

## Triquinelíase: estudo de uma população humana potencialmente exposta à infeção em Portugal, 2023-2024

*Trichinellosis: study of a human population potentially exposed to infection in Portugal, 2023-2024*

Kateryna Zhygachova<sup>1</sup>, Idalina Ferreira<sup>2</sup>, Susana Martins<sup>2</sup>, Anabela Vilares<sup>2</sup>, Tânia Reis<sup>2</sup>, Maria João Gargaté<sup>2</sup>

m.joao.gargate@insa.min-saude.pt

(1) Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

(2) Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

A triquinelíase é uma zoonose parasitária de origem alimentar causada por nemátodos do género *Trichinella*, frequentemente transmitida através do consumo de carne curada, mal cozinhada ou inadequadamente congelada contendo larvas infetantes. Esta doença tem um impacto significativo na saúde pública e constitui um desafio global no âmbito da segurança alimentar, tendo sido detetada em animais silvestres de 66 países. Em Portugal, a triquinelíase é uma doença de declaração obrigatória, não havendo registo de qualquer caso humano desde 1987. Esta ausência contrasta com a situação observada em países vizinhos, como Espanha, que partilha práticas alimentares e perfis epidemiológicos semelhantes ao nosso país.

Este estudo tem como objetivo avaliar a presença de anticorpos do tipo imunoglobulina G (IgG) anti-*Trichinella* spp. em 200 indivíduos potencialmente expostos ao consumo de carne mal cozinhada ou não inspecionada. A deteção foi realizada através do ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), sendo os resultados positivos ou equívocos posteriormente confirmados por imunoblot. Dos 200 indivíduos em estudo foi confirmado um caso positivo, resultando numa seroprevalência de 0,5%. Além disso, o caso confirmado apresentou reatividade específica para os antígenos de *Toxocara* sp., sugerindo uma possível reatividade cruzada ou co- infeção.

A baixa seroprevalência de anticorpos contra *Trichinella spiralis* observada na população estudada, sugere que a triquinelíase humana é rara em Portugal. No entanto, existe a possibilidade de um subdiagnóstico e consequente subnotificação o que, por si só, reforça a importância de vigilância ativa e continuada das zoonoses parasitárias.

### \_Abstract

*Trichinellosis is a foodborne parasitic zoonosis caused by nematodes of the genus Trichinella, often transmitted through the consumption of cured, undercooked or inadequately frozen meat containing infective larvae. This disease has a significant impact on public health and poses a global challenge to food safety, it has been detected in wild animals in 66 countries. In Portugal, trichinellosis is a notifiable disease and no human cases have been reported since 1987. This contrasts with the situation in neighbouring countries such as Spain, which has similar food practices and epidemiological profiles to our country.*

*The aim of this study is to assess the presence of immunoglobulin G (IgG) antibodies against Trichinella spp. in 200 individuals potentially exposed to the consumption of undercooked or uninspected meat. Detection was performed using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), with positive or equivocal results subsequently confirmed by immunoblot.*

*Of the 200 individuals in the study, one positive case was confirmed, resulting in a seroprevalence of 0.5%. Additionally, the confirmed case exhibited specific reactivity to *Toxocara* sp. antigens, indicating potential cross-reactivity or a co infection.*

*The low seroprevalence of antibodies against *Trichinella spiralis* in the studied population suggests that human trichinellosis is rare in Portugal. However, underdiagnosis and underreporting are possible, which highlights the importance of actively and continuously surveilling parasitic zoonoses.*

### \_Introdução

A triquinelíase é uma zoonose parasitária de transmissão alimentar causada por nemátodos do género *Trichinella*. A infeção humana ocorre, principalmente, através da ingestão de carne fumada, mal cozinhada ou inadequadamente congelada, contaminada com larvas do parasita. Esta zoonose representa um problema relevante de saúde pública e um desafio contínuo para a segurança alimentar (1).

De acordo com o Despacho n.º 1150/2021, de 28 de janeiro - Doenças de notificação obrigatória a notificar na plataforma de apoio ao SINAVE (Direção-Geral da Saúde), a triquinelíase é uma doença de notificação obrigatória em Portugal, devendo o seu diagnóstico laboratorial ser confirmado no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

### Taxonomia e diversidade de espécies de *Trichinella*

O género *Trichinella* compreende 13 táxons, incluindo dez espécies identificadas e três genótipos não nomeados (*Trichinella* T6, T8 e T9). As espécies de *Trichinella* são classificadas em dois clades, consoante as larvas na fase muscular apresentem ou não cápsula de colagénio (2). O clade das não encapsuladas inclui três espécies que infetam principalmente mamíferos: *T. pseudospiralis*, que também infeta aves, enquanto *T. papuae* e *T. zimbabwensis*

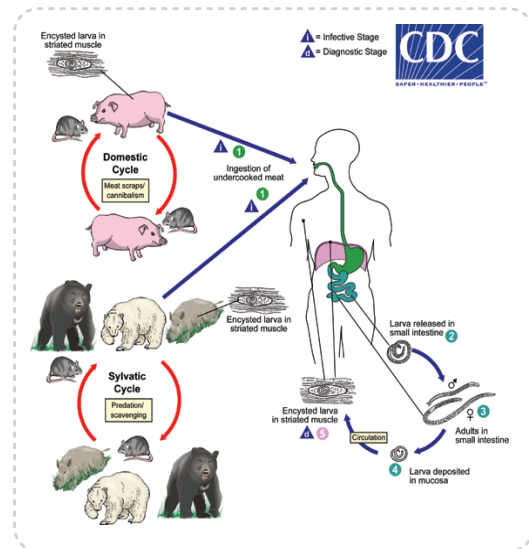
são conhecidos por infetar répteis. Em contraste, o clade encapsulado infeta exclusivamente mamíferos e é composto por sete espécies: *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa*, *T. murrelli*, *T. patagoniensis*, *T. nelsoni* e *T. chanchalensis* (3). Na Europa, foram identificadas quatro destas espécies: *T. spiralis*, prevalente em suínos domésticos e selvagens; *T. britovi*; *T. nativa*, presente em carnívoros de regiões árticas e subárticas e *T. pseudospiralis* (4).

### Ciclo de vida e resposta imunitária do hospedeiro

Existem dois ciclos de vida para *Trichinella*: o ciclo doméstico e o ciclo silvático, ambos ocorrem dentro de um único hospedeiro. No ciclo doméstico, animais como porcos ou cavalos infetam-se ao ingerirem carcaças de roedores infetados, restos de alimentos mal cozinhados ou através de canibalismo. O ciclo silvático envolve principalmente animais predadores que consomem presas infetadas (5). Após a ingestão de tecido muscular infetado, este é digerido no estômago, libertando as larvas. Estas larvas invadem a mucosa do intestino delgado, onde ocorre o seu desenvolvimento em vermes adultos num prazo de 48 horas. Uma vez maduras, as larvas macho e fêmea acasalam. Cerca de uma semana após a infeção, inicia-se a fase muscular. Nesta fase, as larvas recém-nascidas migram pelos vasos linfáticos e sanguíneos até aos músculos estriados, onde penetram ativamente nas células musculares (6). Durante a migração, as larvas podem alcançar vários tecidos ou cavidades do corpo, provocando lesões agudas e inflamação. No entanto, o seu desenvolvimento só prossegue nas células do músculo estriado (7). Após a invasão, as larvas induzem a reorganização das células. Substâncias químicas libertadas pelas larvas fazem com que as células invadidas percam a sua especialização, adquirindo um estado menos diferenciado. Estas células transformadas tornam-se células “Nurse”, que fornecem nutrientes às larvas e apresentam taxas elevadas de proliferação. Durante esta transformação, as células musculares infetadas perdem a estriação característica e a organização interna. Após a desdiferenciação, as células satélites circundantes do tecido muscular são ativadas. No entanto, sem os sinais adequados das células musculares afetadas, estas células de suporte não se desenvolvem em novas fibras musculares.

Em vez disso, também se tornam células “Nurse”, podendo fundir-se e formar estruturas maiores, incluindo uma célula “Nurse” central (6,8). Após algum tempo, que pode variar de semanas a anos, ocorre a calcificação (figura 1).

Figura 1: Ciclo de vida de *Trichinella* spp.



Ingestão de carne mal cozinhada infetada com larvas de *Trichinella* (1). No estômago, as larvas são libertadas dos quistos e penetram no intestino delgado, onde amadurecem em larvas adultas (2,3). Após uma semana, as fêmeas produzem larvas que migram para os músculos estriados, onde se enquistam (exceto *T. pseudospiralis*, *T. papuae* e *T. zimbabwensis*, que não formam quistos) (5).

Durante a infeção por *Trichinella*, o sistema imunitário é ativado e modulado por várias moléculas produzidas pelo parasita. Estas moléculas encontram-se na cutícula da larva ou nos seus produtos de excreção-secreção (ES) (9). As células epiteliais, especialmente um grupo de células quimiossensoriais denominadas células “tuft”, são ativadas em resposta a antígenos helmínticos ou a sinais de lesão tecidual em áreas adjacentes. Uma vez ativadas, estas células segregam citocinas como IL-25, IL-33 e TSLP (linfopoietina estromal tímica). Estas, por sua vez, ativam células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2s), que libertam várias citocinas do tipo 2, incluindo IL-5 e IL-13 (10). Durante a resposta imunitária, são produzidas várias subclasses de anticorpos, como IgE, IgG1 e IgG4. Além disso, diferentes células imunitárias são recrutadas e ativadas, como basófilos, eosinófilos, células T auxiliares, fibroblastos, macrófagos e mastócitos. A interação entre estas células e os anticorpos desencadeia reações de hipersensibilidade

caracterizadas por aumento da permeabilidade vascular, angiogénese, hipercontratilidade do músculo liso, deposição de colagénio e aumento da secreção de muco pelas células caliciformes (10). Processos imunitários semelhantes ocorrem no músculo esquelético, onde a imunidade mediada por células Th2 desempenha um papel central. Embora o hospedeiro consiga, muitas vezes, eliminar os vermes adultos do intestino, as larvas de *Trichinella* podem persistir no tecido muscular, residindo num ambiente intracelular único que permite a sua sobrevivência a longo prazo (8).

### Manifestações clínicas

A triquinelíase pode ser uma infeção assintomática ou apresentar manifestações clínicas graves dependendo do número de larvas ingeridas. O diagnóstico baseia-se em três critérios principais: observação clínica, resultados laboratoriais e informação epidemiológica (11). Durante a fase intestinal da infeção, os sintomas mais comuns incluem náuseas e perturbações gastrointestinais, como vómitos e diarreia. Cerca de uma semana mais tarde, com a progressão da infeção para a fase muscular do ciclo de vida do parasita, podem surgir sintomas adicionais: febre, dores musculares, edema facial, conjuntivite, eosinofilia periférica (até 70% dos leucócitos), e hemorragias subconjuntivais, subungueais ou na retina. Em casos raros, podem ocorrer complicações potencialmente fatais, como miocardite, envolvimento do sistema nervoso central ou pneumonite. Quando as larvas enquistam nos músculos, pode observar-se mialgia e fraqueza muscular, seguidas de uma redução gradual dos sintomas (5,12).

### Ciclo de vida e resposta imunitária do hospedeiro

O diagnóstico laboratorial desempenha um papel crucial na confirmação da triquinelíase. Embora a suspeita inicial se baseie nos sintomas clínicos, no historial clínico do paciente e na presença de eosinofilia, a confirmação requer testes diagnósticos específicos como, deteção de anticorpos ou observação por microscopia de larvas numa biópsia muscular ou testes de biologia molecular também em biópsias musculares (5).

Métodos diretos, como a microscopia, fornecem evidência definitiva ao identificar larvas de *Trichinella* spp. em amostras de

tecido. Métodos indiretos detetam anticorpos, principalmente IgG, contra espécies de *Trichinella* no sangue do paciente. Entre estes, os ensaios imunoenzimáticos (EIA) são amplamente utilizados devido à sua sensibilidade e capacidade de deteção precoce de anticorpos, superando métodos tradicionais como o teste de floculação com bentonite, que apenas deteta infeções agudas em 25% dos casos. Os EIA utilizam extratos antigénicos brutos de larvas musculares de *T. spiralis* ou antigénios excretórios-secretórios (ES) refinados obtidos de larvas cultivadas. O grupo antigénico TSL-1, conservado em todas as espécies de *Trichinella*, permite a deteção independentemente do isolado infetante (13).

Nos humanos, a seroconversão ocorre geralmente entre três a cinco semanas após a infeção, frequentemente após o aparecimento de sintomas agudos (14). O desenvolvimento de anticorpos depende da dose infetante de larvas; maiores quantidades ingeridas levam, em geral, a uma resposta imunitária mais rápida (15). Se os testes iniciais forem negativos, recomenda-se a recolha de várias amostras de soro com semanas de intervalo para confirmar a seroconversão. Os testes para pesquisa de IgG são preferidos devido à sua elevada sensibilidade, sendo que os níveis de anticorpos atingem o pico entre dois a três meses após a infeção e permanecem detetáveis durante vários anos (13).

### Terapêutica

O tratamento precoce com medicamentos antiparasitários como o mebendazol ou o albendazol é crucial para prevenir a progressão da triquinelíase. Estes fármacos atuam sobre as larvas adultas, inibindo a libertação de larvas e reduzindo a gravidade da infeção. No entanto, uma vez que as larvas se estabelecem nas células musculares esqueléticas, geralmente entre 3 a 4 semanas após a infeção, o tratamento pode não eliminar completamente a infeção nem os sintomas associados (5). Em casos mais graves de triquinelíase, especialmente quando há inflamação significativa ou complicações como miocardite ou envolvimento do sistema nervoso central, podem ser prescritos corticosteroides (por exemplo, prednisona) juntamente com os antiparasitários. Os esteroides ajudam a reduzir a inflamação causada pela resposta imunitária às larvas enquistadas, aliviando sintomas como edema e dor muscular (16).

## Epidemiologia

Nos países com sistemas de saúde veterinária desenvolvidos, a ocorrência de casos humanos de triquinelíase devido ao consumo de carne de porco tem diminuído significativamente, devido a melhores medidas de biossegurança e ao aumento da testagem em suínos após o abate. Como resultado, os casos declarados de triquinelíase associados ao consumo de carne de animais selvagens tornaram-se a principal preocupação. Como a *Trichinella* spp. é mais prevalente na vida selvagem do que em animais domésticos, a erradicação deste parasita continua a ser extremamente difícil (11). Casos de *Trichinella* spp. foram notificados em todos os continentes, exceto na Antártida, ocorrendo em animais selvagens em 66 países e em humanos em 55 países (17) (figura 2).

A distribuição das espécies de *Trichinella* na Ásia e Oceânia é diversa, mas provavelmente subestimada devido à falta de estudos molecular confirmatórios. Na Coreia do Sul, foram reportados três casos de infeção humana, apesar de *T. spiralis* não ter sido identificada diretamente na fauna local. Na última década, *T. britovi* tornou-se cada vez mais comum, com relatórios recentes da Arménia que confirmam a sua presença em raposas, lobos, linceas, lontras-euroasiáticas e javalis (18). Na Tailândia, Austrália e Nova Zelândia, dois casos de infeção humana com *T. pseudospiralis* foram confirmados, sugerindo a sua presença endémica nestas regiões (19).

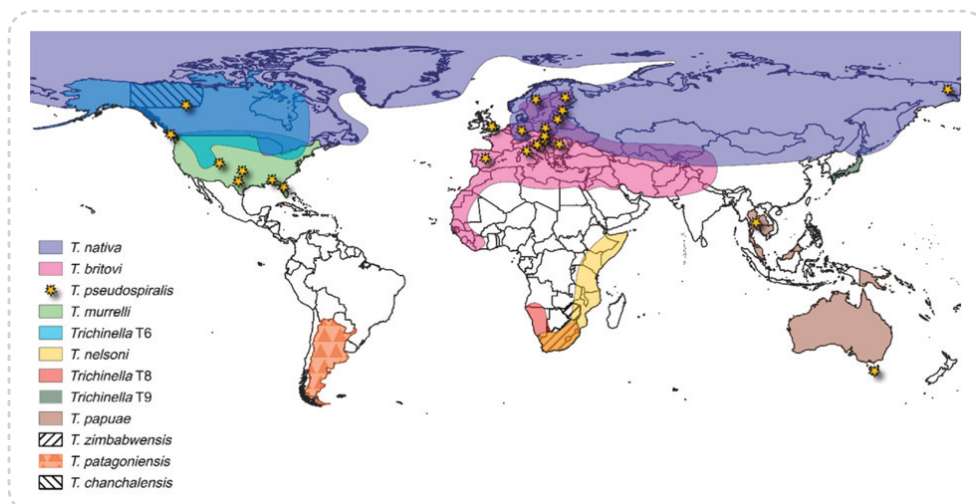
Na América do norte e do sul, a presença de *Trichinella* spp. varia consoante a região. Embora *T. spiralis* tenha sido quase erradicada dos suínos comerciais nos Estados Unidos

e no Canadá, persiste em alguns hospedeiros selvagens, como ursos e javalis. As infeções humanas por *T. spiralis* provenientes de fontes selvagens são raras, mas já foram documentadas em ambos os países (19). *T. nativa* está restrita às regiões do Norte, incluindo o Canadá, Alasca e Gronelândia. Em comunidades indígenas no norte da América do Norte, onde o consumo de carne selvagem é comum, observam-se ocasionalmente infeções humanas. Até ao momento, não há registo de infeções humanas causadas por *T. pseudospiralis* no Continente Americano, embora a sua presença em animais selvagens tenha sido documentada nos Estados Unidos (20) e no Canadá, possivelmente associada a aves migratórias (21).

Em comparação com outros continentes, África tem um número reduzido de relatos confirmados de espécies de *Trichinella* na fauna selvagem. Até ao momento, apenas *T. britovi* foi documentada na África Ocidental, não havendo confirmação de outras espécies de *Trichinella* na fauna da região (22). Acredita-se que *T. britovi* tenha chegado a África através da colonização de animais carnívoros provenientes da Europa e da Eurásia (23).

Na Europa, *T. spiralis* e *T. britovi* são as principais causas de triquinelíase, representando centenas de casos reportados anualmente. Estas espécies são frequentemente encontradas em javalis, um animal de grande importância para o consumo humano. Nas regiões norte e nordeste da Europa, *T. britovi* coexiste frequentemente com *T. nativa*, dando origem a infeções mistas, já documentadas em diversos estudos (24).

Figura 2: Distribuição geográfica das espécies de *Trichinella* (19).



*T. nativa* foi identificada em vários carnívoros terrestres, como raposas e ursos, e em mamíferos marinhos como a foca-cinzenta. Em 2005, ocorreu um surto de *T. nativa* em França, após a importação ilegal de carne de urso negro proveniente do Canadá (25). *T. pseudospiralis* foi detetada numa variedade de espécies selvagens, incluindo sete espécies de aves e oito espécies de mamíferos terrestres em 13 países europeus. Um surto humano de *T. pseudospiralis* em França, em 1999, esteve associado ao consumo de carne de javali mal cozinhada.

Segundo o Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças, em 2023, foram notificados 76 casos humanos de triquinelíase em 11 Estados-Membros da União Europeia, dos quais 68 foram confirmados como tendo sido adquiridos dentro da UE. Isto representa um aumento de 37 casos face a 2022. Mais de metade (53,9%) dos casos confirmados ocorreram na Roménia e em Espanha.

Segundo o Sistema Europeu de Vigilância TESSy, *Trichinella* foi identificada em três surtos alimentares declarados por Bulgária, Roménia e Espanha. O surto na Roménia foi confirmado como causado por *T. spiralis*, enquanto a causa do surto na Bulgária permaneceu desconhecida.

Na União Europeia, os suínos representam a maior categoria de gado consumido. Em 2023, cerca de 200 milhões de suínos foram testados para *Trichinella*, num total de mais de 220 milhões de porcos abatidos, segundo dados da Comissão Europeia. Destes, 46 animais testaram positivo, resultando numa frequência geral de 0,00002%. A Roménia reportou 43 casos positivos em porcos criados em quintas familiares, enquanto Espanha e Croácia reportaram dois e um caso positivo em porcos criados ao ar livre, respetivamente. Todos os casos positivos foram identificados em porcos criados fora de sistemas de alojamento controlado pelas autoridades sanitárias.

Em Espanha, a triquinelíase é uma doença endémica e de declaração obrigatória (26). As espécies *T. spiralis*, *T. pseudospiralis* e *T. britovi* estão envolvidas na epidemiologia do país e podem ser encontradas tanto em animais domésticos como selvagens (27). O primeiro caso de *T. pseudospiralis* foi reportado em janeiro de 2014, num javali caçado perto da fronteira com França, indicando a propagação desta espécie na Europa (28). Entre 2007 e 2010, Espanha apresentou uma

frequência de infeção por *Trichinella* em javalis superiores à média europeia (26). Relativamente à triquinelíase humana, foram registados surtos ocasionais (29), na sequência de estudos na região de Aragão (27). Estes surtos geralmente ocorrem durante as épocas de abate de porco doméstico e de caça ao javali, frequentemente ligados ao consumo de carne que não passou por controlo sanitário adequado (26).

### Ciclo de vida e resposta imunitária do hospedeiro

Em Portugal, o primeiro surto documentado de triquinelíase ocorreu no Sabugal, em 1881 (11). Relatos posteriores descreveram outro surto em Penamacor, em 1951 (30). Adicionalmente, um caso de triquinelíase em Alcobça foi registado em 1967 (31). O sistema nacional de vigilância reportou outro caso em 1987 (32).

Em 2014, foi realizado um estudo de seroprevalência pelo Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge numa população de 273 indivíduos consumidores de carne mal cozinhada, um grupo de residentes nos distritos de Évora e Portalegre e outro grupo de caçadores provenientes de vários pontos do país. Os resultados demonstraram que entre 4% a 5,5% dos participantes eram seropositivos para *T. spiralis*. Os autores sugeriram que a triquinelíase está presente em Portugal, mas está subdiagnosticada devido às suas manifestações clínicas não serem patognomónicas e subsequentemente subnotificada (33).

Em 2017, foi reportado mais um caso de triquinelíase, no entanto a investigação epidemiológica sugeriu que a infeção foi provavelmente adquirida no estrangeiro. O paciente tinha viajado para França, dois meses antes do aparecimento dos sintomas, onde consumiu uma refeição mal cozinhada de composição desconhecida. O doente negou ter comido carne mal passada ou ter tido contacto com animais de quinta enquanto esteve em Portugal, e indicou que nenhum familiar próximo apresentou sintomas semelhantes (11).

Em janeiro de 2020, foram realizadas análises a carne de javali para deteção de *Trichinella* spp., uma vez que, entre os animais de caça maior, o javali é a espécie mais frequentemente caçada em Portugal. Este estudo forneceu a primeira evidência molecular de infeção por *Trichinella britovi* num javali em território português (34).

## \_Objetivo

Em comparação com outros países, particularmente com Espanha, que apresenta padrões epidemiológicos e práticas alimentares semelhantes, a aparente ausência de casos registados de triquinelíase em Portugal levanta algumas questões. Para compreender esta discrepância, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a presença de anticorpos anti-*Trichinella* spp. em indivíduos expostos ao consumo de carne mal cozinhada e/ou não inspecionada, especialmente proveniente de javalis e porcos criados ao ar livre.

## \_Materiais e métodos

Foram analisadas duzentas amostras de soro de indivíduos que relataram o consumo de carne e produtos cárneos. Estas amostras foram analisadas pelo Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Estes indivíduos foram provenientes das cinco regiões de Portugal continental, ao longo de um período de dois anos (2023-2024).

Tratou-se de um estudo anónimo e não relacionável, pelo que não foi obtido consentimento informado dos participantes, uma vez que apenas estavam disponíveis para o laboratório informações relativas ao género e à idade. Este procedimento está em conformidade com a legislação portuguesa (Lei n.º 12/2005, de 26 de janeiro. DR n.º 18/2005, Série I-A de 2005-01-26).

### Teste ELISA

Todos os soros foram testados quanto à presença de anticorpos anti-*Trichinella*, imunoglobulina G (IgG), utilizando um kit ELISA comercial (*Trichinella spiralis* IgG ELISA, TECAN, Alemanha). O teste de ELISA indireto realizado neste estudo requer dois anticorpos: um anticorpo primário, presente em amostras positivas, que se liga ao antigénio do parasita, e um anticorpo secundário, ligado a uma enzima, que reconhece e se liga ao anticorpo primário (35). Inicialmente, as amostras foram adicionadas a placas de microtitulação revestidas com antigénios excretórios-secretórios (ES) específicos, derivados de larvas musculares de *T. spiralis*. As placas foram depois incubadas durante uma hora a 37°C, seguindo-se uma etapa de lavagem. Em seguida, foi adicionado um conjugado marcado com peroxidase de

rábano, que se liga aos anticorpos capturados, e as placas foram incubadas durante mais 30 minutos à temperatura ambiente. Foi depois adicionado o substrato para visualizar os complexos anticorpo - antigénio formados, com incubação durante 15 minutos. Foi realizada uma etapa de lavagem crucial antes da adição do substrato, com o objetivo de remover qualquer conjugado não ligado, evitando-se assim resultados falsos positivos. A reação colorimétrica entre a peroxidase de rábano (HRP) e o substrato tetrametilbenzidina (TMB) produz um produto de cor azul. Por fim, foi adicionado ácido sulfúrico para interromper a reação, resultando numa coloração final amarela. A absorvância foi lida a 450/620 nm utilizando um leitor de microplacas ELISA PR 4100 (BIO-RAD, EUA). A intensidade da cor do produto é proporcional à quantidade de anticorpos específicos presentes na amostra.

Para a interpretação do resultado, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Sample absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off value}}$$

As amostras foram consideradas positivas quando o valor resultante foi superior a 11 Unidades NovaTec (NTU). Amostras com valores inferiores a 9 unidades foram interpretadas como negativas, enquanto os resultados entre 9 e 11 unidades foram classificados como equívocos.

### Teste confirmatório: Immunoblot

De seguida, foi realizado um teste imunoblot comercial (*Trichinella* Es Western Blot IgG, LDBIO, Lyon, França) para confirmar os casos suspeitos (indeterminados e positivos) identificados pelo método ELISA. O kit comercial utilizado contém tiras de nitrocelulose revestidas com antigénios excretados e secretados por *T. spiralis*. Os antigénios foram separados por electroforese com base no peso molecular e, posteriormente, transferidos para membranas de nitrocelulose, i.e. um processo em que um campo elétrico impulsiona as proteínas com carga negativa do gel para a membrana de nitrocelulose com carga positiva. Cada amostra de soro foi incubada durante 90 minutos numa plataforma oscilante com uma tira, permitindo que os anticorpos específicos presentes na amostra se ligassem seletivamente aos antigénios. Após esta etapa, foi realizada uma lavagem. Em seguida, foi adicionado um anticorpo anti-IgG humano conjugado com fosfatase alcalina, que se associa aos anticorpos já ligados, com incubação durante uma hora. De seguida, as tiras foram incubadas durante

artigos breves\_ n. 8

uma hora. De seguida, as tiras foram incubadas durante mais uma hora com uma solução de substrato contendo tampão, cloreto de nitro azul de tetrazólio, 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato e um estabilizador. A reação entre os complexos anticorpos - antigénio e a solução de substrato resultou no aparecimento de bandas reveladoras de proteínas. As amostras foram consideradas positivas quando existe a presença simultânea de três bandas com pesos moleculares de 37, 41 e 50 kDa.

A amostra identificada como positiva através de imunoblot foi posteriormente avaliada quanto a reatividade cruzada também por imunoblot, contra quatro outros helmintas: *Toxocara* sp., *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* e *Schistosoma* sp.

**Análise estatística**

Para a análise descritiva dos dados demográficos, foram calculadas as frequências absolutas e relativas.

**\_Resultados**

Foram estudadas um total de duzentas amostras (200), colhidas entre 2023 e 2024, provenientes das cinco regiões de Portugal continental: Norte, Centro, Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo e Algarve. A maioria provinha da região Norte, representando 47% (94/200) do total de casos estudados. Seguiu-se a região de Lisboa e Vale do Tejo, com 38% (76 /200). As restantes amostras, que constituem cerca de 15%, foram distribuídas da seguinte forma: Região Centro 7%, Alentejo 2% e Algarve 5,5%. Relativamente a uma amostra não tivemos conhecimento da sua origem (tabela 1).

Tabela 1: Distribuição geográfica dos casos estudados por região.

Região	Número de amostras	Percentagem (%)
Norte	94	47,0
Centro	14	7,0
Lisboa e Vale do Tejo	76	38,0
Alentejo	4	2,0
Algarve	11	5,5

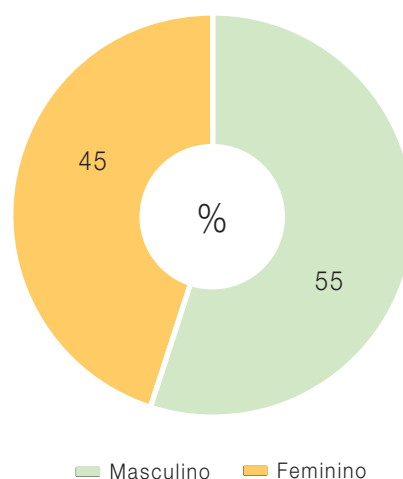
As idades dos indivíduos variaram entre 1 e 90 anos. Os pacientes foram categorizados em quatro grupos etários: crianças (1–12 anos), representando 4% do total de amostras; adolescentes (13–19 anos), com 3%; adultos (20–64 anos), que constituíram a maioria com 60,5% e idosos (65 anos ou mais), representando 32,5% (tabela 2).

Tabela 2: Distribuição dos casos estudados por grupo etário.

Idade	Número de amostras	Percentagem (%)
Crianças (1–12 anos)	8	4,0
Adolescentes (13–19 anos)	6	3,0
Adultos (20–64 anos)	121	60,5
Idosos (≥ 65 anos)	65	32,5

A distribuição por sexo foi equilibrada, com uma ligeira predominância de indivíduos do sexo masculino, que representaram 55% (110/200) do total estudado, enquanto o sexo feminino correspondeu a 45% (gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição dos casos estudados por sexo.



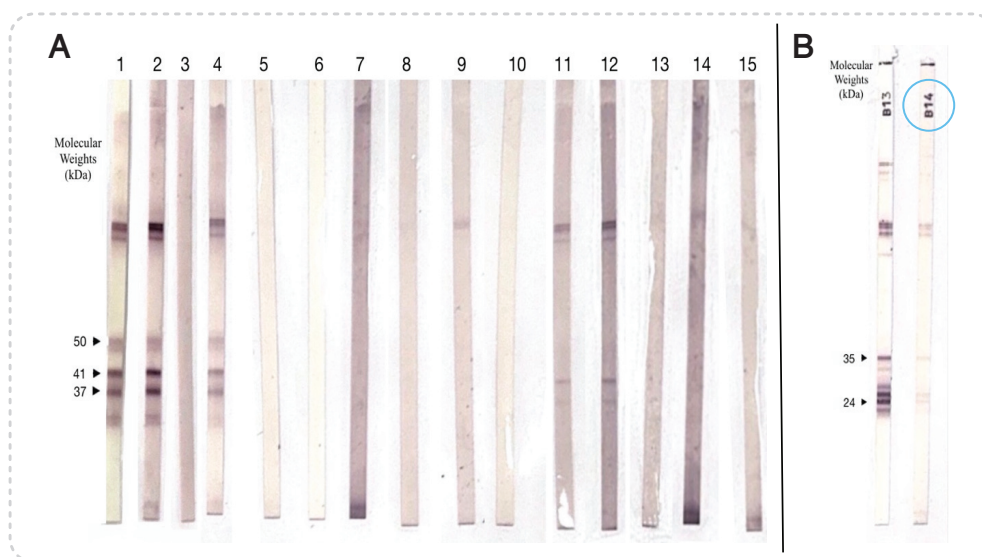
Das 200 amostras analisadas por ELISA, sete foram identificadas como positivas para *Trichinella spiralis*, (3,5%), com um valor médio de 20 NTU e seis amostras foram classificadas como indeterminadas (3%), com um valor médio de 9,5 NTU. As restantes 187 amostras foram negativas (93,5%), com um valor médio de 3,8 NTU.

Para confirmar os 7 casos positivos e os 6 casos indeterminados detetados por ELISA, foi realizada a análise por Immunoblot. Esta análise identificou apenas um caso positivo, resultando numa taxa de confirmação de 7,7%. A amostra

confirmada foi recolhida de uma paciente do sexo feminino, pertencente ao grupo etário dos idosos, residente na região de Lisboa e Vale do Tejo.

Adicionalmente, foi efetuado um teste de reatividade cruzada com quatro espécies de helmintas (*Toxocara* sp., *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* e *Schistosoma* sp.), tendo-se verificado reatividade específica apenas com os antígenos de *Toxocara* sp. na amostra positiva confirmada (figura 3).

Figura 3: Análise por imunoblot da reatividade de anticorpos contra antígenos de *Trichinella* (A) e *Toxocara* sp. (B).



(A) apresenta tiras de imunoblot revestidas com antígenos excretórios-secretórios de *T. spiralis*. Estas tiras foram processadas com amostras de soro classificadas como positivas ou equívocas com base nos resultados do ELISA. A tira 2 mostra uma amostra positiva, exibindo bandas específicas correspondentes aos tamanhos de antígenos de 50 kDa, 41 kDa e 37 kDa. As tiras 1 e 4 funcionam como controlos positivos de diferentes kits de teste utilizados. (B) apresenta tiras de imunoblot revestidas com antígenos excretórios-secretórios de *Toxocara canis*, processadas com a amostra de soro identificada como positiva para *T. spiralis* por imunoblot. A tira B14 exhibe duas bandas específicas (35 e 24 kDa), sugerindo reatividade cruzada.

## Discussão

O presente estudo revelou uma seroprevalência muito baixa de anticorpos IgG contra *Trichinella spiralis*. Tendo -se observado um caso (0,5%) confirmado por imunoblot de infeção por *Trichinella* spp. Este resultado está de acordo com relatos epidemiológicos anteriores, que indicam uma baixa incidência de triquinelíase em Portugal, sugerindo que as infeções humanas raras no país. Importa salientar que a única amostra confirmada como positiva também apresentou reatividade para *Toxocara* sp., o que pode indicar uma coinfeção com ambos

os parasitas ou uma possível reação cruzada. A anonimização das amostras impediu a recolha de novos soros da paciente e a realização de uma investigação epidemiológica adicional para clarificar o estado da infeção.

Vários fatores devem ser considerados na interpretação dos resultados obtidos:

(i) Os 12 resultados falso-positivos no teste ELISA podem dever-se a reações cruzadas com anticorpos gerados contra outros helmintas, tais como *Ascaris lumbricoides*, *Echinococcus granulosus*, *Toxocara* sp., *Taenia solium*,

## artigos breves\_ n. 8

*Trichuris trichiura*, *Schistosoma* sp. e *Strongyloides stercoralis* (33). A reatividade cruzada é uma limitação bem conhecida nos diagnósticos serológicos de helmintíases, devido a estruturas proteicas e glicídicas conservadas entre organismos filogeneticamente distantes. Por exemplo, a fosforilcolina (PC), um epítipo dominante presente nos antigénios de *T. spiralis* (nomeadamente nos grupos TSL-4 e TSL-8), é também amplamente distribuída entre bactérias, fungos e outros nemátodes, o que dificulta o diagnóstico serológico (36). Além disso, antigénios conservados, como as proteínas de 205 kDa, 149 kDa e 32 kDa, foram identificados como reagentes cruzados entre *T. spiralis*, *Fasciola gigantica* e *Echinococcus granulosus* (37).

Têm sido feitos esforços para melhorar a especificidade dos testes ELISA. A purificação dos antigénios TSL-1, glicoproteínas altamente conservadas e principais componentes dos antigénios excretórios-secretórios, foi realizada com recurso a anticorpos monoclonais, o que resultou numa maior especificidade em comparação com preparações brutas de antigénios (38). Uma inovação importante foi a identificação da tivelose, um epítipo glicídico presente nos antigénios TSL-1. Uma versão sintética da tivelose foi desenvolvida para melhorar a especificidade dos testes ELISA. Esta versão revelou vantagens em termos de estabilidade e padronização, tendo demonstrado maior especificidade em várias espécies hospedeiras. No entanto, pode apresentar menor sensibilidade, especialmente em fases iniciais da infeção ou em situações de baixas parasitemias (39). Apesar destes avanços, a técnica de Western Blot (WB) continua a ser o “gold standard” para confirmação serológica, pois permite distinguir entre antigénios específicos de *Trichinella* e epítipos de reação cruzada (38).

(ii) Outro aspeto importante é que apenas as amostras positivas pelo teste ELISA foram submetidas a teste confirmatório por imunoblot. O kit ELISA utilizado baseia-se em antigénios excretórios-secretórios (ES) de *Trichinella spiralis*, conhecidos por serem altamente conservados entre espécies do género *Trichinella* (40). No entanto, o fabricante validou o ensaio especificamente para deteção de *T. spiralis*, pelo que não é possível garantir que o teste detete eficazmente outras espécies, como *T. britovi*, conhecida por circular em animais selvagens em Portugal (34).

Apesar da baixa seroprevalência observada neste estudo, não se pode assumir que a doença está ausente em Portugal. O país partilha diversas características com outros países europeus, como Espanha, onde casos de *Trichinella* spp. são frequentemente notificados (41). Ambos os países seguem tradições alimentares que incluem o consumo de carne de javali e de porco de abate caseiro e seus derivados e de carne de caça. Adicionalmente, tanto em Portugal como em Espanha existe um sistema de vigilância para *Trichinella*, sendo a triquinelíase uma doença de declaração obrigatória (26). Embora em Espanha sejam notificados surtos com maior frequência, Portugal identificou o seu primeiro caso confirmado por técnicas moleculares de *T. britovi* em javali no ano de 2020 (30). Por outro lado, a Roménia, a par de Espanha, foram os países com o maior número de casos de triquinelíase na UE em 2023 (41). A situação na Roménia é particularmente preocupante devido à persistência de práticas tradicionais de criação de suínos em muitas zonas rurais, especialmente entre comunidades nómadas, onde os animais são frequentemente criados sem controlo veterinário regular ou inspeção oficial (42). Como resultado, a Roménia mantém-se como um dos principais focos de triquinelíase da União Europeia.

A baixa frequência da infeção em Portugal pode dever-se ao facto de os sinais e sintomas da triquinelíase serem inespecíficos nas fases iniciais, o que dificulta o diagnóstico diferencial com outras patologias, especialmente fora do contexto de surtos. Acresce ainda a existência de um “período de janela” durante a fase precoce da infeção, em que os testes serológicos podem produzir resultados falsos negativos, dado que os anticorpos, particularmente IgG, podem não ser detetáveis até às 3–5 semanas após a infeção, comprometendo o diagnóstico precoce e conduzindo ao subdiagnóstico e à subnotificação da doença (6).

Este estudo apresenta limitações, a dimensão e distribuição geográfica da amostra não é representativa da população portuguesa, sendo uma amostra de conveniência de casos suspeitos de infeção em que os indivíduos referiram ingerir carne mal cozinhada de javali e porco não inspecionada e bem como carne de caça. A ausência de dados epidemiológicos e clínicos detalhados dos participantes impossibilitou a análise de potenciais fatores de risco.

## \_Perspetivas futuras

Futuros estudos serológicos deverão incluir amostras de maior dimensão e distribuição geográfica mais alargada, bem como a recolha de dados epidemiológicos suplementares. Esta informação poderá ser obtida através de um inquérito epidemiológico que inclua historial de viagens, contacto com animais selvagens e domésticos e informações pormenorizadas sobre hábitos alimentares. A obtenção de consentimento informado que permita o seguimento clínico e a repetição de testes contribuiria significativamente para interpretação dos resultados obtidos. A incorporação de ensaios baseados em tivo-se sintética ou em novos epítomos específicos de *Trichinella* poderá melhorar a especificidade dos testes serológicos, reduzindo falsos positivos, sobretudo em regiões de baixa prevalência. Por fim, tendo em conta o potencial zoonótico da triquinelíase é essencial implementar iniciativas de saúde pública direcionadas à sensibilização de caçadores e criadores dos animais, reforçando que a carne proveniente de caça ou de abates domésticos só deve ser consumida após inspeção veterinária obrigatória, conforme estipulado na legislação portuguesa (Jornal Oficial da União Europeia, 11 de agosto de 2015, Regulamento de Execução (UE) 2015/1375 da Comissão). É igualmente fundamental sensibilizar os profissionais de saúde, encorajando a suspeita clínica e o rastreio de triquinelíase em pacientes com sintomatologia compatível.

## \_Conclusão

Em conclusão, a triquinelíase é uma doença de declaração obrigatória em Portugal, causada por nemátodes do género *Trichinella*. Esta doença está distribuída globalmente, constituindo um importante problema de saúde pública, nomeadamente no contexto da segurança alimentar. Neste estudo, a seroprevalência de anticorpos contra *T. spiralis* na amostra analisada da população portuguesa foi extremamente baixa, sugerindo que a triquinelíase humana é pouco frequente em Portugal. No entanto, a possibilidade de subdiagnóstico e consequente subnotificação, aliada às limitações dos testes serológicos atuais, sobretudo no que respeita à reatividade cruzada, sublinha a necessidade de uma interpretação cuidadosa dos dados existentes e da realização de estudos complementares. Investigações

futuras deverão incluir estudos de base populacional que permitam medir os riscos de exposição e, assim, permitirem uma definição de estratégias de saúde pública adequadas.

### Referências bibliográficas:

- (1) R Rawla P, Sharma S. *Trichinella spiralis* Infection. 2023 Aug 1. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538511/
- (2) Zarlenga D, Thompson P, Pozio E. *Trichinella* species and genotypes. Res Vet Sci. 2020 Dec;133:289-96. Epub 2020 Sep. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.012
- (3) Pozio E, Zarlenga DS. Taxonomy of the *Trichinella* genus. In: Bruschi F (ed). *Trichinella and Trichinellosis*. Academic, 2021. pp. 35-76. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821209-7.00006-8
- (4) European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2023 Zoonoses report. EFSA Journal. 2024;22(12):e9106. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.9106
- (5) Centers for Disease Control and Prevention. DPDx - Trichinellosis [Internet]. Disponível em: https://www.cdc.gov/dpdx/trichinellosis/index.html
- (6) Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. Clin Microbiol Rev. 2009 Jan;22(1):127-45. https://doi.org/10.1128/cmr.00026-08
- (7) Bruschi F, Dupouy-Camet J. *Trichinellosis*. Helminth Infections and their Impact on Global Public Health. Springer Vienna, 2014. pp. 229-73. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1782-8\_8
- (8) Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Sofronic-Milosavljevic L. *Trichinella spiralis*: shaping the immune response. Immunol Res. 2012 Apr;52(1-2):111-19. https://doi.org/10.1007/s12026-012-8287-5
- (9) Grecis RK, Campbell L. Immunity to *Trichinella*. In: *Trichinella and Trichinellosis*. Academic Press, 2021. pp. 267-94. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821209-7.00007-X
- (10) Bruschi F, Ashour DS, Othman AA. *Trichinella*-induced immunomodulation: Another tale of helminth success. Food Waterborne Parasitol. 2022 Jun;27:e00164. https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2022.e00164
- (11) Vale F, Azevedo T, Lima M, et al. Travel-associated human trichinellosis in Portugal. IDCases. 2021 Apr 17;24:e01124. https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01124
- (12) Chatterjee T, Jagani R, Sabhiki AK, et al. Trichinosis. Med J Armed Forces India. 2000 Apr;56(2):161-162. Epub 2017 Jun 10. https://doi.org/10.1016/S0377-1237(17)30138-7
- (13) Murrell KD, Bruschi F. Clinical trichinellosis. Prog Clin Parasitol. 1994;4:117-50
- (14) Dupouy-Camet J, Raffetin A, Rosca EC, et al. Clinical picture and diagnosis of human trichinellosis. *Trichinella and Trichinellosis*. Academic Press, 2021. pp. 333-52. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821209-7.00010-X
- (15) Gómez-Morales MÁ, Cherchi S, Ludovisi A. Serological testing for *Trichinella* infection in animals and man: Current status and opportunities for advancements. Food Waterborne Parasitol. 2022 May 13;27:e00165. https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2022.e00165
- (16) Mohamed SMAG, Taha AAR, Abdel Hamed EF, et al. Updated Treatment Modalities of Trichinellosis: Review Article. Egypt J Hosp Med. 2022 Oct;89(2):7680-83. https://journals.ekb.eg/article\_276901\_5dc9a55862e4395b3152f6c92a2a4512.pdf
- (17) Pozio E. World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. Vet Parasitol. 2007 Oct 21;149(1-2):3-21. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.002
- (18) Grigoryan G, Aghayan SA, Gevorgyan H, et al. The First Report of *Trichinella* britovi in Armenia. Iran J Parasitol. 2020 Jul-Sep;15(3):452-56. https://doi.org/10.18502/ijpa.v15i3.4212

artigos breves\_ n. 8

- (19) Malone CJ, Oksanen A, Mukaratirwa S, et al. From wildlife to humans: The global distribution of *Trichinella* species and genotypes in wildlife and wildlife-associated human trichinellosis. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2024 Apr 7;24:100934. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2024.100934>
- (20) Lindsay DS, Zarlenga DS, Gamble HR, et al. Isolation and characterization of *Trichinella pseudospiralis* Garkavi, 1972 from a black vulture (*Coragyps atratus*). *J Parasitol.* 1995 Dec;81(6):920-23. <https://doi.org/10.2307/3280719>
- (21) Gajadhar AA, Forbes LB. A 10-year wildlife survey of 15 species of Canadian carnivores identifies new hosts or geographic locations for *Trichinella* genotypes T2, T4, T5, and T6. *Vet Parasitol.* 2010 Feb 26;168(1-2):78-83. Epub 2009 Oct 23. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.10.012>
- (22) Pozio E, Pagani P, Marucci G, et al. *Trichinella britovi* etiological agent of sylvatic trichinellosis in the Republic of Guinea (West Africa) and a re-evaluation of geographical distribution for encapsulated species in Africa. *Int J Parasitol.* 2005 Aug;35(9):955-60. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.013>
- (23) Savage RJG. Carnivora. In: Maglio VJ, Cooke HBS (eds). *Evolution of African Mammals*. Cambridge, Mass: Harvard University Press, 2014. pp. 249-67.
- (24) Pozio E. Adaptation of *Trichinella* spp. for survival in cold climates. *Food Waterborne Parasitol.* 2016 Sep;4:4-12. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.07.001>
- (25) Ancelle T, De Bruyne A, Poisson D, et al. Outbreak of trichinellosis due to consumption of bear meat from Canada, France, September 2005. *Euro Surveill.* 2005;10(41):pii=2809. <https://doi.org/10.2807/esw.10.41.02809-en>
- (26) Moral SM, Azorit C, López-Montoya AJ, et al. Epidemiology of *Trichinella* infection in wild boar from Spain and its impact on human health during the period 2006-2019. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2022 Aug 6;19:18-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2022.07.008>
- (27) Pérez-Pérez A, Guimbao Bescós J, Cebollada Gracia AD, et al. Brotes epidémicos de triquinosis ocurridos en Aragón durante el periodo 1998-2017. *Rev Esp Salud Publica.* 2019 Feb 15;93:e201902005. [www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos\\_propios/resp/revista\\_cdrom/VOL93/O\\_BREVES/RS93C\\_201902005.pdf](http://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/resp/revista_cdrom/VOL93/O_BREVES/RS93C_201902005.pdf)
- (28) Fonseca M, Rocha H, Mateus T. *Trichinella* spp. na Europa e em Portugal. *Tecnol. 2019*;18:1-5.
- (29) Rodriguez-Osorio M, Abad JM, de Haro T, et al. Human trichinellosis in Southern Spain: serologic and epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Nov;61(5):834-7. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.834>
- (30) Burmester GR, Pezzutto A. *Imunologia: texto e atlas*. Lisboa: Lidel, 2005.
- (31) Vieira RA. Trichinellosis infection in Portugal. *Wiad Parazytol.* 1983;29:627-33. <https://bibliotekanauki.pl/articles/2153506.pdf>
- (32) Direção-Geral da Saúde/Centro de Emergências de Saúde Pública. RONDA - Reunião sobre observações, notícias, dados e alertas. Lisboa, 2017.
- (33) Ferreira I, Martins S, Reis T, et al. Triquinelose humana: estudo observacional em dois grupos populacionais expostos à infeção por *Trichinella* sp. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2014;3(Supl 3):20-22. <http://hdl.handle.net/10400.18/2290>
- (34) Vieira-Pinto M, Fernandes ARG, Santos MH, et al. *Trichinella britovi* infection in wild boar in Portugal. *Zoonoses Public Health.* 2021 Mar;68(2):103-9. <https://doi.org/10.1111/zph.12800>
- (35) Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* 2022;2508:115-34. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3_10)
- (36) Dea-Ayuela MA, Bolas-Fernández F. *Trichinella* antigens: a review. *Vet Res.* 1999 Nov-Dec;30(6):559-71. [https://www.researchgate.net/publication/12705818\\_Trichinella\\_antigens\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/12705818_Trichinella_antigens_A_review)
- (37) Abdel-Rahman EH, Abdel-Megeed KN, Abuel-Ezz NM. Cross-reaction: a common trait among helminthes. *J Egypt Soc Parasitol.* 2003 Aug;33(2):457-71. [https://applications.emro.who.int/imemrf/J\\_Egypt\\_Soc\\_Parasitol\\_2003\\_33\\_2\\_457\\_471.pdf](https://applications.emro.who.int/imemrf/J_Egypt_Soc_Parasitol_2003_33_2_457_471.pdf)
- (38) Gómez-Morales MA, Ludovisi A, Amati M, et al. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human trichinellosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2008 Nov;15(11):1723-29. <https://doi.org/10.1128/CVI.00257-08>
- (39) Bruschi F, Moretti A, Wassom D et al. The use of a synthetic antigen for the serological diagnosis of human trichinellosis. *Parasite.* 2001 Jun;8: S141-43. <https://doi.org/10.1051/parasite/200108s2141>
- (40) Gamble HR, Pozio E, Bruschi F, et al. International Commission on Trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man. *Parasite.* 2004 Mar;11(1):3-13. <https://doi.org/10.1051/parasite/20041113>
- (41) European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2023 Zoonoses report. *EFSA J.* 2024 Dec 10;22(12):e9106. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.9106>
- (42) Lușe M, Ionică AM, Flonta M, et al. Retrospective Survey of Human Trichinellosis in a Romanian Infectious Diseases Hospital over a Thirty-Year Interval-The Never-Ending Story. *Pathogens.* 2023 Feb 23;12(3):369. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030369>