto foi implantado considerando a portaria consolidada nº4,¹⁰ e também como tentativa de integrar uma política de Saúde Única na condução de uma

vigilância laboratorial. O estudo de agentes responsáveis por zoonoses, como alguns encontrados durante o período avaliado, *T. gondii* e *Chlamydia* spp, dependem de uma visão conjunta das saúdes ambiental, humana e animal.¹⁴ A vigilância de fauna selvagem apresenta como benefícios o monitoramento do estado geral de saúde dos animais e a identificação de doenças infecciosas para qualificar e quantificar o risco de ocorrência das enfermidades e seu impacto sobre a

biodiversidade e também sobre a saúde humana, além de ser fundamental para entender a epidemiologia e ecologia das doenças infecciosas.¹⁵ Entretanto, a dificuldade de aquisição de amostras adequadas pode ser um limitante, assim como as ferramentas para detecção de patógenos, visto que um rastreamento molecular é oneroso para ser aplicado em larga escala.¹⁶ Considerando isto, a anatomia patológica é uma possibilidade importante para avaliação de epizootias, por fatores variados. Primeiramente, a formalina, fixador empregado para conservação dos tecidos, é uma substância de baixo valor,¹⁷ fácil aquisição e que permite a manutenção dos tecidos a temperatura ambiente por tempo elevado, propiciando colheitas a campo com facilidade de transporte¹⁸ para o laboratório de referência, mesmo distante. Além disso, é um potente inativador de patógenos,¹⁹⁻²¹ reduzindo o risco biológico da manipulação das amostras fixadas. Entretanto, por apresentar risco químico,^{20,22} demanda manipulação com equipamento de proteção individual adequado, máscaras com filtros apropriados e pode dificultar alguns tipos de análises moleculares e imuno-histoquímicas mais refinadas, apesar do desenvolvimento tecnológico na área permitir inclusive a realização de PCR nestas amostras.²³ Ainda, é de intenção dos autores atrelar futuramente técnicas biomoleculares na rotina da avaliação das amostras de fauna selvagem, filtrando a necessidade destes testes mais onerosos de acordo com os resultados obtidos na histopatologia e na imuno-histoquímica.

O exame histopatológico consiste na avaliação microscópica dos achados morfológicos observados nos diferentes tecidos e permite a definição de suspeitas,

como exame de triagem, concluindo a etiologia do processo ou direcionando para outros testes mais sensíveis e específicos, como imuno-histoquímica ou exames moleculares. Como desvantagem, demanda profissionais especializados e qualificados na área de patologia veterinária, com expertise na área de patologia de animais selvagens. Idealmente, a histopatologia deve ser relacionada aos achados macroscópicos para conclusão dos casos, pois quadros de traumatismo e intoxicações, muitas vezes não podem ser definidos microscopicamente, necessitando da associação com a necropsia. A Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) recomenda a utilização da histopatologia com um dos exames a ser aplicado em vigilância em fauna selvagem, especialmente em uma vigilância geral.²⁴

Alguns países já possuem programas de vigilância em fauna selvagem estabelecidos.²⁵ Na Holanda, esta vigilância é realizada por uma rede laboratorial organizada e um dos exames aplicados é a análise histopatológica, em conjunto com testes direcionados para patógenos específicos por métodos parasitológicos, bacteriológicos e virológicos.²⁶ Na Bélgica, a vigilância de fauna selvagem é semelhante à descrita acima, sendo que as amostras e os dados são coletados por meio de políticas de vigilância ativa e passiva em todo o território da Valônia (sul da Bélgica) e são transmitidos às principais instalações do “*WildScreen.be’s*” (localizadas em Liège), para realização de necropsia e outras análises complementares, sendo o resultado divulgado para as autoridades regionais e/ou federais, além da comunidade científica.²⁷

Dentre os grupos de patógenos detectados, quadros bacterianos foram predominantes,

isso pode se dar devido a uma possível comorbidade e/ou estresse associado, fazendo com que esses animais apresentem maior probabilidade de se infectar com bactérias patogênicas do que os animais saudáveis.²⁸ O adequado seria a elucidação da espécie bacteriana envolvida, para melhor definição do potencial zoonótico e risco às populações humana e ao ambiente.^{6,29,30} O uso exclusivo da histopatologia como método de triagem diagnóstica, complementado apenas pela imuno-histoquímica, pode justificar o elevado número de casos indeterminados. Possivelmente, muitos destes poderiam ser concluídos em conjunto com a avaliação macroscópica, já que eventos relacionados a antropização (como choque elétrico, atropelamento ou intoxicação – causas essas que dependem da associação macro e microscópica para a conclusão³¹) foram descritos frequentemente nas fichas de encaminhamento. Outro fato que corrobora para a ocorrência de casos indeterminados é que muitos dos animais são encontrados mortos, não havendo histórico clínico, e por vezes, já em avançado estado de decomposição ou autólise, dificultando a análise histopatológica.³² Idealmente, um sistema de vigilância de fauna, deveria contar com ferramentas variadas, como exames sorológicos para diversos patógenos e exames biomoleculares, inclusive ferramentas de metagenômica. Entretanto, a aplicação de todos os métodos em conjunto é inviável do ponto de vista logístico e econômico.

CONCLUSÃO

A implantação de um programa piloto de vigilância laboratorial de fauna selvagem, tendo como ferramenta diagnóstica principal a anatomia patológica, na cidade de São Paulo, permitiu a detecção de patógenos de interesse em saúde pública e a descrição do perfil de parte dos óbitos em fauna selvagem de animais recebidos de órgãos de triagem localizados em um ambiente urbano, com predomínio de quadros bacterianos dentre os casos conclusivos. Há perspectiva de expansão futura para recebimento de animais selvagens (aves e mamíferos) de empreendimentos de fauna do restante do Estado de São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro do Grupo de Apoio às Políticas de Prevenção e Proteção à Saúde (GAPS/Fundo Especial de Saúde para Imunização em Massa e controle de Doenças) (40/19). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) que concede bolsa de mestrado à Alessandra. Ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada, pelo apoio às discentes Alessandra e Natália. Aos colaboradores do Centro de Patologia e do Núcleo de Gestão de Amostras Biológicas do IAL, do Centro de Manejo e Conservação de Animais Silvestres (CeMaCAS) e Parque Ecológico do Tietê (PET).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Grogan LF, Berger L, Rose K, Grillo V, Cashins SD, Skerratt LF. Surveillance for Emerging Biodiversity Diseases of Wildlife. *PLoS Pathog.* 2014;10(5).

2. Woolhouse MEJ, Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(12):1842-7.
3. Nakayima J, Hayashida K, Nakao R, Ishii A, Ogawa H, Nakamura I, et al. Detection and characterization of zoonotic pathogens of free-ranging non-human primates from Zambia. *Parasites and Vectors.* 2014;7(1):1-7.
4. Paz FAZ, Bercini MA. Doenças Emergentes e Reemergentes no Contexto da Saúde Pública Boletim da Saúde Doenças Emergentes e Reemergentes no Contexto da Saúde Pública. *Esc Saúde Pública.* 2009;23(1):1-3.
5. Mackey TK, Liang BA, Cuomo R, Hafen R, Brouwer KC, Lee DE. Emerging and reemerging neglected tropical diseases: A review of key characteristics, Risk factors, And the policy and innovation environment. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(4):949-79.
6. Cunningham AA, Daszak P, Wood JLN. One health, emerging infectious diseases and wildlife: Two decades of progress? *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2017;372(1725).
7. Rabinowitz PM, Kock R, Kachani M, Kunkel R, Thomas J, Gilbert J, et al. Toward proof of concept of a one health approach to disease prediction and control. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(12).
8. Vallat B. Improving wildlife surveillance for its protection while protecting us from the diseases it transmits. 2008. Editorial on-line do sítio da OIE. Acessado em janeiro de 2020.
9. Artois M, Bengis R, Delahay RJ, Duchêne M-J, Duff JP, Ferroglio E, et al. Wildlife Disease Surveillance and Monitoring. In: *Management of Disease in Wild Mammals.* 2009.
10. Brasil, Ministério da Saúde. PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO Nº 4, DE 28 DE SETEMBRO DE 2017. 2017.
11. Ellwanger JH, Chies JAB. Zoonotic spillover and emerging viral diseases – time to intensify zoonoses surveillance in Brazil. *Brazilian J Infect Dis.* 2018;22(1):76-8.
12. East M, Res V, Guardian T, Health TO, Health O, Food UN, et al. Emerging zoonoses: A one health challenge. *EClinicalMedicine.* 2020;19.
13. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. MANUAL DE VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS EM PRIMATAS NÃO-HUMANOS. 2017.
14. Bidaisee S, Macpherson CNL. Zoonoses and one health: A review of the literature. *J Parasitol Res.* 2014;2014.
15. Catão-Dias JL. Doenças e seus impactos sobre a biodiversidade. *Cienc Cult.* 2003;55(3):32-4.
16. Cardoso FA. Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras de sangue periférico Desenvolvimento e validação de um ensaio de PCR-ELISA para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana em amostras. *Mestr (Programa Pós-graduação em Ciências da Saúde) – IMinistério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Cent Pesqui René Rachou, Belo Horiz - MG.* 2013;109.
17. Michalany J. Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. 3rd ed. São Paulo: Editora Michalany; 1998. 295 p.
18. Metovic J, Bertero L, Musuraca C, Veneziano F, Annaratone L, Mariani S, et al. Safe transportation of formalin-fixed liquid-free pathology specimens. *Virchows Arch.* 2018;473(1):105-13.

19. Chafin D. Pre-Analytics of Pathological Specimens in Oncology. *Recent Results Cancer Res.* 2015;199:107-17.
20. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1):147-79.
21. Chua J, Bozue JA, Klimko CP, Shoe JL, Ruiz SI, Jensen CL, et al. Formaldehyde and glutaraldehyde inactivation of bacterial tier 1 select agents in tissues. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(5):919-26.
22. Nielsen GD, Larsen ST, Wolkoff P. Recent trend in risk assessment of formaldehyde exposures from indoor air. *Arch Toxicol.* 2013;87(1):73-98.
23. Patel PG, Selvarajah S, Boursalie S, How NE, Ejdelman J, Guerard KP, et al. Preparation of formalin-fixed paraffin-embedded tissue cores for both RNA and DNA extraction. *J Vis Exp.* 2016;2016(114):1-10.
24. OIE. Training manual on surveillance and international reporting of diseases in wild animals. Workshop for OIE National Focal Points for Wildlife Second Cycle. 2015;96. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/International_Standard_Setting/docs/pdf/WGWildlife/A_Training_Manual_Wildlife_2.pdf. Acessado em dezembro de 2019.
25. Morner T, Obendorf DL, Artois M, Woodford MH. Diseases of wildlife occur in many different forms in a wide range of animal species and populations. *Rev Sci Tech [Internet].* 2002;21(1):67-76. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/febb/e72403d6cfaf0ce328b0af28bef1fe5d2685.pdf>. Acessado em janeiro de 2020.
26. Maas M, Gröne A, Kuiken T, Van Schaik G, Roest HIJ, Van Der Giessen JWB. Implementing wildlife disease surveillance in the Netherlands, a One Health approach. *OIE Rev Sci Tech.* 2016;35(3):863-74.
27. Linden A, Wirtgen M, Volpe S, Nahayo A, Pirson J, Paternostre J, et al. Surveillance of wildlife diseases in Belgium. *Epidémiol santé anim.* 2011;(59-60):213-5.
28. Smith A, Woutrina A, Jonna AK, Dwight C. Salmonella in California Wildlife Species: Prevalence in Rehabilitation Centers and Characterization of Isolates. *J Zoo Wildl Med.* 2002;33(3):228-35.
29. Radhouani H, Silva N, Poeta P, Torres C, Correia S, Igrejas G. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment, and human health. *Front Microbiol.* 2014;5(FEB):1-12.
30. Williams ES, Yuill T, Artois M, Fischer J, Haigh SA. Surveillance and monitoring of wildlife diseases. *Rev sci tech Off int Epiz.* 2002;21(1):139-57.
31. Dettmeyer RB. The role of histopathology in forensic practice: an overview. *Forensic Sci Med Pathol.* 2014;10(3):401-12.
32. Tavichakorntrakool R, Prasongwattana V, Sriboonlue P, Puapairoj A, Pongskul J, Khuntikeo N, et al. Serial analyses of postmortem changes in human skeletal muscle: A case study of alterations in proteome profile, histology, electrolyte contents, water composition, and enzyme activity. *Proteomics Clin. Appl.* 2008;2(9):1255-64.

Correspondência/Correspondence to:

Natália C. C. de A. Fernandes
 ncafernandes@yahoo.com.br
 Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Anatomia Patológica
 Av. Dr Arnaldo, 355, 7º andar, Cerqueira César, CEP 01246-000