

ISSN 1806 - 423 - X  
ISSN 1806 - 4272 – online

# BEPA 158

Volume 14 número 158 fevereiro/2017

# BEPA

## Boletim Epidemiológico paulista

ISSN 1806-423-X

Volume 14 Nº 158

fevereiro de 2017

### Nesta edição

|   |    |
|---|----|
| Padronização do protocolo de hibridização <i>in situ</i> cromogênica (CISH) para detecção de HPV de alto e baixo risco com a utilização da sonda comercial marcada com digoxigenina<br><i>Standardization of the chromogenic in situ hybridization protocol for searching the high and low risk HPV using a commercial probe labeled with digoxigenin</i> ..... | 1  |
| Informação Zika vírus e microcefalia no estado de São Paulo<br><i>Zika virus and microcefalia information in the State of São Paulo</i> .....   | 13 |
| Alerta sarampo, rubéola e síndrome da rubéola congênita. Atualização fevereiro de 2017<br><i>Measles, rubella and congenital rubella syndrome alert. Update February 2017</i> .....   | 17 |
| Atividades da Rede de Teste Rápido Molecular para Tuberculose no Estado de São Paulo<br><i>Activities of the Rapid Molecular Testing Network for Tuberculosis in the State of São Paulo</i> .....   | 21 |
| Programa Estadual DST/Aids-SP realiza 1ª Reunião da Pediatria<br><i>STD/AIDS State Program-SP holds the 1st Meeting of Pediatrics</i> .....   | 31 |
| A Amazônia é a provável região de origem do vírus da febre amarela silvestre que circula hoje no norte do estado de São Paulo<br><i>The Amazon is the probable region of origin of the virus of wild yellow fever that circulates today in the north of the state of São Paulo</i> .....  | 35 |
| Caracterização do complexo <i>Candida glabrata</i> em isolados de hemocultura e avaliação da sensibilidade a antifúngicos<br><i>Characterization of Candida glabrata complex isolates in blood cultures and evaluation of sensitivity to antifungal</i> .....   | 37 |
| Estudo do Potencial anti- <i>Leishmania</i> e anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> do Ergosterol isolado do Basidiomiceto <i>Pleurotus salmoneostramineus</i><br><i>Study of anti-Leishmania potential and anti-Trypanosoma cruzi isolated ergosterol basidiomycete Pleurotus salmoneostramineus</i> .....  | 39 |
| Instruções aos Autores<br><i>Author's Instructions</i> .....  | 41 |

## Expediente



**COORDENADORIA DE  
CONTROLE DE DOENÇAS**

Av. Dr Arnaldo, 351  
1º andar – sala 124

CEP: 01246-000 – Pacaembu  
São Paulo/SP – Brasil

Tel.: 55 11 3066-8823/8824/8825  
E-mail: [bepa@saude.sp.gov.br](mailto:bepa@saude.sp.gov.br)  
<http://www.ccd.saude.sp.gov.br>  
<http://ses.sp.bvs.br/php/index.php>

Os artigos publicados são de  
responsabilidade dos autores.

É permitida a reprodução parcial  
ou total desta obra, desde que  
citada a fonte e que não seja  
para venda ou fim comercial.

Para republicação deste material,  
solicitar autorização dos editores.

**Editor Geral: Marcos Boulos**

**Editor Executivo: Clelia Aranda**

**Editores Associados:**

Dalton Pereira Fonseca Junior – Sucen/SES-SP  
Hélio Hehl Caiaffa Filho – IAL/CCD/SES-SP  
Lilian Nunes Schiavon – CTD/CCD/SES-SP  
Luciana Hardt – IP/CCD/SES-SP  
Marcos da Cunha Lopes Virmond – ILSL/CCD/SES-SP  
Maria Clara Gianna – CRT/DST/Aids/CCD/SES-SP  
Maria Cristina Megid – CVS/CCD/SES-SP  
Regiane Cardoso de Paula – CVE/CCD/SES-SP

**Comitê Editorial:**

Adriana Bugno – IAL/CCD/SES-SP  
Angela Tayra – CRT/Aids/CCD/SES-SP  
Cristiano Corrêa de Azevedo Marques – IB/SES-SP  
Dalma da Silveira – CVS/CCD/SES-SP  
Dalva Marli Valério Wanderley – Sucen/SES-SP  
Juliana Galera Castilho – IP/CCD/SES-SP  
Maria Bernadete de Paula Eduardo – CVE/CCD/SES-SP  
Maria de Fátima Costa Pires – PPG/CCD/SES-SP  
Patrícia Sanmarco Rosa – ILSL/SES-SP

**Coordenação Editorial:**

Kátia Rocini  
Sylia Rehder  
Maria de Fátima Costa Pires  
Lilian Nunes Schiavon  
Mirthes Ueda

**Revisão:**

Kátia Rocini

**Projeto gráfico/editoração:**

Kleiton Mendes de Brito  
Marcos Rosado  
Maria Rita Negrão

**Centro de Produção e Divulgação Científica – CCD/SES-SP**

**Consultores Científicos:**

Alexandre Silva – CDC Atlanta  
Carlos M. C. Branco Fortaleza – FM/Unesp/Botucatu-SP  
Eliseu Alves Waldman – FSP/USP-SP  
Expedito José de Albuquerque Luna – IMT/USP-SP  
Gerusa Figueiredo – IMT/USP-SP  
Gonzalo Vecina Neto – FSP-USP  
Gustavo Romero – UnB/CNPQ  
Hiro Goto – IMT/USP-SP  
José Cássio de Moraes – FCM/SC-SP  
José da Rocha Carvalheiro – Fiocruz-RJ  
José da Silva Guedes – IB/SES-SP  
Myrna Sabino – IAL/CCD/SES-SP  
Paulo Roberto Teixeira – OMS  
Ricardo Ishak – CNPQ/UF-Pa  
Ricardo Kerti Mangabeira Albernaz – CCD/SES-SP  
Roberto Focaccia – IER/SES-SP  
Vilma Pinheiro Gawyszewsk – Opas

**Portal de Revistas - SES/Projeto Metodologia Scielo:**

Lilian Nunes Schiavon

Eliete Candida de Lima Cortez

**Centro de Documentação – CCD/SES-SP**

**CTP, Impressão e Acabamento:**

Imprensa Oficial do Estado S A (Imesp)

**Disponível em:**

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



Acesse a versão eletrônica em:  
[www.ccd.saude.sp.gov.br](http://www.ccd.saude.sp.gov.br)

Rede de Informação e Conhecimento:  
<http://ses.sp.bvs.br/php/index.php>

Colabore com o BEPA:  
[bepa@saude.sp.gov.br](mailto:bepa@saude.sp.gov.br)

Artigo original

## Padronização do protocolo de hibridização *in situ* cromogênica (CISH) para detecção de HPV de alto e baixo risco com a utilização da sonda comercial marcada com digoxigenina

### *Standardization of the chromogenic in situ hybridization protocol for searching the high and low risk HPV using a commercial probe labeled with digoxigenin*

Lidia Midori Kimura;<sup>1</sup> Neuza Kasumi Shirata;<sup>1</sup> Suely Nonogaki;<sup>1</sup> Juliana Mariotti Guerra;<sup>1</sup> Marina Suheko Oyafuso;<sup>II</sup> Yara de Menezes;<sup>II</sup> Leonardo José Tadeu de Araújo;<sup>1</sup> Celso di Loreto<sup>II</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Patologia Quantitativa, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. <sup>II</sup>Núcleo de Anatomia Patológica, Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil

#### RESUMO

**Introdução:** A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é considerada o maior fator de risco para desenvolvimento das lesões pré-cancerosas e cancerosas do colo uterino e câncer de vagina, vulva, pênis, ânus, entre outros. **Objetivo:** Implementar o protocolo comercial de hibridização *in situ* cromogênica (CISH) com sonda (*cocktail*) comercial marcada com digoxigenina para pesquisa de HPV de alto risco (HPV-AR) e de baixo risco (HPV-BR) em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina. **Material e método:** Foi realizada CISH em 83 amostras de biópsias de colo uterino, 38 HPV-BR (6, 11) e 45 HPV-AR (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 69, 82); dez pênis; 11 canal anal e cinco prepúcio, em blocos histológicos fixadas em formalina e incluídas em parafina com alterações sugestivas da presença de HPV. Foram testados cinco protocolos diferentes para as duas sondas, modificações no tempo (t) e temperatura (T) para: hibridização, proteólise, incubação com o sistema de detecção. **Resultados:** Ao aumentar t de proteólise de 3 min a 37 °C para 10 min a 37°C (HPV-AR e HPV-BR), as marcações das células infectadas tornaram-se visivelmente mais nítidas. O mesmo ocorreu alterando-se o t da hibridização de 60 min a 37°C para 120 min a 37°C, assim como t de incubação com o sistema de detecção, de 30 min a 37°C para 60 min a 37°C. **Conclusão:** O protocolo implementado mostrou-se adequado para amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, para as condições de laboratório público.

**PALAVRAS-CHAVE:** Colo do útero. Pênis. Sondas de DNA de HPV. Hibridização *in situ*.

## ABSTRACT

**Introduction:** Infection with human papillomavirus (HPV) is considered the major risk factor for developing cancer and precancerous lesions of cervix, penis, anus, among others. **Objective:** To implement the chromogenic *in situ* hybridization (CISH) protocol with commercial probe for HPV of high risk (HR-HPV) (types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 69, 82) and of low risk (LR-HPV) (types 6, 11) in formalin-fixed and paraffin-embedded samples. **Material and method:** CISH were performed on biopsy samples with morphological changes suggestive of HPV, selected from the file of Pathology Center of Adolfo Lutz Institute. Thirty-eight cervical, 10 penile, 11 anal canal and five foreskin samples were analyzed for both HPV-LR and HR. Five different protocols were tested for the two probes, following modifications in the running time (t) and temperature (T) steps for hybridization, proteolysis, incubation with the detection system. **Results:** In current study, the increase of t and T parameters to proteolysis and incubation with the detection system, for the both probes, raised the labeling in the infected cells. LR-HPV probe was positive in 6.5 % of CIN 1 and in 60.0 % of penile with condyloma accuminata. HR-HPV probe was positive in 18.5 % of cervix and 7.4 % of penile samples. Two cases (one cervix and one penis) were positive for both probes. **Conclusion:** The implemented protocol proved to be suitable for the samples fixed in formalin and embedded in paraffin, for the public laboratory conditions.

**KEYWORDS:** Cervix uteri. Penile. HPV DNA Probes. *In situ* hybridization.

## INTRODUÇÃO

A infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) é considerada o maior fator de risco para desenvolvimento das lesões pré-cancerosas e cancerosas do colo uterino. O DNA do HPV é encontrado em mais de 90% das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do cérvix uterino podendo ser classificado como sendo de alto e baixo risco oncogênico.<sup>1</sup> Além disso, esse vírus também é um importante fator de risco para outros tipos de câncer como o de vagina, vulva, pênis, ânus e nasofaringe.<sup>1</sup>

A classificação dentro de uma mesma espécie de HPV é baseada na homologia de seu genoma, e atualmente já foram

identificados mais de 200 tipos de HPV que são antigenicamente semelhantes. Cerca de 40 tipos de HPV têm acometido a região anogenital, dos quais, aproximadamente, 18 são oncogênicos: HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 63, 66, 68 e 82.<sup>2</sup> Doze tipos de HPV são classificados como carcinogênicos da Classe I (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), um da Classe 2A (HPV 68) e cinco da Classe 2B (26, 67, 69, 73, 82).<sup>3</sup> Os HPVs 6, 11, 42, 43 e 44 são considerados de baixo risco ou sem qualquer risco oncogênico, sendo responsáveis pelo aparecimento das verrugas genitais.<sup>1-4</sup>

Todos os tipos de HPV são replicados exclusivamente no núcleo da célula hospedeira. Nas lesões malignas, o DNA viral se integra aos cromossomos hospedeiros. Para integrar-se ao DNA celular, é necessário que haja uma quebra no genoma viral, que ocorre nas regiões E1 e E2 do vírus. O resultado dessa quebra é uma perda da função desses dois genes, acompanhada de uma desregulação dos genes E6 e E7, ocasionando uma super-expressão desses genes NE em uma transformação da célula hospedeira, que anula a função supressora do p53 e Rb, levando à perda do controle de ciclo celular.<sup>2-7</sup>

Atualmente estão disponíveis no mercado várias técnicas moleculares para detecção do HPV que variam quanto a sua sensibilidade e especificidade,<sup>8</sup> como a hibridização *in situ* (ISH) e suas variantes, captura de híbridos (CH), imuno-histoquímica (IHQ), reação em cadeia pela polimerase (PCR), *southern blot*, sequenciamento, *reverse line blot*, entre outras.<sup>7,9</sup>

A técnica de ISH tem sido empregada para detecção e localização do HPV na célula infectada. Essa metodologia permite localizar sequências específicas de ácidos nucleicos em amostras celulares ou teciduais, podendo assim mostrar a localização do DNA ou RNA viral de forma específica na célula infectada ou mesmo em cromossomos isolados, por meio da ligação de uma sonda específica (sequência curta de DNA) para um tipo de HPV, podendo ser efetuado em lâminas de vidro, com tecido fixado em formalina e incluídos em parafina.<sup>4,6,7</sup>

As sondas podem estar marcadas com compostos fluorescentes na hibridização *in situ* (hibridização *in situ* fluorescente, FISH)

ou com biotina, digoxigenina ou dinitrofenol.<sup>10</sup> Sondas marcadas com a digoxigenina têm sido utilizadas desde a década de 90 como uma alternativa não isotópica, havendo relatos de sua superioridade entre as moléculas dessa classe, pois a reação de fundo é maior com a utilização de sondas marcadas com a biotina.<sup>11</sup>

Uma variante da ISH é a hibridização *in situ* cromogênica (CISH) que, meio de uma reação da diaminobenzidina (DAB), substrato cromogênico e a peroxidase, permite a visualização do HPV no núcleo com aspecto amarronzado ou como pontos amarronzados na célula hospedeira.

Após a ligação da sonda na sequência complementar da célula, a visualização é feita ao microscópio de fluorescência na FISH ou usando luz direta na CISH. A resolução da ISH dependerá do tamanho da sonda utilizada, do preparo apropriado das amostras e do treinamento do patologista na interpretação das amostras coradas. A ISH permite identificar o HPV na sua forma episomal, quando o DNA do HPV encontra-se disperso pelo núcleo ou integrado, apresentando sinais pontuais.<sup>12</sup>

É importante lembrar que não foram estabelecidas guias de padronização para controles e procedimentos, limiares comuns ou conjunto de sondas para validação analítica da ISH para DNA de HPV, como foi relatado por Uhlig et al.<sup>12</sup>

Bagarelli et al.<sup>13</sup> demonstraram em seu estudo que a ISH mostrou alta especificidade e baixa sensibilidade, sendo pouco utilizada na rotina diagnóstica, mas como auxiliar para outras técnicas como a hematoxilina & eosina (H&E), IHQ, e por apresentar elevado potencial na identificação de HPV de alto risco.

Montag et al.<sup>14</sup> mostraram que o limite de detecção, utilizando linhagem celular, foi de 10 a 50 cópias por célula, porém em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina de 10 cópias de HPV por célula.

O objetivo deste estudo foi implementar o protocolo de hibridização *in situ* de sonda (*cocktail*) comercial marcada com digoxigenina para detecção de HPV de alto e baixo risco em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, com o intuito de aprimorar a metodologia na rotina diagnóstica do Núcleo de Patologia Quantitativa – Instituto Adolfo Lutz, quando comparado aos resultados obtidos com o protocolo original.

## MATERIAL E MÉTODO

Selecionamos para este estudo amostras de biópsias de colo uterino e pênis, canal anal e prepúcio, selecionados do arquivo de blocos do Núcleo de Anatomia Patológica, Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, advindas de diferentes Unidades Básicas de Saúde do Estado de São Paulo. As amostras apresentaram alterações morfológicas sugestivas da presença do HPV por meio da coloração de H&E. Todas as amostras foram fixadas em formalina e incluídas em parafina e novos cortes com espessura de 5 µm foram obtidos para a reação de CISH.

Foram submetidas 83 amostras de colo uterino, sendo 38 para HPV de baixo risco (HPV-BR) (tipos 6, 11) e 45 para HPV de alto risco (HPV-AR). Dez amostras de pênis, 11 de canal anal e 5 de prepúcio foram incluídas neste estudo, para análise com a sonda de HPV-AR e BR.

Os HPV-BR testados neste estudo foram os tipos 6 e 11; HPV-AR os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 69, 82, utilizando sonda ZytoFast (ZytoFast HPV High-Risk Digoxigenin-labeled, T-1140-400; ZytoFast HPV type 6/11 Digoxigenin-labeled, T-1055-400; ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Alemanha) e reveladas com o ZytoFast Plus CISH Implementation kit (T-1063-40, ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Alemanha).

Testamos cinco protocolos diferentes para as duas sondas, com modificações em relação ao tempo e temperatura nas seguintes etapas da reação, conforme descrito na Tabela 1:

- proteólise (3 ou 10 minutos a 37°C);
- hibridização (60 minutos a 37°C, 120 minutos a 55°C ou 37°C);
- incubação com o sistema de detecção (30 ou 60 minutos a 37°C).

**Tabela 1.** Distribuição dos parâmetros de tempo e temperatura de proteólise, hibridização, incubação com o sistema de detecção, nas amostras parafinadas submetidas à reação de CISH utilizando HPV-AR

| Tempo e temperatura de proteólise | Tempo e temperatura de hibridização | Tempo e temperatura de incubação com o sistema de detecção (cada etapa) |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---|
| 3 min a 37°C                      | 60 min a 37°C                       | 30 min a 37°C   |
| 3 min a 37°C                      | 120 min a 55°C                      | 30 min a 37°C   |
| 3 min a 37°C                      | 120 min a 37°C                      | 30 min a 37°C   |
| 10 min a 37°C                     | 120 min a 37°C                      | 30 min a 37°C   |
| <b>10 min a 37°C</b>              | <b>120 min a 37°C</b>               | <b>60 min a 37°C</b>  |

Primeiramente foi realizada a padronização de protocolo de reação para a sonda de HPV-AR (Tabela 1) e os parâmetros obtidos foram utilizados para o HPV-BR (Tabela 2).

Até a segunda etapa foi utilizado o mesmo protocolo para as duas sondas conforme descrito abaixo:

1. Desnaturação, desparafinização, alcoolização e hidratação das amostras – as amostras foram desnaturadas por 10 min a 70°C no hibridizador automático para lâminas (Dako, S2450, Glostrup, Denmark), desparafinizadas em xilol e imersão em banhos com álcoois seriados decrescentes, até a lavagem em água corrente e destilada;
2. Bloqueio da peroxidase endógena – solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 6% v/v por 10 min;
3. Na etapa da proteólise foram modificados os itens, tempo e a temperatura conforme demonstrado na Tabela 01 – Proteólise – solução de pepsina (ZytoFast Plus CISH Implementation Kit HRP-DAB, T-1063-40). A enzima foi eliminada por meio da lavagem das lâminas em água corrente e destilada por 10 min;
4. Eliminação da reação de fundo – Heat Pretreatment Solution EDTA (kit) em banho maria a 95°C por 15 min. As lâminas foram imediatamente mergulhadas em água deionizada por 1 min;
5. A sonda foi colocada no agitador de tubos por 30 s e deixada em repouso por 5 min sobre o gelo. Foi aplicada 10 µL da sonda sobre o corte histológico, coberto com lamínulas limpas em álcool, seladas com silicone (FixoGum, Marabu GmbH & Co, Bietigheim-Bissingen, Alemanha) e colocadas no hibridizador;
6. As amostras foram desnaturadas a 75°C por 5 min e hibridizadas por tempo e temperatura conforme Tabela 2;
7. Pós-hibridização – o selante e a lamínula foram removidos e as lâminas foram mergulhadas em tampão de lavagem (kit) a 55°C por 5 min e seguida de lavagem em tampão a temperatura ambiente;
8. Detecção – foi aplicado anticorpo anti-digoxigenina (kit) e em seguida o polímero marcado com peroxidase (kit), conforme tempo e temperatura indicados na Tabela 2;

**Tabela 2.** Distribuição dos parâmetros de tempo e temperatura de proteólise, hibridização, incubação com o sistema de detecção, nas amostras parafinadas submetidas à reação de CISH utilizando HPV-BR (6/11)

| Tempo e temperatura de proteólise | Tempo e temperatura de hibridização | Tempo e temperatura de incubação com o sistema de detecção (cada etapa) |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---|
| 3 min a 37°C                      | 60 min a 37°C                       | 30 min a 37°C   |
| 3 min a 37°C                      | 120 min a 55°C                      | 30 min a 37°C   |
| 10 min a 37°C                     | 120 min a 37°C                      | 30 min a 37°C   |
| <b>10 min a 37°C</b>              | <b>1260 min (21 h) a 37°C</b>       | <b>60 min a 37°C</b>  |



9. Revelação com o cromógeno – o DAB foi preparado conforme as recomendações do fabricante e aplicado sobre os cortes histológicos e incubados por 20 min a 37°C;

10. Contra coloração e montagem – com hematoxilina de Harris, diferenciação em água amoniacal, desidratação em álcool seriado crescente e montagem com meio permanente;

### Aspectos morfológicos

A visualização de sinais foi observada por meio do microscópio de luz (Olympus CX22LED, Olympus Co., Tokyo, Japão) utilizando objetivas com aumento de 10x e 40x, em que foram verificadas marcações nucleares corados de marrom dourado. Foi considerado positivo para HPV quando observados nos núcleos a marcação difusa apontando para a forma epissomal do vírus e pontual na integração do DNA-HPV no genoma celular.

Em todos os protocolos foram incluídos controles positivos. O controle negativo foi realizado pela sonda DNA negativa do kit descrito acima.

### Comitê de ética

Este projeto tem aprovação pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, sob nº projeto CTC 36E/2013.

### RESULTADOS

Foram observados os seguintes resultados após a aplicação dos diferentes protocolos:

Nas amostras que foram submetidas à reação de HPV-BR, encontramos positividade em:

03/38 (7,9%) casos de colo uterino; 07/10 (70,0%) de pênis.

Em relação à sonda de HPV-AR, foram observadas positividade nas seguintes amostras: 20/45 (44,4%) casos de colo uterino e 02/10 (20%) de pênis.

Foi observada positividade simultânea para HPV-AR e HPV-BR em duas amostras, sendo uma de colo uterino e uma de pênis.

A primeira reação realizada apresentou positividade fraca, tanto no HPV-BR e AR, que nos levou a realizar alterações no protocolo de reação, nos parâmetros tempo e temperatura, conforme demonstrada nas Tabelas 1 e 2.

Observamos que quando aumentamos o parâmetro tempo de proteólise de 3 min a 37°C para 10 min a 37°C, tanto nos casos de HPV-AR e HPV-BR, as marcações das células infectadas tornaram-se visivelmente mais nítidas. O mesmo ocorreu quando alteramos o fator tempo de hibridização de 60 min a 37°C para 120 min a 37°C, assim como para o tempo de incubação com o sistema de detecção, de 30 min a 37°C para 60 min a 37°C.

Quando alteramos a temperatura de hibridização para 55°C, verificamos que a sonda para HPV-AR não mostrou variação no resultado, o que não ocorreu com a sonda de HPV-BR.

Uma das amostras descolou da lâmina durante o procedimento, tendo sido necessária a repetição, por quatro vezes. Atribuímos o descolamento dos cortes histológicos à fixação inadequada na fase pré-analítica, visto que o descolamento foi observado apenas nesta amostra, não foi considerado decorrente da reação de CISH.

**Tabela 3.** Distribuição topográfica das amostras parafinadas com a reação de CISH para HPV-AR e HPV-BR em amostras de colo uterino, pênis, canal anal e prepúcio

| Topografia   | HPV-AR (+) | (%)  | HPV-AR (-) | (%)   | HPV-BR (+) | (%)  | HPV-BR (-) | (%)   |
|--------------|------------|------|------------|-------|------------|------|------------|-------|
| Colo uterino | 20/45      | 44,4 | 25/45      | 56,5  | 03/38      | 7,9  | 35/38      | 92,1  |
| Pênis        | 02/10      | 20,0 | 08/10      | 80,0  | 07/10      | 70,0 | 03/10      | 30,0  |
| Canal anal   | -          | -    | 11/11      | 100,0 | -          | -    | 11/11      | 100,0 |
| Prepúcio     | -          | -    | 05/05      | 100,0 | -          | -    | 05/05      | 100,0 |

## DISCUSSÃO

No mercado existem sondas comerciais marcadas com biotina e digoxigenina. A escolha técnica pelas sondas marcadas com digoxigenina foi baseada em relatos de publicações científicas que demonstraram melhor qualidade da reação, quando comparada com o uso da sonda biotinilada, em que podemos observar a reação de fundo mais evidente nas amostras, prejudicando assim a leitura,<sup>10,11</sup> além da evolução observada na IHQ em que os complexos avidina-biotina foram gradativamente substituídos pelos polímeros.<sup>15</sup>

A baixa sensibilidade encontrada neste estudo em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina corrobora com vários trabalhos publicados.<sup>14,16</sup>

Apesar de a ISH ser um método considerado de baixa sensibilidade, é um dos métodos de identificação da localização exata do HPV na célula, elevando assim a especificidade do método.<sup>17</sup> Também poderá auxiliar na distinção do DNA episomal da fração integrada na célula, podendo assim determinar o *status* da doença.<sup>18,19</sup>

Como já descrito anteriormente, Montag et al.<sup>14</sup> descreveram em seu estudo que, nas amostras fixadas em formalina e incluídas

em parafina, o limite de detecção seria de aproximadamente 10 cópias de DNA-HPV por célula. Desta forma, acreditamos que algumas das amostras negativas da nossa casuística possam ser atribuídas ao número de cópias inferiores ao limite de detecção da sonda.

Este estudo permitiu localizar dois casos com positividade para o HPV-AR e BR, mostrando a aplicabilidade desse método nesse tipo de amostras.

Verificamos que o fator tempo e temperatura foram parâmetros importantes na reação, pois auxiliaram na determinação das marcações celulares positivas, minimizando assim os falsos-negativos. Acreditamos que estes parâmetros tenham influenciado no resultado da reação, pois a estabilidade do híbrido formado pode ser modulada não só pela natureza e comprimento das sequências, mas também pela temperatura da reação e concentração salina da solução de hibridização.<sup>3</sup> Estes parâmetros, entre outros, podem definir o rigor da reação, fator determinante da especificidade e sensibilidade dos ensaios.<sup>4</sup>

No trabalho de Montag et al.<sup>14</sup> os autores utilizaram sondas semelhantes ao deste estu-

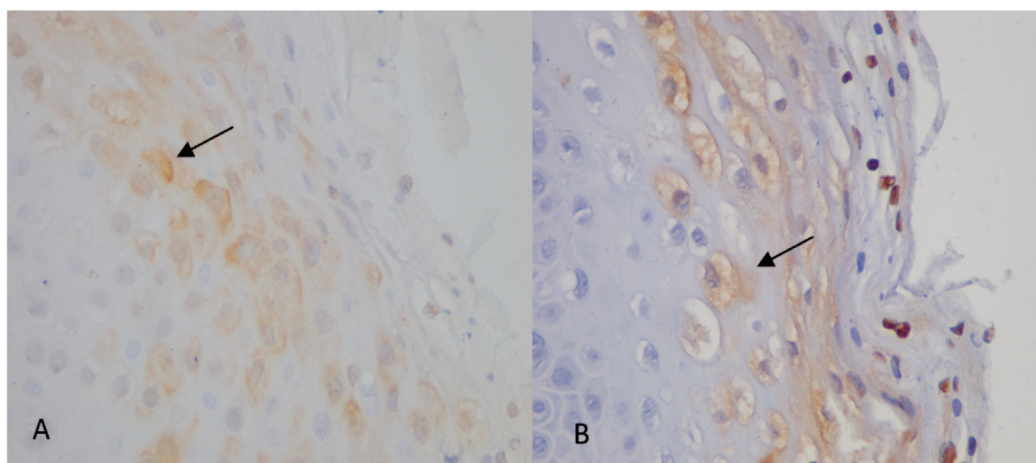
do (ZytoFast), porém marcadas com biotina e protocolo diferente de proteólise por 30 min a 37°C; tempo de hibridização de 1h e 29 min a 37°C; e no sistema de detecção por 40 min a 37°C. Em nosso estudo observamos, pela visualização microscópica, que o melhor protocolo de tempo e temperatura para proteólise, hibridização e incubação, com o sistema de detecção para a sonda de HPV-AR, foi de: 10 min a 37°C; 120 min a 37°C; 60 min a 37°C e para HPV-BR: 10 min a 37°C; 1260 min (21 h) a 37°C; 60 min a 37°C (Figuras 1 e 2).

A qualidade da fixação e do processamento das amostras também pode influenciar nos resultados da ISH, conforme relatado em outros trabalhos.<sup>4,20</sup> Estes dados corroboraram com os achados deste estudo em que amostras fixadas ou processadas inadequadamente apresentaram descolamento no processo da reação, e foram retiradas da nossa casuística.

Além da aplicabilidade, a implantação da técnica de ISH em um laboratório de anatomia patológica, quando comparada a PCR, é

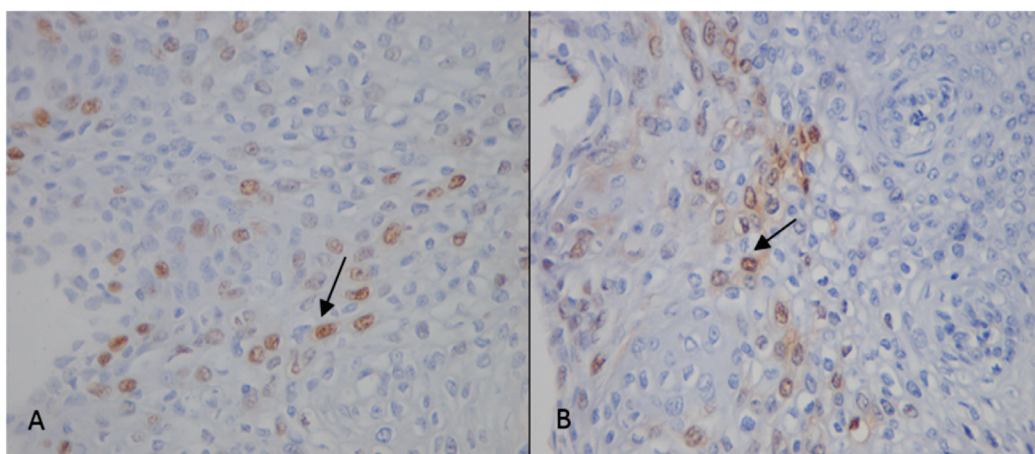
metodológica e financeiramente mais viável, pelas seguintes considerações:

- por apresentarem etapas comuns às de coloração H&E, especiais e IHQ, principalmente esta última;
- um profissional treinado para execução da reação IHQ poderá facilmente aprender a ISH;
- não há necessidade de aquisição de um novo parque de equipamentos (termociclador, extrator e quantificador de ácidos nucleicos, cuba e fonte para eletroforese, cabine de PCR, centrífuga, banho seco, luminômetro, autoclave). O investimento seria no hibridizador automático de lâminas. Os outros equipamentos necessários, tais como a estufa de secagem e cultura, capela de segurança química, panela de pressão, fogareiro elétrico já estão disponíveis em laboratórios de anatomia patológica que realizam a IHQ;
- necessidade de áreas físicas distintas para execução das diferentes etapas dos procedimentos moleculares.



BR – baixo risco; AR – alto risco; P=Proteólise; H=Hibridização; SD=Sistema de detecção; DAB=Cromógeno

**Figura 1.** Caso de CISH positivo para HPV-BR em amostra de pênis (aumento de 40x) vide seta. A-Utilizando parâmetro P 3 min a 37°C; H 18h a 37°C ; SD 30 min a 37°, DAB 20 min a 37°C. B-Utilizando parâmetro P 10 min a 37°C; H 1260 min (21 h) a 37°C; SD 60 min a 37°C; DAB 20 min a 37°C



BR – baixo risco; P=Proteólise; H=Hibridização; SD=Sistema de detecção; DAB=Cromógeno

**Figura 2.** Caso de CISH positivo para HPV-AR em amostra de colo uterino (aumento 40x) vide seta. A-Parâmetros P 3 min a 37°C; H 2h a 37°C; SD 30 min a 37°C; DAB 20 min a 37°C. B-Parâmetro P 10 min a 37°C; H 2h a 37°C; SD 1h a 37°C; DAB 20 min a 37°C

## CONCLUSÕES

As sondas ZytoFast, um cocktail de sondas marcadas com digoxigenina, mostraram-se adequadas para amostras fixadas com formalina e incluídas em parafina, após modificações dos parâmetros tempo e temperatura, que auxiliaram na melhora da visualização microscópica das áreas marcadas com as respectivas sondas.

Outro fator que nos levou pela escolha desta sonda e kit de revelação foi o fator custo. O kit utilizado tem fornecido a solução de pré-tratamento, a solução enzimática pronta para uso, tampão de lavagem, sondas controles DNA e RNA positivos e negativos, anticorpo anti-digoxigenina, polímero marcado com peroxidase, cromógeno, substrato cromogênico, que facilitaram na padronização das reações. Considerando os custos envolvidos na aquisição dos produtos acima listados, separadamente, oneraria ainda mais os testes, portanto, acreditamos que este produto foi o que ofereceu melhor custo/benefício.

O Núcleo de Patologia Quantitativa do Centro de Patologia tem atendido a Vigilância Epidemiológica e os pacientes do SUS. A maioria das amostras deste estudo foi de colo uterino e pênis, mas esperamos receber amostras da região de cabeça e pescoço com suspeita de HPV, nas quais, como descrito na literatura,<sup>15</sup> tem apresentado abundante presença de biotina endógena, o que poderia ser um agravante na análise das amostras com sonda biotinilada.

Concluimos que a implementação dos protocolos comerciais de algumas técnicas metodológicas podem auxiliar na análise diagnóstica e contribuir na obtenção de resposta quanto à patogênese do HPV.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Sonia Maria Pereira de Oliveira – Diretora do Centro de Patologia do IAL pela colaboração e incentivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *J. natl. cancer inst.* 2000; 92: 690-8.
2. Munger K, Baldwin A, Edwards KM et al. Mechanisms of human papillomavirus - induced oncogenesis. *J. virol.* 2004; 78(21):11451-60.
3. Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J. virol.* 2002; 76(19):10009-14.
4. Iftner T, Villa LL. Human papillomavirus technologies. *J. natl. cancer inst. monogr.* 2003; 31:80-8.
5. Bravo IG, Félez-Sánchez M. Papillomaviruses: viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evol Med Public Health.* 2015(1): 32-51.
6. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; 92(5):1654-8.
7. Guo M, Gong Y, Deavers M et al. Evaluation of a commercialized in situ hybridization assay for detecting human papillomavirus DNA in tissue specimens from patients with cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *J. clin. microbiol.* 2008; 46(1):274-80.
8. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int. j. biol. markers.* 2009; 24(4):215-22.
9. Steinau M, Onyekwuluje JM, Scarbrough MZ, Unger ER, Dillner J, Zhou T. Performance of commercial reverse line blot assays for human papillomavirus genotyping. *J. clin. microbiol.* 2012; 50(5):1539-44.
10. Komminoth P. Digoxigenin as an alternative probe labeling for in situ hybridization. *Diagn. mol. pathol.* 1992; 1(2):142-50.
11. Siadat-Pajouh M, Ayscue AH, Periasamy A, Herman B. Introduction of a fast and sensitive fluorescent in situ hybridization method for single-copy detection of human papillomavirus (HPV) genome. *J. histochem. cytochem.* 1994; 42(11):1503-12.
12. Uhlig K, Earley A, Lamont J et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) or other in situ hybridization (ISH) testing of uterine cervical cells to predict precancer and cancer. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US). AHRQ Technology Assessments; 2013.
13. Bagarelli LB, Oliani AH. Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização in situ em lesões intra-epiteliais do colo uterino. *Rev. bras. ginecol. obstet.* 2004; 26(1):59-61. Doi:10.1590/S0100-72032004000100009
14. Montag M, Blankenstein TJ, Shabani N, Brüning A, Mylonas I. Evaluation of two commercialised in situ hybridisation assays for detecting HPV-DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch. gynecol. obstet.* 2011; 284(4):999-1005.
15. Qureshi MN, Rudelli RD, Tubbs RR, Biscotti CV, Layfield LJ. Role of HPV DNA testing in predicting cervical intraepithelial lesions: comparison of HC HPV and ISH HPV. *Diagn. cytopathol.* 2003; 29(3):149-55.

16. Vosse BA, Seelentag W, Bachmann A, Bosman FT, Yan P. Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: comparison of the avidin-biotin complex system and the EnVision+ system. *Appl. immunohistochem. mol. morphol.* 2007; 15(1):103-7.
  17. Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch. pathol. lab. med.* 2003; 127(8): 940-5.
  18. Unger ER. In situ diagnosis of human papillomaviruses. *Clin. lab. med.* 2000; 20(2):289-301.
  19. Dabić MM, Hlupić L, Babić D, Jukić S, Seiwerth S. Comparison of polimerase chain reaction and catalyzed signal amplification in situ hybridization methods for human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Arch. med. res.* 2000; 35(6):511-6.
  20. Tbakhi A, Totos G, Hauser-Kronberger C et al. Fixation conditions for DNA and RNA in situ hybridization: a reassessment of molecular morphology dogma. *Am. j. pathol.* 1998; 152(1):35-4.
- 
- 

**Correspondência/Correspondence to:**

Lidia Midori Kimura  
Núcleo de Patologia Quantitativa – Centro de Patologia – Instituto Adolfo Lutz  
Av. Dr. Arnaldo, 355 – 7º andar – Sala 705  
Pacaembu – São Paulo – SP  
CEP: 01246-902



Acesse a versão eletrônica em:  
[www.ccd.saude.sp.gov.br](http://www.ccd.saude.sp.gov.br)

Rede de Informação e Conhecimento:  
<http://ses.sp.bvs.br/php/index.php>

Colabore com o BEPA:  
[bepa@saude.sp.gov.br](mailto:bepa@saude.sp.gov.br)

---

*Atualização*

## Informação Zika vírus e microcefalia no estado de São Paulo

### *Zika virus and microcefalia information in the State of São Paulo*

**Renata Soares Martins; Michele Higa Fróes; Walkiria Delnero Almeida Prado; Gizelda Katz**

Central/Cievs-SP. Centro de Vigilância Epidemiológica. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil

---

Em outubro de 2015 a Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco notificou e solicitou apoio do Ministério da Saúde para complementar as investigações iniciais de 26 casos de microcefalia, recebidas de diversos serviços de saúde nas semanas anteriores à notificação. Por se tratar de evento raro e comparando com o perfil clínico e epidemiológico dessa doença no Estado, concluiu-se que se tratava de evento de importância para a saúde pública estadual. Naquele momento, uma das principais hipóteses sob investigação era a infecção pelo vírus Zika, potencializando a ocorrência de microcefalias e das demais causas conhecidas como outras infecções virais, exposição a produtos físicos, químicos ou fatores genéticos.

Em 28 de novembro de 2015, com base nos resultados preliminares das investigações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais, além da identificação do vírus Zika em líquido amniótico de duas gestantes da Paraíba com histórico de doença exantemática durante a gestação e fetos com microcefalia, e da identificação de vírus Zika em tecido de recém-nascido com microcefalia que evoluiu para óbito no estado do Ceará, o Ministério

da Saúde reconheceu a relação entre o aumento na prevalência de microcefalias no Brasil com a infecção pelo vírus Zika durante a gestação. No dia seguinte, 29 de novembro, mudou a classificação desse evento, no âmbito do RSI, para potencial Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII).

Com o aumento de casos no ano de 2015, o Ministério da Saúde elaborou o “Protocolo de atenção e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do Sistema Nervoso Central (SNC)”, em parceria com as Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde.

No período de outubro a dezembro de 2015, o estado de São Paulo teve 127 notificações de casos de microcefalia no Registro de Eventos em Saúde Pública (RESP), sendo que destes, 4 foram confirmados para infecção congênita sem identificação etiológica, 3 foram confirmados para infecção congênita por STORCH,<sup>I</sup> 41 permanecem em investigação (11 foram classificados como provável infecção congênita<sup>II</sup> e 20 foram classificados como provável infecção por Zika<sup>III</sup>) e 79 foram descartados (58 descartados para microcefalia e 21 descartados para infecção congênita).

---

<sup>I</sup>2 sífilis; 1 citomegalovírus.

<sup>II</sup>Provável infecção congênita: Recém-nascido com exame de imagem alterado sugestivo de infecção congênita.

<sup>III</sup>Provável infecção por Zika: Gestante com exantema durante a gestação e recém-nascido com alteração de imagem e STORCH negativo.



No período de 1º de janeiro de 2016 a 31 de dezembro de 2016 foram notificados no Resp 790 casos de microcefalia, sendo que destes 13 foram confirmados de infecção congênita sem identificação etiológica, 18 foram confirmados de infecção congênita por STORCH,<sup>IV</sup> 28 foram confirmados laboratorialmente para infecção por Zika, 345 permanecem em investigação (43 foram classificados como provável infecção congênita<sup>I</sup> e 15 foram classificados como provável infecção por Zika<sup>II</sup>) e 386 foram descartados (190 descartados para microcefalia e 196 descartados para infecção congênita).

Entre 1º e 17 de janeiro de 2017 foram notificados no Resp 14 casos de microcefalia,

sendo que 10 permanecem em investigação (3 classificados como provável infecção congênita) e 4 casos foram descartados para microcefalia.

A distribuição dos casos referentes ao período de janeiro de 2016 a janeiro de 2017, segundo município, pode ser observado nos Mapas 1, 2, 3 e 4.

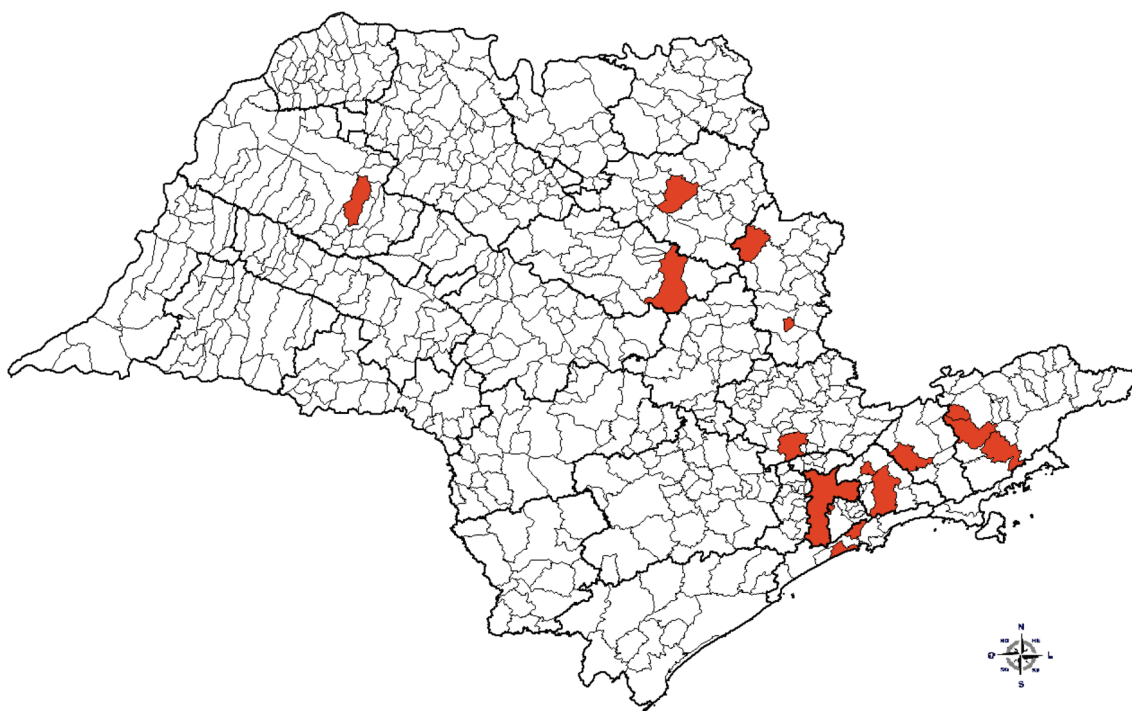
Os municípios que não possuem casos em investigação ou casos confirmados (zero casos) não constam listados nesta tabela.

Para facilitar a consulta e por GVE (Mapas 1, 2, 3 e 4) somaram-se os casos em investigação com os casos prováveis infecção por Zika e provável infecção congênita.

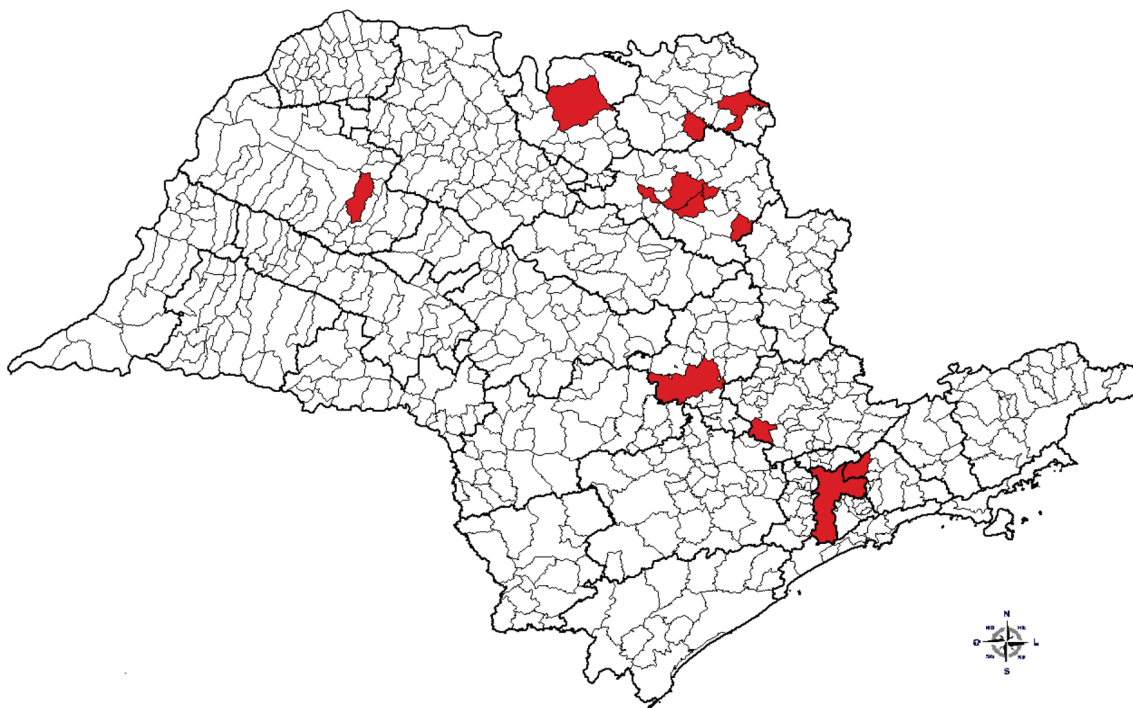
**Tabela 1.** Classificação dos casos suspeitos de microcefalia notificados no Registro de Eventos em Saúde Pública (RESP) – 2015 a janeiro de 2017, estado de São Paulo

| Classificação  | 2015       | 2016       | 2017      | Total      |
|--|------------|------------|-----------|------------|
|  | N          | N          | N         | N          |
| <b>Total de casos notificados</b>                                    | <b>127</b> | <b>790</b> | <b>14</b> | <b>931</b> |
| Casos notificados e confirmados                                      | 7          | 59         | 0         | 66         |
| Casos confirmados de infecção congênita sem identificação etiológica | 4          | 13         | 0         | 17         |
| Casos confirmados com amostra positiva para vírus zika               | 0          | 28         | 0         | 28         |
| Casos confirmados sugestivo de infecção congênita por STORCH         | 3          | 18         | 0         | 21         |
| Casos notificados em investigação                                    | 41         | 345        | 10        | 396        |
| Casos prováveis infecção congênita                                   | 11         | 43         | 3         | 56         |
| Casos prováveis Zika   | 20         | 15         | 0         | 35         |
| Casos notificados e descartados                                      | 79         | 386        | 4         | 469        |
| Casos descartados sem microcefalia                                   | 58         | 190        | 4         | 252        |
| Casos descartados por outras causas                                  | 21         | 196        | 0         | 217        |

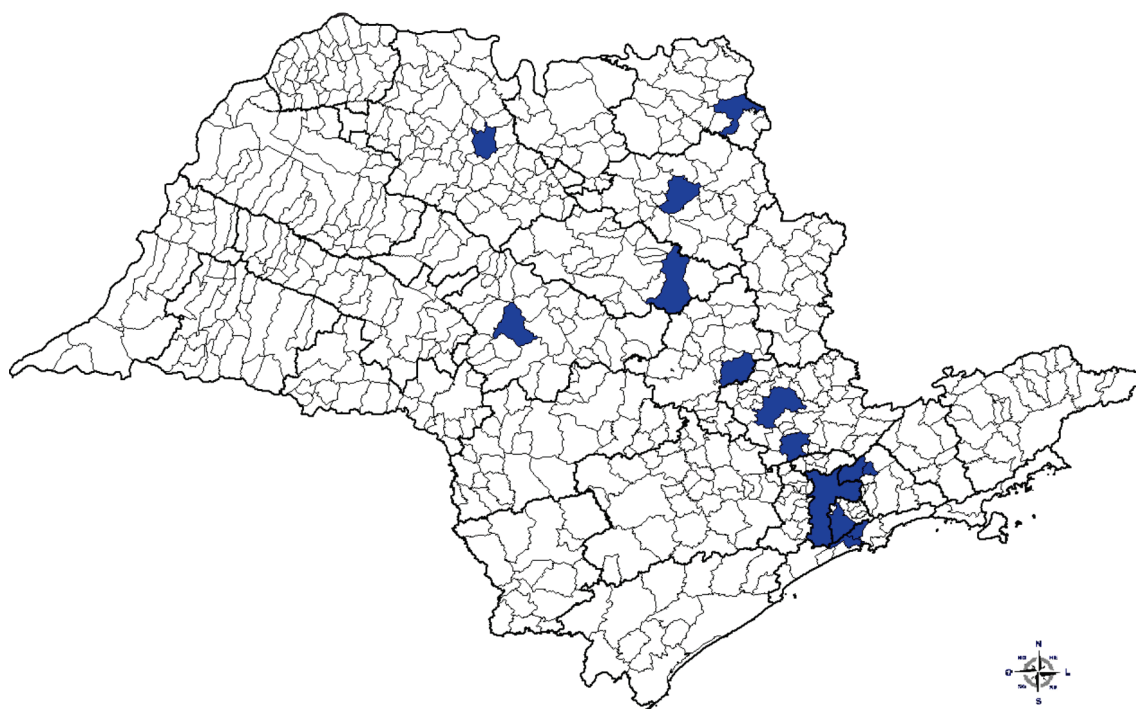
<sup>IV</sup>5 citomegalovírus; 6 sífilis; 5 toxoplasmose; 1 parvovírus.



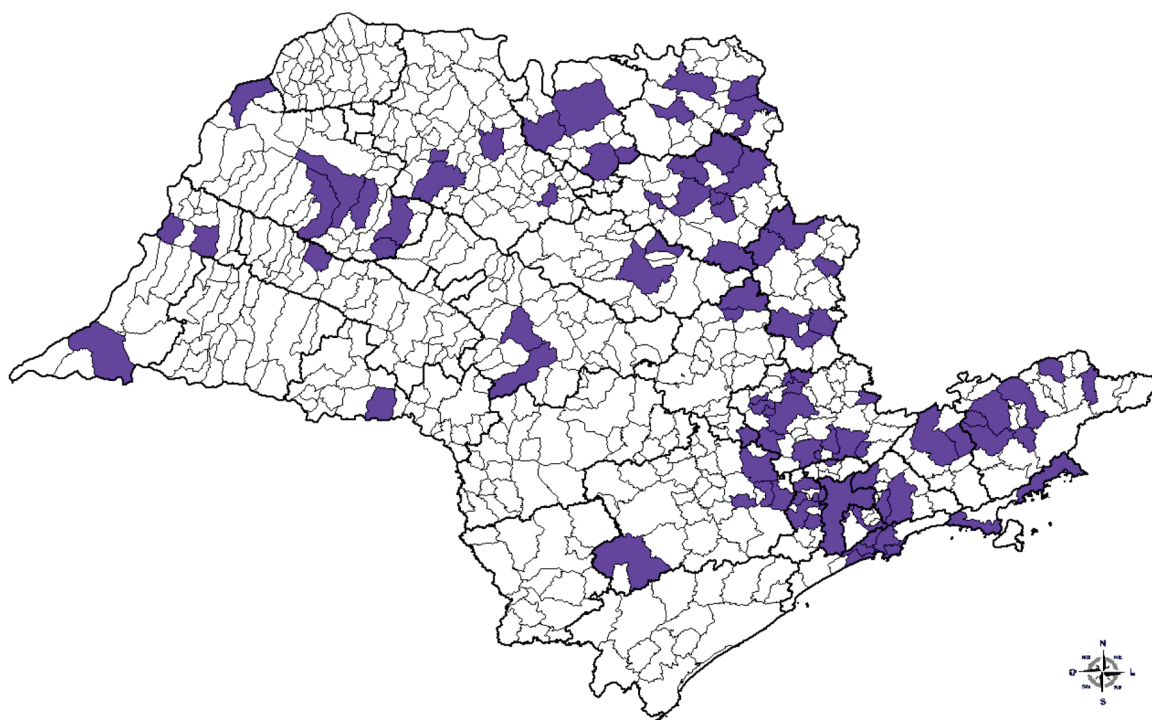
**Mapa 1.** Casos de Microcefalia, estado de São Paulo, 2015-2015, Municípios com casos confirmados de infecção congênita por STORCH



**Mapa 2.** Casos de Microcefalia, estado de São Paulo, 2015-2015, Municípios com casos confirmados de Zika laboratorialmente



**Mapa 3.** Casos de Microcefalia, estado de São Paulo, 2015-2015, Municípios com casos confirmados de infecção congênita sem identificação etiológica



**Mapa 4.** Casos de Microcefalia, estado de São Paulo, 2015-2015, Municípios com casos confirmados em investigação

*Atualização*

## Alerta sarampo, rubéola e síndrome da rubéola congênita. Atualização fevereiro de 2017

### *Measles, rubella and congenital rubella syndrome alert. Updatdtte February 2017*

#### **Equipe Técnica**

Divisão de Doenças Respiratórias. Centro de Vigilância Epidemiológica. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil

Após 22 anos do compromisso assumido de eliminar a circulação endêmica do vírus do sarampo no continente americano, com implementação de atividades de vacinação, vigilância e diagnóstico da doença, a região das Américas foi a primeira considerada livre da doença em 27 de setembro de 2016.<sup>1</sup>

A declaração de eliminação do sarampo foi feita pelo Comitê Internacional de Especialistas para Documentação e Verificação do Sarampo, Rubéola e Eliminação da Síndrome da Rubéola Congênita nas Américas. O anúncio ocorreu durante o 55º Conselho Diretor da Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial de Saúde (OPAS/OMS), do qual também participaram autoridades de saúde governamentais dos países de todas as Américas. As outras cinco regiões do mundo têm como meta alcançar a eliminação até 2020.<sup>2</sup>

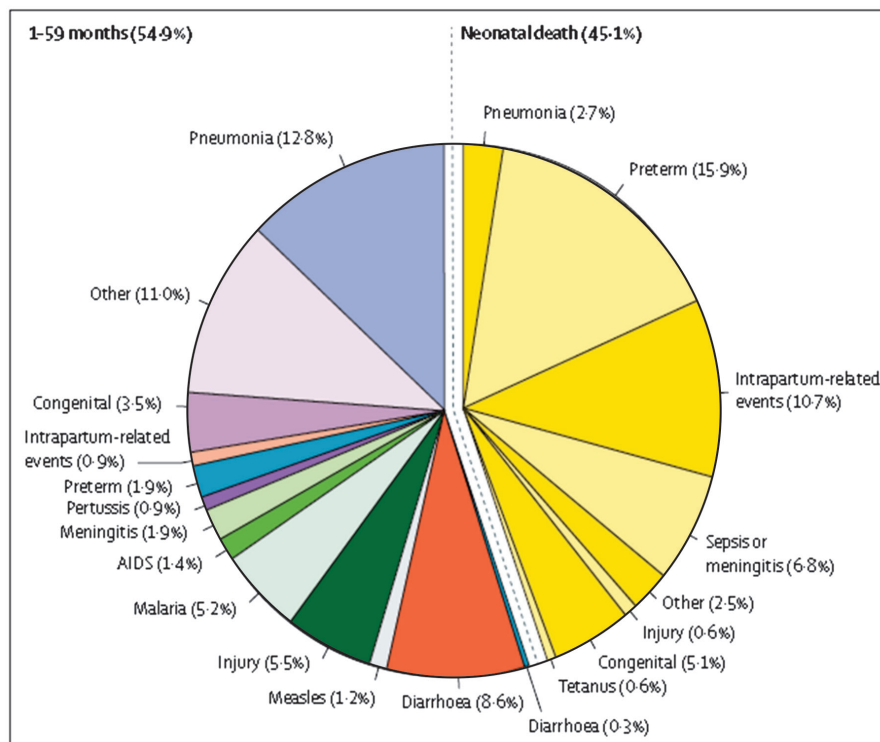
O Brasil recebeu a certificação da eliminação da rubéola em 5 de dezembro de 2015, após cinco anos sem casos registrados.<sup>3</sup>

O sarampo é uma doença viral aguda altamente transmissível, que pode ser especialmente grave e evoluir com complicações eventualmente fatais. Após exposição a um caso de sarampo, praticamente todos os indivíduos suscetíveis adquirem a doença. O vírus pode ser transmitido cerca de 5 dias antes e 5 dias após a erupção cutânea. Desta maneira, não é possível se determinar quando a exposição poderá ocorrer.

Como resultado dos esforços globais para a eliminação do sarampo, 244.704 casos da doença foram relatados em todo o mundo em 2015, o que representa um declínio significativo em relação aos anos anteriores. Outrossim, a maioria destes casos foi notificada na África e na Ásia. E apesar da disponibilidade de uma vacina segura e eficaz contra a doença existir há várias décadas, o sarampo foi responsável, em 2015, por 1% a 2% dos óbitos globais em menores de cinco anos.<sup>4</sup> A Figura 1, discriminada, ilustra este dado.

A Região das Américas cumpriu o objetivo de eliminar a circulação endêmica do sarampo em 2002. A série histórica da doença na região no período pós-eliminação (2003-2010) foi relativamente estável, com uma média anual de 153 casos importados ou relacionados à importação. No entanto, entre 2011 e 2015, Brasil, Canadá, Equador e Estados Unidos registraram 8 a 12 vezes mais casos que no período precedente. A alta transmissibilidade do vírus, coberturas vacinais não homogêneas e a globalização contribuíram para a maior frequência de casos nesse período.

A taxa regional de incidência de sarampo mais elevada nas Américas foi em 2014 (1,7 casos por milhão de habitantes). Esta incidência, porém, se mostrou inferior aos cinco casos por milhão de habitantes estabelecidos pela OMS em 2010, como meta para o progresso em direção ao objetivo de eliminação mundial do sarampo.



Fonte: [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com) Publicado online 10 de novembro 2016 [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31593-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31593-8)

**Figura 1.** Causas globais de óbitos em menores de 5 anos, 2015

No Brasil, um surto de sarampo originado a partir de um caso importado em 2013 durou 27 meses e resultou em 1.052 casos da doença reportados, principalmente, em dois estados (Ceará e Pernambuco). Nesse surto, foi identificado o genótipo D8, que circula na Europa.<sup>2</sup>

O surto em Pernambuco manteve-se de 19 de março de 2013 a 14 de março de 2014 e o grupo etário mais atingido foram crianças menores de um ano (48% dos casos). O surto no Ceará ocorreu entre 26 de dezembro de 2013 e 6 de julho de 2015. Adolescentes e adultos jovens (15-39 anos) foram a faixa etária mais afetada (39%), seguidos por crianças menores de um ano (28%).

Ações coordenadas com mobilização dos diferentes níveis de gestão (federal, estadual, municipal e local) para a implementação de medidas de controle, de prevenção, de

vigilância e de diagnóstico foram decisivas para alcançar a interrupção da circulação sustentada nesses locais em 6 de julho de 2015, 12 meses após o último caso registrado.<sup>6</sup>

A eliminação da rubéola no continente americano foi declarada em 2015; a partir desse ano, casos esporádicos foram registrados na região, relacionados à importação. A rubéola é uma infecção viral transmitida por gotículas, quando as pessoas espirram ou tosse. Se a infecção ocorrer durante a gravidez, especialmente nos primeiros três meses de gestação, podem ocorrer aborto espontâneo, morte fetal, óbito pós-nascimento e a Síndrome da Rubéola Congênita (SRC), com importantes e graves defeitos congênitos (cegueira, surdez, malformações cardíacas etc.). Uma mulher infectada com rubéola durante os primeiros três meses de gravidez tem até 90% de chance

de dar à luz um bebê com SRC ou de seu bebê não sobreviver. Globalmente, mais de 100.000 bebês nascem com SRC por ano.<sup>5</sup>

A Tabela 1, abaixo, apresenta o número anual de casos de sarampo, de rubéola e de Síndrome da Rubéola Congênita, no período de 2011 até a semana epidemiológica 4 de 2017 (que termina em 4 de fevereiro de 2017).

Desta forma, o controle e a eliminação do sarampo (e da rubéola) são possíveis, mas inerentemente são condições frágeis: sem controle global a possibilidade de reintrodução dos vírus é premente.

Não pode haver o risco de complacência com o sarampo e, por conseguinte, a rubéola.

Portanto, é fundamental o fortalecimento das atividades de imunização, vigilância e diagnóstico do sarampo, rubéola e da síndrome da rubéola congênita, para ultrapassar os desafios de manter e sustentar a eliminação, a saber:

- Alcançar altas (95%) e homogêneas coberturas vacinais para as duas doses da vacina sarampo-caxumba-rubéola (SCR, em nível nacional, estadual, regional, municipal e local).

- Aumentar a cobertura em campanhas de vacinação de seguimento. Apenas seis países conduziram campanhas de seguimento em 2014 e 2015; dois deles alcançaram coberturas vacinais maiores que 95% (República Dominicana e Venezuela), enquanto os outros quatro obtiveram coberturas menores que 90% (Argentina, Brasil, Chile e Paraguai).
- Manter uma vigilância epidemiológica de alta qualidade com pronta detecção e acompanhamento adequado dos casos suspeitos. Dessa forma, é necessário manter uma rede laboratorial que permita o diagnóstico diferencial, bem como estabelecer uma vigilância ativa e integrada de doenças exantemáticas febris,<sup>2</sup> haja vista a evidência de vírus produtores de exantema em circulação atualmente no Brasil e no Estado de São Paulo, como dengue, chikungunya e, especialmente, a infecção pelo vírus Zika.
- Por fim, assegurar que os países e os parceiros estratégicos mantenham o compromisso político de sustentar o processo de eliminação do sarampo e da rubéola,<sup>2</sup> nos diferentes níveis.

**Tabela 1.** Casos de sarampo, rubéola e SRC por ano nas Américas, Brasil e estado de São Paulo, 2011-2017\*

| Ano   | Américas |         |     | Brasil  |         |     | Estado de São Paulo |         |     |
|-------|----------|---------|-----|---------|---------|-----|---------------------|---------|-----|
|       | Sarampo  | Rubéola | SRC | Sarampo | Rubéola | SRC | Sarampo             | Rubéola | SRC |
| 2011  | 1.310    | 7       | 1   | 43      | 0       | 0   | 27                  | 0       | 0   |
| 2012  | 135      | 13      | 3   | 2       | 0       | 0   | 1                   | 0       | 0   |
| 2013  | 422      | 9       | 0   | 220     | 0       | 0   | 5                   | 0       | 0   |
| 2014  | 1.818    | 4       | 0   | 876     | 0       | 0   | 7                   | 0       | 0   |
| 2015  | 614      | 4       | 1   | 214     | 0       | 0   | 2                   | 0       | 0   |
| 2016  | 74       | 2       | 0   | 0       | 0       | 0   | 0                   | 0       | 0   |
| 2017* | 13       | 0       | 0   | 0       | 0       | 0   | 0                   | 0       | 0   |

\*Acessado em fevereiro de 2017; Disponível em [www.paho.org/immunization/MeaslesRubellaBulletin](http://www.paho.org/immunization/MeaslesRubellaBulletin); Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Vigilância de A a Z.; \*Acessado em fevereiro de 2017; Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/vigilancia-de-a-a-z>; \*SINANnet, dados até fevereiro de 2017  
Fontes: Pan American Health Organization, Measles/Rubella Weekly Bulletin.

---

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organização Pan-Americana da Saúde [internet]. Brasília; c2015 [acesso em dez 2016]. A Região das Américas é a primeira no mundo a ser declarada como livre da rubéola. Disponível em: [http://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=4828:a-regiao-das-americas-e-a-primeira-no-mundo-a-ser-declarada-como-livre-da-rubeola-&Itemid=821](http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=4828:a-regiao-das-americas-e-a-primeira-no-mundo-a-ser-declarada-como-livre-da-rubeola-&Itemid=821)
  2. Organização Pan-Americana da Saúde [internet]. Washington; c2016 [acesso em dez 2016]. Plano de ação para manter a eliminação do sarampo, rubéola e síndrome da rubéola congênita na região das Américas: relatório final. Disponível em: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=35679&Itemid=270&lang=pt](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=35679&Itemid=270&lang=pt)
  3. Ministério da Saúde [internet]. Brasília; c2015 [acesso em dez 2016]. Brasil recebe certificado de eliminação da rubéola em território nacional. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/21072-brasil-recebe-certificado-de-eliminacao-da-rubeola-em-territorio-nacional>
  4. Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu j et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *The Lancet* [internet]. 2016 dec [acesso em inserir data];388(10063). Disponível em [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31593-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31593-8)
  5. American Academy of Pediatrics. [Chapter title, inserir o título] In: Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS, eds. *Red Book: 2015 Report of the Committee on Infectious Diseases*. 30. ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2015. [Rubella, 688-95. (não entendi do que se trata essa informação)]
  6. Ministério da Saúde [internet]. Brasília; c2015 [acesso em dez 2016]. Estado do Ceará interrompe cadeia de transmissão do sarampo. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/19866-estado-do-ceara-interrompe-cadeia-de-transmissao-do-sarampo>
- 
-

## Atividades da Rede de Teste Rápido Molecular para Tuberculose no Estado de São Paulo

### *Activities of the Rapid Molecular Testing Network for Tuberculosis in the State of São Paulo*

Divisão de Tuberculose. Centro de Vigilância Epidemiológica. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil

## INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS), recomendou o uso do Xpert MTB/RIF para diagnóstico da tuberculose, uma nova geração de diagnóstico molecular automatizado, entre especialistas também denominado Teste rápido molecular para tuberculose (TRM-TB), e em 2014 publicou Manual de implementação, com evidências científicas atualizadas e experiências operacionais que reforçam as recomendações do uso do teste para:

1. Diagnóstico de Tuberculose (TB) pulmonar utilizando amostras de escarro, bem como lavado gástrico e aspirado bronco-alveolar em:

- Adultos com suspeita de TB, recomendação condicionada a recursos (evidência científica de alta qualidade);
- Crianças com suspeita de TB, recomendação condicionada a recursos (evidência científica de baixa qualidade);
- Adultos com suspeita de TB multidroga-resistente (MDR-TB) ou HIV associada a TB, forte recomendação (evidência científica de alta qualidade) ou crianças (forte recomendação e baixa evidência).

2. Diagnóstico de TB extrapulmonar utilizando amostras de liquor para meningite (forte recomendação e baixa evidência), linfonodos e outros tecidos (recomendação condicionada a recursos e baixa evidência).

Até o momento, o uso do teste não está indicado para amostras de fezes, urina ou sangue pela falta de dados sobre a utilidade do método nesses casos.

### O que é o TRM-TB

O TRM-TB é um teste automatizado, simples, rápido e de fácil execução nos laboratórios. O principal objetivo da introdução do novo teste é detectar, simultaneamente, o *Mycobacterium tuberculosis* e a resistência à rifampicina em aproximadamente duas horas, de forma a proporcionar em tempo ágil o diagnóstico.

O TRM-TB apresenta sensibilidade para diagnóstico em torno de 90%, maior que o da baciloscopia (60 a 80%) e especificidade de cerca de 99%. Para a detecção de resistência à rifampicina a sensibilidade é de 95% e a especificidade de 98%.

Outra vantagem é que os requisitos de biossegurança são os mesmos da baciloscopia.

A incorporação dessa nova tecnologia para o diagnóstico da TB no Sistema Único de Saúde



(SUS) foi aprovada pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (Conitec) e publicada no Diário Oficial da União em setembro de 2013.

### **Critérios nacionais de implantação**

O Ministério da Saúde (MS) iniciou em 2013 discussões com vários estados da federação para implantação do TRM-TB, tendo estabelecido os seguintes critérios de distribuição:

- Capitais e demais municípios com mais de 130 casos novos registrados em 2012;
- Municípios sede de presídios com estrutura de laboratório e demanda significativa de baciloscopia;
- Municípios de fronteira e/ou com população indígena (> 50 casos novos notificados em 2011);
- Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen) que tenham demanda significativa de baciloscopia.

O MS adquiriu 160 equipamentos de TRM-TB, de quatro módulos cada, sendo que 148 foram destinados a 125 laboratórios, de 92 municípios que compõem a Rede de Teste Rápido para Tuberculose (RTR-TB). Outros 12 equipamentos foram destinados para pesquisas em nove municípios. Todas as Unidades da Federação (UFs) estão inseridas nessa rede.

### **Critérios estaduais de implantação**

A estratégia do Estado de São Paulo (ESP) foi distribuir os equipamentos pelas regiões de saúde, na rede estadual de laboratórios do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e em municípios com mais de 130 casos novos

e/ou demanda significativa de baciloskopias, conforme o critério do MS. Apenas um laboratório do sistema prisional recebeu um equipamento.

### **Critérios para utilização do TRM-TB**

Segundo recomendações da OMS e do MS, o TRM-TB deve ser utilizado para diagnóstico de todos os casos suspeitos de TB, preferencialmente população vivendo com HIV/AIDS (PVHA), população privada de liberdade (PPL) e para todos os retratamentos. Importante lembrar que para os retratamentos a baciloscopia deve ser realizada concomitantemente, uma vez que a simples detecção do MTB não significa doença em atividade, mas sim DNA detectado. Não há evidências de quanto tempo após o tratamento o DNA permanece ainda detectado.

As recomendações do MS de realização do TRM-TB e dos demais exames laboratoriais disponíveis para o diagnóstico da doença, estão contidas na Nota Informativa, nº 09/2014/CGPNCT/DEVEP/SVS/MS.

Por razões técnicas e operacionais, o ESP adotou condutas que diferem dessas recomendações:

1. Manter a coleta de duas amostras, e assim garantir a realização de todos os exames (baciloscopia quando necessário, cultura e Teste de Sensibilidade -TS).
2. Não iniciar o tratamento com esquema para MDR-TB, quando o TRM-TB detectar resistência à rifampicina, em razão da baixa prevalência de resistência no ESP. Os casos que apresentarem resistência à rifampicina pelo TRM-TB deverão ser discutidos com a equipe do Centro de

Vigilância Epidemiológica – Divisão de Tuberculose (CVE/TB). O esquema de tratamento será individualizado de acordo com critérios clínicos, laboratoriais e radiológicos de cada caso, aguardando o resultado do TS. Quando o resultado do TS no meio líquido for sensível a isoniazida e rifampicina, a orientação no ESP é manter o esquema iniciado e rediscutir o caso. Essa decisão baseia-se no fato que as evidências científicas até o momento não indicam quais dos métodos (fenotípico ou genotípico) identificam melhor a resistência.

### Sistema de informação

Com a implantação da RTR-TB, houve a necessidade do monitoramento da realização dos referidos testes. O Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) elaborou um formulário *online*, a ser preenchido mensalmente pelos laboratórios da rede, mesmo aqueles que já utilizam o sistema informatizado Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL).

Esse monitoramento em âmbito nacional não prevê o acompanhamento nominal dos pacientes. Assim, o ESP disponibilizou na página do IAL um sistema controlado por senha, no qual todos os laboratórios informam com dados de identificação, semanalmente, todos os casos detectados, incluindo os RIF resistentes. Apesar desses sistemas disponíveis, a informação do resultado do exame para o usuário local e para a vigilância e monitoramento dos casos ainda é obstáculo para o sucesso da implantação da RTR-TB.

Dos 36 laboratórios que receberam os equipamentos, apenas os de Guarulhos, Itapeverica da Serra, Santo André, Corevali

e os IAL possuem um sistema que permite o monitoramento online em todos os níveis. Os 7 laboratórios do Município de São Paulo, bem como São Bernardo e Barueri utilizam um sistema informatizado, que permite interação com o nível local on line, mas não com os níveis estaduais. Nos restantes, o sistema é manual.

### Indicadores analisados no Informe técnico da RTR-TB no ESP

#### Produção do TRM-TB

- Número de municípios que reportaram dados da produção do TRM;
- Número de TRM-TB realizados para casos novos e de retratamento da tuberculose;
- Percentual de exames realizados em relação ao número de exames estimados por equipamento de quatro módulos no período – rendimento.

#### Vigilância Epidemiológica

- Percentual de resultado MTB detectado entre o total de TRM-TB realizado (casos novos e de retratamento);

Confirmação bacteriológica dos casos, segundo forma clínica após a implantação do TRM-TB;

- Percentual de resultados de casos resistentes à rifampicina entre o total de MTB positivo;
- Avaliação dos casos com resistência à rifampicina.

A implantação dos equipamentos foi realizada por etapas.

No final de 2013 e início de 2014, uma equipe de monitores do ESP foi treinada por técnicos da Cepheid (laboratório produtor do TRM-TB) e MS. Em seguida, dois técnicos de cada laboratório que receberam o equipamento foram capacitados pelos monitores. O primeiro equipamento foi instalado em 2014 no laboratório municipal de Guarulhos e os exames iniciados em março do mesmo ano. Em junho desse mesmo ano, o equipamento foi instalado no laboratório municipal de Santos e os demais entregues em outubro gradativamente instalados. Dessa forma, o ESP em 2014, implantou o TRM-TB inicialmente em 31 laboratórios. Em 2015, foram instalados os restantes num total de 36 laboratórios com 47 equipamentos.

Atualmente os 47 equipamentos de quatro módulos estão distribuídos em 21 municípios, conforme descrito na Tabela 1.

Em 2014, os 31 laboratórios realizaram cerca de 30.000 testes, com 6,7% de *MTB* detectado, e em 2015, de janeiro a dezembro, foram 138.596 TRMs, com 7,2% de detecção em 36 laboratórios, conforme descrito na tabela 2. Embora a classificação do tipo de caso não seja muito precisa (informação obtida da solicitação de exame), pode ser observada a diferença de detecção entre casos novos e retratamentos.

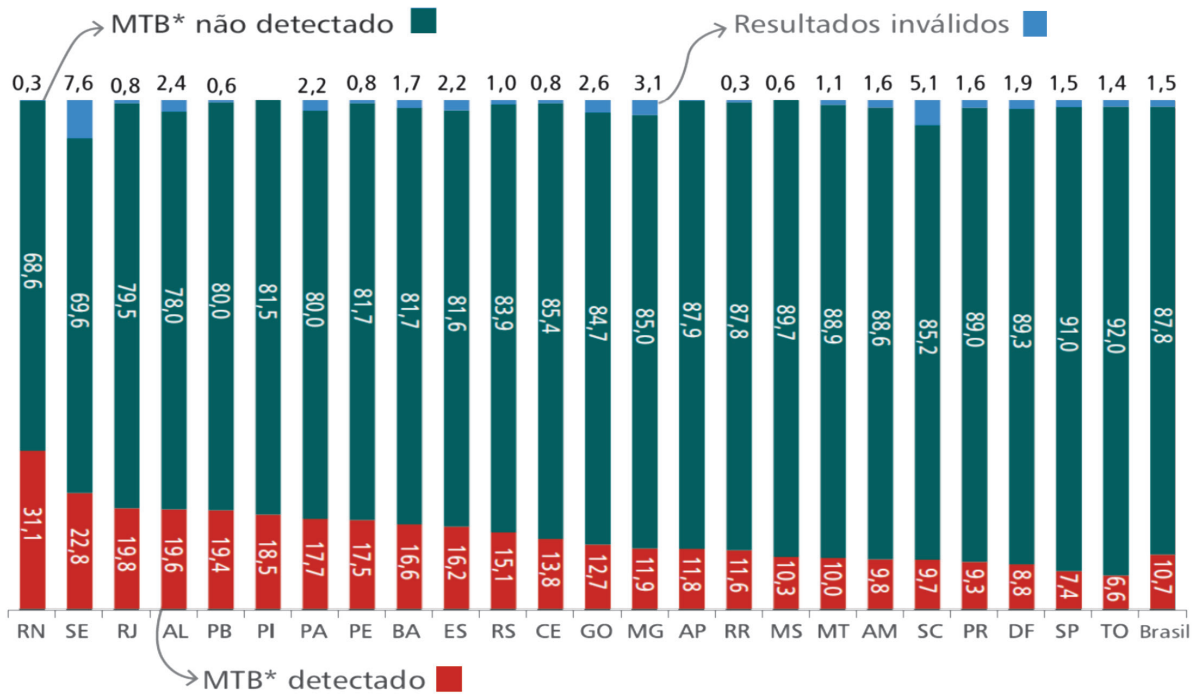
**Tabela 1.** Número de equipamentos de TRM-TB por município. Estado de São Paulo, 2015

| Municípios com equipamentos de TRM-TB |                       | Nº Equipamentos |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------|
| 1                                     | São Paulo             | 19              |
| 2                                     | Araçatuba             | 1               |
| 3                                     | Barueri               | 1               |
| 4                                     | Bauru                 | 1               |
| 5                                     | Bragança Paulista     | 1               |
| 6                                     | Campinas              | 3               |
| 7                                     | Carapicuíba           | 1               |
| 8                                     | Guarulhos             | 2               |
| 9                                     | Itapecerica da Serra  | 1               |
| 10                                    | Jundiaí               | 1               |
| 11                                    | Marília               | 1               |
| 12                                    | Presidente Prudente   | 1               |
| 13                                    | Ribeirão Preto        | 2               |
| 14                                    | Santo André           | 2               |
| 15                                    | Santos                | 3               |
| 16                                    | São Bernardo do Campo | 1               |
| 17                                    | São José do Rio Preto | 1               |
| 18                                    | Sorocaba              | 2               |
| 19                                    | Taubaté               | 1               |
| 20                                    | Tremembé              | 1               |
| 21                                    | Franco da Rocha       | 1               |
| <b>Total</b>                          |                       | <b>47</b>       |

A porcentagem de detecção de *MTB* de cerca de 7%, comparado com outros estados, é aparentemente baixa, isso pode ser explicado pelo maior número de sintomáticos respiratórios (SR) examinados no ESP. Quanto maior o número de SR examinados abrangendo a população em geral, menor será o número de casos de tuberculose detectados. Nas Figuras 1 e 2 os resultados podem ser comparados com outros estados.

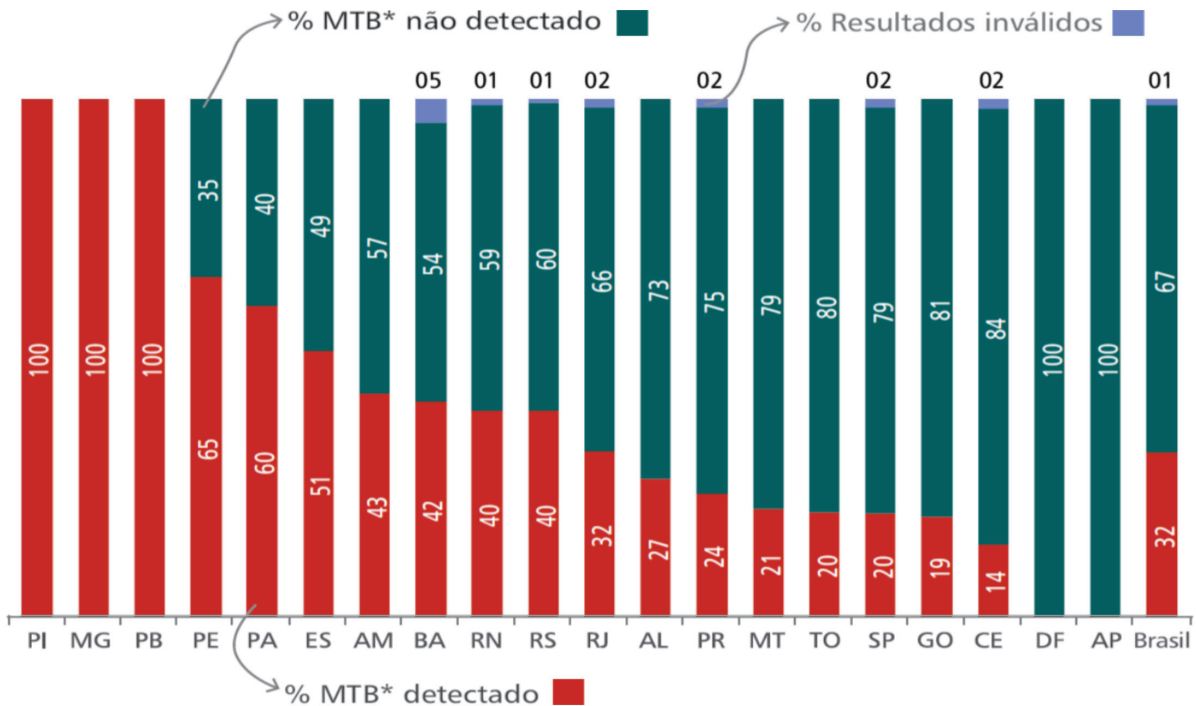
**Tabela 2.** TRM realizados em amostras no ESP segundo tipo de caso e resultado, 2014 e 2015

| Testes                 | 2014   |     |         |      | 2015   |     |         |     |         |      |         |     |
|------------------------|--------|-----|---------|------|--------|-----|---------|-----|---------|------|---------|-----|
|                        | Novos  | %   | Retrata | %    | Total  | %   | Novos   | %   | Retrata | %    | Total   | %   |
| Total TRM              | 29.177 |     | 343     |      | 29.520 |     | 136.687 |     | 1.909   |      | 138.596 |     |
| MTB detectado          | 1.871  | 6,4 | 75      | 21,8 | 1.946  | 6,7 | 9.592   | 7,0 | 396     | 20,7 | 9.988   | 7,2 |
| Rifampicina resistente | 41     | 2,2 | 11      | 14,7 | 52     | 2,7 | 366     | 3,8 | 24      | 6,1  | 390     | 3,9 |



\*Mycobacterium tuberculosis  
 Fonte: Rede de Teste Rápido para tuberculose

**Figura 1.** Teste Rápido Molecular para Tuberculose realizado para casos novos e retratamentos segundo resultado em porcentagens. Brasil, Junho de 2014 a maio de 2015



\*Mycobacterium tuberculosis  
 Fonte: Rede de Teste Rápido para tuberculose

**Figura 2.** Resultado do Teste Rápido Molecular para Tuberculose entre os casos suspeitos de retratamento, segundo unidade federada de realização de exame. Brasil, Junho de 2014 a maio de 2015

Comparando a confirmação bacteriológica de 2014 e 2015, verifica-se que houve um aumento de 81,9% para 83,4% para casos pulmonares, e a de extrapulmonares aumentou de 17,8 % para 20,9% (Tabela 3).

Na tabela 4, pode-se observar que em 2014, entre os casos pulmonares confirmados, 6,9% tiveram TRM-TB realizado e, em 2015, 35,9%, sendo para os extrapulmonares 2,2% e 13,8% nos mesmos anos, respectivamente. Esses dados podem indicar que o TRM teve um papel crescente na confirmação bacteriológica de casos de tuberculose.

Embora a Organização Mundial da Saúde (OMS) defina como padrão a realização de 12 exames por dia, no estado de São Paulo considerou-se que os laboratórios têm condições de realizar 14 a 15 exames/dia, com média de 22 dias úteis por mês, portanto estimando o

rendimento mensal por equipamento de 320 exames/mês.

Com essa prerrogativa, a análise da produção de exames mostra que os laboratórios que mais utilizam os equipamentos são os laboratórios municipais da Capital e Guarulhos, muitos deles com mais de 100% de rendimento, apontando para a necessidade de mais equipamentos (Quadro 1)

Os laboratórios com menor rendimento têm sido estimulados a melhorar seu desempenho.

Em 2014, 28 casos foram monitorados como resistentes à rifampicina pelo TRM-TB de um total de 52 amostras, sendo que 21,4% tinham TS no meio líquido (fenotípico) com resultado de rifampicina resistente e 42,9% rifampicina sensível (Tabela 5). Em 2015, esse quadro foi semelhante, 27,9% tinham resultado de TS resistente e 39,9% sensível.

**Tabela 3.** Confirmação bacteriológica dos casos de tuberculose segundo forma clínica, Estado de São Paulo, 2014 e 2015

|                                | 2014          |            | 2015          |            |
|--------------------------------|---------------|------------|---------------|------------|
|                                | Casos         | %          | Casos         | %          |
| Confirmados pulmonares         | 13.639        | 81,9       | 14.567        | 83,4       |
| Total de casos pulmonares      | 16.663        | 100        | 17.475        | 100        |
| Confirmados extrapulmonares    | 508           | 17,8       | 580           | 20,9       |
| Total de casos extrapulmonares | 2.854         | 100        | 2.772         | 100        |
| Total de confirmados           | 14.147        | 72,5       | 15.147        | 74,8       |
| <b>Total de casos</b>          | <b>19.517</b> | <b>100</b> | <b>20.247</b> | <b>100</b> |

Fonte: TBWEB

**Tabela 4.** Confirmação bacteriológica incluindo TRM-TB, dos casos de tuberculose segundo forma clínica, ESP, 2014 e 2015

| Confirmados             | 2014   |     | 2015   |      |
|-------------------------|--------|-----|--------|------|
|                         | Casos  | %   | Casos  | %    |
| pulmonares com TRM      | 941    | 6,9 | 5.225  | 35,9 |
| pulmonares              | 13.639 |     | 14.567 |      |
| extrapulmonares com TRM | 11     | 2,2 | 80     | 13,8 |
| extrapulmonares         | 508    |     | 580    |      |

Fonte: TBWEB

**Quadro 1.** TRM realizados nos anos de 2014 e 2015, segundo laboratórios, com respectivos rendimentos. Estado de São Paulo

| Laboratórios                      |                             | 2014          |               |                | 2015           |               |              |
|-----------------------------------|-----------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|---------------|--------------|
|                                   |                             | TRM           | Padrão*       | Rend.          | TRM            | Padrão*       | Rend.        |
| Lab. Estaduais em SP/<br>Capital  | Instituto Clemente Ferreira | 367           | 1.280         | 28.7           | 1.942          | 3.840         | 50.6         |
|                                   | Santa Casa                  | 241           | 960           | 25.1           | 1.605          | 3.840         | 41.8         |
|                                   | Emílio Ribas                | 121           | 960           | 12.6           | 1.068          | 3.840         | 27.8         |
|                                   | Unifesp                     | -             | -             | -              | 917            | 3.840         | 23.9         |
|                                   | CRT-Aids                    | 37            | 1.280         | 2.9            | 711            | 3.840         | 18.5         |
|                                   | <b>Total</b>                | <b>766</b>    | <b>4.480</b>  | <b>17.1</b>    | <b>6.243</b>   | <b>19.200</b> | <b>32.5</b>  |
| Lab. Municipais de SP/<br>Capital | Santo Amaro                 | 3.963         | 2.880         | 137.6          | 21.954         | 11.520        | 190.6        |
|                                   | S. Miguel                   | 3.529         | 2.880         | 122.5          | 15.810         | 11.520        | 137.2        |
|                                   | N.Sra do Ó                  | 672           | 1.920         | 35.0           | 10.111         | 7.680         | 131.7        |
|                                   | Lapa                        | 1.946         | 1.920         | 101.4          | 9.537          | 7.680         | 124.2        |
|                                   | Sudeste                     | 1.664         | 1.920         | 86.7           | 7.942          | 7.680         | 103.4        |
|                                   | Penha                       | 597           | 960           | 62.2           | 2.568          | 3.840         | 66.9         |
|                                   | SAE Líder                   | 237           | 960           | 24.7           | 997            | 3840          | 26.0         |
|                                   | <b>Total</b>                | <b>1.2608</b> | <b>13.440</b> | <b>93.8</b>    | <b>68.919</b>  | <b>53.760</b> | <b>128.2</b> |
| Lab. Área Metropolitana           | Guarulhos                   | 5.672         | 5.120         | 110.8          | 8.255          | 7.680         | 107.5        |
|                                   | S.B. Campo                  | 816           | 960           | 85.0           | 3.052          | 3.840         | 79.5         |
|                                   | I. da Serra                 | 766           | 960           | 79.8           | 2.850          | 3.840         | 74.2         |
|                                   | Santo André                 | 357           | 960           | 37.2           | 1.713          | 3.840         | 44.6         |
|                                   | Barueri                     | -             | -             | -              | 1.527          | 3.840         | 39.8         |
|                                   | Carapicuíba                 | 102           | 960           | 10.6           | 1.174          | 3.840         | 30.6         |
|                                   | F. da Rocha                 | -             | -             | -              | 967            | 2.880         | 33.6         |
|                                   | <b>Total</b>                | <b>7713</b>   | <b>8960</b>   | <b>86.1</b>    | <b>19.538</b>  | <b>29.760</b> | <b>65.7</b>  |
| Lab. Interior de São<br>Paulo     | Mun.Santos                  | 1652          | 2240          | 73.8           | 3.309          | 3.840         | 86.2         |
|                                   | HC R. Preto                 | -             | -             | -              | 1.842          | 2.880         | 64.0         |
|                                   | Mun. R. Preto               | 433           | 960           | 45.1           | 2.397          | 3.840         | 62.4         |
|                                   | Mun. Campinas               | 943           | 2.560         | 36.8           | 4.734          | 7.680         | 61.6         |
|                                   | Mun. Jundiaí                | 48            | 960           | 5.0            | 1.465          | 3.840         | 38.2         |
|                                   | Corevali                    | -             | -             | -              | 916            | 2.880         | 31.8         |
|                                   | Bragança Paulista           | 769           | 1280          | 60.1           | 2.597          | 3.840         | 67.6         |
|                                   | <b>Total</b>                | <b>3.845</b>  | <b>8.000</b>  | <b>48.1</b>    | <b>17.260</b>  | <b>28.800</b> | <b>59.9</b>  |
| IAL                               | CRL - Bauru                 | 48            | 960           | 5.0            | 3.748          | 3.840         | 97.6         |
|                                   | CRL - P.Prudente            | 828           | 960           | 86.3           | 3.434          | 3.840         | 89.4         |
|                                   | CRL - Campinas              | 496           | 960           | 51.7           | 2.639          | 3.840         | 68.7         |
|                                   | CRL - Marília               | 283           | 1.280         | 22.1           | 2.555          | 3.840         | 66.5         |
|                                   | CRL - Santos                | 502           | 1.920         | 26.1           | 4.649          | 7.680         | 60.5         |
|                                   | CRL - Sorocaba              | 1.120         | 2.560         | 43.8           | 4.491          | 3.840         | 117.0        |
|                                   | CLR - Araçatuba             | 520           | 960           | 54.2           | 2.029          | 3.840         | 52.8         |
|                                   | CRL - Santo André           | 484           | 1.280         | 37.8           | 1.081          | 3.840         | 28.2         |
|                                   | CRL - Taubaté               | 187           | 1280          | 14.6           | 1584           | 3.840         | 41.3         |
|                                   | CRL - S.J.R. Preto          | 120           | 960           | 12.5           | 426            | 3.840         | 11.1         |
|                                   | <b>Total</b>                | <b>4.588</b>  | <b>13120</b>  | <b>35.0</b>    | <b>26.636</b>  | <b>42.240</b> | <b>63.1</b>  |
| <b>Estado</b>                     | <b>29.520</b>               | <b>48.000</b> | <b>61.5</b>   | <b>138.596</b> | <b>173.760</b> | <b>79.8</b>   |              |

\* Padrão: estimado 320 exames/mês por aparelho por número de meses trabalhados no ano  
Rend.= rendimento (%)

**Tabela 5.** N° de amostras e casos com resultados de TRM-TB com rifampicina resistente segundo resultado de teste de sensibilidade no meio líquido, ESP, 2014 e 2015

**Tabela 5.** Casos de Tuberculose com resultados de TRM-TB rifampicina resistente, segundo resultado de Teste de sensibilidade no meio líquido, ESP, 2014 e 2015

| <b>Casos com resultado rifampicina resistente no TRM</b>             | <b>N°</b> | <b>%</b> | <b>N°</b>  | <b>%</b> |
|--|-----------|----------|------------|----------|
| TS líquido rifampicina sensível                                      | 12        | 42,9     | 67         | 40       |
| TS líquido rifampicina resistente                                    | 6         | 21,4     | 47         | 27,9     |
| Sem TS   | 10        | 35,7     | 54         | 32,1     |
| Total de casos   | 28        | 100      | 168        | 100      |
| <b>Total de amostras com resultado rifampicina resistente no TRM</b> | <b>52</b> |          | <b>390</b> |          |

Embora a recomendação fosse de realizar cultura e teste de sensibilidade no meio líquido para todos, isto não foi possível. Assim, em 2014, 35,7% dos casos não foram monitorados com realização do teste de sensibilidade e, em 2015, 32,1%, ou porque a cultura foi negativa ou por outros motivos operacionais. A hipótese aventada é que a prevalência de resistência a rifampicina seja mais baixa no ESP. Dessa forma, é de primordial importância uma investigação mais aprofundada (sequenciamento genético) das mutações relacionadas com a resistência dos casos que apresentaram resultados discordantes entre os métodos genotípicos e fenotípicos e seu possível envolvimento com a resposta clínica ao tratamento.

## CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O método Xpert®MTB/Rif representa mais do que uma nova técnica diagnóstica, “Ele agrega ao imaginário coletivo (de gestores, profissionais de saúde, de laboratório e usuários) a sensação de que progresso está sendo feito. Daí a necessidade de não frustrar as expectativas de implantação e garantir um

desdobramento satisfatório das ações” (Santos Filho e Sanchez 2014).

Até o momento, não foi possível avaliar se houve impacto do TRM-TB na redução do período entre o diagnóstico e o início de tratamento da tuberculose.

Idealmente, um sistema de informação laboratorial na plataforma web, com acesso aos resultados de exames em todos os níveis do sistema de saúde, possibilitando monitoramento dos casos, apoiaria o real impacto do uso do método. Nessa impossibilidade, ferramentas adicionais são necessárias e recomenda-se aos municípios:

- monitoramento sistemático dos casos detectados de MTB pelo TRM;
- acompanhamento com listagens nominais e variáveis específicas, junto aos laboratórios, dos casos identificados com resistência à rifampicina;
- avaliação clínica e baciloscopia nas situações de retratamentos de MTB detectados.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Informativa nº 9 de 2014. Recomendações sobre o diagnóstico da tuberculose por meio do teste rápido molecular para tuberculose. [aprovada em 18 dez 2014]
  2. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Ofício Circular nº 13 de 2014. Rede de Teste Rápido para Tuberculose (RTR-TB).
  3. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Rede de teste rápido molecular para tuberculose: seis meses de implantação. Abr 2015 p. 27.
  4. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Ofício Circular nº 5 de 2015. Procedimento Operacional Padrão TRM-TB.
  5. Jacobson KR, Tierney DB, Jeon CY, Mitnick CD, Murray MB. Treatment Outcomes among Patients with Extensively Drug-Resistant Tuberculosis: Systematic Review and Meta-Analysis. Clin. infect. dis. [internet]. 2010 [acesso em 19 abr 2016];51(1):6-14. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/content/51/1/6>
  6. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Rede de Teste Rápido para Tuberculose no Brasil: primeiro ano da implantação. Brasília: Ministério da Saúde; 2015 p. 64.
  7. Santos Filho ET, Sanchez MN. A implementação do teste molecular para diagnóstico da tuberculose pulmonar no Brasil: um estudo de caso. Fundação Ataulpho de Paiva; 2014.
  8. World Health Organization. Xpert mtb/rif implementation manual: technical and operational “how-to.” Geneva: World Health Organization; 2014.
- 
- 

**Correspondência/correspondence to:**  
dvtbc@saude.sp.gov.br





Acesse a versão eletrônica em:  
[www.ccd.saude.sp.gov.br](http://www.ccd.saude.sp.gov.br)

Rede de Informação e Conhecimento:  
<http://ses.sp.bvs.br/php/index.php>

Colabore com o BEPA:  
[bepa@saude.sp.gov.br](mailto:bepa@saude.sp.gov.br)

*Relato de encontro*

## **Programa Estadual DST/Aids-SP realiza 1ª Reunião da Pediatria** *STD/AIDS State Program-SP holds the 1st Meeting of Pediatrics*

**Carmen Silvia Bruniera Domingues; Daniela Bertolini; Eliana Galano**

Centro de Referência e Treinamento em DST/Aids-SP. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil



Foto: Daniela Bertolini, diretora da pediatria; e Eliana Galano, psicóloga, ambas do CRT/DST/Aids-SP, abrem a 1ª Reunião de Pediatria

Como forma de ampliar o cuidado às crianças e/ou adolescentes que vivem e convivem com a infecção pelo HIV, o Ambulatório de Pediatria do Centro de Referência e Treinamento DST/Aids-SP promoveu, no dia 15/02/2017, a 1ª Reunião da Pediatria do CRT DST/Aids-Programa Estadual DST/Aids-SP. O encontro contou com a participação de 50 profissionais de 32 serviços de aids pediátrica do estado de São Paulo, inclusive de universidades, e os temas abordados foram o “Diagnóstico Tardio do HIV em Crianças e Adolescentes” e a “Revelação Diagnóstica na Clínica da Aids Pediátrica: Novos desafios”.

Na apresentação sobre Diagnóstico Tardio foi exposto que essa é uma questão importante, que necessita de estratégias para o enfrentamento, por ser responsável por uma parcela

considerável de casos de transmissão vertical do HIV na atualidade. Dentre essas estratégias, foi publicada em janeiro de 2017 a Nota Técnica 002/2016/CRT-PE-DST/Aids-CCD/SES-SP com várias orientações, que incluem:

- o reforço de que todas as mulheres infectadas devem testar seus filhos menores de 20 anos;
- que todo homem infectado deve ser questionado periodicamente se tem parceiras e essas devem ser testadas;
- a orientação de que o pré-natal de mulheres soronegativas gestantes, parceiras de homens infectados deve ser realizado, quando possível, nas unidades especializadas em DST/Aids (Sae);

- o monitoramento sorológico dessas mesmas mulheres durante todo período de aleitamento materno, que deve ser realizado também nas unidades especializadas (Sae), até o período pós desmame.

A apresentação sobre Revelação Diagnóstica trouxe novas perspectivas dentro da aids pediátrica, abordando a questão do Segredo Familiar e suas consequências para as crianças e adolescentes que não são infectados pelo vírus, mas que convivem com familiares soropositivos. Foram discutidas várias publicações científicas que avaliaram os fatores que interferem na decisão dos pais em revelar o seu diagnóstico do HIV aos filhos, assim como sobre a ausência de diretrizes no que diz respeito à divulgação da exposição ao vírus e às medicações, àquelas crianças e/ou adolescentes não infectados. As discussões sugeriram que tais temas envolvem aspectos éticos, sociais e clínicos, sendo necessário que os serviços e equipes elaborem estratégias de trabalho que contemplem as necessidades desse grupo populacional.

A Reunião Clínica também contou com a participação da Dra. Regina Célia M. Succi apresentando os resultados da pesquisa “Revelação Diagnóstica a crianças e adolescentes que convivem com familiares soropositivos para o HIV/Aids”, realizada na Unifesp. Foram discutidas, no transcorrer da apresentação, as motivações dos pais para iniciarem a conversa sobre o HIV com seus filhos, assim como seus temores e barreiras

que dificultam essa revelação. Concluiu-se que as famílias que convivem com o HIV ainda enfrentam grandes dificuldades com o compartilhamento da realidade do diagnóstico da doença, sendo que o silêncio sobre o diagnóstico tende a atuar como uma defesa construída para evitar a exclusão e o preconceito.

Nesse primeiro evento os participantes mostraram-se muito envolvidos com a iniciativa, com sugestões sobre assuntos de interesse a serem discutidos em futuras reuniões.

Os encontros serão realizados bimestralmente, estando o próximo agendado para o dia 12 de abril de 2017. Essa iniciativa terá sempre o objetivo de compartilhar experiências e ampliar as discussões sobre os principais desafios enfrentados na Clínica da Aids Pediátrica. Para além dos avanços científicos, este grupo populacional apresenta necessidades que exigem dos profissionais e dos serviços de saúde respostas efetivas, com considerações aprofundadas quando se planeja um cuidado integral e humanizado.

Em breve, os serviços de aids pediátrica receberão o convite com a programação do próximo encontro. Devido ao grande número de pessoas que manifestaram interesse em participar, será necessária a confirmação da presença.

Para informações adicionais ou em caso de dúvidas, solicitamos que entrem em contato pelo endereço eletrônico: [grupopediatria@crt.saude.sp.gov.br](mailto:grupopediatria@crt.saude.sp.gov.br)

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes. Brasília; 2014.
  2. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Referência e Treinamento em DST/Aids. Guia de referências técnicas e programáticas para eliminação da transmissão vertical do HIV. São Paulo, 2014. 240p. ISBN:978-85-99792-23-0.
  3. Galano E, De Marco MA, Silva MH, Succi RCM, Machado DM. Revelação diagnóstica do HIV/Aids para crianças: um relato de experiência. *Psicol. cienc. prof.* vol.34 no.2 Brasília abr./jun. 2014.
  4. Galano E. O uso do “Kit Revelação Diagnóstica” no trabalho com crianças e jovens portadores de HIV/aids. In: Conselho Federal de Psicologia (CFP), Centro de Referência Técnica em Políticas Públicas (CREPOP). *Práticas em psicologia e políticas públicas - Práticas emergentes e inovadoras de psicólogos(as) no campo das DST/aids.* Brasília: CFP/CREPOP n.1; 2009, p.6-29.
- 
-



Acesse a versão eletrônica em:  
[www.ccd.saude.sp.gov.br](http://www.ccd.saude.sp.gov.br)

Rede de Informação e Conhecimento:  
<http://ses.sp.bvs.br/php/index.php>

Colabore com o BEPA:  
[bepa@saude.sp.gov.br](mailto:bepa@saude.sp.gov.br)

Notícia

## A Amazônia é a provável região de origem do vírus da febre amarela silvestre que circula hoje no norte do estado de São Paulo

*The Amazon is the probable region of origin of the virus of wild yellow fever that circulates today in the north of the state of São Paulo*



Haemagogus: (Imagem: Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN)

A Amazônia é a provável região de origem do vírus da febre amarela silvestre que circula hoje no norte do estado de São Paulo

O virologista Renato Pereira de Souza e sua equipe no Instituto Adolfo Lutz (IAL), na capital paulista, chegaram a essa conclusão depois de fazer o sequenciamento parcial do vírus extraído de macacos encontrados mortos no último semestre nas regiões de São José do Rio Preto e Ribeirão Preto. “Os vírus que infectavam esses animais são geneticamente mais próximos daqueles em circulação na Amazônia do que dos vírus de surtos anteriores ocorridos em São Paulo”,

conta Souza, diretor do Núcleo de Doenças de Transmissão Vetorial do IAL. “A Amazônia é possivelmente a fonte dos vírus que estão causando o surto atual em São Paulo e outros estados”, conta. No doutorado, concluído em 2013, Souza analisou como variaram as características genéticas do vírus da febre amarela de 1930 a 2008 na América do Sul. Ao reconstruir a evolução genética do vírus no tempo e no espaço, ele observou que a origem era sempre a Amazônia, onde o vírus circula nas áreas de floresta entre seres humanos e macacos, transmitido por mosquitos dos gêneros *Haemagogus*

e *Sabethes*. De tempos em tempos, o vírus é exportado, provavelmente de carona no sangue de pessoas assintomáticas, para outras regiões, onde subsiste por períodos curtos. “Acredito que esse quadro esteja se repetindo”, afirma Souza. O surto de 2017 já é considerado o maior em 14 anos. Em janeiro, foram confirmados 127 casos de infecção em quatro estados e 47 mortes (42 em Minas Gerais, três em São Paulo e duas no Espírito Santo). Nos últimos meses, o grupo do IAL notou que o vírus vem atingindo mais espécies de macacos em

São Paulo. Era encontrado em bugios e agora foi detectado em macacos-prego e saguis. Os pesquisadores temem que o vírus se espalhe por regiões onde há grandes populações do mosquito *Aedes aegypti*, que também transmite dengue, zika e chikungunya. Se chegar ao *Aedes*, a febre amarela pode se tornar uma doença urbana. “Não estamos preparados para isso”, diz Souza.

**Notícia publicada originalmente na Revista Pesquisa Fapesp de fevereiro de 2017, n. 252. Autor: Ricardo Zorzetto**



Sabethes (Imagem: Superintendência de Controle de Endemias - Sucea)

---

*Resumo*

## Caracterização do complexo *Candida glabrata* em isolados de hemocultura e avaliação da sensibilidade a antifúngicos

Hussein Ali Zein; Marcia de Souza Carvalho Melhem (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2014

---

### RESUMO

*Candida glabrata* assumiu grande importância na clínica médica, desde que, sua resistência adquirida ao fluconazol foi descrita. Além disso, estudos mostraram a fraca atividade *in vitro* de outros fármacos azólicos contra isolados dessa espécie. *C. glabrata* é agente de infecções invasivas e o monitoramento da eficácia de antifúngicos usados na prática médica frente a isolados dessa espécie tem relevância clínica. *C. bracarensis* e *C. nivariensis* são espécies relacionadas, fenotipicamente, à *C. glabrata* para as quais há necessidade de métodos moleculares para sua identificação. Na América Latina, a ocorrência de infecções em corrente sanguínea por *C. glabrata* e espécies correlatas não é tão alta quanto na América do Norte e, por isso, pouco é conhecido sobre sua distribuição e perfil de suscetibilidade a antifúngicos nessa região. Neste estudo, foram analisados 75 isolados com características morfológicas e bioquímicas de *C. glabrata*, obtidos da corrente sanguínea de pacientes atendidos em hospitais do estado de São Paulo, entre 2007 e 2013. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) de cinco fármacos antifúngicos: anfotericina B, caspofungina, voriconazol, fluconazol e itraconazol, foram determinadas pela metodologia de microdiluição de referência M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A ação fungicida de anfotericina B foi avaliada por método de curva de morte. A pesquisa das duas espécies correlatas foi realizada com metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR) em todos os isolados. Nenhum isolado de *C. bracarensis* e *C. nivariensis* foi encontrado neste estudo. Resistência a itraconazol foi encontrada em 18,6 % (14) das cepas de *C. glabrata*. Altos valores de CIM de voriconazol ( $> 0,5$  mg/L), de acordo com *cut-off* (ponto de corte) epidemiológico, foram observados para duas cepas. O intervalo de CIM para fluconazol variou de 4mg/L a 16mg/L, para caspofungina os valores de CIM situaram-se entre 0,03 mg/L e 0,5 mg/L e os de anfotericina B ficaram entre 0,12mg/L e 1 mg/L. Na curva de morte verificou-se que a maioria das cepas morreu antes das 24h, permanecendo viáveis apenas 3 isolados, sendo que 2 deles não sofreram ação fungicida da anfotericina B dentro das condições experimentais. Concluiu-se que fluconazol, anfotericina B e caspofungina mostraram forte efeito inibitório frente a todos os 75 isolados de *C. glabrata*; no entanto, resistência ao itraconazol e menor sensibilidade ao voriconazol, assim como tolerância à ação fungicida de anfotericina B foi observada. Esses dados indicaram emergência de isolados resistentes a mais de um fármaco e reforçam a necessidade de monitorar a atividade de antifúngicos usados na clínica médica, com vistas a otimizar o tratamento dos casos de candidemia.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Candida glabrata*. Espécies correlatas. Resistência. Antifúngicos.



---

*Abstract*

## *Characterization of Candida glabrata complex isolates in blood cultures and evaluation of sensitivity to antifungal*

Hussein Ali Zein; Marcia de Souza Carvalho Melhem (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2014

---

### ABSTRACT

*Candida glabrata* has assumed great importance in clinical medicine, since acquired resistance to fluconazole had been described. Furthermore, studies have shown the weak *in vitro* activity of other azole drugs against isolates of this species. Since *C. glabrata* is an agent of invasive infections, monitoring the effectiveness of antifungal agents used in medical practice against isolates of this species has become of great importance. *C. bracarensis* and *C. nivariensis* are phenotypically related species to *C. glabrata* and so it is necessary molecular methods to identify properly these members. In Latin America, the occurrence of bloodstream infections in *C. glabrata* and related species is not as high as in North America, and little is known about their distribution and antifungal susceptibility profile in this region. In this study, we analyzed 75 isolates with morphological and biochemical features of *C. glabrata* obtained from the bloodstream of patients treated in hospitals in the state of São Paulo, between 2007-2013. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of five antifungal drugs, namely: amphotericin B, caspofungin, voriconazole, fluconazole and itraconazole were determined by microdilution reference method M27-A3 from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The fungicidal action of amphotericin B was evaluated by the method of time-kill curves. The investigation of the two related species was performed with polymerase chain reaction (PCR) in all isolates. No isolate of *C. bracarensis* and *C. nivariensis* was found in this study. Resistance to itraconazole was found in 18.6% (14) strains of *C. glabrata*. High MIC values of voriconazole (> 0.5 mg/L), according to epidemiological cut-off were observed for two strains. The fluconazole-MICs ranged from 4mg/L to 16mg/L, caspofungin-MIC were between 0.03 mg/L and 0.5 mg/L, and amphotericin B-MIC were between 0.12 mg/L and 1 mg/L. Time-kill curves method showed that the majority of strains died before 24 h, remaining viable 3 isolates, and 2 of them suffered no fungicidal action of amphotericin B under the experimental conditions. It was concluded that fluconazole, amphotericin B, and caspofungin showed strong inhibitory effect against all 75 clinical isolates of *C. glabrata*, however, resistance to itraconazole and lower susceptibility to voriconazole, besides tolerance to killing effect of amphotericin B was observed. These data indicate the emergence of strains resistant to more than one drug and reinforce the need to monitor the activity of antifungal agents used in clinical medicine, in order to optimize the treatment of cases of candidemia.

**KEYWORDS:** *Candida glabrata*. Related species. Resistance. Antifungals Agents.

Resumo

## Estudo do Potencial anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma cruzi* do Ergosterol isolado do Basidiomiceto *Pleurotus salmoneostramineus*

Daiane Dias Ferreira; André Gustavo Tempone Cardoso (orientador)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil 2014

---

### RESUMO

Considerando a necessidade de novos tratamentos para doenças negligenciadas como a leishmaniose visceral e a doença de Chagas, o presente trabalho realizou o fracionamento do basidiomiceto comestível *Pleurotus salmoneostramineus* na busca por substâncias potencialmente antiparasitárias. Dentre as frações ativas, foi isolado um composto denominado ergosterol, o qual apresentou atividade anti-*Leishmania (L.) infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi*. O ergosterol foi ativo contra amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum*, com valor de Concentração Efetiva 50% (CE50) de 125 $\mu$ M e de 129 $\mu$ M contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. O estudo da citotoxicidade em células de mamífero resultou em um valor de CE50 de 619  $\mu$ M. Seu mecanismo de ação em tripomastigotas resultou uma rápida permeabilização da membrana plasmática, com a despolarização do potencial de membrana mitocondrial, levando o parasito à morte. Apesar disso, não se verificou aumento de espécies reativas de oxigênio no parasito, demonstrando que seu mecanismo de ação não envolve a indução de estresse oxidativo. A seleção de metabólitos secundários antiparasitários presentes na natureza pode fornecer futuros protótipos para o desenho de novos fármacos para doenças negligenciadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ergosterol. *Pleurotus salmoneostramineus*. *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania infantum*. Mecanismo de ação.

*Abstract*

## **Study of anti-*Leishmania* potential and anti-*Trypanosoma cruzi* isolated ergosterol basidiomycete *Pleurotus salmoneostramineus***

**Daiane Dias Ferreira; André Gustavo Tempone Cardoso (orientador)**

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil 2014

---

### **ABSTRACT**

Considering the need for new treatments for neglected diseases as visceral leishmaniasis and Chagas disease, in this work we fractionated the edible mushroom *Pleurotus salmoneostramineus* in the search for potential antiparasitic compounds. Among the active fractions, it was isolated the ergosterol, which showed anti-*Leishmania (L.) infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi* activities. The ergosterol was active against intracellular amastigotes of *Leishmania (L.) infantum* and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, with 50% Inhibitory Concentration (IC50) values of 125  $\mu$ M and 129  $\mu$ M, respectively. The cytotoxicity in mammalian cells resulted in an IC50 value of 619  $\mu$ M. Its mechanism of action in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes resulted in permeabilization of the plasma membrane, as well as depolarization of mitochondrial membrane potential, leading to parasite death. Nevertheless, there was no increase in reactive oxygen species, demonstrating that its mechanism of action does not involve the induction of oxidative stress in the parasite. The selection of antiparasitic secondary metabolites present in nature can provide future prototypes for the design of new drugs for neglected diseases.

**KEYWORDS:** Ergosterol. *Pleurotus salmoneostramineus*. *Trypanosoma cruzi*. *Leishmania infantum*. Mechanism of action.

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

O BEPA. **Boletim Epidemiológico Paulista, criado em 2004**, é uma publicação mensal da Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), órgão da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP), responsável pelo planejamento e execução das ações de promoção à saúde e prevenção de quaisquer riscos, agravos e doenças, nas diversas áreas de abrangência do Sistema Único de Saúde de São Paulo (SUS-SP).

### Missão

Editado nos formatos impresso e eletrônico, o BEPA tem o objetivo de documentar e divulgar trabalhos relacionados à vigilância em saúde, de maneira ágil, estabelecendo um canal de comunicação entre as diversas áreas técnicas e instâncias do SUS-SP. Além de disseminar informações entre os profissionais de saúde, o Boletim propõe o incentivo à produção de trabalhos técnico-científicos desenvolvidos no âmbito da rede de saúde. Nesse sentido, proporciona a atualização e o aprimoramento dos profissionais e das instituições responsáveis pelos processos de prevenção e controle de doenças, das esferas pública e privada.

### Arbitragem

Os manuscritos submetidos ao BEPA devem atender às instruções aos autores, que seguem as diretrizes dos Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos, editados pela Comissão Internacional de Editores de Revistas Médicas (Committee of Medical Journals Editors – Grupo de Vancouver), disponíveis em: <http://www.icmje.org/>

### Processo de revisão

Os trabalhos publicados no BEPA passam por processo de revisão por especialistas. A Coordenação Editorial faz uma revisão inicial para avaliar se os autores atenderam aos padrões do boletim, bem como às normas para o envio dos originais. Em seguida, artigos originais e de revisão são encaminhados a dois revisores da área pertinente, sempre de instituições distintas daquela de origem dos artigos, e cegos quanto à identidade e vínculo institucional dos

autores. Após receber os pareceres, os Editores, que detêm a decisão final sobre a publicação ou não dos trabalhos, avaliam a aceitação dos artigos sem modificações, a recusa ou a devolução aos autores com as sugestões apontadas pelos revisores.

### Tipos de artigo

**1. Artigo original** – Apresenta resultados originais provenientes de estudos sobre quaisquer aspectos da prevenção e controle de riscos e agravos e de promoção da saúde, desde que no escopo da epidemiologia, incluindo relatos de casos, surtos e/ou vigilância. Esses artigos devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para a saúde pública. Devem relatar os resultados a partir de uma perspectiva de saúde pública, podendo, ainda, ser replicados e/ou generalizados por todo o sistema (o que foi encontrado e o que a sua descoberta significa). Extensão máxima de 6.000 palavras; 10 ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos); 40 referências bibliográficas. Resumo em português e em inglês (*abstract*), com no máximo 250 palavras, e entre três e seis palavras-chave (*keywords*).

**2. Revisão** – Avaliação crítica sistematizada da literatura sobre assunto relevante à saúde pública. Devem ser descritos os procedimentos adotados, esclarecendo os limites do tema. Extensão máxima de 6.000 palavras; resumo (*abstract*) de até 250 palavras; entre três e seis palavras-chave (*keywords*); sem limite de referências bibliográficas; seis ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos).

**3. Artigos de opinião** – São contribuições de autoria exclusiva de especialistas convidados pelo Editor Científico, destinadas a discutir ou tratar, em maior profundidade, de temas relevantes ou especialmente oportunos, ligados às questões de saúde pública. Não há exigência de resumo ou *abstract*.

**4. Artigos especiais** – São textos não classificáveis nas categorias acima referidas, aprovados pelos Editores por serem considerados de especial relevância. Sua revisão admite critérios próprios, não havendo limite de tamanho ou exigências prévias quanto à bibliografia.

**5. Comunicações rápidas** – São relatos curtos, destinados à rápida divulgação de eventos significativos

no campo da vigilância à saúde. A sua publicação em versão impressa pode ser antecedida de divulgação em meio eletrônico. Extensão máxima de 2.000 palavras; sendo opcional a inclusão de resumo (até 150 palavras), palavras-chave (entre três e seis), ilustrações e referências. É recomendável que os autores das comunicações rápidas apresentem, posteriormente, um artigo mais detalhado.

**6. Informe epidemiológico** – Tem por objetivo apresentar ocorrências relevantes para a saúde coletiva, bem como divulgar dados dos sistemas públicos de informação sobre doenças, agravos, e programas de prevenção ou eliminação. Sua estrutura é semelhante à do artigo original, porém sem resumo ou palavras-chave; extensão máxima de 5.000 palavras; 15 referências; quatro ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos).

**7. Informe técnico** – Texto institucional que tem por objetivo definir procedimentos, condutas e normas técnicas das ações e atividades desenvolvidas no âmbito da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP). Inclui, ainda, a divulgação de práticas, políticas e orientações sobre promoção à saúde e prevenção e controle de riscos e agravos. Extensão máxima de 5.000 palavras; seis ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos); 30 referências bibliográficas. Não inclui resumo nem palavras-chave.

**8. Resumo** – Serão aceitos resumos de teses e dissertações até dois anos após a defesa. Devem conter os nomes do autor e do orientador, título do trabalho (em português e inglês), nome da instituição em que foi apresentado e ano de defesa. No máximo 250 palavras e entre três e seis palavras-chave.

**9. Pelo Brasil** – Deve apresentar a análise de um aspecto ou função específica da promoção à saúde, vigilância, prevenção e controle de agravos nos demais Estados brasileiros. Extensão máxima de 3.500 palavras; resumo com até 250 palavras; entre três e seis palavras-chave; 20 referências; seis ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos).

**10. Atualizações** – Textos que apresentam, sistematicamente, atualizações de dados estatísticos gerados pelos órgãos e programas de prevenção e controle de riscos, agravos e doenças do Estado de São Paulo. Até 3.000 palavras e oito ilustrações. Não inclui resumo nem palavras-chave.

**11. Republicação de artigos** – são artigos publicados em outros periódicos de relevância, nacionais ou

internacionais, abordando temas importantes cuja veiculação seja considerada, pelos Editores, de grande interesse à saúde.

**12. Relatos de encontros** – Devem focar o conteúdo do evento e não sua estrutura. Extensão máxima de 2.000 palavras; 10 referências (incluindo eventuais *links* para a íntegra do texto). Não incluem resumo nem palavras-chave.

**13. Notícias** – São informações oportunas de interesse para divulgação no âmbito da saúde pública. Até 600 palavras, sem a necessidade de referências.

**14. Dados epidemiológicos** – Atualizações de dados estatísticos sobre agravos e riscos relevantes para a saúde pública, apresentadas por meio de tabelas e gráficos. Inclui contextualização dos dados em até 300 palavras.

**15. Recortes Históricos – Texto com informações que registram determinado período, personagem ou fato da história da saúde pública e da ciência.** Sua revisão admite critérios próprios da Coordenação Editorial. A inclusão de bibliografia é opcional.

**16. Cartas** – As cartas permitem comentários sobre artigos veiculados no BEPA, e podem ser apresentadas a qualquer momento após a sua publicação. No máximo 600 palavras, sem ilustrações.

Observação: Informes técnicos, Informes epidemiológicos, Pelo Brasil, Atualizações e Relatos de encontros devem ser acompanhados de carta de anuência do diretor da instituição à qual o(s) autor(es) e o objeto do artigo estão vinculados.

#### **Apresentação dos trabalhos**

A cada trabalho deverá ser anexada uma carta de apresentação, assinada por todos os autores, dirigida à Coordenação Editorial do Boletim Epidemiológico Paulista. Nela deverão constar as seguintes informações: o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico; nenhum autor tem vínculos comerciais que possam representar conflito de interesses com o trabalho desenvolvido; todos os autores participaram da elaboração do seu conteúdo (elaboração e execução, redação ou revisão crítica, aprovação da versão final).

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados. Nesse sentido, os autores devem explicitar, em MÉTODOS, que a pesquisa foi concluída de acordo com os padrões exigidos pela Declaração de Helsinki e aprovada por comissão de ética reconhecida pela Comissão Nacional

de Ética em Pesquisa (Conep), vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS).

O trabalho deverá ser redigido em Português (BR), com entrelinhamento duplo. O manuscrito deve ser encaminhando em formato eletrônico (e-mail, CD-Rom) e impresso (folha A4), aos cuidados da Coordenação Editorial do BEPA, no seguinte endereço:

**Boletim Epidemiológico Paulista**  
Av. Dr. Arnaldo, 351, 1º andar, sala 124  
Pacaembu – São Paulo/SP – Brasil  
CEP: 01246-000  
E-mail: bepa@saude.sp.gov.br

### Estrutura dos textos

O manuscrito deverá ser apresentado segundo a estrutura das normas de Vancouver: título; autores e instituições; resumo e abstract; introdução; metodologia; resultados; discussão e conclusão; agradecimentos; referências bibliográficas; e tabelas, figuras e fotografias.

**Página de rosto** – Contém o título do artigo, que deve ser conciso, específico e descritivo, em português e inglês. Em seguida, deve ser colocado o nome completo de todos os autores e a instituição a que pertencem; indicação do autor responsável pela troca de correspondência; se subvencionado, indicar o nome da agência de fomento que concedeu o auxílio e o respectivo nome/número do processo; se foi extraído de dissertação ou tese, indicar título, ano e instituição em que foi apresentada.

**Resumo** – Colocado no início do texto, deve conter a descrição, sucinta e clara, dos propósitos do estudo, metodologia, resultados, discussão e conclusão do artigo. Em muitos bancos de dados eletrônicos o resumo é a única parte substantiva do artigo indexada e, também, o único trecho que alguns leitores leem. Por isso, deve refletir, cuidadosamente, o conteúdo do artigo.

**Palavras-chave (descritores ou unitermos)** – Seguindo-se ao resumo, devem ser indicadas no mínimo três e no máximo seis palavras-chave do conteúdo, que têm por objetivo facilitar indexações cruzadas dos textos e publicações pela base de dados, juntamente com o resumo. Em português, as palavras-chave deverão ser extraídas do vocabulário Descritores em Ciências em Saúde (DeCS), da Bireme (<http://decs.bvs.br/>); em inglês, do Medical Subject Headings (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>). Caso não sejam encontradas palavras-chave adequadas à temática

abordada, termos ou expressões de uso corrente poderão ser empregados.

**Introdução** – Iniciada em página nova, contextualiza o estudo, a natureza das questões tratadas e sua significância. A introdução deve ser curta, definir o problema estudado, sintetizar sua importância e destacar as lacunas do conhecimento abordadas.

**Metodologia (Métodos)** – Deve incluir apenas informação disponível no momento em que foi escrito o plano ou protocolo do estudo (toda a informação obtida durante a condução do estudo pertence à seção de resultados). Deve conter descrição, clara e sucinta, acompanhada da respectiva citação bibliográfica, dos procedimentos adotados, a população estudada (universo e amostra), instrumentos de medida e, se aplicável, método de validação e método estatístico.

– Devem ser apresentados em sequência lógica no texto, tabelas e figuras, colocando primeiramente as descobertas principais ou mais importantes. Os resultados encontrados devem ser descritos sem incluir interpretações e/ou comparações. Sempre que possível, devem ser apresentados em tabelas e figuras autoexplicativas e com análise estatística, evitando-se sua repetição no texto.

**Discussão** – Deve começar com a apreciação das limitações do estudo, seguida da comparação com a literatura e da interpretação dos autores, explorando adequada e objetivamente os resultados.

**Conclusão** – Traz as conclusões relevantes, considerando os objetivos, e indica formas de continuidade do trabalho.

**Agradecimentos** – Em havendo, deve-se limitar ao mínimo possível, sempre ao final do texto.

**Citações bibliográficas** – A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Ao longo do artigo, o número de cada referência deve corresponder ao número sobrescrito, **colocado sem parênteses e imediatamente após a respectiva citação**. Devem ser numeradas, a partir daí, consecutivamente.

Exemplo:

“No Brasil, a hanseníase ainda é um problema a ser equacionado e, no Estado de São Paulo, há várias regiões com altas taxas de detecção.<sup>1</sup> Dentre as diversas medidas tomadas pelo Ministério da Saúde (MS)<sup>2</sup> para eliminação da hanseníase como um problema de saúde pública no País, atingindo a prevalência de um caso para cada 10 mil habitantes, destacam-se as ações de educação e informação,

preconizadas para todos os níveis de complexidade de atenção.”

**Referências bibliográficas** – listadas ao final do trabalho, devem ser numeradas de acordo com a ordem em que são citadas no texto. A quantidade de referências deve se limitar ao definido em cada tipo de artigo aceito pelo BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista.

A normalização das referências deve seguir o estilo *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* (Vancouver), <http://www.icmje.org/>.

Para referências cujos exemplos não estejam contemplados neste texto, consultar os *links*: Guia de Apresentação de Teses (Modelo para Referências) da Faculdade de Saúde Pública/USP, [http://www.bvs-p.fsp.usp.br:8080/html/pt/paginas/guia/i\\_anexo.htm](http://www.bvs-p.fsp.usp.br:8080/html/pt/paginas/guia/i_anexo.htm) ou *Citing Medicine, 2nd edition*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>.

Segundo as normas de Vancouver, os títulos de periódicos são abreviados conforme aparecem na Base de dados PubMed, da *US National Library of Medicine*, disponível no site <http://www.pubmed.gov>, selecionando *Journals Database*.

Para consultar títulos de periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

Exemplos de Referências:

a) Artigos de periódicos:

Se a publicação referenciada apresentar dois ou mais autores, indicam-se até os seis primeiros, seguidos da expressão *et al*.

1. Opromolla PA, Dalbem I, Cardim M. Análise da distribuição espacial da hanseníase no Estado de São Paulo, 1991-2002. *Rev bras epidemiol.* 2005;8(4):356-64.
2. Ponce de Leon P, Valverde J, Zdero M. Preliminary studies on antigenic mimicry of *Ascaris Lumbricoides*. *Rev latinoam microbiol.* 1992;34:33-8.
3. Carlson K. Reflections and recommendations on reserch ethics in developing countries. *Soc Sci Med.* 2002;54(7):1155-9.

b) Livros:

1. Pierson D, organizador. *Estudos de ecologia humana: leituras de sociologia e antropologia social*. São Paulo: Martins Fontes; 1948.

A indicação da edição é necessária a partir da segunda.

c) Capítulos de livro:

1. Wirth L. História da ecologia humana. In: Pierson D, organizador. *Estudos de ecologia humana: leituras de sociologia e antropologia social*. São Paulo: Martins Fontes; 1948. p.64-76.

d) Autoria corporativa:

1. Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. *Amamentação e uso de drogas*. Brasília (DF); 2000.
2. Organización Mundial de la Salud. *Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos*. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

e) Dissertações de mestrado, teses e demais trabalhos acadêmicos:

1. Moreira MMS. *Trabalho, qualidade de vida e envelhecimento [dissertação de Mestrado]*. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública; 2000.
2. Rotta CSG. *Utilização de indicadores de desempenho hospitalar como instrumento gerencial [tese de Doutorado]*. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2004.

f) Trabalhos apresentados em congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

1. Levy MSF. *Mães solteiras jovens*. In: *Anais do 9º Encontro Nacional de Estudos Populacionais*; 1994; Belo Horizonte, BR. São Paulo: Associação Brasileira de Estudos Populacionais; 1995. p. 47-75.
2. Fischer FM, Moreno CRC, Bruni A. *What do subway workers, commercial air pilots, and truck drivers have in common?* In: *Proceedings of the 12. International Triennial Congress of the International Ergonomics Association*; 1994 Aug 15-19; Toronto, Canada. Toronto: IEA; 1994. v. 5, p. 28-30.

g) Documentos eletrônicos:

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE [boletim na internet]. *Síntese de indicadores sociais 2000* [acesso em 5 mar. 2004]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>
2. Sociedade Brasileira de Pediatria. *Calendário de vacinas para crianças/2008* [base de dados na internet]. Disponível em: [http://www.sbp.com.br/show\\_item2.cfm?id\\_categoria=21&id\\_detalhe=2619&tipo\\_detalhe=s&print=1](http://www.sbp.com.br/show_item2.cfm?id_categoria=21&id_detalhe=2619&tipo_detalhe=s&print=1)

3. Carvalho MLO, Pirotta KCM, Schor N. Participação masculina na contracepção pela ótica feminina. Rev Saúde Pública [periódico na internet]. 2001 [acesso em 25 maio 2004];35:23-31. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-9102001000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-9102001000100004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)

h) Legislação:

1. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União. 18 set. 2003; Seção 1:14.
2. São Paulo (Estado). Lei n. 10.241, de 17 de março de 1999. Dispõe sobre os direitos dos usuários dos serviços e das ações de saúde no Estado e dá outras providências. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 18 mar. 1999; Seção 1:1.
3. Casos não contemplados nestas instruções devem ser citados conforme indicação do *Committee of Medical Journals Editors* (Grupo Vancouver), disponível em <http://www.cmje.org>.

**Tabelas** – devem ser apresentadas em folhas separadas ou arquivo a parte, numeradas consecutivamente com

algarismos arábicos, na ordem em que forem citadas no texto. A cada uma deve ser atribuído um título breve, evitando-se linhas horizontais ou verticais. Notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas, não no cabeçalho ou título. Os arquivos não poderão ser apresentados em formato de imagem.

**Quadros** – são identificados como tabelas, seguindo numeração única em todo o texto. A exemplo das tabelas, devem ser apresentados, da mesma forma, em folhas separadas ou arquivo a parte, numerados consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que forem citados no texto. Também não poderão ser apresentados no formato de imagem.

**Figuras** – fotografias, desenhos, gráficos etc., citados como figuras, devem ser numerados consecutivamente, em algarismos arábicos, na ordem em que forem mencionados no texto, por número e título abreviado no trabalho. As legendas devem ser apresentadas conforme as tabelas. As ilustrações devem ser suficientemente claras para permitir sua reprodução, em resolução de no mínimo 300 dpi.

**Orientações Gerais** – tabelas, ilustrações e outros elementos gráficos devem ser nítidos e legíveis, em alta resolução. Se já tiverem sido publicados, mencionar a fonte e anexar a permissão para reprodução. O número de elementos gráficos está limitado ao definido em cada tipo de artigo aceito pelo BEPA. Abreviaturas, quando citadas pela primeira vez, devem ser explicadas.

**Instruções na íntegra em:**

<http://www.saude.sp.gov.br/coordenadoria-de-controle-de-doencas/publicacoes/bepa-edicoes-em-pdf>





Acesse a versão eletrônica em:  
[www.ccd.saude.sp.gov.br](http://www.ccd.saude.sp.gov.br)

Rede de Informação e Conhecimento:  
<http://ses.sp.bvs.br/php/index.php>

Colabore com o BEPA:  
[bepa@saude.sp.gov.br](mailto:bepa@saude.sp.gov.br)

