

BEPA

Boletim Epidemiológico Paulista

PUBLICAÇÃO MENSAL SOBRE AGRAVOS À SAÚDE PÚBLICA ISSN 1806-423-X

Volume 5 Nº 49

janeiro de 2008

Nesta Edição

Primeiro surto de *Cyclospora cayetanensis* investigado no Brasil, ocorrido em 2000, no município de General Salgado (SP), e medidas de controle 5
First Cyclospora cayetanensis outbreak reported in Brazil occurred in 2000, in the General Salgado city (SP), and control measures

Algoritmo de testes sorológicos de triagem para infecção por HTLV-1/2 usado no Instituto Adolfo Lutz 12
Algorithm of HTLV-1/2 serological screening tests employed by Instituto Adolfo Lutz

Febre amarela. 15
Yellow fever

Instruções aos Autores 25
Author's Instructions



Expediente

O Boletim Epidemiológico Paulista é uma publicação mensal da Coordenação de Controle de Doenças (CCD) da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.
Av. Dr. Arnaldo, 351 – 1º andar, sala 135
CEP: 01246-000 – São Paulo – Brasil
Tel.: (55) 11 3066-8823 e 3066-8825
bepa@saude.sp.gov.br

Coordenadora

Clelia Maria Sarmento de Souza Aranda

Editora Geral

Clelia Maria Sarmento de Souza Aranda

Editores Associados

Afonso Viviane Junior – Suceu/SP
Ana Freitas Ribeiro – CVE/CCD/SES-SP
Fernando Fiuza – Instituto Clemente Ferreira/CCD/SES-SP
José Carlos do Carmo – Cerest/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
Marta Lopes Salomão – IAL/CCD/SES-SP
Neide Yume Takaoka – Instituto Pasteur/CCD/SES-SP

Consultores Científicos

Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza
FM/Unesp/Botucatu/SP
Cristiano Corrêa de Azevedo Marques – CCD/SES-SP
Eliseu Alves Waldman – FSP/USP/SP
José Cássio de Moraes – FCM-SC/SP
Luiz Eduardo Batista – CCD/SES-SP
Luiz Jacintho da Silva – FM/Unicamp
Maria Bernadete de Paula Eduardo – CCD/SES-SP
Vilma Pinheiro Gawyszewsk – CCD/SES-SP

Coordenação Editorial

Cecília Abdalla
Cláudia Malinverni
Leticia Maria de Campos
Sylia Rehder

Núcleo de Comunicação – CCD

Projeto gráfico/editoração eletrônica

Marcos Rosado – Nive/CVE
Zilda M Souza – Nive/CVE

Endereço eletrônico: <http://www.ccd.saude.sp.gov.br>

Os artigos publicados são da responsabilidade dos autores. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial. Para republicação de qualquer material, solicitar autorização dos editores.

Editorial

Desde 1942 o Brasil não registra casos de febre amarela urbana. No entanto, a forma silvestre da doença é enzoótica em áreas importantes do Norte, Nordeste e Centro-Oeste. E este comportamento é totalmente explicável: estas Regiões concentram áreas de mata, onde habitam mosquitos de várias espécies – incluindo os que transmitem a FA – e macacos, animais suscetíveis e reservatórios da doença. Em matas, macacos são picados, adoecem, se curam ou morrem por febre amarela, um ciclo previsto dentro das regras da natureza.

Macacos encontrados mortos podem sugerir um aumento da circulação do vírus em ambiente de mata. Por essa razão, em 1999 foi implantada a vigilância da morte de macacos, sinalizadora de risco do aparecimento de casos de FA em humanos. Com isso foi ampliada a sensibilidade do sistema de vigilância em todo o País, servindo como sentinela para a ocorrência de possíveis casos e surtos na população. Desta forma, todos os anos as Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde notificam epizootias em macacos, que desencadeiam a adoção de medidas para o controle da doença.

No Estado de São Paulo, é orientação técnica da Secretaria de Estado da Saúde, no caso de morte de macacos comprovadamente por febre amarela ou por causa indefinida: a vacinação casa a casa; intensificação da vacinação de viajantes para a áreas em questão; coleta de informações junto à população sobre a morte de primatas e casos suspeitos em humanos; busca ativa de casos com quadro clínico de febre, icterícia e hemorragia; e pesquisa entomológica e monitoramento de vetores. A estratégia tem se mostrado eficaz: os dois últimos casos notificados no Estado foram resgistrados em 2000.

Em 2007 o sistema nacional de vigilância identificou o aumento da ocorrência de mortes de macacos chegando a cerca de 200 localidades até janeiro de 2008. Já no início deste ano o Ministério da Saúde começou a receber notificação de casos suspeitos de FA em humanos, todos em pessoas não-vacinadas que estiveram em área silvestre ou muito próximas dela.

A divulgação desses casos e a interpretação equivocada de que haveria risco iminente da reintrodução de casos urbanos da doença levaram a população a buscar a vacina de forma indiscriminada e, muitas vezes, desnecessária. Pessoas residentes em áreas urbanas e sem perspectivas de viagem para áreas de risco engrossaram as filas dos postos, algumas até duplicaram a dose, acreditando assim “reforçar” a proteção. Mais uma vez a comunicação social foi usada no Estado de São Paulo como ferramenta para a informação correta e responsável, por meio de entrevistas de técnicos e artigos publicados em diversos veículos, além de amplo material das Divisões de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses e de Imunização disponibilizada no site do Centro de Vigilância Epidemiológica (www.cve.saude.sp.gov.br).

*No Estado de São Paulo temos uma situação confortável em relação ao controle da febre amarela: não registramos epizootias por febre amarela em macacos nas áreas em que mantemos a vigilância; temos uma cobertura vacinal de mais de 80% da população residente nas áreas consideradas de risco e um índice de infestação do *Aedes aegypti* em níveis inferiores aos considerados como risco para a introdução da FA urbana pela Organização Mundial da Saúde (acima de 40%). O momento agora é de intensificar a divulgação da necessidade da vacina para os viajantes que forem para os Estados considerados de risco e manter nosso sistema em alerta, seguindo os critérios técnicos e científicos para a adoção de condutas e*

Primeiro surto de *Cyclospora cayetanensis* investigado no Brasil, ocorrido em 2000, no município de General Salgado (SP), e medidas de controle

First *Cyclospora cayetanensis* outbreak reported in Brazil occurred in 2000, in the General Salgado city (SP), and control measures

Maria Bernadete de Paula Eduardo¹, Daniel B. Vilela², Graziela G. Alvarez², Greice M. I. Carmo², Márcia C.F.P. Reina³, Vera R. T. Eid³, Angela M. Vieira³, Raquel P. Caldeira³, Elaine R.S.S. Baldi³, Arnaldo Mauro Elmec⁴, Alexandre J. da Silva⁵

¹Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar do Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac" da Coordenadoria de Controle de Doenças, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – DDTHA/CVE/CCD/SES-SP

²Curso de Epidemiologia Aplicada às Doenças Transmitidas por Alimentos (I Turma Ano 2000), da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – FSP/USP

³Grupo de Vigilância Epidemiológica e Grupo de Vigilância Sanitária de São José do Rio Preto – GVE/GVS/CCD/SES-SP

⁴Divisão de Saneamento e Meio Ambiente do Centro de Vigilância Sanitária – CVS/CCD/SES-SP

⁵Centers for Disease Control and Prevention – CDC/Atlanta

Resumo

Cyclospora cayetanensis adquiriu importância por causar surtos e casos esporádicos de diarreia em todo o mundo, associados a alimentos. No Brasil, até 1999 nenhum surto de ciclosporiase havia sido registrado. O objetivo deste trabalho é apresentar os resultados da investigação do surto de *Cyclospora cayetanensis* ocorrido no período de setembro a dezembro de 2000, em General Salgado (SP), associado ao sistema de abastecimento público de água da cidade. Um estudo descritivo foi conduzido para identificar a fonte de transmissão, com entrevistas de pacientes, análise dos registros de diarreia dos anos anteriores, inspeções sanitárias dos sistemas de água e esgoto, exames laboratoriais de amostras de fezes dos pacientes, dos alimentos suspeitos e da água do sistema. Caso clínico compatível foi definido como o indivíduo com diarreia líquida e pelo menos mais três dos sintomas gastrointestinais, como náusea, vômito, flatulência, dor abdominal, perda de peso ou diarreia prolongada, residente em General Salgado durante o período do surto. Casos confirmados foram definidos como aqueles com oocistos típicos nas amostras de fezes. Amostras clínicas e de alimentos foram analisadas pelo Instituto Adolfo Lutz. Amostras de água foram testadas pelo CDC/Atlanta por técnica de PCR. Foram identificados 350 casos envolvidos no surto (taxa de incidência = 32,3 casos/1.000 habitantes), dos quais crianças menores de 4 anos constituíram o grupo mais afetado (taxa de incidência = 49,1 casos/1.000 habitantes). Dos 40 casos testados para bactéria, vírus e parasita dez foram positivos para *Cyclospora cayetanensis*. O sistema público de água era composto de 15 poços artesianos com infiltração de águas pluviais e esgoto. A água do poço de número 7 foi positiva para *Cyclospora cayetanensis*. Para controlar o surto, mudanças importantes foram necessárias no sistema de abastecimento público de água e esgoto. Medidas educacionais, monitoramento da diarreia aguda, testes laboratoriais de todos os novos casos de diarreia e controle da qualidade da água, durante e após a reconstrução dos sistemas, contribuíram para eliminar a fonte de transmissão da *Cyclospora cayetanensis*. Seis novos casos esporádicos foram ainda registrados em 2001. De 2002 a dezembro de 2007 nenhum caso foi identificado.

Palavras-chave: *Cyclospora cayetanensis*; parasita protozoário coccídeo emergente; vigilância epidemiológica; surto de transmissão hídrica; surto transmitido por alimentos.

Abstract

Cyclospora cayetanensis, an emerging coccidian parasite, acquired importance due to cause diarrhea outbreaks and sporadic cases worldwide associated with food. In Brazil, until 1999, no cyclosporiasis outbreak was registered. We summarize the findings of the

Cyclospora cayetanensis outbreak investigation occurred from September to December 2000, in the city of General Salgado, SP, associated with the public drinking water system. A descriptive study was conducted to identify the source of transmission, including interviews with patients, data analysis of local diarrhea trends, sanitary inspections in water and sewer systems, as well as laboratorial tests of patients stool, suspected food and public drinking water samples. Compatible clinical case was defined as the person with liquid diarrhea and, at least, three other gastrointestinal symptoms such as nausea, vomit, flatulence, abdominal pain, weight loss or prolonged diarrhea, resident in General Salgado, during the period of the outbreak. Confirmed laboratorial cases were defined as those with typical oocysts in the stool sample. Clinical samples and food were analyzed by Adolfo Lutz Institute. Water samples were tested at the CDC/Atlanta, by PCR analysis. A total of 350 cases were identified as involved in this outbreak (incidence rate = 32.3 cases/1,000 inhabitants) and children under 4 years old were the group more affected (incidence rate = 49.1 cases/1,000 inhabitants). Among 40 cases tested for bacteria, virus and parasite, 10 were positive for *Cyclospora cayetanensis*. The water system was compound by 15 artesian wells with infiltration of pluvial water and sewer. The water from one of them (well # 7) was positive for *Cyclospora cayetanensis*. Control of this outbreak required important changes in public drinking water and sewer systems of the city. Educational measures, monitoring of acute diarrhea, laboratorial tests of all new cases of diarrhea, water quality control, during and after the reconstruction of the systems, contributed to eliminate the *Cyclospora cayetanensis* source of transmission. Six new sporadic cases were also reported during 2001. From 2002 to December 2007 no cases were identified.

Key words: *Cyclospora cayetanensis*; emerging coccidian protozoan parasite; epidemiological surveillance; waterborne disease outbreak; foodborne disease outbreak.

Introdução

Cyclospora cayetanensis, um parasita protozoário coccídeo emergente, assim denominado e classificado em 1994 por Ortega *et al.*¹, adquiriu recentemente importância por causar surtos e casos esporádicos de diarreia veiculados por vários alimentos. Com um período de incubação de aproximadamente uma semana após a ingestão de água ou alimentos contaminados, nas infecções sintomáticas apresenta quadro clínico com diarreia líquida e evacuações explosivas e outros sintomas como náusea, anorexia, perda de peso, flatulência, dor abdominal, dores musculares, fadiga e, mais raramente, febre baixa. Infecções sem tratamento podem durar de vários dias a um mês, com freqüentes recidivas. O tratamento é feito com trimethoprim-sulfamethoxazole². A ciclosporíase é endêmica em regiões de clima quente ou tropical. Entretanto, inúmeros surtos vêm sendo registrados em países de clima frio ou temperado na Europa^{3,4}, Estados Unidos e Canadá, dois deles associados a cerejas importadas da Guatemala nos anos de 1996 e 1997^{5,6,7,8,9}.

No Brasil, até 1999, não havia registro de surtos de ciclosporíase. De setembro a dezembro de 2000, ocorreu um surto de diarreia na cidade de General Salgado (SP), com características muito semelhantes

a outro ocorrido no ano anterior, em que, apesar de ter sido associado à água do sistema de abastecimento público por um estudo de caso-controle¹⁰, não se conseguiu identificar o agente etiológico.

General Salgado, um município de condições sociais e econômicas modestas, de clima quente, com 10.824 habitantes no ano 2000 (fonte: IBGE), na região de São José do Rio Preto, a noroeste do Estado de São Paulo, caracterizava-se principalmente por atividades agrícolas. Possuía à época um hospital (Santa Casa/convênio SUS), uma unidade básica de saúde, um laboratório particular conveniado ao SUS e seis médicos; e um programa de vigilância sindrômica da diarreia (Monitorização da Doença Diarréica Aguda – MDDA, da Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, órgão da Coordenadoria de Controle de Doenças – DDTHA/CVE/CCD/SES-SP)¹¹ – implantado desde 1998.

O objetivo deste trabalho é apresentar os resultados da investigação do surto de *Cyclospora cayetanensis* ocorrido no período de setembro a dezembro de 2000, em General Salgado (SP), associado ao sistema de abastecimento público de água na cidade.

Métodos

Um estudo descritivo foi conduzido para identificar a fonte de transmissão, com entrevistas de pacientes e análise dos fatores de risco comuns. O padrão da doença diarreica aguda da cidade foi avaliado com dados registrados no programa MDDA desde 1998. Foram realizadas inspeções sanitárias em todos os locais e estabelecimentos identificados como fatores de risco comuns para a transmissão da doença.

Amostras de fezes dos pacientes e de alimentos foram testadas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL/CCD/SES-SP), Regional de São José do Rio Preto e IAL Central, para identificação de bactérias, vírus e parasitas. Para análise de parasitas foram utilizadas técnicas convencionais (Kinyoun modificada e autofluorescência)¹². Amostras de água de 15 poços artesanais do sistema de abastecimento da cidade foram coletadas pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (Cetesb) e analisadas pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC/Atlanta), utilizando-se técnicas de biologia molecular (PCR, amplificação de DNA e seqüenciamento). O CDC realizou também testes complementares para confirmação do agente em amostras de fezes e identificação da espécie. Dados de índice pluviométrico do município foram analisados, uma vez que a população e os doentes relacionavam o aumento das chuvas com o aparecimento da doença.

Caso clínico compatível foi definido como o indivíduo com diarreia líquida e, pelo menos, mais três sintomas gastrintestinais, como náusea, vômito, flatulência, dor abdominal, perda de peso ou diarreia

prolongada, residente em General Salgado, durante o período do surto. Considerou-se surto a ocorrência de dois casos ou mais de doença diarreica resultante de uma fonte comum.

Resultados e discussão

Enquadraram-se na definição de caso clínico 350 casos, com uma taxa de incidência de 32,3 casos/1.000 habitantes (idade mediana de 30 anos e variação de 13 dias a 86 anos): 10,6% eram crianças menores de 4 anos de idade (taxa de incidência de 49,1 casos/1.000 habitantes), 5,1% entre 5-9 anos (taxa de incidência de 20,4 casos/1.000 habitantes); 16,3% de 10-19 anos (taxa de incidência de 27,5 casos/1.000 habitantes); 44,3% adultos de 20-49 anos (taxa de incidência de 32 casos/1.000 habitantes) e 23,7%, de 50 anos e mais (taxa de incidência de 36,6 casos/1.000 habitantes); 54,9% eram do sexo feminino e 45,1% masculino. Outubro, correspondendo às semanas epidemiológicas (SE) 40 a 44, foi o mês de pico do surto (64%) (Figura 1); o primeiro caso relacionado a este surto relatou início dos sintomas em 19/9/2000, na SE 38.

Os sintomas apresentados foram diarreia líquida (99,4%), dor abdominal (81%), flatulência (73%), vômitos (41%), febre (35%) e perda de peso (27%); duração mediana da doença de 14 dias (variação de 10 a 45 dias); número de evacuações de 6 a 8 por dia, com alguns relatos de mais de 15 evacuações/dia; 12% necessitaram de internação hospitalar e 30% referiram diarreia recidivante. Os pacientes foram tratados com trimethoprim-sulfamethoxazole.

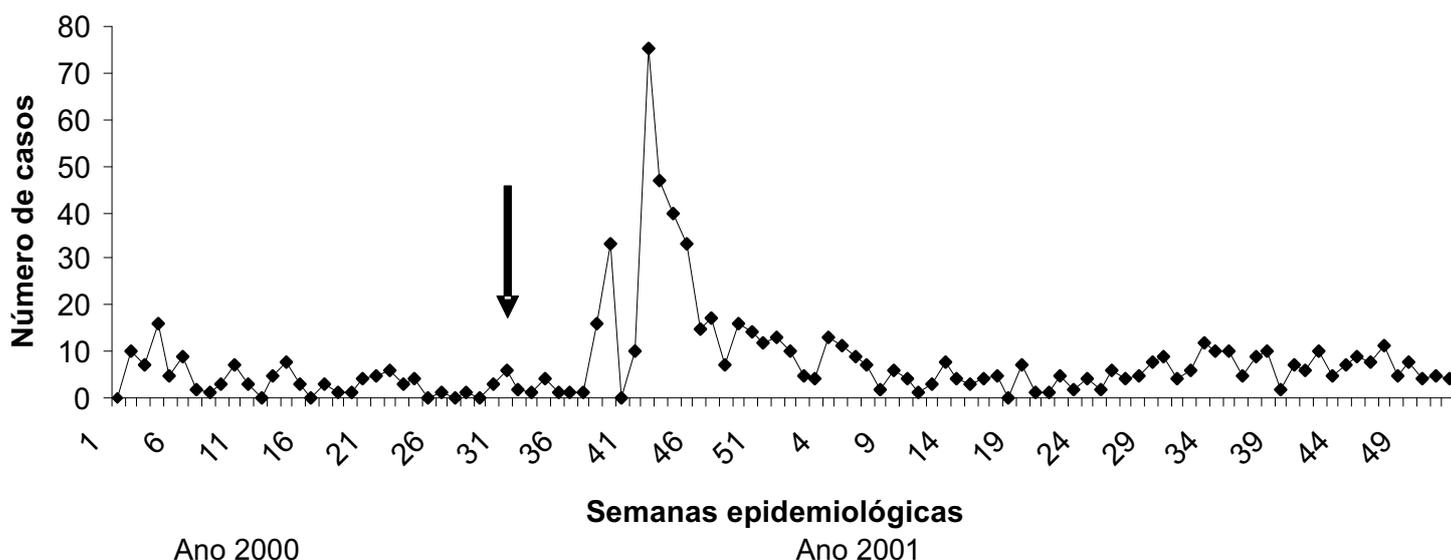


Figura 1. Curva epidêmica – Distribuição dos casos de diarreia registrados pelo MDDA em General Salgado, nos anos de 2000 e 2001, por semana epidemiológica, com destaque para a ocorrência do surto de ciclosporiase entre as semanas 38 e 52 do ano 2000 (N = 350 casos).

Fonte: DDTHA/CVE/CCD/SES-SP

Dos 40 casos testados para bactéria, vírus e parasita, 10 foram positivos para *Cyclospora cayetanensis*. Em todas as demais amostras, os resultados foram negativos para bactérias, vírus e parasitas. As análises de verduras e morangos, realizadas pelo IAL Central por técnicas convencionais, não identificaram a presença de parasitas ou outros patógenos.

O sistema de abastecimento público de água era composto por 15 poços artesianos; a água captada para três reservatórios era tratada com cloro e flúor. Constatou-se que o sistema encontrava-se mal-conservado, com rede de distribuição com tubulações antigas e poços sujeitos a infiltrações de águas pluviais e esgoto. A água do poço de número 7 foi positiva para *Cyclospora cayetanensis*, pelo exame de PCR.

A comparação com índices pluviométricos da cidade mostrou que cerca de uma semana após chuvas em grande volume os casos de diarreia aumentavam. Inspeções visuais sanitárias constataram que as águas das chuvas misturavam-se com o esgoto da cidade, despejado em um pequeno

rio (praticamente seco), sem tratamento, com canos de esgoto mal-conservados e aparentes na superfície do solo (Figuras 2 a 5). Provavelmente por isso e pelo terreno em declive, atingiam alguns poços, contaminando-os com o parasita que não se inativa somente com a cloração. A distribuição dos casos na cidade pode ser observada no mapa (Figura 6).

No ano de 2001, durante o período de modificações e obras nos sistema de água e esgoto, foram ainda identificados seis novos casos, confirmados por critério laboratorial, ocorridos nos seguintes meses: um em fevereiro na SE 8 (uma criança de 2 anos de idade, sexo feminino); dois em maio, na SE 19 (30 anos, sexo feminino) e na SE 22 (36 anos, sexo feminino); um em outubro na SE 42 (65 anos, sexo masculino); um em novembro na SE 47 (5 anos, sexo feminino) e um dezembro na SE 51 (36 anos, sexo masculino). De 2002 até dezembro de 2007 mais nenhum caso de *C. cayetanensis* foi identificado na cidade.



Figura 2. Fotografia de tubulação de esgoto.



Figura 3. Fotografia de tubulação com vazamentos.

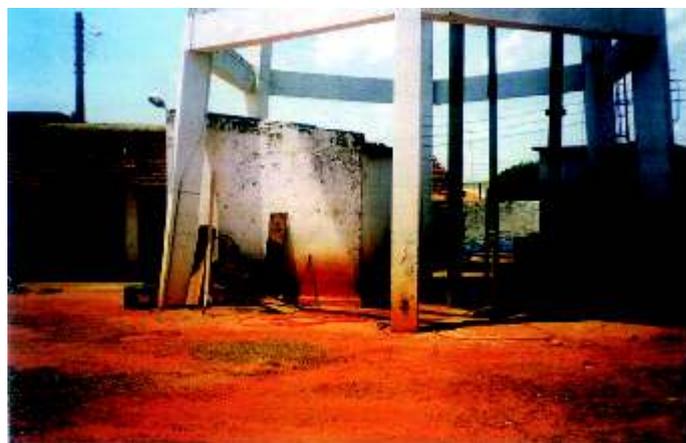


Figura 4. aspecto de um dos reservatórios – GS, ano 2000.

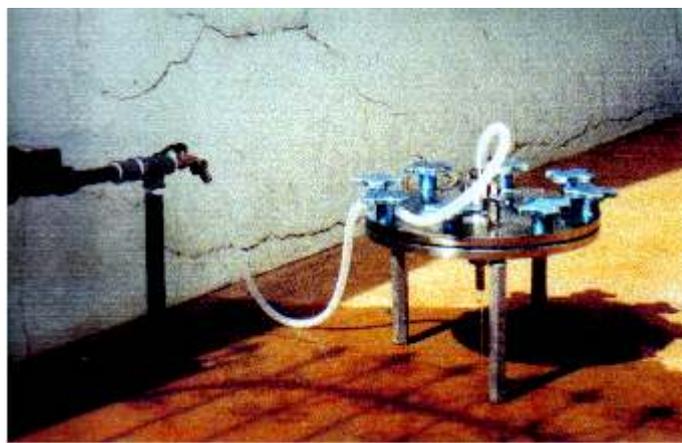


Figura 5. Poço 7: coleta de água para análise molecular – GS, ano 2000.



Figura 6. Mapa de General Salgado com a distribuição de casos de *Cyclospora cayetanensis* por ruas, nas semanas epidemiológicas 39 a 43, ano 2000.

Conclusões

Este foi o primeiro surto de diarreia associado a *Cyclospora* notificado e investigado no Brasil. Oocistos de *Cyclospora* vêm sendo isolados em vários países do mundo, associados a surtos causados por alimentos como frutas, especialmente cerejas e morangos, verduras de folhas verdes consumidas cruas, como saladas, manjeriço e outros, e em países de clima frio, devido a alimentos importados de áreas tropicais. Também vem sendo descrita como importante causa de diarreia em

viajantes^{13,14}, considerada patógeno emergente relacionado à globalização do mercado econômico, à intensa mobilização da população e a hábitos de consumo de vegetais crus.

Algumas hipóteses foram levantadas para explicar a origem da doença em General Salgado. Foi considerada causa provável de sua emergência o então desenvolvimento recente de algumas atividades comerciais e agrícolas na cidade e região, como a importação de sementes de palmito pupunha e de roupas por meio de “sacoleiras”, entre

outras atividades que aumentaram, na época, o trânsito de pessoas procedentes de alguns países da América Latina, onde a doença é considerada endêmica^{15,16,17}.

Como resultado da investigação, foi modificado o sistema de água e esgoto da cidade. Medidas educativas, orientações quanto ao consumo da água e de alimentos e implementação do programa MDDA, com coleta de amostras de fezes para testes laboratoriais de todos os casos registrados de diarreia, durante e após a execução das obras, contribuíram para o controle do surto. Ações de controle da qualidade de água e vigilância sanitária foram intensificadas, com vistas a interromper a transmissão da *C. cayetanensis* e impedir novos surtos. A experiência adquirida pela equipe regional de vigilância na investigação desse surto contribuiu, também, para aumentar a sensibilidade do sistema de vigilância das doenças transmitidas por água e alimentos em toda a região de São José do Rio Preto, e importantes esforços para a identificação etiológica de surtos e casos de diarreia.

O surto descrito serve de alerta para médicos, microbiologistas e equipes de vigilância quanto à necessidade de se incorporar à prática de investigação clínica e laboratorial da doença diarreica, em especial quando prolongada e recidivante, os testes para parasitas, geralmente considerados erroneamente de menor importância. O episódio mostrou o potencial da *C. caeytanenis*, sua rota de transmissão, os fatores de risco predisponentes e, especialmente, o risco a que se expõe uma população quando ocorrem falhas nos sistemas de abastecimento de água e rede de esgoto.

Agradecimentos

A todos que participaram da investigação do surto, em especial à equipe de saúde e vigilância do município de General Salgado; às equipes do Instituto Adolfo Lutz – Regional de São José do Rio Preto e IAL Central –, que se dedicaram à elucidação etiológica do surto; à Dra. Maria Zanoli Sato e toda a equipe da Cetesb, responsável pela coleta de água e envio de amostras ao CDC/Atlanta; ao Prof. Dr. Almério de Castro Gomes e à Profa. Dra. Margarida Maria M. B. de Almeida, da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP-USP), pela assistência técnica e acompanhamento dos alunos durante a investigação, e ao Prof. Dr. José Cássio de Moraes, diretor, à época, do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac” (CVE/CCD/SES-SP), pelo apoio à equipe nesta desafiante missão.

Referências bibliográficas

1. Ortega YR, Gilman RH, Sterling CR. A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeidiidae) from humans. *J Parasitol.* 1994;80:625-9.
2. Centro de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Ciclosporíase/*Cyclospora cayetanensis*. Manual de Doenças Transmitidas por Alimentos – Informe Net DTA [acessado em 16 de janeiro 2008]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/inf_cyclospora.htm.
3. Can KJ, Chalmers RM, Nichols G, O'Brien SJ. *Cyclospora* infections in England and Wales: 1993 to 1998. *Commun Dis Public Health.* 2000;3:46-9.
4. Döller PC, Dietrich K, Filipp N, Brockmann S, Dreweck C, Vonthein R, Wagner-Wiening C, Wiedennmann A. Cyclosporiasis outbreak in Germany associated with the consumption of salad. *Emerg Infec Dis* [serial on-line]. 2002 8 Sep [acessado em Jan 16 2008];. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no9/01-0517.htm>.
5. Herwaldt BL, Ackers ML. An outbreak in 1996 of cyclosporiasis associated with imported raspberries. The *Cyclospora* Working Group. *N Engl J Med.* 1997;336:1548-56.
6. Herwaldt BL, Beach MJ. The return of *Cyclospora* in 1997: Another outbreak of cyclosporiasis in North America associated with imported raspberries. The *Cyclospora* Working Group. *Annals of Internal Medicine* 1999;130(3):210-20.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: outbreaks of cyclosporiasis – United States and Canada, 1997. *MMWR.* 1997;46:689-91.
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of cyclosporiasis – Northern Virginia – Washington, DC – Baltimore, Maryland, Metropolitan Area, 1997. *MMWR.* 1997;46:689-91.
9. Mohle-Boetani JC, Werner SB, Waterman SH, Vugia DJ. The impact health communication and enhanced laboratory-based surveillance on detection of cyclosporiasis outbreaks in California. *Emerg Infec Dis.* 2000;6(2): 200-203.
10. Vilela DB, Alvarez GG, Carmo GMI. Surto de diarreia relacionada com alimentos: um estudo de caso-controle, General Salgado, SP, 1999-2000. Informe Net/DDTHA/CVE – 2000 [on-line]: slides. [acessado em 16 de

- janeiro de 2008]. Disponível em: ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/dta_inqsurtosgs.ppt.
11. Centro de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas – Normas e Instruções. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde; 2002.
 12. Zini RM, Santos CCM, Almeida IAZC, Peresi JTM, Marques CCA. Atuação do Laboratório de Saúde Pública na elucidação do surto de diarreia causado por *Cyclospora cayetanensis* no município de General Salgado – SP. Rev Inst Adolfo Lutz. 2004; 63(1): 116-121.
 13. Puente S; Morente A; García-Benayas T; Subirats M; Gascón J; González-Lahoz JM. Cyclosporiasis: a point source outbreak acquired in Guatemala. J Travel Med. 2006;13(6):334-7.
 14. Hoang LM; Fyfe M; Ong C; Harb J; Champagne S; Dixon B; Isaac-Renton J. Outbreak of cyclosporiasis in British Columbia associated with imported Thai basil. Epidemiol Infect. 2005;133(1):23-7.
 15. Botero-Garcés J; Montoya-Palacio MN; Barguil JI; Castaño-González A. Brote epidémico por *Cyclospora cayetanensis* en Medellín, Colombia. Rev Salud Publica. 2006;8(3)258-68.
 16. Madico G, McDonald J, Gilman RH, Cabrera L, Sterling CR. Epidemiology and treatment of *Cyclospora cayetanensis* infection in Peruvian children. Clin Infect Dis. 1997;24:977-81.
 17. Ortega YR, Roxas CR, Gilman RH, Miller NJ, Cabrera L, Taquiri C, et al. Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. Am J Trop Med Hyg. 1997;57:683-6.

Correspondência/Correspondence to:

Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar

Av. Dr. Arnaldo, 351, 6º andar, sala 607

Cerqueira César

Tel.: (55) 11 3066-8758

CEP: 01246-001 – São Paulo/SP – Brasil

E-mail: meduardo@saude.sp.gov.br

Algoritmo de testes sorológicos de triagem para infecção por HTLV-1/2 usado no Instituto Adolfo Lutz

Algorithm of HTLV-1/2 serological screening tests employed by Instituto Adolfo Lutz

Fabrcio Jacob^{1,2}, Elizabeth de los Santos-Fortuna¹, Adele Caterino-de-Araujo^{1,2}

¹Seção de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – IAL/CCD/SES-SP)

²Programa de Pós-Graduação em Ciências – CCD/SES-SP

Resumo

O Ministério da Saúde recomenda para o diagnóstico de infecção por HTLV-1/2 a utilização de um ensaio imunoenzimático (EIA) que contenha antígenos específicos do HTLV-1 e HTLV-2 na triagem sorológica e, nos soros reagentes, a repetição do mesmo teste em duplicata. O presente artigo tem como objetivo apresentar os resultados obtidos com a rotina diagnóstica de infecção por HTLV-1/2 e o algoritmo de testes de triagem utilizado pelo Instituto Adolfo Lutz Central, que difere do recomendado pelo Ministério. Amostras de soro encaminhadas por ambulatórios de especialidades do SUS e pelos Centros de Referência e Treinamento em AIDS de São Paulo, no período de dezembro de 1998 a março de 2006, foram analisadas quanto à presença de anticorpos anti-HTLV-1/2 usando kits de reagentes EIAs disponíveis no mercado. Os resultados obtidos são apresentados como valores de sensibilidade, especificidade e eficiência dos EIAs de primeira, segunda e terceira gerações em relação ao teste confirmatório de Western Blot, destacando os resultados falso-negativos. Nenhum kit de reagentes EIA, isoladamente, foi capaz de detectar todos os soros verdadeiramente positivos quanto à presença de anticorpos anti-HTLV-1/2. Houve necessidade da utilização de dois EIAs de composição antigênica e formatos diferentes para a triagem sorológica, com melhor desempenho dos EIAs de segunda geração. Os resultados obtidos confirmam a necessidade da utilização de dois kits de reagentes EIAs na triagem sorológica de infecção por HTLV-1/2 em laboratórios de diagnóstico, diferentemente do preconizado pelo Ministério da Saúde.

Palavras-chave: vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I (HTLV-1); HTLV-2; sorologia; ensaio imunoenzimático (EIA); Western Blot (WB); testes de triagem; anticorpos.

Abstract

The Ministry of Health of Brazil recommends for HTLV-1/2 diagnosis the use of one enzyme immunoassay (EIA) which contains selected antigens for HTLV-1 and HTLV-2 in sera screening, and in reactive sera, re-testing in duplicate on the same EIA. This study had the objective to present the algorithm of screening tests used by Instituto Adolfo Lutz of São Paulo (IAL), that differs from the algorithm recommended by the Ministry of Health. Serum samples sent to IAL from Public Health clinics, and AIDS Reference Centers during December 1998 to March 2006 were analyzed for the presence of anti-HTLV-1/2 antibodies using two EIAs of different formats and composition. The results obtained are presented as values of sensitivity, specificity and efficiency of EIA kits of 1st, 2nd, and 3rd generations in relation to the confirmatory Western Blotting assay. Neither 1st and 2nd, nor 3rd generations EIA

kits were able to detect all truly HTLV-1/2 positive sera. In spite of the best performance of 2nd generation EIA kits, the results obtained emphasizes the need of using two EIAs as screening. The results obtained confirm and advise the use of two HTLV-1/2 EIAs as screening in Public Health Laboratories from Brazil, differently of the recommended by the Ministry of Health.

Key words: Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1); HTLV-2; serology, immunoenzymatic assay (EIA); Western Blot (WB); screening tests; antibodies.

Introdução

A infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I (HTLV-1) está reconhecidamente associada à leucemia linfoma de células T (adult T-cell leukemia/lymphoma – ATLL), e a paraparesia espástica tropical/mielopatia, associada ao HTLV-1 (tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy) (TSP/HAM), sendo endêmica no Japão, Caribe, em alguns países africanos e certas localidades do Brasil¹. Já o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2 (HTLV-2) ainda não está confirmado como o agente etiológico de um tipo particular de doença, exceção feita a algumas manifestações neurológicas semelhantes à TSP/HAM².

Todavia, em casos de co-infecção HIV/HTLV-2 pode ocorrer diminuição da replicação do HIV e progressão lenta para Aids; ao contrário, na co-infecção HIV-HTLV-1 há aumento do número de células CD4 e maior replicação do HIV^{3,4}. Usuários de drogas injetáveis (UDI) e ameríndios são populações endêmicas de infecção por HTLV-2, no Brasil².

Embora entre populações endêmicas as formas de transmissão sexual e vertical sejam as mais freqüentes vias de aquisição desses vírus, o contato com sangue previamente contaminado é considerado forma predominante de transmissão/aquisição viral entre UDI, principalmente quando infectados pelo HIV-1^{1,5}.

Atento à forma parenteral de transmissão viral, o Ministério da Saúde, em sua portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993, tornou obrigatória a realização da pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2 em bancos de sangue do Brasil⁶. Mais recentemente, o órgão recomendou dois algoritmos a serem utilizados em serviços de doação de sangue e laboratórios de diagnóstico: em bancos de sangue as amostras de soro devem ser submetidas à triagem para detecção de anticorpos específicos pelo teste imunoenzimático (EIA), que apresenta em sua composição antígenos específicos de HTLV-1 e HTLV-2. Amostras de soro

com resultado reagente ou indeterminado devem ser retestadas em duplicata pelo mesmo EIA; amostras que novamente resultarem reagentes e/ou indeterminadas devem ser excluídas da doação de sangue.

Quanto aos laboratórios de diagnóstico, após a triagem para HTLV-1/2 por um EIA e retestadas em duplicata dos soros reagentes e indeterminados, deve-se proceder ao teste confirmatório de imunofluorescência indireta (IFI) ou Western Blot (WB)⁷.

Em 1988, o Food and Drug Administration (FDA), dos Estados Unidos, licenciou o primeiro kit de reagentes para a detecção de anticorpos dirigidos ao HTLV-1, usando a técnica EIA. Este ensaio foi recomendado para a triagem de doadores de sangue e para a avaliação de pacientes com diagnóstico clínico sugestivo de ATLL e de TSP/HAM⁸.

Os testes EIA de primeira geração empregavam como antígeno lisado viral total do HTLV-1, e foram utilizados na triagem sorológica em soro ou plasma nos Estados Unidos e na Europa⁹. A semelhança entre os genomas do HTLV-1 e do HTLV-2 (60% de similaridade) permitiu a utilização de EIA com lisado viral do HTLV-1 na triagem sorológica de HTLV-2¹⁰. No entanto, a sensibilidade não era boa e o diagnóstico diferencial tornou-se importante, visto que o HTLV-2 é reconhecidamente menos patogênico do que o HTLV-1⁵. Pelas características expostas, os testes de primeira geração foram denominados EIA para HTLV-1/2 e, posteriormente, acrescidos de lisado viral total de HTLV-2.

Um fato importante que deve ser lembrado diz respeito à sensibilidade e especificidade dos ensaios disponíveis no comércio, que dependem da composição antigênica e da configuração do teste. Nos testes sorológicos de segunda geração foi adicionado ao lisado viral de HTLV-1 e/ou HTLV-2, uma proteína recombinante do envelope viral, a gp21 (rgp21). Com isso, houve melhora na sensibilidade de detecção da infecção por HTLV-2, que subiu para 93,8%¹¹.

Estima-se que a sensibilidade dos kits de reagentes disponíveis no mercado para a pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1 seja de 97,3% a 100,0%, e a especificidade, na ordem de 99,3% a 99,9% (índices calculados em amostra de 5 mil doadores de sangue dos Estados Unidos, provenientes de áreas não endêmicas para essa infecção viral)¹².

Mais recentemente, foram desenvolvidos os kits de terceira geração, em que a fase sólida e o conjugado são constituídos por proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos, sozinhos ou em combinação, usando o princípio do "sanduíche". Estes kits de reagentes são altamente sensíveis e específicos, quando comparados aos que empregavam apenas lisado viral dos HTLVs^{13,14}. O acréscimo de antígenos específicos causou uma significativa melhora da sensibilidade para a detecção de anticorpos dirigidos, principalmente ao HTLV-2.

Embora os testes de última geração apresentem uma alta especificidade, próxima de 100%, quando empregados em populações de baixa prevalência de infecção por HTLV, tal como doadores de sangue, mostram valores preditivo positivo muito baixos¹⁵. Assim, mesmo as amostras com resultados repetidamente reagentes ainda requerem confirmação quanto à presença de anticorpos específicos.

Atualmente, dispõe-se de diversos testes sorológicos de uso confirmatório: o Western Blot (WB), a imunofluorescência indireta (IFI), a radioimunoprecipitação (RIPA) e, mais recentemente, o imunoensaio de linha (INNO-LIA)^{8,16}; dentre eles, o ensaio de WB se destaca como o teste confirmatório mais utilizado na rotina diagnóstica, embora nenhum deles seja reconhecido pelo FDA. Assim, vem-se cogitando a possibilidade de se utilizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) em células mononucleares do sangue periférico no diagnóstico diferencial de infecção por HTLV-1 de HTLV-2^{1,17,18}.

O Instituto Adolfo Lutz Central – órgão da Coordenadoria de Controle de Doença da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (IAL/CCD/SES-SP) –, desde dezembro de 1998, vem realizando a sorologia para HTLV-1/2 pela pesquisa de anticorpos específicos em amostras de soro provenientes de pacientes da rede pública de saúde. Pela experiência adquirida e os problemas enfrentados, relata quais kits de reagentes se mostraram mais eficientes para serem usados em

população de risco de São Paulo e recomenda seu algoritmo de triagem sorológica para a rede de laboratórios de saúde pública do País¹⁹.

Material e métodos

De dezembro de 1998 a março de 2006 a Seção de Imunologia do IAL Central analisou 2.312 amostras de soro quanto à presença de anticorpos dirigidos ao HTLV-1/2: 1.393 soros eram provenientes de Centros de Referência e Treinamento em AIDS de São Paulo e 919 soros de ambulatórios de especialidades do SUS.

O algoritmo adotado pelo IAL para sorologia de HTLV-1/2 (Figura 1) foi a realização concomitante de dois EIAs de diferentes formatos e composição antigênica na triagem. Os soros considerados reagentes em pelo menos um EIA foram, posteriormente, submetidos à pesquisa de anticorpos específicos pelo teste confirmatório de WB, cuja realização e interpretação seguiram os critérios estabelecidos pelo fabricante (WB HTLV 2.4, Genelabs® Diagnosis).

Os kits de reagentes usados na rotina do IAL dependeram exclusivamente da oferta e disponibilidade pelo serviço público de saúde. Das 2.312 amostras de soro, 1.857 (80,32%) foram testadas por dois EIAs e 455 (19,58%), por um. Soros considerados reagentes em pelo menos um EIA foram submetidos ao WB. Quatrocentos e sessenta e uma amostras foram testadas pelo WB: 74 das 455 analisadas por um EIA, e 367 das 1.857 testadas por dois.

Ao longo do período de estudo foram empregados sete diferentes kits de reagentes EIA e um teste confirmatório de WB (Tabela 1). Os ensaios foram conduzidos de acordo com as instruções recomendadas pelos seus fabricantes, e consideradas reagentes as amostras de soros que resultaram em relação: D.O. da amostra/cut-off da reação (densidade óptica/ponto de corte) ≥ 1 . Não foi adotada a "zona cinza" de 10% a 20% acima ou abaixo do valor do cut-off para a confirmação dos resultados pelo WB.

Os resultados de sorologia para HTLV-1/2 foram coletados e analisados pelo Programa Minitab (MINITAB® Release 14.1 ©1972-2003 Minitab Inc.). Para o cálculo de sensibilidade, especificidade e eficiência relativas dos kits de reagentes EIA foram utilizados os resultados de WB positivo e negativo como padrão-ouro.

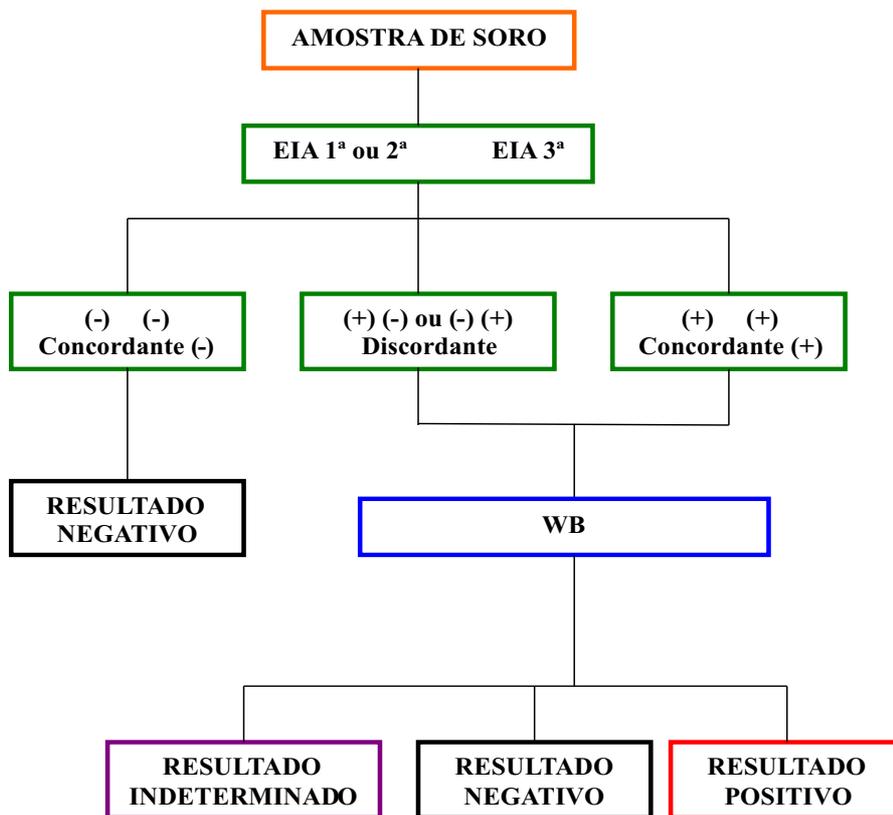


Figura 1. Algoritmo de testes laboratoriais empregado pelo Instituto Adolfo Lutz para a detecção de anticorpos anti-HTLV-1/2.

Resultados

A Tabela 1 apresenta o número de amostras analisadas por cada kit diagnóstico, e os resultados de sensibilidade, especificidade e eficiência dos mesmos em relação ao WB 2.4.

Houve melhor desempenho dos kits de segunda geração que continham como antígeno lisado viral total de HTLV-1 e HTLV-2, associado à proteína recombinante rgp21 (Hemagen[®] HTLV-I + HTLV-II, Hemagen Diagnósticos Com. Ltda; Vironostika HTLV-I/II, BioMerieux).

De acordo com a Tabela 2, 19 (11,45%) das 166 amostras de soro que resultaram discordantes nos EIAs eram verdadeiramente positivas para a presença de anticorpos anti-HTLV-1/2, de acordo com a reatividade observada no WB. Os resultados obtidos definem os kits de reagentes EIAs que utilizam proteínas recombinantes/peptídeos sintéticos (terceira geração) como mais sensíveis do que os demais (coluna 1). Por outro lado, os kits que empregam lisado viral total de HTLV-1 e HTLV-2, somado a antígeno recombinante (segunda geração), mostraram-se mais específicos (coluna 3). Esses resultados justificam o uso do algoritmo com dois EIAs de princípios e metodologias distintas na triagem para o HTLV-1/2.

Tabela 1. Sensibilidade, especificidade e eficiências relativas dos kits de ensaio imunoenzimático (EIA) para detecção de anticorpos específicos para HTLV-1/2 em relação ao WB 2.4, em população encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz para análise.

EIAs	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Eficiência (%)
1ª geração (n=1.071)			
V* (n=194)	71.4	100	78.9
HB (n=182)	80.9	33.3	70.4
P (n=695)	98.4	44.4	82.4
2ª geração (n=925)			
V** (n=660)	95.8	70	90.2
HE (n=265)	90.9	83.3	86.9
3ª geração (n=2.173)			
O (n=454)	94.4	46.7	80.4
M (n=1.719)	98.2	42.6	83.7

Legendas: n = total de amostras de soro analisadas por cada kit.
 1ª geração: kits de reagentes EIA que utilizam lisado viral purificado de HTLV-1/2 como antígeno (Hemobio HTLV/II HBK 424, EMBRABIO; Platelia HTLV-I New, Bio-Rad; * Vironostika HTLV-I/II, Organon Teknika Corp).
 2ª geração: kits de reagentes que empregam lisado viral purificado de HTLV-1/2 em associação com antígenos recombinantes (Hemagen HTLV-I + HTLV-II, Hemagen Diagnósticos Com. Ltda; ** Vironostika HTLV-I/II, BioMerieux).
 3ª geração: kits de reagentes EIA que contêm proteínas recombinantes/peptídeos sintéticos de HTLV-1/2 como antígeno (Murex HTLV-I+II, Murex Biotech; Ortho HTLV-I/HTLV-II, Ortho Clinical Diagnostics Inc.).
 WB: WB HTLV 2.4, Genelabs Diagnostics.

Tabela 2. Número e porcentagem de soros que resultaram reagentes na triagem sorológica para pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/2 usando dois kits de reagentes EIA de primeira, segunda ou terceira geração, de acordo com os resultados obtidos no WB 2.4. Análise comparativa entre os kits EIA cujos resultados se mostraram discordantes.

EIA (resultados) (n=367)	WB 2.4						Total	
	Positivo		Indeterminado		Negativo		nº	%
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Discordantes	19	11.45	93	56.02	54	32.53	166	100.0
1ª (-) vs 3ª (+)	9	18.00	24	48.00	17	34.00	50	100.0
1ª (+) vs 3ª (-)	3	5.45	35	63.65	17	30.91	55	100.0
2ª (-) vs 3ª (+)	5	15.15	13	39.39	15	45.45	33	100.0
2ª (+) vs 3ª (-)	2	7.14	21	75.00	5	17.86	28	100.0
Concordantes (+)	153	76.12	44	21.89	4	1.99	201	100.0

Legendas: Western Blot: WB HTLV 2.4, Genelabs Diagnostics.

Discussão

Estima-se que o Brasil seja, atualmente, o país com maior número absoluto de indivíduos infectados pelos vírus HTLV-1/2, apresentando cerca de 2,5 milhões de portadores²⁰. A considerável prevalência de infecção pelo HTLV-1/2, aliada às dificuldades encontradas em seu diagnóstico, principalmente em relação ao HTLV-2 e/ou a casos de co-infecção com HIV, torna necessária a adoção de medidas que venham a melhorar esse diagnóstico^{18,21-25}.

Uma sugestão emerge deste trabalho que mostrou 19 soros com resultados discordantes nos kits de reagentes EIA e que resultaram positivos no teste

confirmatório de WB. Esses resultados reiteram a necessidade de utilização de dois kits EIA para a triagem de infecção por HTLV-1/2 em população de risco de São Paulo.

Raciocínio semelhante pode surgir da observação das amostras que resultaram WB indeterminado (n=93, 56,02%), uma vez que pode se tratar de soros de pacientes em fase de soroconversão para o HTLV-1/2 ou de pacientes com profunda imunossupressão^{19,25,26}. No mais, os resultados obtidos permitem verificar diferenças no desempenho dos kits EIAs empregados na triagem sorológica para HTLV-1/2, tal como apontar os kits de terceira geração como mais sensíveis em relação aos demais, devido ao menor número de resultados falso negativos.

Por outro lado, os kits de reagentes de segunda geração, que continham em sua composição lisado viral purificado de HTLV-1 e HTLV-2 e proteína recombinante rgp21, mostraram menor porcentagem de casos falso-positivos, ou seja, maior especificidade de relativa.

Ainda, independentemente dos resultados de desempenho encontrados nos kits EIA que fizeram parte deste estudo, uma maior importância deve ser destinada ao fato de que nenhum kit de reagentes mostrou 100% de sensibilidade e/ou especificidade relativas. Ou seja, qualquer que fosse o kit EIA escolhido na triagem, ele sozinho não seria capaz de detectar todos os casos verdadeiramente positivos para a infecção por HTLV-1/2.

Pelos resultados obtidos, os autores sugerem a utilização do algoritmo de testes de triagem usado no Instituto Adolfo Lutz para outros laboratórios de diagnóstico da rede pública de saúde do Brasil.

Nota: Artigo baseado na dissertação de mestrado de Fabrício Jacob, apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, da Secretaria de Estado da Saúde, em São Paulo (SP), em 2007. "Levantamento do perfil sorológico de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em casuística encaminhada ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo para análise" – F. Jacob – Bolsista Mestrado CAPES.

Referências bibliográficas

1. Proietti AB de FC. HTLV Cadernos Hemominas. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais; 2006.
2. Posada-Vergara MP, Montanheiro P, Fukumori LMI, Bonasser F, Duarte AJS, Penalva De Oliveira AC *et al.* Clinical and epidemiological aspects of HTLV-II infection in São Paulo, Brazil: presence of tropical spastic paraparesis/HTLV-associated myelopathy (TSP/HAM) simile diagnosis in HIV-1-co-infected subjects. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2006;48:207-10.
3. Brites C, Alencar R, Gusmão R, Pedroso C, Pedral-Sampaio D, Badaró R *et al.* Co-infection with HTLV-1 is associated with a shorter survival time for HIV-1-infected patients in Bahia, Brazil. *AIDS.* 2001;15:2053-55.
4. Turci M, Pilotti E, Ronzi P, Magnani G, Boschini A, Parisi SG, *et al.* Coinfection with HIV-1 and human T-cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users is associated with delayed progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;41:100-6.
5. Roucoux DF & Murphy EL. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev.* 2004;6:144-54.
6. Ministério da Saúde. Portaria 1.376, de nov. 1993. Diário Oficial da União, Brasília, 2 de dez. 1993. [Aprova alterações na Portaria n. 721/GM, de 9 de ago. 1989, que aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e da outras providências].
7. Ministério da Saúde. HTLV-I/II – Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública. Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. 1998. II (Série TELELAB); 54p.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Current trends licensure of screening tests for antibody to human T-lymphotropic virus type I. *Morb Mortal Wkly Rep.* 1988 [acessado em 11 set. 2001];37(48):736-40. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001311.htm>
9. Manns A, Blattner WA. The epidemiology of the human T-cell lymphotropic virus type I and II: etiologic role in human disease. *Transfusion.* 1991;31:67-75.
10. Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood.* 1995; 86:3619-39.
11. Wiktor SZ, Pate EJ, Weiss SH, Gohd RS, Correa P, Fontham ET, *et al.* Sensitivity of HTLV-I antibody assays for HTLV-II. *Lancet.* 1991;338:512-13.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Current trends human T lymphotropic virus type I screening in volunteer blood donors – United States, 1989. *Morb Mortal Wkly Rep.* 1990 [acessado em 15 jul. 2001]; 39(50): 915, 921-24. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001864.htm>.
13. Andersson S, Thorstensson R, Ramirez KG, Krook A, Von Sydow M, Dias F *et al.* Comparative evaluation of 14 immunoassay for the detection of antibodies to the human T-lymphotropic virus types I and II using painels of sera Sweden and West Africa. *Transfusion.* 1999;39:845-51.
14. Vrieling H, Reesing HW, Habibuw M, Schuller M, Van Der Meer C. Comparison of four HTLV-I and HTLV-I + II ELISAs. *Vox Sang.* 1999;76:187-91.
15. Thorstensson R, Albert J, Andersson S. Strategies for diagnosis of HTLV-I and II. *Transfusion.* 2002;42:780-91.
16. Santos TJT. Biomolecular study of seroindeterminate individuals for the retrovirus HTLV-I/II. *Arq Neuropsiquiatr.* 2001;60:174-75.
17. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-De-Araujo A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2007a; 49(6): 361-364.
18. Morimoto HK, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, Reiche FV *et al.* Difficulties in the diagnosis of HTLV-2 infection in HIV/AIDS patients from Brazil. Comparative performances of serologic and molecular assays, and detection of HTLV-2b subtype. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2007; 49(4): 225-230.
19. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-De-Araujo A. Serological patterns for HTLV-I/II and its temporal trend in high-risk populations attended at Public Health Units of São Paulo, Brazil. *J Clin Virol (em revisão, 2007b).*

20. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA, Interdisciplinary HTLV Research Group – Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cadern Saúde Publ.* 2005;21:926-31.
21. De-Araujo AC, Casseb JSR, Neitzert E, Xavier De Souza ML, Mammano F, Del Mistro A, et al. HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. *Eur J Epidemiol.* 1994;10:165-71.
22. Gallo D, Diggs JL, Hanson CV. Evaluation of two commercial human T-cell lymphotropic virus Western blot (immunoblot) kits with problems specimens. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 2046-49.
23. Casseb J, Souza T, Pierre-Lima MT, Yeh E, Hendry MR, Gallo D. Testing problems in diagnosing HTLV infection among intravenous drug users with AIDS in São Paulo city, Brazil. *AIDS Res hum Retrovir.* 1997;13:1639-41.
24. Caterino-De-Araujo A, Santos-Fortuna E, Meleiro MCZ, Suleiman J, Calabro ML, Favero A, et al - Sensitivity of two ELISA tests in relation to Western blot in detecting HTLV-I and HTLV-II infection among HIV-1-infected patients from São Paulo, Brazil. *Diagn Microbiol infect Dis.* 1998;30:173-82.
25. Zehender G, De Maddalena C, Gianotto M, Cavalli B, Santambrogio S, Orso M, et al. High prevalence of false-negative anti- HTLV type I/II enzyme-linked immunosorbent assay results in HIV type 1-positive patients. *AIDS Res Hum Retrovir.* 1997;13:1141-46.
26. Bassani S, Toro C, Jiménez V, Rodés B, Soriano V. Can the level of immunosuppression in human immunodeficiency virus-infected patients affect the reliability of human T-cell lymphotropic virus type 2 serological diagnosis? *Clin Vacc Immunol.* 2006;13:160-61.

Correspondência/Correspondence to:

Profª Drª Adele Caterino-de-Araujo
Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar
CEP: 01246-902 – São Paulo/SP – Brasil
Telefax: (55) 11 3068-2898
E-mail: caterino@ial.sp.gov.br, caterino@usp.br

Febre amarela Yellow fever

Divisão de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses
Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac" – CVE
Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD
Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES-SP

Introdução

Febre amarela é uma doença causada por um vírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, com apresentação clínica variável, desde formas subclínicas até manifestações graves. Nos casos graves a letalidade pode variar de 20% a 50%.

De grande magnitude no País nas primeiras décadas do século 20, não ocorreram mais registros de sua forma urbana desde 1942, em Sena Madureira, no Acre. A freqüência dos casos em sua forma silvestre, no período de 1996 a 2007, está apresentada na Tabela 1.

No Estado de São Paulo os últimos casos autóctones de febre amarela silvestre ocorreram em 2000 – dois casos na região de São José do Rio Preto (local provável de infecção: municípios de Santa Albertina e Ouroeste).

A transmissão silvestre dá-se quando o homem suscetível¹ entra em áreas de mata e floresta e é picado pelo mosquito infectado, dos gêneros

Haemagogus (*H. janthinomys*, *H. albomaculatus*, *H. leucocelaenus*) e *Sabethes* (*S. clopterus*). O ciclo de transmissão é: macaco (reservatório) mosquito homem. Na febre amarela urbana a transmissão se estabelece a partir da picada do mosquito infectado (*Aedes aegypti*) e, neste caso, o ciclo de transmissão ocorre homem (reservatório) mosquito homem.

O período de incubação é de três a seis dias, com início abrupto de febre, cefaléia, calafrio, náuseas, vômitos, mialgia, prostração, congestão conjuntival, artralgia e fotofobia. Os quadros graves podem evoluir com icterícia, fenômenos hemorrágicos, hipotensão, sinal de Faget (dissociação pulso-temperatura), prostração, oligúria ou anúria.

A partir de 1999, em virtude da ocorrência de epizootias e de casos da doença em humanos no País, o Ministério da Saúde redefiniu as áreas de risco das regiões endêmicas, de transição e de risco potencial (Mapa 1). O Programa Nacional de Imunização, em sua rotina, inclui a vacina contra a

Tabela 1. Casos de febre amarela em humanos no Brasil, por unidade federada, no período de 1996 a 2007.

UF	1996		1997		1998		1999		2000		2001		2002		2003		2004		2005		2006		2007		TOTAL	
	C	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	O	C	O	Caso	Óbito
AC									1																1	
AM	14	12			3	1	5	4	1		3	2	6	2			3	2	2	2	1	1	2	2	40	26
BA									10	3															10	3
DF									2	2															2	2
GO							11	5	53	23													2	2	66	30
MA																									0	0
MG									2	2	32	16	6	2	58	21									98	41
MS	1	1																							1	1
MT					1	1	5	4	7	3	2	1			5	2					1	1			21	12
PA			2	2	23	8	36	9	1	1	2	1	1	1	1		2	1					1		69	23
RD			1	1							1	1													2	2
RR					7	4	3	2			1	1	2	1					1	1			1	1	15	10
SP									2	2															2	2
TO							16	5	6	4															22	9
TOTAL	15	13	3	3	34	14	76	29	85	40	41	22	15	6	64	23	5	3	3	3	2	2	6	5	340	161

Fonte: Assessoria de Comunicação Social/Divisão de Imprensa – Ministério da Saúde.

¹não vacinado, vacinado há mais de dez anos, sem registro de doença anterior.

febre amarela para a população residente nestas regiões. Além disso, medidas utilizadas na vigilância e controle do *Aedes aegypti* nas cidades relacionadas ao dengue, como melhora do saneamento básico e educação em saúde, prestam-se a colaborar para que não haja reurbanização da doença.

Em 2003, o Ministério da Saúde, com o objetivo de aumentar a sensibilidade do sistema de vigilância da febre amarela, implantou a vigilância de epizootias a partir da notificação de morte de macacos. Esta ação permite a detecção oportuna da circulação do vírus, antes mesmo da ocorrência de casos humanos, e intensifica as ações de controle.



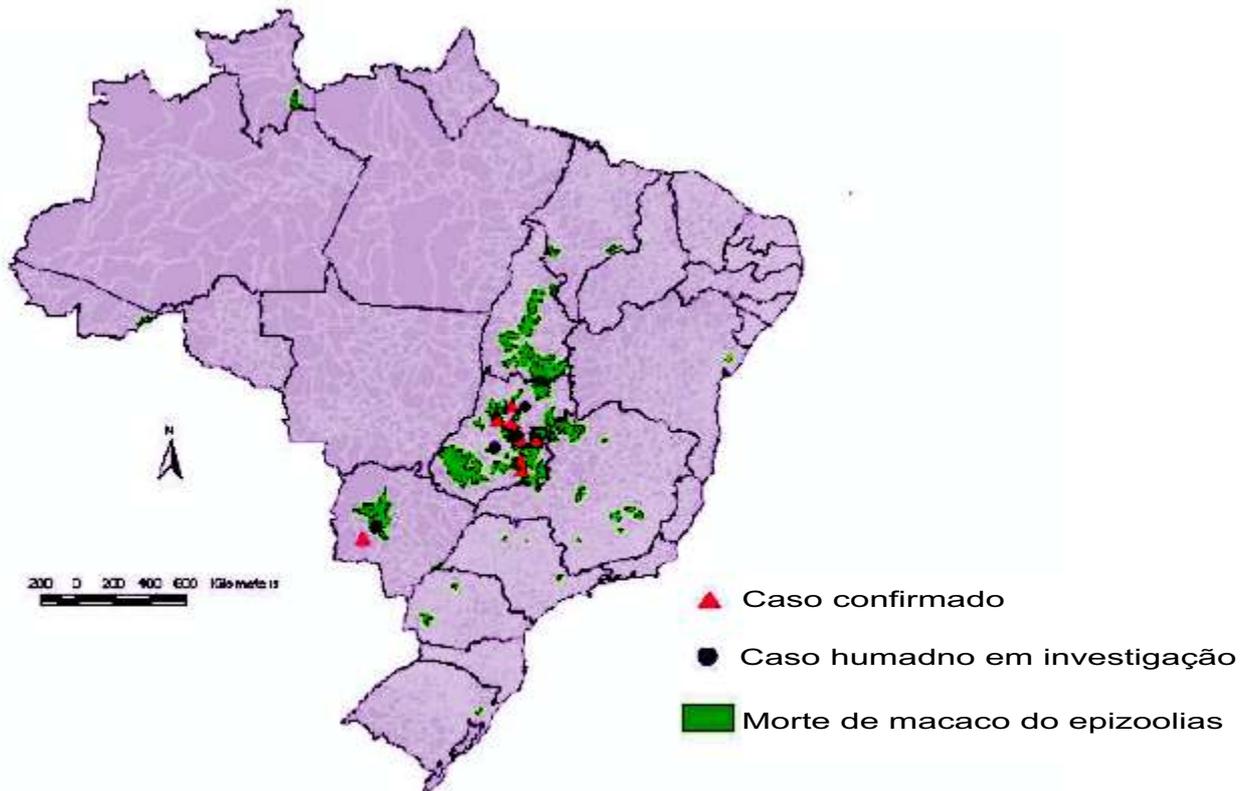
Situação atual

De janeiro a novembro de 2007 foram notificadas 46 localidades com mortes de macacos em todo o Brasil. Destas, foram confirmadas epizootias por febre amarela silvestre em quatro Estados: Goiás, Tocantins, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal. De dezembro de 2007 até a presente data, foram notificadas 219 localidades em áreas circunscritas de 116 municípios com mortes de macacos (Mapa 2).

De dezembro de 2007 até a presente data, foram notificados 44 casos suspeitos de febre amarela silvestre no Brasil (dados até 29 de janeiro de 2008),

19 confirmados (Mapa 2), com dez óbitos. Dezenove casos foram descartados e seis permanecem em investigação. Dentre os casos confirmados, os prováveis locais de infecção foram áreas silvestres dos Estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal – boletim da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletimfa_2901.pdf.

Esses registros relacionaram-se a indivíduos não-vacinados que estiveram em áreas de floresta ou mata, em regiões de transmissão do vírus silvestre.



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde.

Mapa 2. Distribuição de municípios com registros de morte de macacos, epizootias por febre amarela silvestre e casos humanos (dezembro de 2007 a janeiro de 2008)

Diante disso, o Ministério da Saúde desencadeou medidas para impedir a disseminação da doença:

Vigilância da morte de macacos

A Secretaria de Vigilância em Saúde definiu os seguintes procedimentos:

- Notificação pela autoridade sanitária, ou por qualquer cidadão, de ocorrência de mortes de macacos sem causa esclarecida;
- Epizootia por febre amarela: notificação de morte macaco realizada pela Secretaria de Saúde com confirmação:
 - laboratorial: isolamento do vírus ou outra evidência laboratorial em macacos;
 - vínculo clínico-epidemiológico: evidência de circulação do vírus da febre amarela (isolamento em mosquito e/ou caso humano confirmado) na região ou em área geograficamente próxima ou com características ambientais semelhantes.

Vigilância de casos humanos

Definiu, em nota técnica em 11 de janeiro de 2008, caso suspeito:

- Indivíduo com quadro febril agudo, acompanhado de

icterícia e/ou hemorragia, residente ou procedente de área de risco para febre amarela silvestre, nos últimos 15 dias, sem comprovação de ser vacinado contra febre amarela nos últimos dez anos. (acesso: www.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=962).

Caso confirmado

Critério clínico-laboratorial: todo caso suspeito que apresente pelo menos uma das seguintes condições:

- Isolamento do vírus da febre amarela;
- Detecção de anticorpos do tipo IgM pela técnica de Mac-Elisa em indivíduos não-vacinados ou com aumento de quatro vezes ou mais nos títulos de anticorpos do tipo IgG, pela técnica de inibição da hemaglutinação ou IgG-Elisa;
- Achados histopatológicos compatíveis;
- Detecção de genoma viral.

Também será considerado caso confirmado o indivíduo assintomático ou oligossintomático originado de busca ativa que não tenha sido vacinado e apresente sorologia (Mac-Elisa positiva para febre amarela

Critério clínico-epidemiológico: todo caso suspeito

de febre amarela que evoluiu para óbito em menos de dez dias, sem confirmação laboratorial, no início ou curso de surto ou epidemia em que outros casos já tenham sido comprovados laboratorialmente.

Imunização

A vacinação é medida eficiente de controle da doença em humanos e recomendada prioritariamente nas seguintes situações:

- Vacinação, no mínimo dez dias antes da viagem, para indivíduos que se deslocam para área de risco de transmissão de febre amarela silvestre, definida pela Secretaria de Vigilância em Saúde em 21 de janeiro de 2008 como:
 - Indivíduos que se dirijam para os Estados de Goiás e Tocantins, para o Distrito Federal, noroeste de Minas Gerais (Arinos, Buriti, Cabeceira Grande, Cascalho Rico, Luislândia, Santo Antônio da Prata) e oeste do Mato Grosso do Sul (Anastácio, Aquidauana, Bonito, Dourados), a partir de 6 meses de idade;
 - Indivíduos que se dirijam para áreas de mata, reservas e florestas dos Estados do Amapá, Amazonas, Acre, Pará, Rondônia, Roraima, Maranhão e Mato Grosso, a partir de 9 meses de idade;

A vacinação de residentes de área de transição do Estado de São Paulo, que ainda não foram imunizados e que não se deslocam para áreas afetadas, será implementada após remessa de vacinas da produção ampliada de Biomanguinhos.

A utilização da vacina tem as seguintes contra-indicações:

- Imunodeficiência congênita ou adquirida (imunodeficiência grave associada à infecção pelo HIV), transplantados, imunodepressão secundária a neoplasia, quimioterapia, radioterapia, corticoterapia (doses maiores ou iguais a 2mg/Kg/dia de prednisona ou equivalente para crianças; e maiores ou iguais a 20mg/dia para adultos, por um período maior que 14 dias).
- História de reação anafilática relacionada a ovo de galinha e seus derivados.
- Gestação em qualquer fase constitui contra-indicação relativa, devendo ser avaliado cada caso.

Observação: indivíduos soropositivos para HIV e que se desloquem para áreas de risco de transmis-

são de febre amarela poderão receber a vacina levando-se em conta a contagem de CD4 e carga viral; avaliar cada caso. São condições de adiamento da vacinação doenças agudas febris moderadas ou graves, até a resolução do quadro.

No Estado de São Paulo, o Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac", da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CVE/CCD/SES-SP) reforça as seguintes recomendações:

- Intensificação da vigilância epidemiológica da febre amarela.
- Notificação imediata de casos suspeitos de febre amarela à Secretaria Municipal de Saúde, que encaminhará a notificação ao Grupo de Vigilância Epidemiológica (GVE, lista disponível no site www.cve.saude.sp.gov.br) e à Superintendência de Controle de Endemias (Sucen) regional, após avaliação criteriosa da definição de caso suspeito estabelecida pela SVS/MS.
- O GVE deverá notificar por telefone (0800 555466) a Central de Vigilância Epidemiológica do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), utilizando a Ficha de Investigação Epidemiológica (FIE) do Sistema Nacional de Agravos de Notificação (Sinan), e o CVE para o Ministério da Saúde. É imprescindível constar informações sobre: data de início dos sintomas, data de coleta da amostra, quadro clínico, deslocamentos realizados pelo suspeito durante o período de transmissibilidade e vacinação contra febre amarela. Estas informações são fundamentais para subsidiarem as medidas de controle a serem adotadas.
- Nos casos que cumprem a definição de suspeito, definida em nota técnica pelo Ministério da Saúde, coletar amostra de sangue e encaminhá-la ao Instituto Adolfo Lutz para realização de exame para confirmação laboratorial, após preenchimento da Ficha de Notificação e Sinan. É importante anexar à solicitação do exame: a data do início dos sintomas, data da coleta da amostra e vacinação contra febre amarela.
- Para confirmação de um caso de febre amarela, todas as informações clínicas epidemiológicas e laboratoriais serão avaliadas conjuntamente pelo Ministério da Saúde e Secretaria Estadual de Saúde.
- Na confirmação de caso de febre amarela as medidas de controle deverão ser intensificadas, conforme estabelecido nas normas de vigilância.

Correspondência/Correspondence to:

Divisão de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses
Av. Dr. Arnaldo, 351 – 6º Andar – Cep: 01246-000 – São Paulo – Brasil
Tel: (55) 11 30668292 – e-mail: dvzoo@saude.sp.gov.br

Instruções aos Autores

O **Boletim Epidemiológico Paulista (Bepa)** publicação mensal da Coordenadoria de Controle de Doenças, órgão da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP) veicula artigos relacionados aos agravos à saúde pública ocorridos nas diversas áreas de controle, assistência e diagnóstico laboratorial do Sistema Único de Saúde de São Paulo (SUS-SP). Além de disseminar informações entre os profissionais de saúde de maneira rápida e precisa, o Bepa tem como objetivo incentivar a produção de trabalhos que subsidiem as ações de prevenção e controle de doenças na rede pública, apoiando, ainda, a atuação dos profissionais do sistema de saúde privado, promovendo a atualização e o aprimoramento de ambos.

Os documentos que podem ser publicados neste boletim estão divididos nas seguintes categorias:

1. **Artigos originais** – destinados à divulgação de resultados de pesquisa original inédita, que possam ser replicados e/ou generalizados. Devem ter de 2.000 a 4.000 palavras, excluindo tabelas, figuras e referências.

2. **Revisão** – Avaliação crítica sistematizada da literatura sobre assunto relevante à saúde pública. Devem ser descritos os procedimentos adotados, esclarecendo a delimitação e limites do tema. Extensão máxima: 5.000 palavras.

3. **Comunicações breves** – São artigos curtos destinados à divulgação de resultados de pesquisa. No máximo 1.500 palavras, uma tabela/figura e cinco referências.

4. **Informe epidemiológico** – Textos que têm por objetivo apresentar ocorrências relevantes para a saúde coletiva, bem como divulgar dados dos sistemas de informação sobre doenças e agravos. Máximo de 3.000 palavras.

5. **Informe técnico** – Trabalhos que têm por objetivo definir procedimentos, condutas e normas técnicas das ações e atividades desenvolvidas no âmbito da saúde coletiva. No máximo 5.000 palavras.

A estrutura dos textos produzidos para a publicação deverá adequar-se ao estilo Vancouver, cujas linhas gerais seguem abaixo.

• **Página de identificação** – Título do artigo, conciso e completo, em Português e Inglês; nome completo de todos os autores; indicação da instituição à qual cada autor está afiliado; indicação do autor responsável pela troca de correspondência; se subvencionado, indicar nome da agência de fomento que concedeu o auxílio e respectivo nome do processo; se foi extraído de dissertação ou tese, indicar título, ano e instituição em que foi apresentada.

• **Resumo** – Todos os textos, à exceção dos

• **Informes técnicos**, deverão ter resumo em Português e em Inglês (*Abstract*), dimensionado entre 150 palavras (**comunicações breves**) e no máximo 250 palavras (**artigos originais, revisões, atualizações e informes epidemiológicos**). Para os artigos originais, o resumo deve destacar os propósitos do estudo, procedimentos básicos adotados (seleção de sujeitos de estudo ou animais de laboratório, métodos analíticos e observacionais), principais descobertas e conclusões. Devem ser enfatizados novos e importantes aspectos do estudo ou das observações. Uma vez que os resumos são a principal parte indexada do artigo em muitos bancos de dados eletrônicos, e a única parte que alguns leitores lêem, os autores precisam lembrar que eles devem refletir, cuidadosamente, o conteúdo do artigo. Para os demais textos, o resumo deve ser narrativo, mas com as mesmas informações.

• **Descritores (unitermos ou palavras-chave)** – Seguindo-se ao resumo, devem ser indicados no mínimo três e no máximo dez descritores do conteúdo, que têm por objetivo facilitar indexações cruzadas dos textos e podem ser publicados juntamente com o resumo. Em Português, os descritores deverão ser extraídos do vocabulário “Descritores em Ciências em Saúde” (DeCS), da Bireme. Em Inglês, do “Medical Subject Headings” (Mesh). Caso não sejam encontrados descritores adequados à temática abordada, termos ou expressões de uso corrente poderão ser empregados.

• **Introdução** – Contextualiza o estudo, a natureza dos problemas tratados e sua significância. A introdução deve ser curta, definir o problema estudado, sintetizar sua importância e destacar as lacunas do conhecimento abordadas.

• **Metodologia (Métodos)** – A metodologia 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.

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

- **Discussão** – Deve enfatizar os novos e importantes aspectos do estudo e as conclusões que dele derivam, sem repetir material colocado nas seções de introdução e resultados. Deve começar com a apreciação das limitações do estudo, seguida da comparação com a literatura e da interpretação dos autores, apresentando, quando for o caso, novas hipóteses.
- **Conclusão** – Traz as conclusões relevantes, considerando os objetivos do trabalho e formas de continuidade. Se tais aspectos já estiverem incluídos na discussão, a conclusão não deve ser escrita.
- **Referências bibliográficas** – A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores.

- **Citações bibliográficas no texto, tabelas e figuras:** deverão ser colocadas em ordem numérica, em algarismo arábico, sobrescrito, após a citação, constando da lista de referências bibliográficas. Exemplo:

“Os fatores de risco para a infecção cardiovascular estão relacionados à imunocompetência do hospedeiro¹.”

- **Referências bibliográficas:** devem ser numeradas consecutivamente, obedecendo à ordem em que aparecem pela primeira vez no texto, de acordo com o estilo Vancouver. A ordem de citação no texto obedecerá esta numeração. Até seis autores, citam-se todos os nomes; acima disso, apenas os seis primeiros, seguidos da expressão em Latim “*et al*”. É recomendável não ultrapassar o número de 30 referências bibliográficas por texto.

A) Artigos de periódicos – As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados devem estar de acordo com o *Index Medicus*, e marcadas em negrito.

Exemplo:

1. Ponce de Leon P; Valverde J e Zdero M. Preliminary studies on antigenic mimicry of *Ascaris Lumbricoides*. **Rev Lat-amer Microbiol** 1992; 34:33-38.

2. Cunha MCN, Zorzatto JR, Castro LLC. Avaliação do uso de Medicamentos na rede pública municipal de Campo Grande, MS. **Rev Bras Cien Farmacêuticas** 2002; 38:217-27.

B) Livros A citação de livros deve seguir o exemplo abaixo:

3. Medronho RA. Geoprocessamento e saúde: uma nova abordagem do espaço no processo saúde-doença. Primeira edição. Rio de Janeiro: Fiocruz/CICT/NECT.

C) Capítulos de livro – Já ao referenciar capítulos de livros, os autores deverão adotar o modelo a seguir:

4. Arnau JM, Laporte JR. Promoção do uso racional de medicamentos e preparação de guias farmacológicos. *In*: Laporte JR, Tognoni G, Rozenfeld

S. Epidemiologia do medicamento: princípios gerais. São Paulo: Hucitec; Rio de Janeiro: Abrasco; 1989.

D) Dissertações e teses:

5. Moreira MMS. Trabalho, qualidade de vida e envelhecimento [dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública; 2000. p. 100.

E) Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

6. Barboza *et al*. Descentralização das políticas públicas em DST/Aids no Estado de São Paulo. *In*: III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; 2004 ago; São Paulo: Rev IAL. P. 34 [resumo 32-SC].

F) Periódicos e artigos eletrônicos:

7. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Síntese de indicadores sociais 2000. [Boletim on-line]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> [2004 mar 5]

G) Publicações e documentos de organizações governamentais:

8. Brasil. Decreto 793, de 5 de abril de 1993. Altera os Decretos 74.170, de 10 de junho de 1974, e 79.094, de 5 de janeiro de 1977, que regulamentam, respectivamente, as Leis 5991, de 17 de janeiro de 1973, e 6360, de 23 de setembro de 1976, e dá outras providências. Brasília (DF): Diário Oficial da União; 6 abr 1993. Seção 1. p. 4397.

9. Organización Mundial de la Salud (OMS). Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (*Grupo Vancouver*) (<http://www.cmje.org>).

Tabelas – Devem ser apresentadas em folhas separadas, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que forem citadas no texto. A cada uma deve ser atribuído um título breve, **NÃO SE UTILIZANDO TRAÇOS INTERNOS HORIZONTAIS OU VERTICAIS**. Notas explicativas devem ser colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título.

Quadros – São identificados como tabelas, seguindo uma única numeração em todo o texto.

Figuras – Fotografias, desenhos, gráficos etc., citados como figuras, devem ser numerados consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram mencionados no texto, por número e título abreviado no trabalho. As legendas devem ser apresentadas em folha à parte; as ilustrações devem ser suficientemente claras para permitir sua reprodução. Não são permitidas figuras que representem os mesmos dados.