

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

Boletim Epidemiológico Paulista

BEPA 112

Volume 10 Número 112 abril/2013

BEPA

Boletim Epidemiológico Paulista

ISSN 1806-423-X

Volume 10 Nº 112

abril de 2013

Nesta edição

Método de diagnóstico *antemortem* da raiva humana por meio de técnicas de biologia molecular, utilizando saliva e biópsia de pele da região da nuca

An antemortem method for diagnosis of human rabies by molecular techniques using saliva and neck-skin biopsy 1

Perguntas e Respostas sobre o vírus A(H7N9)

Questions and answers about the vírus A(H7N9) 11

Situação Epidemiológica da Influenza

Vigilância Sentinela da Influenza – Estado de São Paulo – Brasil

Epidemiological situation of influenza

Sentinel Surveillance of influenza - State of São Paulo-Brazil 17

Avaliação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Stenotrophomonas maltophilia*, Complexo *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli* e *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* obtidos de amostras respiratórias de pacientes portadores de Fibrose Cística

Evaluation of antibiotic susceptibility of Stenotrophomonas maltophilia, Burkholderia cepacia complex, Burkholderia gladioli and Achromobacter xylosoxidans subsp. xylosoxidans recovered from respiratory samples from cystic fibrosis patients 29

Instruções aos Autores

Author's Instructions 31

Expediente



**COORDENADORIA DE
CONTROLE DE DOENÇAS**

Av. Dr Arnaldo, 351
1º andar – sala 133

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

Tel.: 55 11 3066-8823/8824/8825

E-mail: 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:

Aglae Neri Gambirasio – ICF/CCD/SES-SP

Alberto José da Silva Duarte – IAL/CCD/SES-SP

Ana Freitas Ribeiro – CVE/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

Moisés Goldbaum – SUCEN/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

Ivanete Kotait – IP/CCD/SES-SP

Maria Bernadete de Paula Eduardo – CVE/CCD/SES-SP

Maria de Fátima Costa Pires – PPG/CCD/SES-SP

Patricia Sanmarco Rosa – ILSL/SES-SP

Coordenação Editorial:

Leticia Maria de Campos

Lilian Nunes Schiavon

Maria de Fátima Costa Pires

Sylia Rehder

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

Kátia Rocini – Revisão

Marcos Rosado – Projeto gráfico/edição eletrônica

Consultores Científicos:

Albert Figueiras – Espanha

Alexandre Silva – CDC Atlanta

Eliseu Alves Waldman – FSP/USP-SP

Exedito José de Albuquerque Luna – IMT/USP

Carlos M. C. Branco Fortaleza – FM/Unesp/Botucatu- SP

Gonzalo Vecina Neto – FSP/USP

Hélio Hehl Caiiffa Filho – HC/FMUSP

José Cássio de Moraes – FCM-SC/SP

José da Silva Guedes – IB/SES-SP

Gustavo Romero – UnB/CNPQ

Hiro Goto – IMT/SP

José da Rocha Carvalheiro – Fiocruz-RJ

Luiz Jacintho da Silva – FM/Unicamp

Myrna Sabino – IAL/CCD/SES-SP

Paulo Roberto Teixeira – OMS

Ricardo Ishak – CNPQ/UF Pará

Roberto Focaccia – IER/SES-SP

Vilma Pinheiro Gawyszewsk – OPAS

Centro de Documentação – CCD/SES-SP

Portal de Revistas - SES/Projeto Metodologia Scielo:

Lilian Nunes Schiavon

Eliete Candida de Lima Cortez

Sandra Alves de Moraes

CTP, Impressão e Acabamento:

Imprensa Oficial do Estado de São Paulo

Disponível em:

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



Acesse a versão eletrônica em:
www.ccd.saude.sp.gov.br

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

Artigo original

Método de diagnóstico *antemortem* da raiva humana por meio de técnicas de biologia molecular, utilizando saliva e biópsia de pele da região da nuca

An antemortem method for diagnosis of human rabies by molecular techniques using saliva and neck-skin biopsy

Juliana Galera Castilho; Carla Isabel Macedo; Saulo de Oliveira Santos; Rafael de Novaes Oliveira; Samira Maria Achkar; Maria Luiza Carrieri; Ivanete Kotait; Pedro Carnieli Jr.
Instituto Pasteur, São Paulo, SP – Brasil

RESUMO

Por meio das técnicas de RT-PCR com *primers* direcionados para o gene da glicoproteína e RT-PCR e hemi-nested RT-PCR com *primers* direcionados para o gene da nucleoproteína, o RNA do vírus da raiva foi identificado em 95,2% de 21 amostras, 18 de saliva e três de biópsia de pele da região da nuca, coletadas entre a hospitalização e a morte de um paciente com sinais clínicos da raiva. O tratamento administrado ao paciente incluiu a indução de coma e terapia antiviral. Cada técnica, isoladamente, detectou RNA viral em 90,5%; 57,1% e 85,7% das amostras, respectivamente. Nossos resultados sugerem que a amplificação em paralelo de diferentes regiões do genoma do vírus da raiva pode fornecer maior confiabilidade ao diagnóstico *antemortem* da doença, auxiliando a decisão médica quanto à aplicação do protocolo de tratamento com antivirais.

PALAVRAS-CHAVE: Raiva. Diagnóstico *Antemortem*. Reação em cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

By using RT-PCR with primers targeted to the glycoprotein gene and RT-PCR and hemi-nested RT-PCR with primers targeted to the nucleoprotein gene, rabies viral RNA was identified in 95.2% of 21 samples, 18 of saliva and three of neck-skin biopsy, taken between hospitalization and death from a patient with clinical signs of rabies. Treatment administered to the patient included induction of coma and antiviral therapy. Each technique in isolation detected viral RNA in 90.5%, 57.1% and 85.7% of the samples, respectively. Our findings suggest that the parallel amplification of different regions of the genome of rabies virus can provide greater reliability to the *antemortem* diagnosis of rabies assisting medical decision regarding the application of the protocol treatment with antivirals.

KEYWORDS: Rabies. *Antemortem* Diagnosis. Polymerase Chain Reaction.

INTRODUÇÃO

A raiva é uma doença aguda, progressiva e fatal, causada por um vírus RNA da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*, denominado vírus da raiva (RABV). O genoma do RABV é composto por RNA de fita simples, polaridade negativa, de aproximadamente 12kb e codifica cinco proteínas estruturais.¹ Apesar do grande progresso obtido no desenvolvimento de vacinas e no controle da doença, o número anual de mortes por raiva no mundo é estimado em 55.000.² No Brasil, 166 casos de raiva humana foram confirmados no período de 2000 a 2010.³

O diagnóstico da raiva humana apenas baseado em sintomatologia clínica é difícil e incerto, exceto quando sinais específicos de hidrofobia e aerofobia estão presentes.^{4,2}

A raiva deve ser incluída como diagnóstico diferencial nos casos de encefalites infecciosas agudas e progressivas de origem desconhecida, independentemente de histórico de agressão animal.⁵ O diagnóstico precoce pode eliminar

custos com testes diagnósticos desnecessários e tratamentos médicos inapropriados.⁶ Além disso, também reduz o número de pessoas potencialmente expostas ao vírus durante o contato com o paciente e permite a identificação de pessoas que são candidatas ao tratamento profilático.^{7,8}

As amostras usadas para o diagnóstico *antemortem* incluem soro, líquido cefalorraquidiano (LCR), saliva, decalque de córnea e biópsia de pele da região da nuca.^{9-11,6,8} As técnicas convencionais, como detecção de antígeno, detecção de anticorpos e isolamento viral, têm sucesso limitado e as duas últimas são demoradas. As técnicas de biologia molecular para diagnóstico *antemortem* da raiva humana vêm sendo aprimoradas, provando serem bastante promissoras.^{12,13,4,11}

Os relatos de cura da raiva em dois pacientes, um nos Estados Unidos em 2004¹⁴ e um no Brasil em 2008,¹⁵ tornaram ainda mais necessário o aperfeiçoamento de técnicas rápidas e confiáveis

para monitorar o paciente durante o tratamento. O adequado diagnóstico *antemortem* deve ocorrer antes da utilização da terapia experimental, especialmente porque não existem ainda drogas antivirais licenciadas para raiva.⁵

Assim, o Instituto Pasteur, no Brasil, vem realizando e aprimorando protocolos baseados em técnicas moleculares para a identificação e caracterização molecular do RABV a partir de amostras de biópsia de pele da região da nuca e saliva coletadas em pacientes suspeitos de raiva. Um destes pacientes apresentou elevado número de amostras, coletadas em dias consecutivos, acarretando a possibilidade de realizar avaliação destes protocolos.

O presente estudo foi realizado para verificar, na rotina do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pasteur – SP, a eficiência de um protocolo preestabelecido de diagnóstico

antemortem de raiva humana utilizando saliva ou biópsia de pele da região da nuca. O protocolo em questão utiliza técnicas de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) e heminested PCR (hnPCR) com *primers* específicos direcionados aos genes da glicoproteína (G) e nucleoproteína (N) do RABV.

MATERIALE MÉTODOS

Amostras

Foram coletadas 21 amostras (3 de folículo piloso e 18 de saliva) de um paciente com diagnóstico clínico epidemiológico de raiva, entre 19/06/09 a 06/07/2009 (Tabela 1). Esses paciente foi submetido ao tratamento utilizando o Protocolo de Milwaukee modificado, denominado Protocolo de Recife,¹⁵ a partir do 5º dia de internação.

Tabela 1. Resultados de RT-PCR, hnPCR e IVC de amostras de paciente tratado com o protocolo de Milwaukee modificado

Amostras Código/tipo	Data da coleta	Primers utilizados para RT-PCR e hnPCR			IVC
		21G-304*	304-504**	GA3222-40/GB4119-39*	
IP4384/09 - saliva	19/06/2009	POS	POS	POS	POS
IP4385/09 - saliva	20/06/2009	POS	NEG	POS	IMP
IP4386/09 - saliva	21/06/2009	POS	POS	POS	IMP
IP4387/09 - saliva	22/06/2009	POS	POS	POS	POS
IP4388/09 - biópsia de pele	22/06/2009	POS	POS	POS	NR
IP4493/09 - biópsia de pele	23/06/2009	POS	POS	POS	NR
IP4494/09 - saliva	23/06/2009	NEG	NEG	NEG	POS
IP4495/09 - saliva	24/06/2009	POS	POS	POS	POS
IP4496/09 - saliva	25/06/2009	POS	POS	POS	POS
IP4578/09 - saliva	26/06/2009	POS	POS	POS	POS
IP4579/09 - saliva	27/06/2009	POS	POS	POS	IMP
IP4580/09 - biópsia de pele	27/06/2009	NEG	POS	POS	NR
IP4582/09 - saliva	28/06/2009	POS	POS	POS	IMP
IP4583/09 - saliva	29/06/2009	POS	POS	POS	POS
IP4687/09 - saliva	30/06/2009	NEG	POS	POS	IMP
IP4688/09 - saliva	01/07/2009	NEG	NEG	POS	IMP
IP4690/09 - saliva	02/07/2009	NEG	POS	POS	IMP
IP4784/09 - saliva	03/07/2009	NEG	POS	POS	POS
IP4785/09 - saliva	04/07/2009	NEG	POS	POS	POS
IP4786/09 - saliva	05/07/2009	NEG	POS	NEG	IMP
IP4787/09 - saliva	06/07/2009	NEG	POS	POS	IMP

POS – positivo. NEG – negativo. NR – não realizado. IMP – impossibilitado devido à morte dos animais em até 3 dias da inoculação. IVC – inoculação viral em camundongos.

* primers utilizados na RT-PCR. – ** primers utilizados na hnRT-PCR

Inoculação viral em camundongos (IVC)

As suspensões de saliva foram inoculadas intracerebralmente em camundongos de acordo com a técnica descrita por Koprowski.¹⁶ Devido ao pequeno tamanho, as amostras de biópsia da região da nuca não foram utilizadas nesse teste, sendo apenas utilizadas nos testes moleculares.

RT-PCR E hnPCR

O RNA foi extraído de 300µL das amostras de saliva (n=18) e de 0,6g das amostras de biópsia (n=3) utilizando Trizol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de biópsia foram cortadas em pequenos fragmentos com bisturi estéril. O vírus fixo CVS (Challenge Virus Standard) foi usado como controle positivo, e material extraído de cérebro de camundongos não infectados e água ultra-pura foram usados como controles negativos.

Foram utilizados os *primers* 21G, 304 e 504¹⁷ direcionados a região correspondente ao gene N. Inicialmente, a RT-PCR foi realizada com os *primers* senso 21G e antisenso 304. Em seguida, os produtos de PCR foram utilizados para a realização da hemi-nested PCR (hnPCR) com os *primers* senso 504 e antisenso 304. Os *primers* senso GA3222-40 e antisenso GB4119-39¹⁸ direcionados a região correspondente ao gene G foram utilizados para a realização da RT-PCR. As reações foram realizadas como descritas por

Macedo et al.¹¹ As sequências e posições dos primers utilizados estão descritas na Tabela 2. Assim, as amostras descritas na Tabela 1 foram testadas com três conjuntos de primers: 21G/304 e 304/504 (alvo=gene N) e GA3222-40/GB4119-39 (alvo=gene G) e foram produzidos fragmentos de 1478pb, 248pb e 915pb, respectivamente.

Sequenciamento de DNA e análise filogenética

Os fragmentos amplificados foram purificados com GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences™) e sequenciados usando *primers* senso e antisenso com DYEnamic ET Dye Terminator (Amersham Biosciences™) de acordo com as instruções do fabricante. As sequências foram determinadas em Analisador Genético - ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). As sequências N e G foram alinhadas com sequências homólogas recuperadas do GenBank usando o método CLUSTALW e o software BioEdit.¹⁹ Alinhamentos foram então usados para a elaboração de árvores filogenéticas usando o método de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-joining*) com modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros e 1.000 bootstrap de repetições para suporte estatístico usando Mega 2.1.²⁰

Tabela 2. Primers utilizados nas reações de RT-PCR e hnPCR

Primer	Sequência	Posição
21G ¹⁷	5'-ATGTAACACCTCTACAATG -3'	55-73
304 ¹⁷	5'-TTGACGAAGATCTTGCTCAT -3'	1514-1533
504 ¹⁷	5'-TATACTCGAATCATGATGAATGGAGGTCGACT -3'	1286-1317
GA3222-40 ¹⁸	5'-CGCTGCATTTTRTCARAGT -3'	3221-3239
GB4119-39 ¹⁸	5'-GGAGGGCACCATTTGGTMTTC3'	4116-4135

RESULTADOS

Os resultados de IVC e RT-PCR podem ser visualizados na tabela 1. Das 18 amostras de saliva, nove apresentaram resultado positivo pelo IVC. As técnicas moleculares (RT-PCR e hnPCR) utilizadas simultaneamente apresentaram 94,4% de positividade (n= 17) demonstrando a presença do vírus e/ou RNA viral na saliva do paciente desde o momento da internação até o óbito.

Quando analisados separadamente os resultados de RT-PCR de cada conjunto de *primers* verificamos que o conjunto direcionado ao gene da glicoproteína foi o que detectou o RNA viral em maior número de amostras de saliva (94,11%), e o conjunto 21G/304 o menor (58,8%).

O conjunto de *primers* 21G/304 também não permitiu a detecção do RNA viral na amostra de folículo piloso IP4580/90 que apresentou resultado positivo quando testada pelos dois outros conjuntos. As amostras IP4388/90 e IP4493/90 apresentaram resultado positivo pelos três conjuntos de *primers*.

Dezoito amostras (85,7%) foram positivas pela técnica de hnPCR utilizando *primers* 504 e 304 e 19 (90,5%) pela técnica de RT-PCR utilizando *primers* GA3222-40 e GB4119-39. Os resultados obtidos pelos dois conjuntos de *primers* foram divergentes somente para três amostras. Quando considerados os resultados obtidos pelos três conjuntos, 20 (95,2%) foram positivas.

Destas 20 amostras, 8 também foram positivas pela IVC. O resultado das amostras de saliva restantes não pôde ser confirmado devido à morte dos camundongos nos primeiros três dias após a inoculação, possivelmente devido à toxicidade das amostras, uma vez que seringas com filtro esterilizante foram utilizadas para remover a contaminação bacteriana. Uma amostra de saliva que apresentou resultado

negativo pelas técnicas moleculares foi positiva pela IVC (Tabela 1).

A análise filogenética das sequências (dados não apresentados) revelaram que o paciente foi infectado com vírus compatível com linhagem de canídeo brasileiro (variante 2), confirmando a investigação epidemiológica que relata agressão por cão.

DISCUSSÃO

A maioria dos casos de raiva continua a ocorrer devido à falta de biológicos a preços acessíveis ou disponibilidade de profilaxia apropriada.²¹ A combinação de um rápido diagnóstico, vacinas aperfeiçoadas, descoberta de medicamentos e conhecimentos acadêmicos em mecanismos básicos de doença permitirá um avanço nas futuras tentativas de prevenção, de controle e, em última análise, o tratamento da raiva.⁵

O diagnóstico da raiva baseado em sintomas clínicos por si só é difícil e não confiável. Os casos suspeitos de raiva humana, portanto, exigem diagnóstico laboratorial preciso e rápido. O exame *postmortem* de decalques de sistema nervoso central utilizando a imunofluorescência direta (IFD) é a técnica ouro para o diagnóstico da raiva.^{22,2} A imuno-histoquímica é um teste opcional,²³ e a inoculação viral em cultura de células (IVCC) e IVC² são testes confirmatórios para a IFD. Entretanto, a maioria das técnicas convencionais usadas para o diagnóstico *postmortem* da raiva não são adequadas para o diagnóstico *antemortem* devido ao risco associado à realização de biópsia cerebral em paciente.^{9,10}

O diagnóstico laboratorial *antemortem* da raiva é baseado tipicamente na detecção de antígeno viral em biópsia de pele, RNA viral em

biópsia de pele ou saliva ou anticorpos no soro ou LCR.⁸⁻¹⁰ A sensibilidade dessas técnicas apresenta grande variação de acordo com o estágio da doença, o nível de anticorpos, a natureza intermitente da excreção viral e treinamento da equipe técnica.²

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos são tão específicos quanto a IFD, podem ser realizados mais rapidamente do que IVC ou IVCC e apresentam elevada sensibilidade.^{24,25} Além disso, ao contrário da IFD, esses testes podem também detectar RNA viral em fluidos utilizados no diagnóstico *antemortem* em humanos.¹²

Diversos protocolos vêm sendo descritos na literatura, apresentando, entre outras, variações quanto ao tipo de amostra analisada e ao gene alvo de amplificação.

O presente estudo descreve a conduta realizada no Instituto Pasteur de São Paulo em relação ao diagnóstico molecular realizado em amostras de pacientes suspeitos de raiva. Durante os anos de pesquisa no diagnóstico *antemortem* da raiva por RT-PCR, o grupo de pesquisadores do instituto vem tentando aprimorar as técnicas moleculares no intuito de fornecer resultados rápidos e sensíveis visando à tentativa de tratamento do paciente o mais rápido possível, assim como o acompanhamento da evolução do quadro.

Todos os protocolos descritos neste trabalho vêm sendo utilizados no Instituto Pasteur no diagnóstico *antemortem* de vários pacientes (dados não apresentados). Esses outros pacientes que foram diagnosticados positivos para raiva vieram a óbito poucos dias após o início dos testes e apenas uma ou duas amostras foram analisadas. O elevado número de amostras do paciente mencionado nesse estudo, coletadas durante dias consecutivos, nos levou a relatar esse caso em particular. Além disso, demonstrou a rotina laboratorial no

monitoramento do paciente durante o tratamento. Esse monitoramento é necessário para determinar uma possível eliminação viral que permitiria a modificação e posterior término do tratamento. Infelizmente, isso não ocorreu e o RNA viral foi detectado até o momento do óbito do paciente.

Embora o RNA do RABV possa ser detectado em vários fluidos biológicos e amostras, saliva e biópsia de pele são os espécimes mais amplamente estudados em pesquisas relacionadas aos testes diagnósticos *antemortem*.^{6,7,10,11} Dados de um grande estudo de coorte¹³ envolvendo 43 pacientes mostraram que RT-hnPCR de biópsia de pele (98,3%) e saliva (70,2%) apresentaram maior sensibilidade que RT-hnPCR de urina (9,5%). Em outros estudos, maior taxa de positividade foi alcançada com saliva em comparação ao LCR.^{26,27,6} Os resultados obtidos em nosso laboratório utilizando RT-PCR e hnPCR de LCR no diagnóstico *antemortem* da raiva em vários pacientes acometidos pela doença (dados não apresentados) nos levam a não indicar a amostra de LCR como a mais adequada na tentativa de diagnóstico. Por outro lado, saliva e biópsia de pele da região da nuca apresentaram resultados bastante promissores desde o início de nossos estudos.¹¹ No presente trabalho, o diagnóstico *antemortem* por RT-PCR e hnPCR a partir de amostras de biópsia de pele e saliva apresentaram 100% e 94,4% de resultados positivos, estando de acordo com os autores que sugerem essas amostras como as mais indicadas para detecção de RNA viral.

Quanto à escolha dos *primers*, o gene N é o mais conservado e cuja proteína é expressa em maior quantidade nos lissavírus, sendo o mais comum alvo de amplificação.²⁸ Macedo et al.¹¹ desenvolveu um protocolo de RT-PCR para detectar um fragmento de 248pb do gene N. Este

método foi capaz de detectar o ácido nucleico viral em 70% das amostras de biópsia de pele obtidas antes e depois do óbito. Crepin et al.⁶ e Nagaraj et al.,²⁹ utilizando RT-PCR e RTnPCR, respectivamente, com *primers* também direcionados ao gene N, relataram taxas de positividade de 30% e 37,5%, respectivamente, em amostras de saliva. O gene da polimerase (gene L) é outra região do genoma dos lissavírus que possui blocos bem conservados. Dacheux et al.,¹³ utilizando RT-hnPCR e *primers* direcionados a essa região, reportaram índices de positividade de 98,3% e 70,2% em amostras de saliva e biópsia de pele, respectivamente.

Primers direcionados ao gene G e à região intergênica G-L foram desenhados e utilizados para o diagnóstico e identificação por multiplex RT-PCR dos RABV isolados de várias espécies hospedeiras no Brasil.^{30,31} No presente estudo, no qual utilizamos *primers* direcionados ao gene N (21G/304 e 504/304) e G (GA3222-40 e GB4119-39), obtivemos positividade de 100% e 94,4% com amostras de biópsia de pele e saliva, respectivamente, quando os resultados são considerados em conjunto.

A confiabilidade dos resultados obtidos com amostras de saliva foi verificada por uma análise realizada em paralelo utilizando IVC, uma técnica simples que possui alta sensibilidade.⁴ Infelizmente, 9 de 18 amostras causaram a morte dos camundongos nos três primeiros dias após a inoculação, possivelmente como resultado de toxicidade. Por isso, apenas 50% dos resultados para essas amostras pôde ser verificado utilizando esta técnica. Contudo, todos os resultados de

RT-PCR e hnPCR em amostras de biópsia de pele e saliva reportadas aqui foram confirmados por sequenciamento de DNA e análise filogenética.

Quando cada conjunto de *primers* foi analisado separadamente, observamos que o conjunto 21G/304 apresentou a menor sensibilidade (57,1%).

Em contraste, o conjunto 504/304 e GA3222-40/GB4119-39 proporcionou resultados positivos para 18 (85,7%) e 19 (90,5%) das amostras, respectivamente, sendo que duas amostras negativas por hnPCR utilizando *primers* 504 e 304 foram positivas por RT-PCR utilizando *primers* GA3222-40 e GB4119-39, enquanto uma negativa por este último protocolo foi positivo em hnPCR utilizando os iniciadores 504 e 304. Isso mostra que esses dois protocolos se complementam, aumentando a confiabilidade dos resultados no diagnóstico *antemortem*.

CONCLUSÃO

Os nossos resultados sugerem que a probabilidade de detecção *antemortem* do RNA do RABV utilizando como amostras biópsia de pele da região da nuca e saliva é elevada e que a utilização de RT-PCR e hnPCR com conjuntos de *primers* direcionados a diferentes regiões do genoma do vírus da raiva pode ser mais seguro e mais eficiente do que a utilização de um único conjunto, além de ser mais rápido do que as técnicas convencionais, aumentando a confiabilidade dos testes diagnósticos. A sua utilização pode beneficiar a aplicação e monitoramento da utilização dos protocolos de tratamento antivirais.

REFERÊNCIAS

1. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus taxonomy. Ninth report of the international Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego, CA: Academic Press; 2012.
2. World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies, First Report; 2005. (WHO Technical Report Series, 931).
3. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Controle, vigilância e profilaxia da raiva [monografia na internet]. Brasília; 2010 [acesso em 29 dez. 2012]; Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/prog_vig_raiva_dados_ate_out_2010.pdf
4. Madhusudana SN, Sukumaran SM. Antemortem diagnosis and prevention of human rabies. *Ann of Ind Acad of Neurol.* 2008;11(1):3-12.
5. Franka R, Rupprecht CE. Treatment of rabies in the 21st century: curing the incurable? *Future microbiol.* 2011;6(10):1135-40.
6. Crepin P, Audry L, Rotivel Y, Gacoin A, Caroff C, Bourhy H. Intravitam diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J. clin microbiol.* 1998; 36(4):1117-21.
7. David D, Rupprecht CE, Smith JS, Stram Y. Antemortem detection and virus characterization of three human rabies fatalities in Israel between 1996-1997. *Isr. j. vet. med [periódico na internet].* 1999 [acesso em 29 dez. 2012];54(3). Disponível em: <http://www.isrvma.org/ImageToArticle/Files/Vol%2054%203.doc>
8. Rupprecht CE, Cathleen AH, Hemachudha T. Rabies re-examined. *Lancet.* 2002;2: 327-43.
9. Trimarchi CV, Smith JS. Diagnostic evaluation. In: Jackson AC, Wunner WH, editores. *Rabies.* New York: Academic Press;2002. p. 307-49.
10. Smith J, Mcelhinney L, Parson G. Case report: rapid ante-mortem diagnosis of a human case of rabies imported into UK from Philippines. *J. med. virol.* 2003;69:1550-3.
11. Macedo CI, Carnieli Jr. P, Brandão PE, Rosa EST, Oliveira RN, Castilho JG et al. Diagnosis of human rabies cases by polymerase chain reaction of neck-skin samples. *Braz. j. infect. dis.* 2006; 10(5):341-5.
12. Wacharapluesadee S, Hemachudha T. Ante-and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests. *Expert rev. mol. diagn.* 2010;10(2):207-18.
13. Dacheux L, Reynes JM, Buchy P, Sivuth O, Diop BM, Rousset D et al. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin. Infect. dis.* 2008;47(11):1410-7.
14. Willoughby RE Jr, Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond CM, Schwabe MJ et al. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J. med.* 2005;352:2508-14.
15. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo para tratamento da raiva humana no Brasil. *Epidemiol. Serv. saúde.* 2009;18(4):385-94.
16. Koprowski H. The mouse inoculation test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editores. *Laboratory techniques in rabies.* 4.ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 80-7.
17. Orciari LA, Niezgodna M, Hanlon CA, Shaddock JH, Sanderlin DW, Yager PA et al. Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs after oral vaccination. *Vaccine.* 2001; 14(19):4511-8.
18. Sato G, Itou T, Miura Y, Mikami T, Ito M, Kurane I et al. Genetic and phylogenetic analysis of glycoprotein of RABV isolated

- from several species in Brazil. *J. vet. Med. sci.* 2004;66(7):747-53.
19. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 1999;41:95-8.
 20. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IE, Nei M. MEGA 2: Molecular evolutionary genetic analysis software. *Evolutionary Genetics Analysis Software, Bioinformatics.* 2001;17(12):1244-5.
 21. Wilde H. Failures of post-exposure rabies prophylaxis. *Vaccine.* 2007;25(44):7605-9.
 22. Dean DJ, Abelseth MK, Atanasiu P. The fluorescent antibody test. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, editores. *Laboratory techniques in rabies.* 4.ed. Geneva: World Health Organization; 1996. p. 88-95.
 23. Lembo T, Niezgodna M, Velasco-Villa A, Cleaveland S, Ernest E, Rupprecht CE. Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. *Emerg. Infect. dis.* 2006;12(2):310-3.
 24. Bordignon J, Brasil-Dos-Anjos G, Bueno CR, Salvatiera-Oporto J, Dávila AM, Grisard EC et al. Detection and characterization of RABV in southern Brazil by PCR amplification and sequencing of the nucleoprotein gene. *Arch. virol.* 2005;150(4):695-708.
 25. Franka R, Svrcek S, Madar M, Kolesarova M, Ondrejškova A, Ondrejka R et al. Quantification of the effectiveness of laboratory diagnostic of rabies using classical and molecular-genetic methods. *Vet. Med.* 2004;49(7):259-67.
 26. Hemachudha T, Wacharapluesadee S. Antemortem diagnosis of human rabies. *Clin. Infect. dis.* 2004;39(7):1085-6.
 27. Saengseesom W, Mitmoonpitak C, Kasempimolporn S, Sitprijia V. Real-time PCR analysis of dog cerebrospinal fluid and saliva samples for ante-mortem diagnosis of rabies. *Southeast Asian j. trop. med. public health.* 2007;38(1):53-7.
 28. Delmas O, Holmes EC, Talbi C, Larrous F, Dacheux L, Bouchier C et al. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. *PLoS ONE.* 2008;3(4):e2057.
 29. Nagaraj T, Vasanth JP, Desai A, Kamat A, Madhusudana SN, Ravi V. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *J. clin. virol.* 2006;36(1):17-23.
 30. Carnieli P Jr, Fahl WO, Brandão PE, Oliveira R de N, Macedo CI, Durymanova E et al. Comparative analysis of rabies virus isolates from Brazilian canids and bats based on the G gene and G-L intergenic region. *Arch. virol.* 2010;155(6):941-8.
 31. Sato G, Tanabe H, Shoji Y, Takuya I, Ito FH, Sato T et al. Rapid discrimination of rabies viruses isolated from various host species in Brazil by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. clin. virol.* 2005;33(4):267-73.

Correspondência/Correspondence to:

Juliana Galera Castilho
 Instituto Pasteur, Av. Paulista 393
 CEP: 01311-000, São Paulo, SP – Brasil
 Tel: 55 11 3145-3172.
 E-mail: juliana.castilho@uol.com.br



Acesse a versão eletrônica em:
www.ccd.saude.sp.gov.br

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

Perguntas e Respostas sobre o vírus A(H7N9)* *Questions and answers about the vírus A(H7N9)*

Centers for Disease Control and Prevention

Uma nova cepa do vírus da influenza aviária foi descoberta em aves e pessoas na China. Até o momento, não foi identificada transmissão de pessoa para pessoa. Na sequência, apresentamos algumas perguntas e respostas frequentes sobre esse novo vírus.

O que é o vírus A(H7N9)?

Vírus A(H7N9) é a designação de um subtipo de vírus da influenza que pode ser encontrado em aves, porém normalmente não afeta seres humanos. Como todos os vírus da influenza A, existem também diferentes cepas de A(H7N9). Desde o final de março de 2013, a China tem notificado infecções em seres humanos e aves (domésticas) com uma nova cepa do A(H7N9) que é muito diferente dos vírus A(H7N9) anteriormente conhecidos.

Essa nova cepa de A(H7N9) está infectando seres humanos?

Sim. Embora os vírus A(H7N9) nunca tenham sido detectados em seres humanos antes, nas duas primeiras semanas de abril, a China relatou a ocorrência de mais de 70 casos de infecção humana com esse novo vírus A(H7N9). Até 25 de abril de 2013, contabilizaram-se 109 casos confirmados e 22 óbitos registrados na China, conforme boletim da Organização Mundial de Saúde (OMS).

Como as pessoas estão se infectando?

Esse vírus foi encontrado em aves (domésticas) na China, em algumas das mesmas áreas nas quais infecções humanas ocorreram. Uma vez que esse vírus normalmente não se dissemina entre os humanos, trabalha-se com a hipótese de que as pessoas se infectaram após contato com aves infectadas.

Como as pessoas se infectam com vírus de aves?

As infecções humanas com vírus da influenza aviária são raras, porém aconteceram no passado, em geral após contato próximo com aves infectadas (vivas ou mortas) ou ambientes contaminados com os vírus da influenza aviária.

As aves infectadas podem disseminar uma quantidade significativa do vírus da influenza, por exemplo, em seus dejetos ou em seu muco. Se alguém tocar uma ave infectada ou um ambiente contaminado pelo vírus e então tocar seus olhos, seu nariz ou sua boca, pode se infectar com o vírus da influenza aviária. Existem algumas evidências de que a infecção também pode ocorrer se o vírus da influenza aviária se tornar, de alguma forma, capaz de se transmitir pelo ar, como, por exemplo, quando uma ave infectada bate as asas. Se uma pessoa respirar o vírus é possível que se infecte.

*Texto traduzido por Leticia Maria de Campos, da CCD/SES-SP; revisado por Dra. Telma Regina Marques Pinto Carvalhanas, da DDTR/CVE/CCD/SES-SP, e Dra. Ana Freitas Ribeiro, do CVE/CCD/SES-SP, Brasil, abril de 2013.

A infecção por esse vírus é grave?

A maior parte dos casos notificados de infecção por esse vírus em seres humanos não indica casos muito graves da doença. Existem, também, relatos de casos mais brandos da doença e de um possível caso de uma pessoa que teve resultados positivos no teste para identificação do vírus, mas não teve quaisquer sintomas.

Quais são os sintomas da doença causada por esse vírus?

Os sintomas iniciais são febre alta e tosse. Muitos casos progrediram para formas bastante graves da doença, incluindo pneumonia grave, síndrome de desconforto respiratório agudo (SDRA), choque séptico e falência múltipla de órgãos, que podem evoluir para o óbito.

Esse vírus está se transmitindo de pessoa para pessoa?

No presente, autoridades sanitárias chinesas investigam cuidadosamente essa situação. Estão acompanhando os contatos próximos das pessoas infectadas para descobrir se também se infectaram. Isso é importante para avaliar se está ocorrendo a transmissão do vírus de pessoa para pessoa. Até o momento, centenas de comunicantes foram checados e não houve qualquer evidência de transmissão sustentada do vírus de pessoa para pessoa.

É possível que esse vírus se transmita de pessoa para pessoa?

Sim. Com base no que sabemos atualmente sobre infecções causadas por outros vírus da influenza aviária em seres humanos, é possível e mesmo provável que exista alguma transmissão

limitada desse vírus de pessoa para pessoa. O fator importante será determinar se o vírus adquire a capacidade de se transmitir de uma pessoa para outra com facilidade. A transmissão sustentada de pessoa para pessoa é necessária para que haja disseminação global (pandemia). Autoridades de saúde estão monitorando cuidadosamente a situação para identificar a ocorrência dessa transmissão.

Existe alguma vacina para proteção contra o novo vírus A(H7N9)?

Não. No momento, não existe vacina para proteger contra esse vírus. O CDC (Atlanta-EUA) e outras instituições estão trabalhando para desenvolver um protótipo de vírus vacinal, que possa ser usado para produzir uma vacina, caso seja necessário.

Existem medicamentos para tratar as doenças associadas a esse vírus?

O CDC recebeu duas amostras do vírus A(H7N9) da China, uma no dia 11 e outra no dia 20 de abril de 2013. Testes de resistência antiviral no primeiro vírus isolado no CDC foram feitos e indicam que ele seria sensível (suscetível) aos dois medicamentos antivirais usados para tratar a influenza sazonal: o oseltamivir, inibidor de neuraminidase (Tamiflu®) e zanamivir (Relenza®). Testes mostraram que o vírus seria resistente aos medicamentos da classe das adamantinas (rimantadina e amantadina), que constitui outra classe de medicamentos antivirais que não são, atualmente, recomendados para uso, em razão da grande resistência a estas drogas entre vírus de influenza sazonal. Testes laboratoriais realizados no segundo isolado do vírus para determinar a

suscetibilidade aos antivirais ainda estão em andamento no CDC.

É importante assinalar que os vírus da influenza estão em constante mutação, e algumas dessas mudanças podem resultar na resistência dos vírus a um ou mais medicamentos antivirais para influenza, assim, esses medicamentos podem nem sempre ser totalmente eficazes. Os vírus A(H7N9) encontrados na China são muito diferentes dos outros vírus H7N9 anteriormente identificados, e ainda há muito a aprender sobre suas propriedades. Adicionalmente, o vírus ainda está em processo de evolução e adaptação. À medida que novos isolados do vírus A(H7N9) forem recebidos, o CDC continuará realizando testes para determinar a suscetibilidade de outros vírus A(H7N9) aos medicamentos antivirais existentes.

No momento, o CDC recomenda o tratamento do A(H7N9) com oseltamivir (Tamiflu®) e zanamivir (Relenza®).

Qual é o risco que esse vírus representa, agora, nos Estados Unidos?

Não foram detectados casos de infecção humana ou aviária com o A(H7N9) nos Estados Unidos. No momento, o risco às pessoas nos Estados Unidos é considerado baixo.

É possível que venham a ser encontrados casos humanos de influenza A(H7N9) nos Estados Unidos?

Sim. O cenário mais provável para isso seria a infecção pelo A(H7N9) em um viajante à China. Muitas pessoas viajam entre a China e

os Estados Unidos. O CDC divulgou um alerta aos profissionais de saúde e médicos nos Estados Unidos, para manter a vigilância sobre sintomas de influenza em viajantes que retornam de países com influenza aviária. O CDC divulgou, também, orientações para isolar, testar e tratar tais pacientes. Uma vez que esse vírus não parece estar se disseminando com facilidade de pessoa para pessoa, a ocorrência de alguns casos nos Estados Unidos com histórico de viagens à China não mudará o risco de infecção para o público geral nos Estados Unidos.

Como são diagnosticadas as infecções pelo vírus A(H7N9) nos seres humanos?

Não existem, no momento, testes disponíveis, sejam eles do tipo comercializado em farmácias, seja nos consultórios médicos para rapidamente detectar e distinguir os vírus A(H7N9) e os outros vírus de influenza. Um teste mais sofisticado, porém, que detecta especificamente os vírus A(H7N9) foi desenvolvido pelo CDC para uso por laboratórios de saúde pública qualificados nos Estados Unidos e internacionalmente. Esse teste envolve a coleta de uma amostra do trato respiratório (nariz, garganta, pulmão) de um paciente doente. A amostra é, então, enviada para um laboratório de saúde pública no qual um procedimento conhecido como rRT-PCR (reação em cadeia de transcriptase reversa em tempo real) é realizado. A rRT-PCR é muito precisa e sensível na detecção dos vírus de influenza. O procedimento costuma dar resultados em 4 horas; o tempo decorrido no processamento e no relato dos resultados, porém, pode variar dependendo do laboratório.

O CDC recomenda que as pessoas adiem ou cancelem viagens para a China por causa da influenza A(H7N9)?

Uma vez que o A(H7N9) não está se transmitindo com facilidade de pessoa para pessoa, no momento, o CDC não recomenda que as pessoas adiem ou cancelem viagens para a China. A Organização Mundial da Saúde também está monitorando cuidadosamente a situação e não recomenda restrições a viagens.

Qual o conselho do CDC para as pessoas que vão viajar para a China?

O CDC aconselha aos viajantes tomar algumas precauções de bom senso, como não tocar aves ou outros animais e lavar as mãos com frequência. Aves e seus produtos derivados devem ser bem cozidos. O CDC divulgará atualizações para estas recomendações aos viajantes caso a situação na China se altere. Essas orientações podem ser acessadas em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/notices/watch/avian-flu-h7n9-china>.

As pessoas que viajam para a China devem ter uma receita de antivirais antes de viajar?

No momento, o CDC não recomenda prescrição de medicamentos antivirais ou automedicação para a influenza A(H7N9). O CDC recomenda às pessoas que irão viajar para a China que fiquem atentas e observem precauções básicas de bom senso para se proteger e monitorar sua saúde durante e depois da viagem.

Qualquer pessoa que tenha febre, tosse ou falta de ar em prazo de até 10 dias depois de viajar deve procurar um médico e contar sobre sua viagem recente à China.

Quais são as recomendações do CDC sobre o H7N9 para pessoas nos Estados Unidos?

O CDC não tem quaisquer recomendações novas ou específicas para o público americano sobre o A(H7N9).

O CDC está preocupado que o A(H7N9) venha a causar uma pandemia?

Esta é uma situação de emergência em saúde pública e é possível que uma pandemia venha a se iniciar, caso o vírus se modifique e passe a se transmitir com facilidade de pessoa para pessoa. O CDC está se preparando para essa possibilidade.

O que o CDC está fazendo em resposta ao A(H7N9)?

O CDC está monitorando cuidadosamente essa situação e se articulando com parceiros nacionais e internacionais, incluindo o CDC da China e a Organização Mundial da Saúde. No dia 8 de abril de 2013, o CDC ativou o Centro de Operações de Emergência em nível 2 (ativação limitada) para dar apoio ao gerenciamento da emergência do A(H7N9) na China. O CDC também está mandando uma equipe para a China a fim de dar apoio ao grupo de resposta a surtos em nível local.

Além disso, o CDC está tomando medidas de preparação rotineiras, incluindo:

- O desenvolvimento de um protótipo de vírus vacinal que possa ser usado para produzir uma vacina, caso isso venha a ser necessário.
- A criação de um *kit* de testes para detecção do vírus que possa ser usado por outros laboratórios de saúde pública.

- A realização de estudos em amostras de sangue para verificar se existe alguma imunidade a esse vírus na população.
- A realização de testes contínuos para determinar a suscetibilidade do A(H7N9) aos medicamentos antivirais licenciados, oseltamivir (conhecido comercialmente como Tamiflu®) e o zanamivir (cujo nome comercial é Relenza®), bem como medicamentos antivirais experimentais.
- O CDC também está reunindo maiores informações para que possa ser realizada uma avaliação de risco de saúde pública mais robusta. Esta é uma situação em evolução e ainda há muito a aprender.

REFERÊNCIAS – LINK RECOMENDADO

1. **H7N9: Frequently Asked Questions.**
<http://www.cdc.gov/flu/avianflu/h7n9-faq.htm>;
Acessado em: 25 de abril de 2013.

Correspondência/Correspondence to:
Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória/CCD/SES-SP
Av. Dr. Arnaldo, 351 – 6º andar
Tel: 55 11 3066-8757
E-mail: dvresp@saude.sp.gov.br



Acesse a versão eletrônica em:
www.ccd.saude.sp.gov.br

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

Situação Epidemiológica da Influenza

Vigilância Sentinela da Influenza – Estado de São Paulo – Brasil

Epidemiological situation of influenza

Sentinel Surveillance of Influenza - State of São Paulo-Brazil

Documento elaborado e atualizado pela Equipe Técnica da Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória/CVE/CCD/SES-SP; colaboração da Divisão de Imunização/CVE/CCD/SES-SP e do Instituto Adolfo Lutz - IAL/CCD/SES-SP. São Paulo/Brasil, março de 2013

Cenário global

De acordo com o boletim nº 180 (março de 2013) da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre a temporada atual da influenza, no Hemisfério Norte (HN) houve predominância do vírus Influenza A (H3N2) e, no momento, encontra-se em declínio. No entanto, o número de internações por pneumonia e influenza entre adultos maiores de 65 anos tem aumentado.

Nos Estados Unidos, a detecção viral diminuiu na maior parte do país, sendo que o pico da estação ocorreu antecipadamente na segunda semana de janeiro de 2013, o que gerou um alerta mundial. Os vírus predominantes foram Influenza A(H3N2), influenza A(H1N1) pdm09 e influenza B. A caracterização

antigênica os identificou, respectivamente, como A/California/7/2009-like, A/Victoria/361/2011-like e B/Wisconsin/1/2010-like, pertencente à linhagem Yamagata. Em 29,2% das amostras de vírus influenza B testadas também foi identificada a linhagem B/Victoria. Todos os vírus identificados estão contemplados na formulação da vacina do Hemisfério Norte.

Desde o início da estação, nenhuma das amostras testadas de influenza A(H3N2) e influenza B apresentaram resistência aos inibidores da neuraminidase (zanamivir e oseltamivir). Apenas uma amostra de influenza A(H1N1) pdm09 resistente ao oseltamivir foi reportada.

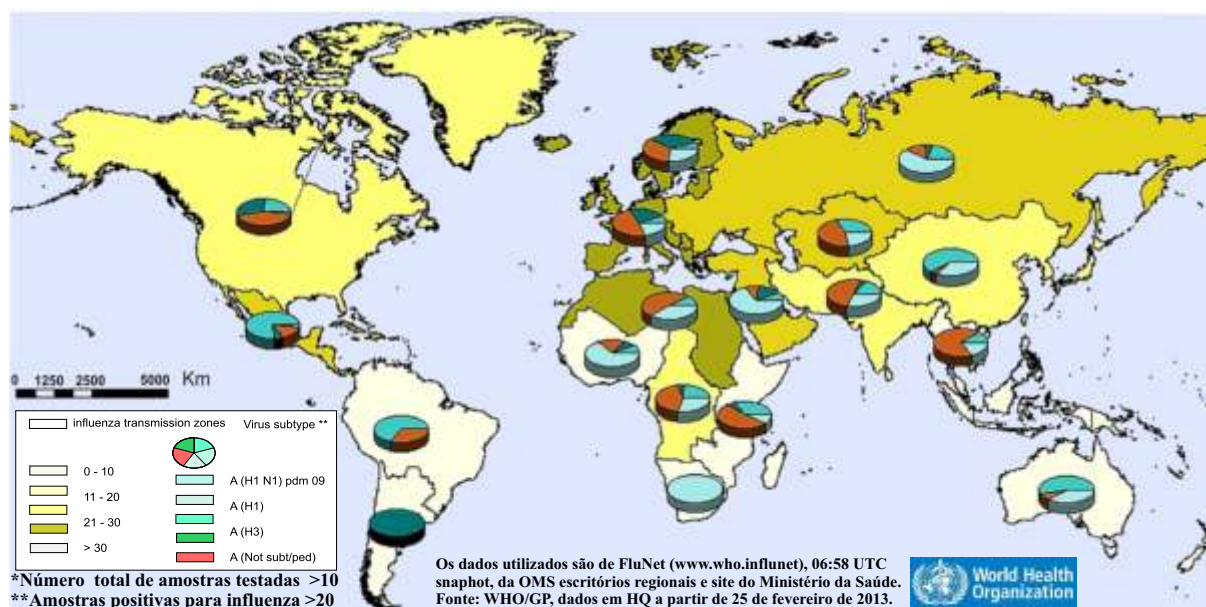


Imagem adaptada

Fonte: OMS, Boletim nº 180. Disponível em: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/

Figura 1. Percentual de amostras respiratórias positivas para o vírus influenza por zona de transmissão, situação na semana epidemiológica 7, entre os dias 10-16 de fevereiro de 2013

Em resumo:

Na América do Norte, a detecção do vírus influenza A diminuiu, enquanto um número maior do vírus influenza B vem sendo detectado. O vírus influenza A (H3N2) permaneceu predominante na região.

Na Europa, a atividade viral da influenza diminuiu nas regiões ocidental e setentrional, porém permanece aumentada na Europa Oriental. O vírus influenza A(H1N1) pdm09 foi o mais frequentemente detectável, com exceção da Dinamarca, Irlanda e Reino Unido, que reportaram maior proporção de influenza A(H3N2) e influenza B que o restante da Europa, enquanto a Bulgária, Itália e Espanha reportaram maior atividade do vírus influenza B.

A atividade viral em toda a região de clima temperado da Ásia encontra-se em declínio, exceto na Mongólia. O vírus influenza A(H1N1) pdm09 predominou em alguns países da região, com cocirculação do vírus influenza A(H3N2). Assim como em outras áreas houve predomínio do A(H3N2), cocirculou o A (H1N1) pdm09 e o influenza B.

Caribe, América Central, América do Sul e Oceania apresentaram detecção viral esporádica. De modo geral, houve predomínio do vírus influenza A (H3N2) na América do Sul.

Na África, também, observou-se detecção viral diminuída, porém com aumento da detecção do vírus influenza B ao norte e do vírus A (H1N1) pdm09 na região sul.

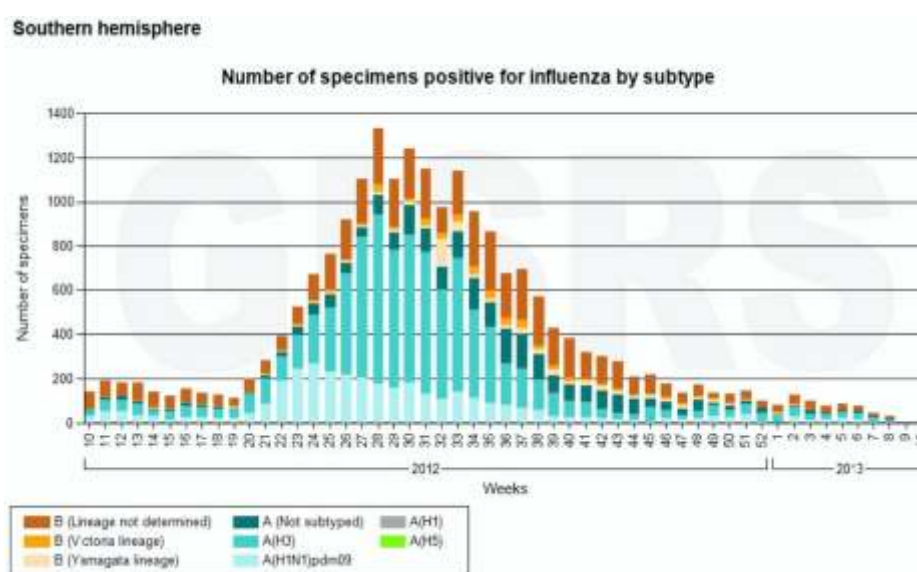
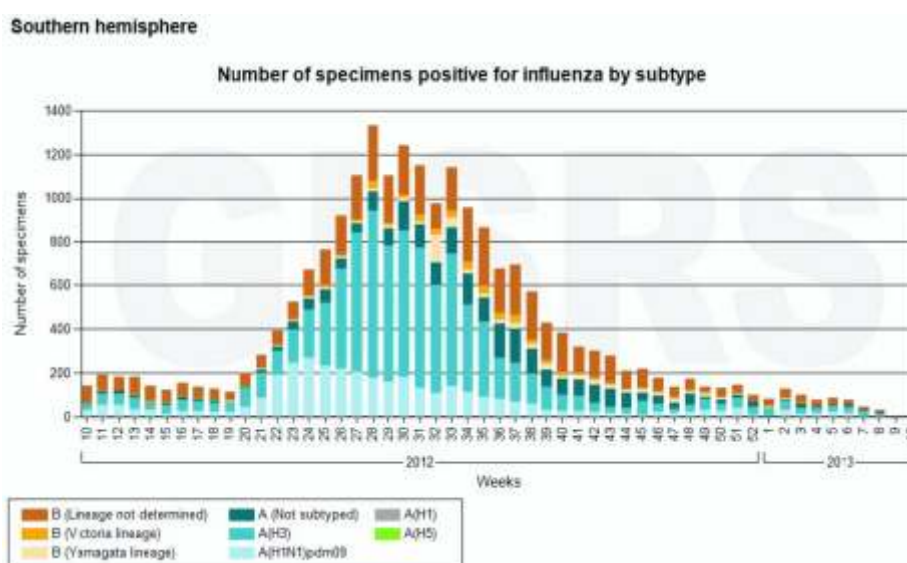


Figura 2. Hemisfério Sul: número de amostras positivas para o vírus influenza por subtipo

Fonte: OMS, Boletim nº 180.

Disponível em: <http://gamapserver.who.int/gareports/Default.aspx?ReportNo=5&Hemisphere=Southern>



Fonte: OMS, Boletim nº 180.

Disponível em: <http://gamapserv.who.int/gareports/Default.aspx?ReportNo=5&Hemisphere=Northern>

Figura 3. Hemisfério Norte: número de amostras positivas para o vírus influenza por subtipo

Síndrome respiratória aguda grave (SRAG)

Conforme protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde (MS) em 2011, considera-se caso suspeito indivíduo de qualquer idade com Síndrome Respiratória Aguda caracterizada por febre alta, mesmo que referida, tosse e dispnéia, acompanhada ou não dos sinais e sintomas abaixo:

- aumento da frequência respiratória (de acordo com a idade);
- hipotensão em relação à pressão arterial habitual do paciente; e
- em crianças, além dos itens acima, observar também os batimentos de asa de nariz, cianose, tiragem intercostal, desidratação e inapetência.

De acordo com as diretrizes nacionais vigentes, os casos de SRAG com internação hospitalar e óbitos devem ser notificados individual e imediatamente, de preferência em até 24 horas no Sinan *online*, com a utilização da Ficha de Investigação Individual.

O Ministério da Saúde do Brasil, no boletim informativo (SE 26 30/6/2012), reforçou a importância da “adoção do tratamento oportuno dos casos suspeitos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) e dos casos de Síndrome Gripal (SG) com fatores de risco associados, segundo definição de caso do “Protocolo de Tratamento de Influenza – 2011”, independente de qualquer solicitação de exame. Para atingir sua eficácia máxima, o antiviral deve ser iniciado nas primeiras 48 horas após o início da doença. Entretanto, mesmo ultrapassado esse período, o MS indica a prescrição do medicamento”.

Ainda conforme boletim publicado, “Na Síndrome Gripal, em casos excepcionais e com base no julgamento clínico, o tratamento antiviral pode ser considerado para pacientes ambulatoriais sem fatores de risco, desde que o tratamento possa ser iniciado nas primeiras 48 horas do início da doença”. Para maiores informações, consulte o Protocolo publicado no Boletim Epidemiológico

(Volume 43, de março de 2012) disponível no site www.saude.gov.br.

No sentido de facilitar a prescrição do medicamento Oseltamivir, o MS informou que por determinação da Anvisa, segundo RDC 39, de 09/07/2012, este medicamento foi retirado da Lista C1 da RDC N° 70, de 23/12/2009 que trata de “outras substâncias sujeitas a controle especial”. Desse modo, não será mais exigido o controle especial em duas vias e o Oseltamivir deverá ser prescrito como os demais medicamentos, em receita simples.

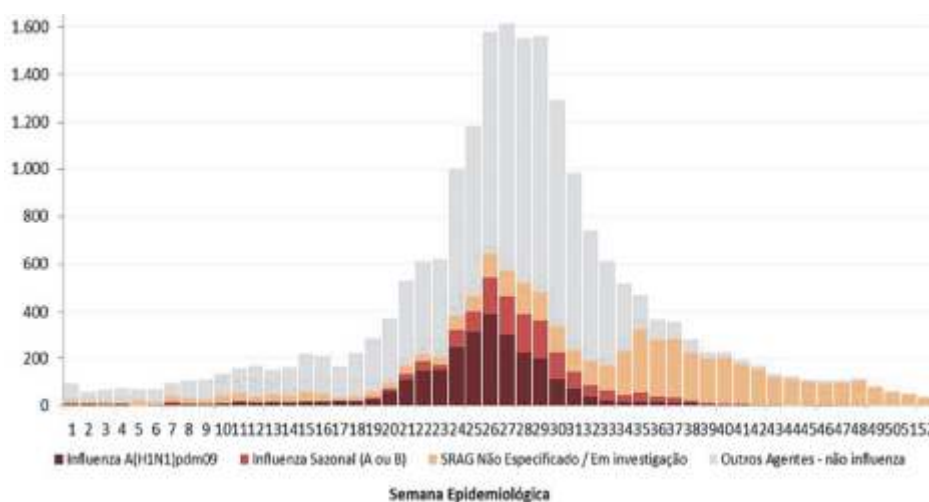
No Brasil

Conforme Boletim informativo do Ministério da Saúde, até a SE 52/2012, foram registrados no Sinan *online* um total de 20.539 casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) que foram hospitalizados (Figura 4). Desses, 9% (1.931) evoluíram para óbito. Do total de casos, os vírus influenza foram responsáveis por 19,5% (4.016), sendo que destes, 65% (2.614) foram pelos vírus A (H1N1) pdm09. As

maiores proporções de casos de SRAG hospitalizados são de residentes nas regiões Sul 53,8% (11.041) e Sudeste 37% (7.595). Do total de óbitos por SRAG hospitalizados, a influenza foi responsável por 22,7% (439) e destes, 79,9% (351) foram pelo vírus A (H1N1) pdm09. Dentre os casos confirmados de SRAGH para o vírus Influenza A (H1N1) 09pdm (2.614), 33,8% (884) pertencem à região Sudeste e 29,1% (762) à região Sul.

No Estado de São Paulo

Até dezembro de 2012 (SE 52), foram notificados 4.378 casos de SRAG hospitalizados (Figura 5), sendo 15,4% (676) casos confirmados para o vírus influenza, sendo 48,3% (371) confirmados para o vírus influenza A (H1N1) pdm09, 42,8% (290) foram confirmados para o vírus influenza A sazonal e 22,2% (15) confirmados para o vírus influenza B. Dentre os casos confirmados para influenza A, 182 foram não subtipados, 102 para H3 sazonal e 6 H1 sazonal.



Para informações adicionais, favor consultar:

http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=33850&janela=1

Fonte: Boletim informativo, Influenza (gripe) – Semana Epidemiológica (SE) 52 (atualizado em 28/02/2013)

Figura 4: Casos de SRAG hospitalizados, segundo diagnóstico etiológico e SE de início dos sintomas. Brasil, 2012.

Foram registrados 102 (15,8%) óbitos entre os casos confirmados para influenza. Vinte e oito (27,4%) foram confirmados para o vírus influenza A ou B sazonal e 74 (72,5%) confirmados para o vírus influenza A(H1N1) pdm09.

Dentre os 371 casos confirmados de SRAG hospitalizados por A (H1N1) pdm09, 196 (52,8%) foram do sexo masculino. No entanto, dos casos confirmados para o vírus influenza sazonal (A e B), 181 (59,3%) pertenciam ao sexo feminino. A distribuição percentual dos casos e

óbitos, segundo a faixa etária, pode ser observada na tabela 1.

Dentre as 179 mulheres em idade fértil (15 a 49 anos), 31 (17,3%) eram gestantes, sendo o diagnóstico etiológico e condição gestacional apresentados na tabela 2.

Na figura 6, encontra-se representada a frequência de sinais e sintomas apresentados pelos casos confirmados para o vírus influenza e, na figura 7, apresenta-se a frequência de comorbidades.

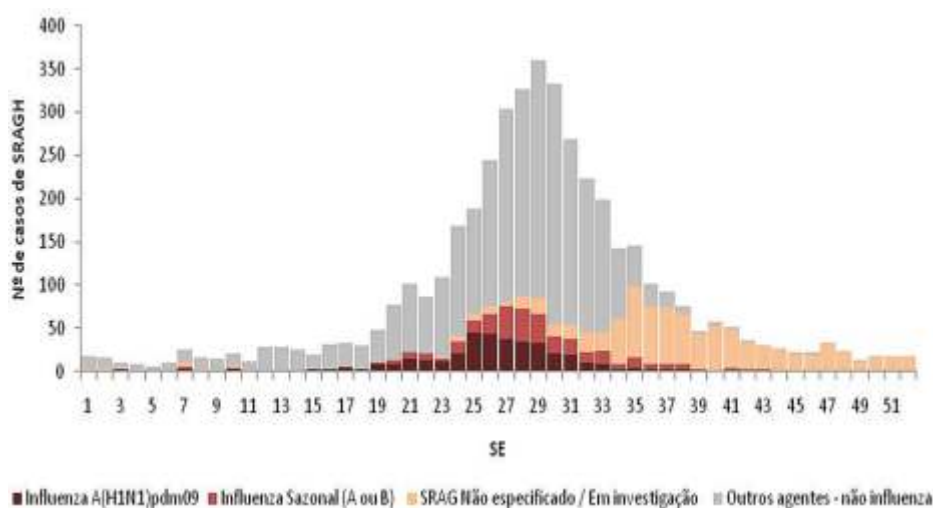


Tabela 1. Distribuição dos casos e óbitos confirmados para o vírus influenza, segundo faixa etária, ESP, 2012

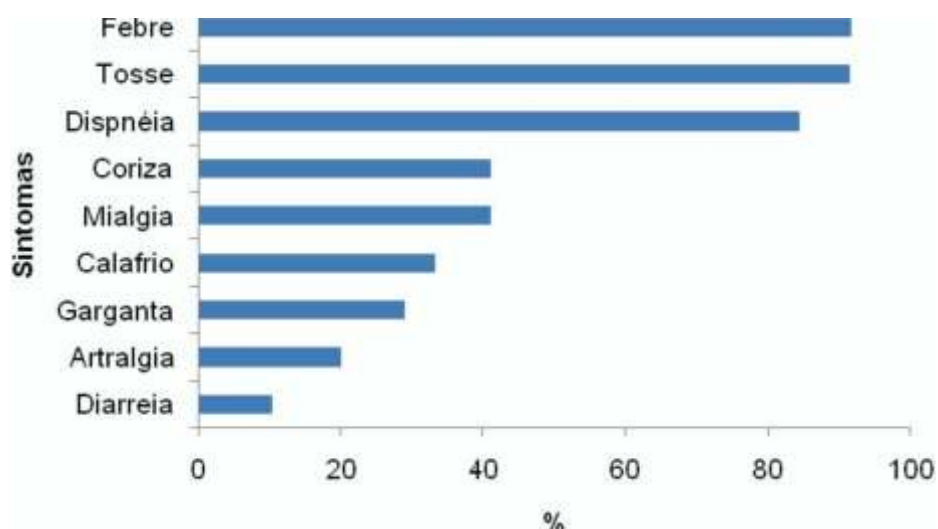
Faixa etária (anos)	Caso	Influenza A(H1N1)pdm09 % Óbito	%	Caso	Influenza sazonal (A e B) % Óbito	%		
< 2 anos	44	11,9	2	2,7	26	8,5	1	3,6
02-09	36	9,7	1	1,4	31	10,2	0	0,0
15-24	44	11,9	5	6,8	31	10,2	0	0,0
25-59	219	59,0	57	77,0	137	44,9	12	42,9
60-99	28	7,5	9	12,2	80	26,2	15	53,6
TOTAL	371	100,0	74	100,0	305	100,0	28	100,0

Fonte: Sinan online influenza/SVS/MS, SE 5/2013, sujeito a alteração

Tabela 2. Distribuição dos casos confirmados de SRAG hospitalizados, segundo diagnóstico etiológico e condição gestacional, ESP, 2012

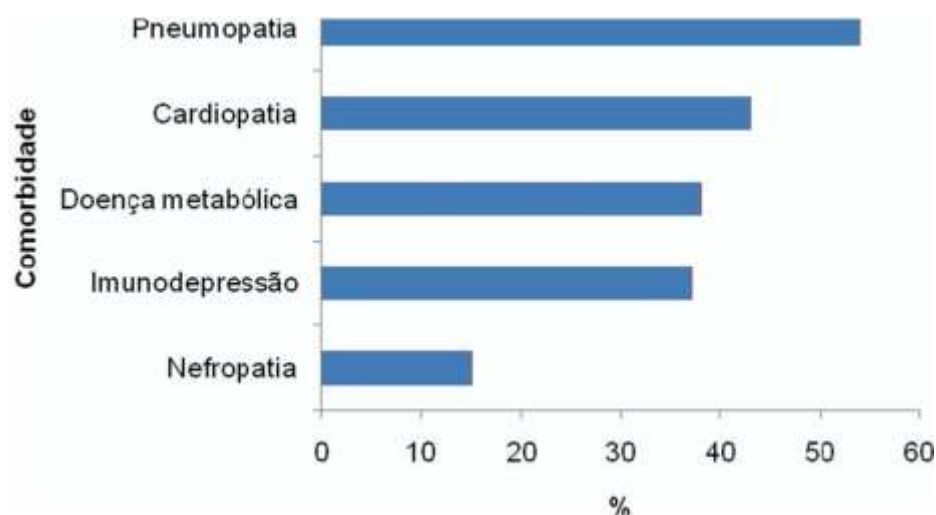
Condição gestacional	Influenza A (H1N1)pdm09	%	Influenza sazonal (A ou B)	%
1º Trimestre	4	28,6	3	17,6
2º Trimestre	5	35,7	4	23,5
3º Trimestre	5	35,7	10	58,8
Total	14	100,0	17	100,0

Fonte: Sinan *online* influenza/SVS/MS, SE 52/2012, sujeito a alteração



Fonte: Sinan *online* influenza/SVS/MS, SE 5/2013, sujeito a alteração

Figura 6. Frequência de sinais e sintomas apresentados pelos casos de SRAGH confirmados para o vírus influenza, ESP, 2012



Fonte: Sinan *online* influenza/SVS/MS, SE 5/2013, sujeito a alteração

Figura 7. Frequência de comorbidades apresentadas pelos casos de SRAGH confirmados para o vírus influenza, ESP, 2012

Na figura 8, destacou-se a frequência de hospitalizações registradas no Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Sistema Único de Saúde (SUS), por pneumonia e influenza (CID-10: J09 a J18), mês a mês, de 2008 a novembro de 2012. Não foi contemplado o código J22, uma vez que está agregado ao grupo J66-J99 na tabulação de morbidades disponibilizada pelo Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (Datasus). Observou-se nítido aumento das internações durante o ano de 2009 e um padrão de comportamento semelhante nos registros de 2010 a 2012.

Vigilância Sentinela de Influenza

O Programa Global de Influenza monitora a atividade da influenza em nível mundial. Ele tem por base dados epidemiológicos e laboratoriais reportados pela Rede de Vigilância Mundial de Influenza, na qual o Brasil e, por conseguinte, o Estado de São Paulo, encontram-se inseridos.

É considerado caso suspeito de síndrome gripal (SG) indivíduo com doença aguda (com duração máxima de cinco dias), apresentando

febre (ainda que referida), acompanhada de tosse ou dor de garganta, na ausência de outros diagnósticos.

As informações aqui apresentadas são referentes às amostras ativas e identificadas por meio das técnicas de imunofluorescência (IFI), coletadas nas unidades sentinela de influenza, e da técnica de RT-PCR, ambas realizadas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) central e suas unidades regionais, sendo os resultados registrados no Sistema da Vigilância Sentinela de Influenza Nacional (Sivep-Gripe/SVS/MS).

No Brasil

De acordo com o Boletim informativo, Influenza (gripe) – Semana Epidemiológica (SE) 52/2012, foram coletadas 9.777 amostras respiratórias, sendo 1.391 (14,2%) positivas para o painel de vírus respiratórios. Nesse ano, observou-se aumento na circulação do vírus influenza A por volta da SE 22/2012, com pico de casos na SE 25/2012. Desde então, observou-se redução do total de casos positivos para o vírus influenza A e destaque especial para a circulação do VRS.



Disponível: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defhttm.exe?sih/cnv/nrsp.def>

Figura 8. Frequência de internações por influenza e pneumonia na rede hospitalar do SUS, segundo mês e ano, ESP, 2008 – Novembro de 2012

A faixa etária com a maior proporção de amostras positivas foi a de crianças de até quatro anos. Nesse grupo de idade foram coletadas 3.603 amostras, das quais 668 (18,5%) foram positivas para o vírus influenza ou outros vírus respiratórios. O VRS apresentou maior percentual de positividade, nessa faixa etária, com 54,5% (364/668) das amostras positivas.

Entre os indivíduos das demais faixas etárias foi observada maior positividade para o vírus influenza A: 35,9% (55/153) dos casos entre 5 e 14 anos; 44,5% (77/173) entre 15 e 24 anos; 37,7% (125/332) entre 25 e 59 anos; e 34,4% (21/61) dos casos de 60 anos ou mais.

No Estado de São Paulo

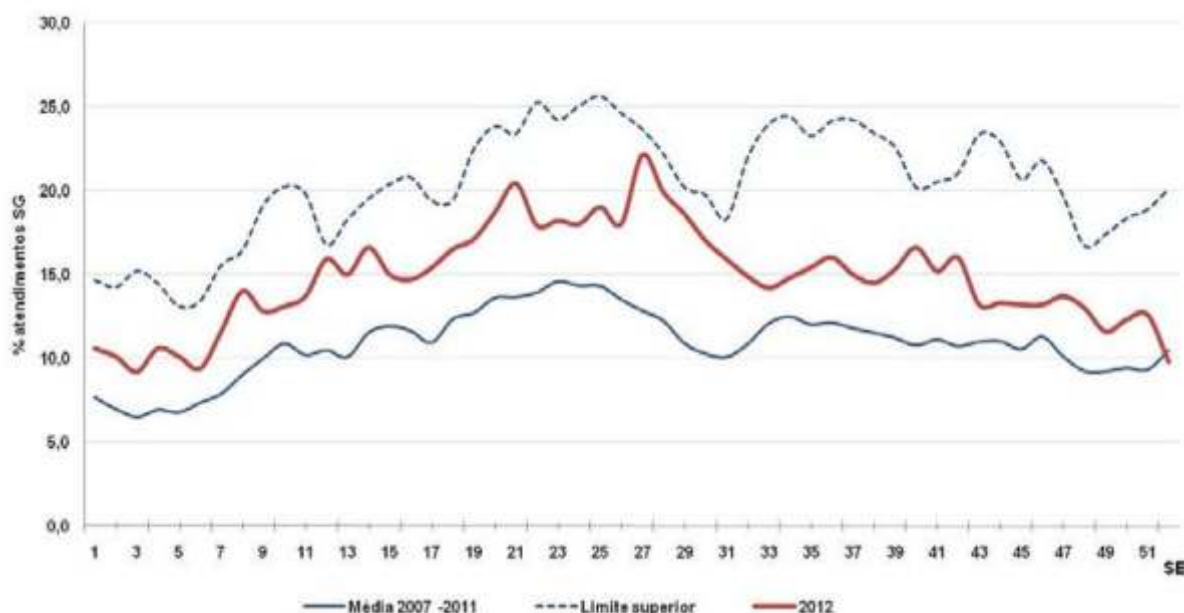
O Estado de São Paulo conta, atualmente, com 10 unidades sentinela ativas para a vigilância da influenza, estrategicamente distribuídas na Grande São Paulo e Interior,

sendo a meta estadual a coleta de 50 amostras biológicas por SE.

De acordo com os dados disponíveis no Sivep-Gripe, em 2012, observou-se aumento progressivo da proporção de atendimento de casos de SG em relação ao atendimento por clínica médica e pediatria até SE 27, com declínio posterior, como ilustra o diagrama de controle (Figura 9).

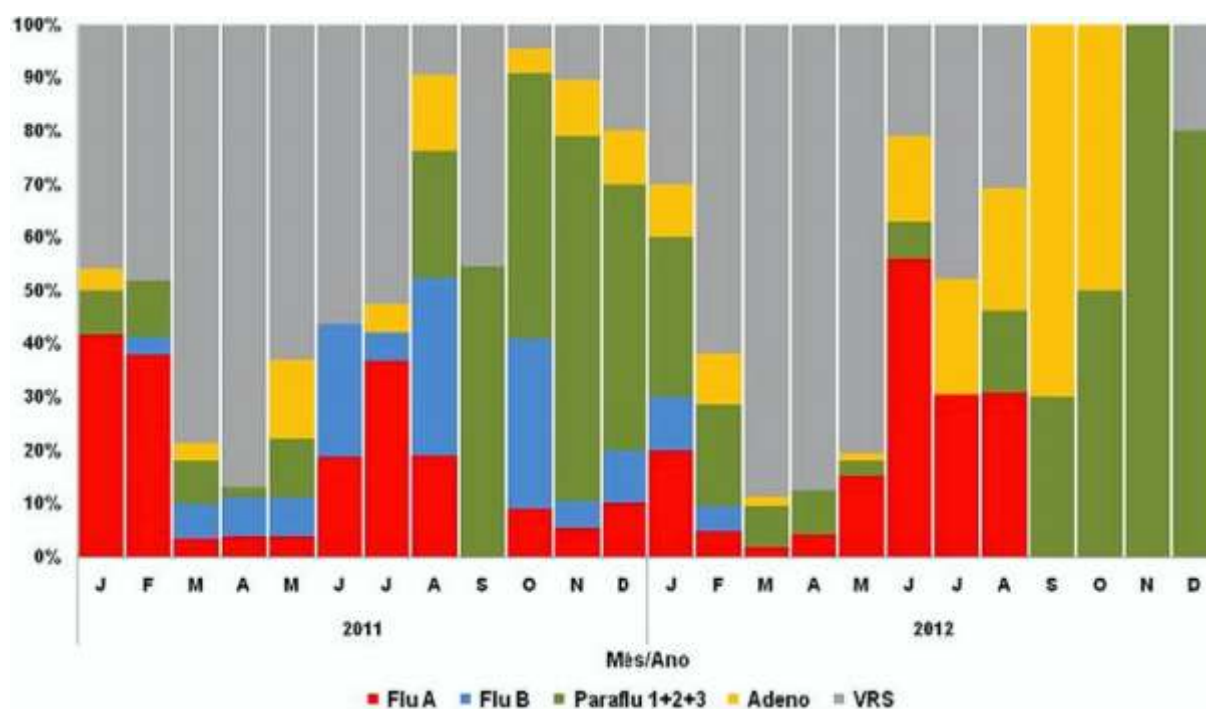
Até a SE 52/2012, foram processadas 2.083 amostras respiratórias, sendo 316 (15,2%) positivas para o painel de vírus respiratórios. Houve predomínio do VRS (59,5%), seguido dos vírus influenza A (16,5%), parainfluenza (13,3%), adenovírus (10,1%) e influenza B (0,6%), conforme demonstrado na Figura 10.

De acordo com os dados registrados no Sivep-Gripe em 2012, observou-se a cocirculação dos vírus influenza A, influenza B, parainfluenza, adenovírus, com predomínio do VRS de fevereiro a maio, porém de setembro a dezembro houve aumento na detecção dos vírus parainfluenza.



Fonte: Sivep-Gripe/SVS/MS, SE 5/2013, sujeito a alteração.

Figura 9. Proporção de atendimentos de síndrome gripal (SG) em relação ao total de atendimentos de clínica médica/pediatria nas unidades sentinela, ESP, 2007 a 2012



Fonte: Sivep-Gripe/SVS/MS, SE 5/2013, sujeito a alteração

Figura 10. Proporção de vírus respiratórios identificados em amostras clínicas de Unidades Sentinela de Influenza segundo o mês/ano, Estado de São Paulo, 2011 e 2012

O Núcleo de Doenças Respiratórias (NDR) do IAL fornece atualizações mensais sobre os vírus identificados na IFI e submetidos à técnica de RT-PCR. Em 2012, dentre as 156 amostras positivas para o vírus influenza (RT-PCR), foram identificadas: 63,47% para o vírus influenza A (H3), 21,80% para o vírus influenza A (H1N1) 09pdm, 12,17% vírus influenza A não subtipado e 2,56% para o vírus influenza B. (Fonte: IAL Central/Virologia).

Na temporada 2012, as cepas mais prevalentes no ESP, caracterizadas pelo Núcleo de Doenças Respiratórias do Centro de Virologia/IAL, participante da Rede Nacional de Vigilância da Influenza e da GISN, foram:

- A/California/07/2009-Like (H1N1)pdm09;
- A/Perth/16/2009 (H3N2);
- B/Victoria/02/87.

Campanha de vacinação

Durante a campanha de vacinação contra a influenza, em 2012, foram vacinadas 5.582.293 pessoas. A cobertura vacinal (CV), de acordo com o grupo populacional vacinado, está demonstrada na tabela 3.

A OMS reúne anualmente consultores técnicos, em fevereiro e setembro, com o objetivo de recomendar a inclusão dos vírus predominantes na vacina anual, respectivamente, nos hemisférios norte e sul. No período de abril a setembro de 2012, as cepas mais prevalentes no hemisfério sul, contempladas na recomendação da vacina trivalente da temporada 2013, foram:

- A/California/07/2009-Like (H1N1) pdm09;
- A/Victoria/361/2011-Like (H3N2);
- B/Wisconsin/1/2010-Like.

Tabela 3. Distribuição da cobertura vacinal na Campanha Nacional de Vacinação contra a Influenza, segundo grupo populacional, ESP, 2011-2012

População	CV(%) 2011	CV(%) 2012
Crianças	87,5	94,74
Trabalhadores da saúde	84,2	94,76
Gestantes	59,9	82,24
Indígenas	80,2	118,55
Idosos	80,3	77,49
Total	79,9	81,77

Fonte: PNI - Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações, até SE 5/2013, sujeito a alteração. Disponível em: http://pni.datasus.gov.br/consulta_influenza_12_selecao.asp?naofechar=N&enviar=ok&grupo=todos&fixa=todos&sel=coberturas

A Campanha de Vacinação de 2013 está prevista para o período de 15 a 26 de abril, contemplando os grupos populacionais descritos acima, os pacientes portadores de doenças crônicas, a população privada de liberdade e a inclusão das puérperas.

Recomendações gerais

As recomendações de alerta e medidas de prevenção individual (lavagem frequente das mãos, uso de lenços descartáveis ao tossir e espirrar etc.) e ambiental (ambientes ventilados e limpos) devem ser mantidas e fortalecidas, além da atenção especial com crianças, gestantes e puérperas, portadores de doenças crônicas (cardiopatias, síndromes metabólicas, pneumopatias, em especial asma brônquica, nefropatias etc.) e idosos.

Ao surgirem sinais e sintomas de influenza (gripe) ou resfriado, como febre, tosse e dor de garganta, as pessoas não devem tomar remédios por conta própria, uma vez que os sintomas podem ser mascarados, dificultando o diagnóstico. Dessa forma, recomenda-se que o paciente procure o serviço de saúde mais próximo para

assistência médica, esclarecimento diagnóstico e tratamento adequado.

Recomenda-se fortemente que todos os serviços de saúde em nível estadual e municipal alertem seus principais equipamentos públicos e privados para que os profissionais de saúde continuem a priorizar:

- a) a detecção precoce e o monitoramento de eventos incomuns;
- b) a investigação de casos graves individuais ou em situações de surto;
- c) o monitoramento das infecções respiratórias agudas e os vírus circulantes;
- d) a manutenção e atualização frequente dos fluxos de distribuição de medicamentos e dos sistemas de informações Sivep-GripeSinan, Net Surto etc.;
- e) monitorar os grupos de risco aumentado para desenvolvimento de doenças graves;
- f) monitorar as coberturas vacinais e a homogeneidade (vacina contra influenza, notadamente nos grupos de risco, no sentido de fortalecer as ações de vigilância e imunização;

- g) a indicação e utilização do Oseltamivir de forma adequada e o mais precoce possível, em conformidade com o protocolo vigente do MS;
- h) atentar para mudanças do padrão antigênico e genético dos vírus circulantes, como também para o aparecimento de resistência antiviral;
- i) estimular as boas práticas de etiqueta respiratória;
- j) efetivar e fortalecer parcerias.

REFERÊNCIAS UTILIZADAS E RECOMENDADAS

1. Situação epidemiológica da influenza pandêmica (H1N1) 2009 no mundo e no Brasil, até a semana epidemiológica 47 de 2009. Informe epidemiológico Influenza Pandêmica (H1N1) [periódico na internet]. 2009 [acesso em maio 2011];1(11):1-11. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza_se_47.pdf (acesso em maio de 2011).
2. World Health Organization. Media Centre: H1N1 in post-pandemic period. [acesso em dez 2010]. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/index.html
3. World Health Organization, Global Influenza Programme. Influenza update – 30 December 2010 [acesso em jan. 2011]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2010_12_30_GIP_surveillance/en/
4. World Health Organization, Global Influenza Programme. Influenza update – 20 May 2011. [acesso em abril de 2011]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2011_05_20_GIP_surveillance/en/
5. Regional Update EW 15, 2013: influenza and other respiratory viruses. PAHO; 23 abr. 2013 [acesso em abril de 2013]. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=21252&Itemid=
6. Secretaria da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica “Alexandre Vranjac”. Informe Técnico: campanha nacional de vacinação contra Influenza 2011 – “vacinação para quem precisa de mais proteção. Um direito seu assegurado pelo SUS”. São Paulo: CVE; 2011 [acesso em maio 2011]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/imuni/pdf/IF11_INFLUENZA_VAC.pdf
7. World Health Organization, Global Influenza Programme. Influenza update – 03 Jun 2011. [acesso em junho de 2011]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2011_06_03_GIP_surveillance/en/
8. World Health Organization, Global Alert and Response. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO – 03 Jun 2011. [acesso em junho de 2011]. Disponível em: http://www.who.int/csr/don/2011_06_03/en/index.html
9. World Health Organization, Global Influenza Programme. Influenza update – 29 Jul 2011. [acesso em jul. 2011]. Disponível em: www.who.int/entity/influenza/surveillance_monitoring/updates/2011_07_29_GIP_surveillance/en/

10. World Health Organization, Global Influenza Programme. Influenza update – 12 Ago 2011. [acesso em ago. 2011]. Disponível em: http://www.who.int/entity/influenza/surveillance_monitoring/updates/2011_08_12_GIP_surveillance/en/index.html
11. World Health Organization, Global Influenza Programme. Influenza update – 07 Out 2011. [acesso em out. 2011]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2011_10_07_GIP_surveillance/en/index.html
12. World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2012 southern hemisphere influenza season [documento na internet]; 29 set 2011. [acesso em out. 2011]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2011_09_recommendation.pdf
13. World Health Organization. Standardization of terminology for the variant A (H3N2) virus recently infecting humans – joint announcement of FAO, OIE and WHO; 23 dez. 2011. [acesso em dez. 2011]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/terminology_ah3n2v/en/index.html
14. World Health Organization, Global Influenza Programme. Influenza update – 06 Jan 2012. [acesso em jan. 2012]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2012_01_06_GIP_surveillance/en/index.html
15. Bulletin of the World Health Organization. Washington, DC: World Health Organization; 2012;90(4) [acesso em abr. 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/influenza/resources/publications/Bulletin/en/index.html>
16. World Health Organization, Global Influenza Programme. Influenza update – 27 Apr 2012. [acesso em maio 2012]. Disponível em: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2012_04_27_update_GIP_surveillance/en/index.html
17. Silva Junior JB da, Henriques CMP, Verotti MP, Martins JRP, Carvalho ML de, Rosa FM et al. Informe técnico de influenza: vigilância da síndrome respiratória aguda grave (SRAG), de síndrome gripal (SG) e de internações por CID J09 a J18. Brasília: SVS; 2012 [acesso em jan. 2012]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/info_tecn_influenza_31_01_2012_28novo_29.pdf
18. Secretaria da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica “Alexandre Vranjac”. Informe técnico: campanha nacional de vacinação contra influenza 2012 – “Proteger é cuidar. Vacinação contra gripe de 5 a 25 de maio”. São Paulo: CVE; 2012 [acesso em maio 2012]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/imuni/pdf/IF12_VAC_INFLUENZA.pdf
19. Boletim Informativo – Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. Influenza Semana Epidemiológica (SE) 26 (30/6/2012). Disponível em: Acesso em 11 de julho de 2012. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=40503

Correspondência/Correspondence to:
 Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória
 Av. Dr. Arnaldo, 351 – 6º andar
 CEP: 01246-000 – Pacaembu
 Tel: 55 11 3066-8757
 E-mail: dvresp@saude.sp.gov.br

Avaliação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Stenotrophomonas maltophilia*, Complexo *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia gladioli* e *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* obtidos de amostras respiratórias de pacientes portadores de Fibrose Cística

Renata Gusson Agelune Martins; Doroti de Oliveira Garcia (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – 2011

Fibrose Cística (FC) é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no canal de cloreto CFTR e caracterizada por uma extensa gama de sinais e sintomas clínicos. Devido a alterações na composição eletrolítica da camada de líquido periciliar, uma série de fatores convergem para o estabelecimento de infecção e inflamação pulmonar crônicas. *Stenotrophomonas maltophilia* (SM), Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), *Burkholderia gladioli* (Bg) e *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (Ax) são bacilos Gram-negativos não fermentadores, frequentemente isolados de culturas de amostras respiratórias de pacientes com Fibrose Cística e intrinsecamente resistentes a diversas classes de antimicrobianos. O presente estudo buscou avaliar o perfil de sensibilidade desses microrganismos, isolados de amostras respiratórias de pacientes fibrocísticos atendidos no Instituto da Criança do HC-FMUSP. Um total de 781 amostras foram obtidas entre junho de 2003 a junho de 2004 e setembro de 2006 a setembro de 2007. Desse total, foram isoladas 57 cepas (7,3%) de SM (23 no primeiro período e 34 no segundo); 34 cepas (4,4%) de CBc (22 no primeiro período e 12 no segundo); 8 cepas (1%) de Bg (5 no primeiro período e 3 no segundo) e 23 (2,9%) de Ax (17 no primeiro período e 6 no segundo). Os isolados foram submetidos ao teste de disco-difusão (DD) frente a 22 antimicrobianos. A verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método da diluição em ágar e teste epsilométrico. Pesquisou-se, fenotipicamente, a produção de beta-lactamases do tipo Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL) e Metallo-Beta-Lactamase (MBL). Minociclina foi a droga mais ativa, inibindo 100% das cepas estudadas. Sulfametoxazol-trimetoprim ainda apresenta um bom desempenho contra SM, porém, verificou-se resistência de 10,5%. Levofloxacina inibiu 96% das cepas de SM. Piperacilina-tazobactam foi ativa contra 100% das cepas do gênero *Burkholderia* e Ax. Notaram-se diferenças importantes entre CBc e Bg. O primeiro, intrinsecamente resistente aos aminoglicosídeos, e a segunda, 100% sensível à tobramicina. Observaram-se, também, diferenças entre os membros do CBc: *B. multivorans* apresentou 100% de resistência ao imipenem, enquanto *B. vietnamiensis* foi sensível a essa droga. Ao se comparar os resultados obtidos pela CIM e DD, observou-se uma grande discrepância entre as duas técnicas, para a maioria das drogas testadas. Não foi evidenciada a produção de ESBLs e MBLs. Foram observadas variações do fenótipo de resistência em cepas isogênicas isoladas de pacientes cronicamente colonizados/infetados pelas diferentes espécies avaliadas. O aparecimento de cepas resistentes aos poucos antimicrobianos disponíveis para uso clínico ainda eficazes reforça a necessidade de um contínuo monitoramento dos padrões de sensibilidade desse grupo específico de microrganismos colonizantes/infetantes do trato respiratório de pacientes portadores de FC.

PALAVRAS-CHAVE: *Stenotrophomonas maltophilia*. Complexo *Burkholderia cepacia*. *Burkholderia gladioli*. *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*. Testes de sensibilidade microbiana. Fibrose cística.

Evaluation of antibiotic susceptibility of Stenotrophomonas maltophilia, Burkholderia cepacia complex, Burkholderia gladioli and Achromobacter xylosoxidans subsp. xylosoxidans recovered from respiratory samples from cystic fibrosis patients

Renata Gusson Agelune Martins; Doroti de Oliveira Garcia (orientadora)

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – 2011

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the CFTR chloride channel and characterized by a broad range of clinical signals and symptoms. As a consequence of electrolytical imbalance in the periciliary liquid layer a series of factors converge to the onset of chronic bacterial infection and concomitant airway inflammation. *Stenotrophomonas maltophilia* (Sm), *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), *Burkholderia gladioli* (Bg) and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (Ax) are non-fermentative gram-negative bacilli frequently recovered from respiratory tract samples of Cf patients and intrinsically resistant to diverse antimicrobial agents. The aim of the present study was to evaluate the susceptibility profiles of these microorganisms recovered from respiratory samples of CF patients attending the Pediatric Pulmonology Unit of the Instituto da Criança, University of São Paulo Medical School. A total of 781 samples were obtained from June 2003 to June 2004 and September 2006 to September 2007. From this total, 57 Sm isolates (7.3%) (6/2003–6/2004 = 23; 9/2006–9/2007 = 34); 34 Bcc isolates (4.4%) (6/2003-06/2004 = 22; 9/2006-9/2007 = 12); 8 Bg isolates (1%) (6/2003-6/2004 = 5; 9/2006–9/2007 = 3) and 23 Ax isolates (6/2003-6/2004 = 17; 9/2006–9/2007 = 6) were obtained. The isolates were tested for 22 antimicrobial agents using disk diffusion (DD) method. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was carried out using agar dilution and epsilometer test techniques. Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and Metallo- β -lactamases (MBLs) were phenotypically searched using double-disk diffusion method. Minocycline was the most effective drug, inhibiting 100% of the isolates. Sulphamethoxazole-trimethoprim still showed a good effect against Sm, however 10.5% of the isolates presented resistance. Levofloxacin inhibited 96% of Sm isolates. Piperacillin-tazobactm inhibited 100% of Bcc, Bg and Ax isolates. Important differences between Bcc and Bg were found. The first, intrinsically resistant to aminoglycosides, the last, 100% susceptible to tobramycin. *Burkholderia multivorans* isolates were 100% resistant to imipenem while *Burkholderia vietnamiensis* was susceptible. Discrepancies were noticed between the results obtained by CIM and DD techniques. ESBLs and MBLs were not phenotypically evidenced. Isogenic isolates obtained from chronically colonized/infected patients showed phenotypical differences in the susceptibility profile for all the different species surveyed. The resistance rates found for the few antimicrobial agents still effective on this important group of microorganisms colonizing/infecting CF patients, reinforce the need for a continuous *in vitro* monitoring of susceptibility profiles.

KEYWORDS: *Stenotrophomonas maltophilia*. *Burkholderia cepacia* Complex. *Burkholderia gladioli*. *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*. Antimicrobial susceptibility testing. Cystic fibrosis.

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 às ações de vigilância em saúde, de maneira rápida e precisa, estabelecendo um canal de comunicação entre as diversas áreas 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; resumo de até 150 palavras; entre três e seis palavras-chave; quatro ilustrações (tabelas, figuras, gráficos e fotos); e 10 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. 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 encaminhado 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 131,
 Pacaembu – São Paulo/SP – Brasil
 CEP: 01246-000
 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.
- **Resultados** – 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.¹ Dentre as diversas medidas

tomadas pelo Ministério da Saúde (MS)² 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 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 research 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
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

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.

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 aos Autores atualizada em janeiro de 2013

Instruções na íntegra no site da CCD:
<http://www.ccd.saude.sp.gov.br>



Acesse a versão eletrônica em:
www.ccd.saude.sp.gov.br

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

