



2020

número

27

2ª série

Lisboa _ INSA, IP

publicação quadrimestral _ maio-agosto

ISSN: 2183-8873 (em linha)

Observações

Boletim Epidemiológico

sumário_

_Editorial

As funções essenciais são necessariamente colaborativas, **p 02**
em benefício da Saúde Pública

Essential functions are necessarily collaborative, for the benefit of Public Health

Carlos Matias Dias, Marta Barreto

_Artigos breves

_Alimentação e nutrição

- 1_Monitorização do teor de açúcar em algumas categorias de alimentos disponíveis no mercado: realidade portuguesa em 2019 **p 04**

Monitoring sugar content in some food categories available in the market: Portuguese reality in 2019

Andreia Lopes, Paulo Fernandes, Roberto Brazão, M. Graça Dias

- 2_Monitorização da energia e dos teores de açúcar e sal em cereais de pequeno-almoço e bolachas disponíveis no mercado português, 2019 **p 08**

Monitoring sugar, salt and energy content of breakfast cereals and biscuits available in the Portuguese market, 2019

Paulo Fernandes, Andreia Lopes, Roberto Brazão, M. Graça Dias

- 3_Exposição precoce a micotoxinas: o contributo dos projetos MYCOMIX e earlyMYCO **p 12**

Early-life exposure to mycotoxins: the contribution of MYCOMIX and earlyMYCO projects

Paula Alvito, Patrícia Bastos-Amador, Elsa L. Duarte, Manuela Ferreira, Carla Nunes, Carla Martins, Ricardo Assunção

_Doenças genéticas e cromossómicas

- 4_Métodos para estudos populacionais de associação genótipo-fenótipo com base em genes candidatos **p 17**
Methods for candidate gene genotype-phenotype association studies in populations

Susana David

- 5_Síndrome de quilomicronemia familiar em Portugal, agosto 2020 **p 03**

Familial chylomicronemia syndrome in Portugal, August 2020

Ana Catarina Alves, Sílvia Sequeira, Oana Moldovan, Henedina Antunes, Esmeralda Martins, Rute Gonçalves, João Sequeira Duarte, António Guerra, Miguel Salgado, Aida Azevedo, Ana Gaspar, Isabel Palma, Quitéria Rato, Mafalda Bourbon

- 6_Prevalência de nados-vivos com síndrome de Down: indicador conjunto da gravidez tardia e das políticas de diagnóstico pré-natal entre 2011-2017 **p 27**

Down syndrome livebirth prevalence: joint indicator of late pregnancy and prenatal diagnosis policies between 2011-2017

Paula Braz, Ausenda Machado, Carla Ramalho, Carlos Matias Dias

_Doenças infecciosas

- 7_Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE): ixodídeos e bactérias patogénicas detetadas em Portugal continental durante o ano de 2019 **p 31**

Vector Surveillance Network (REVIVE): ixodids and pathogenic bacteria detected in mainland Portugal during 2019

Maria Sofia Nuncio, Ana Sofia Santos, Isabel Lopes de Carvalho, Rita de Sousa, Hugo Osório, Maria Margarida Santos-Silva, Maria João Alves; Equipa REVIVE

- 8_Monitorização do mosquito invasor *Aedes albopictus* em Portugal pela Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE), 2017-2019 **p 39**

Monitoring of the invasive mosquito Aedes albopictus in Portugal by the Vector Surveillance Network (REVIVE), 2017-2019

Hugo Costa Osório, Fátima Amaro, Líbia Zé-Zé, Manuel Silva, Maria João Alves; Equipa REVIVE

_Perturbações do Desenvolvimento Infantil

- 9_Prevalência da perturbação do espectro do autismo na região Centro de Portugal: um estudo no âmbito do projeto ASDEU **p 47**

Prevalence study of autism spectrum disorder in the região Centro of Portugal: the ASDEU project

Célia Rasga, João Xavier Santos, Cátia Café, Alexandra Oliveira, Frederico Duque, Ana Nunes, Guiomar Oliveira, Astrid Moura Vicente



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge

As funções essenciais são necessariamente colaborativas, em benefício da Saúde Pública

Essential functions are necessarily collaborative, for the benefit of Public Health

Este vigésimo sétimo número da segunda edição do *Boletim Epidemiológico Observações* (BEO 27) publicado pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) inclui diversos artigos que ilustram a relação entre algumas das funções essenciais que o INSA mantém em tempo de pandemia, nomeadamente enquanto observatório de saúde, instituição de investigação e desenvolvimento e difusora da cultura científica, e as políticas e os serviços de saúde.

No âmbito da função essencial que o INSA desempenha enquanto observatório de saúde, são publicados cinco artigos. Os dois artigos na área da alimentação e nutrição traduzem evidência encorajadora ao relevar uma redução progressiva do teor de açúcar pela indústria alimentar em alguns alimentos, sugerindo também, que é possível atingir as metas propostas em normativos nacionais relativamente ao sal e ao açúcar noutros alimentos. Também os dois artigos relativos à Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE) confirmam o papel imprescindível das redes de monitorização e vigilância de vetores para o diagnóstico precoce e para a intervenção em doenças ligadas a fatores ambientais e com elevado potencial de disseminação, neste caso em particular sobre ixodídeos e bactérias patogénicas detetadas em Portugal e sobre a monitorização do mosquito invasor *Aedes albopictus*, um importante vetor na transmissão de vírus como o chikungunya, o dengue e o Zika. Ainda no âmbito desta função essencial, é publicado o artigo “Prevalência de nados-vivos com síndrome de Down: indicador conjunto da gravidez tardia e das políticas de diagnóstico pré-natal”, o qual ilustra uma importante aplicação dos registos nosológicos, como é o caso do Registo Nacional de Anomalias Congénitas (RENAC), ao evidenciar o diagnóstico desta condição na fase pré-natal em mais de 80% dos casos, resultado apenas possível devido aos serviços de diagnóstico precoce amplamente disponíveis no nosso país.

Neste vigésimo sétimo número do BEO fica também amplamente ilustrado o trabalho que o INSA desenvolve na sua função essencial de “investigação, desenvolvimento e inovação”. Neste campo são publicados três artigos. Um acerca da prevalência da perturbação do espectro do autismo, que confirma a pertinência dos inquéritos epidemiológicos em populações específicas, como a população escolar, com o objetivo de planear, monitorizar e avaliar os serviços de apoio em meio escolar a portadores deste tipo de doenças. Considerando uma fase mais precoce da história natural dos problemas de saúde e doenças, é publicado um artigo que reporta resultados de um estudo sobre as exposições precoces das crianças a micotoxinas e o seu potencial impacto na saúde, e um outro artigo que defende o estudo genético e molecular da síndrome de quilomicronemia familiar, uma doença rara. Ambos ilustram a ligação entre a investigação e o desenvolvimento de propostas de produtos e serviços com aplicação à prevenção primária e secundária de doenças devidas a exposições alimentares e genéticas.

Finalmente, no âmbito da função do INSA como difusor da cultura científica, podemos ler o artigo sobre os métodos utilizados em estudos populacionais de associação genótipo-fenótipo com base em genes candidatos, os quais têm contribuído de forma relevante para a identificação de variantes genéticas causais e para a nossa compreensão da arquitetura genética das doenças humanas.

Um outro aspecto que merece realce neste número do BEO é o facto de que seis dos nove artigos publicados têm coautores afiliados a instituições externas ao INSA, quer instituições públicas, como as cinco Administrações Regionais de Saúde e os seus Departamentos de Saúde Pública e uma das Regiões Autónomas, 14 hospitais através dos seus serviços clínicos, incluindo uma das Regiões Autónomas, ou os 10 Institutos de investigação ligados às universidades, além dos serviços incluídos em centros universitários hospitalares e um centro de investigação, incluído numa Fundação de iniciativa privada.

Embora já patente nos números anteriores deste Boletim, este, em especial, evidencia a abertura do INSA e dos seus Departamentos Técnico-científicos, traduzida na colaboração com a comunidade que trabalha e tem interesse na Saúde Pública em Portugal.

Esta colaboração interinstitucional, a par da necessária independência científica e técnica, contribuem de forma importante para a complementaridade e desenvolvimento de todas as instituições, num espírito de relação transparente e mutuamente benéfica, sem comprometer a função de referência no sector da saúde, o trabalho com as Autoridades de Saúde, com as instituições oficiais nacionais e com as instituições europeias e internacionais de referência.

Será nesta malha que se poderá, talvez, procurar e aperfeiçoar um dos pilares centrais para a atualização estratégica do Instituto, no panorama, ainda incerto, após a pandemia.

Carlos Matias Dias

*Médico especialista em Saúde Pública
Departamento de Epidemiologia
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
carlos.dias@insa.min-saude.pt*

Marta Barreto

*Investigadora, Departamento de Epidemiologia
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*

Monitorização do teor de açúcar em algumas categorias de alimentos disponíveis no mercado: realidade portuguesa em 2019

Monitoring sugar content in some food categories available in the market: Portuguese reality in 2019

Andreia Lopes, Paulo Fernandes, Roberto Brazão, M. Graça Dias

andrea.lopes@insa.min-saude.pt

Unidade de Observação e Vigilância. Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

É globalmente reconhecido que o consumo excessivo de açúcar está relacionado com o desenvolvimento de doenças crónicas, nomeadamente a obesidade e a diabetes tipo 2, conforme o evidenciam diversos estudos científicos. Para diminuir a prevalência deste tipo de doenças, o Governo português aprovou a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS), assente na promoção de um padrão de alimentação saudável que, entre outros objetivos, pretende uma redução progressiva do consumo diário de açúcar. O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, na qualidade de parceiro estratégico na implementação da EIPAS, através do seu Departamento de Alimentação e Nutrição, procedeu à monitorização do teor de açúcar em diversas categorias de alimentos, designadamente iogurtes (sólidos e líquidos), leites aromatizados e refrigerantes, disponíveis no mercado português. Os dados foram recolhidos em *websites* de comércio eletrónico das principais cadeias de distribuição alimentar em Portugal, durante o ano de 2019. As medianas dos teores de açúcar, excluindo a lactose, foram 7,7 e 7,2 g/100 g para os iogurtes sólidos e líquidos, respetivamente e 3,8 e 4,5 g/100 mL para os leites aromatizados e refrigerantes, respetivamente. Para a categoria dos iogurtes, e comparando os valores atuais com os valores do estudo de monitorização do teor de açúcar nestes alimentos realizado em 2018, em que se utilizou a mesma metodologia, os resultados revelam uma redução progressiva do teor de açúcar pela indústria alimentar.

_Abstract

It is widely recognized that excessive sugar consumption is related to the development of chronic diseases, namely obesity and type 2 diabetes, according to evidence from several scientific studies. To reduce the prevalence of this type of diseases, the Portuguese Government approved the Integrated Strategy for the Promotion of Healthy Eating (EIPAS), based on the promotion of a healthy eating pattern that, among other objectives, aims at a progressive reduction of daily sugar consumption. The National Institute of Health Dr Ricardo Jorge, as a strategic partner in EIPAS implementation, through its Food and Nutrition Department, monitored the sugar content in several food categories, namely yoghurts (solid and liquid), flavored milks and soft drinks, available on the Portuguese market. Data were collected on e-commerce sites of the main food distribution chains in Portugal during 2019. Medians of sugar content, excluding lactose, were 7.7 and 7.2 g/100 g for solid and liquid yoghurts, respectively and 3.8 and 4.5 g/100 mL for flavored milks and soft drinks, respectively. For the category of yoghurts, and comparing the current

values with the values from the monitoring sugar content study in these foods conducted in 2018, in which the same methodology was used, the results reveal a progressive reduction in the sugar content by the food industry.

_Introdução

Estudos recentes reportam que cerca de 5,9 milhões de portugueses (quase 6 em cada 10) têm excesso de peso (pré-obesidade e obesidade), sendo que nas crianças (<10 anos) e nos adolescentes (10-17 anos) já se verifica uma percentagem bastante considerável de pré-obesidade (17% e 24%, respetivamente) e de obesidade (7,7% e 8,7%, respetivamente). Também a prevalência de outro tipo de doenças crónicas, das quais se destaca a diabetes, revela-se muito elevada na população portuguesa (cerca de 10%) ⁽¹⁾.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Comissão Europeia recomendam que as estratégias nacionais de alimentação e nutrição devem: assentar numa abordagem de intervenção multissetorial, designadamente com o objetivo de modificar a oferta alimentar de determinados alimentos, nomeadamente os que apresentam elevado teor de açúcar; incentivar ações de reformulação nutricional dos produtos alimentares através de uma ação articulada com a indústria alimentar; capacitar os cidadãos e profissionais que trabalham ou influenciam o consumo de alimentos para as escolhas alimentares saudáveis.

A OMS recomenda que menos de 10% do nosso consumo energético total seja proveniente de açúcares livres, o que é equivalente a 50 g por dia (aproximadamente 12 colheres de chá) e, idealmente, abaixo dos 5%, para se obter maiores



benefícios na saúde. Segundo a mesma organização, açúcares livres são todo o tipo de açúcares que são adicionados a alimentos e bebidas, quer pelo produtor quer pelo consumidor, assim como aqueles que estão naturalmente presentes no mel, xaropes, sumos de fruta ou concentrados de fruta.

Os resultados do Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (2015-2016) indicam que, para a ingestão de açúcares livres, o açúcar de mesa/de adição é o maior contribuidor, seguindo-se os refrigerantes e os iogurtes, que detêm um contributo relevante (2). De referir ainda que os iogurtes contribuem com uma importante percentagem para a ingestão de açúcar nas crianças. Cerca de 10% da ingestão de açúcares livres nas crianças portuguesas é proveniente do consumo de iogurtes (3).

Em Portugal, a Estratégia Integrada para a Alimentação Saudável (EIPAS), implementada desde 2017, embora com efeitos práticos a partir de 2018, invoca um esforço integrado para a criação de ambientes promotores da saúde, pelo que incentiva a reformulação dos produtos no mercado. Assim, no que respeita ao consumo de açúcar, preconiza que o teor de açúcar deverá ser inferior a 5 g por 100 g de alimento sólido e menos de 2,5 g por 100 mL para os líquidos (4).

O Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, em articulação com os objetivos da EIPAS procedeu à monitorização do teor de açúcar nas categorias de alimentos, iogurtes (sólidos e líquidos), leites aromatizados e refrigerantes.

_Objetivo

Monitorizar o teor de açúcar nas categorias de alimentos iogurtes, leites aromatizados e refrigerantes disponíveis no mercado português, para conhecimento da realidade nacional atual e consequente apoio às autoridades de saúde, com o propósito de se atingirem as metas preconizadas pela Estratégia Integrada para a Alimentação Saudável.

_Material e métodos

Procedeu-se à avaliação do teor de açúcar nas categorias alimentares iogurtes (sólidos e líquidos), leites aromatizados e refrigerantes. Os dados foram recolhidos através da informação constante dos rótulos disponibilizados no comércio eletrónico das maiores cadeias de supermercados a operar no mercado português. Os valores obtidos foram comparados com as recomendações explanadas na EIPAS para 2020 para o teor de açúcar: 5 g/100 g para alimentos sólidos e 2,5 g/100 mL para os líquidos. Para a categoria dos iogurtes foram ainda comparados os valores obtidos com os valores apurados no estudo de monitorização de açúcar nestes alimentos realizado em 2018, em que se utilizou a mesma metodologia (5).

Tendo em consideração que o rótulo exibe o teor total de açúcar, posteriormente, para os lácteos, a este valor foi subtraído o teor médio de lactose, açúcar naturalmente presente nestes produtos. Para o efeito utilizou-se como referência o guia *Perfil Nutricional - Restrições à publicidade alimentar dirigida a crianças - 2019*, publicado pela Direção-Geral da Saúde, por ser o documento em que se estabelecem os valores de lactose, com base nos teores máximos encontrados no leite disponível no mercado português. Os valores referidos neste documento são de 3,8 g / 100 g de lactose para os iogurtes e de 5,5 g / 100 mL para os leites (3).

_Resultados e discussão

Os resultados obtidos apresentam-se nos [gráficos 1-4](#).

No total de 305 iogurtes sólidos considerados ([gráfico 1](#)), 55 apresentaram teores de açúcar total (rotulado) de acordo com as recomendações da EIPAS para 2020, de 5 g/100 g, o que se traduz numa taxa de satisfação do valor preconizado de 18%. Para esta categoria a mediana foi de 11,5 g/100 g.

Numa amostra de 208 iogurtes líquidos ([gráfico 2](#)), observou-se a mediana de açúcar total (rotulado) de 11,0 g/100 g, ligeiramente inferior à categoria anterior.

A informação nutricional dos iogurtes líquidos é rotulada por 100 g, pelo que não foi possível a sua comparação com o



Gráfico 1: ⬇ Teor de açúcar em iogurtes sólidos.

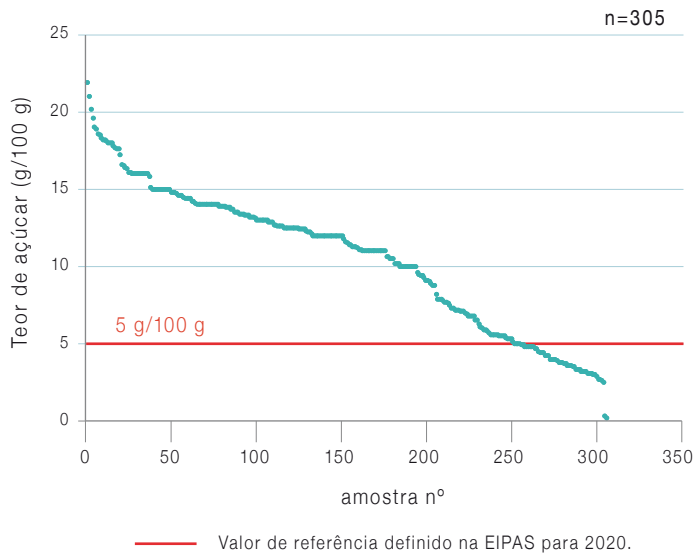


Gráfico 2: ⬇ Teor de açúcar em iogurtes líquidos.

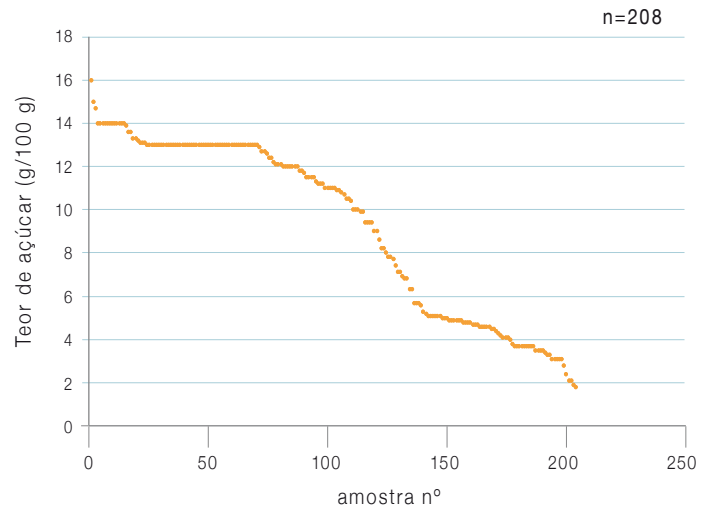


Gráfico 3: ⬇ Teor de açúcar em leites aromatizados.

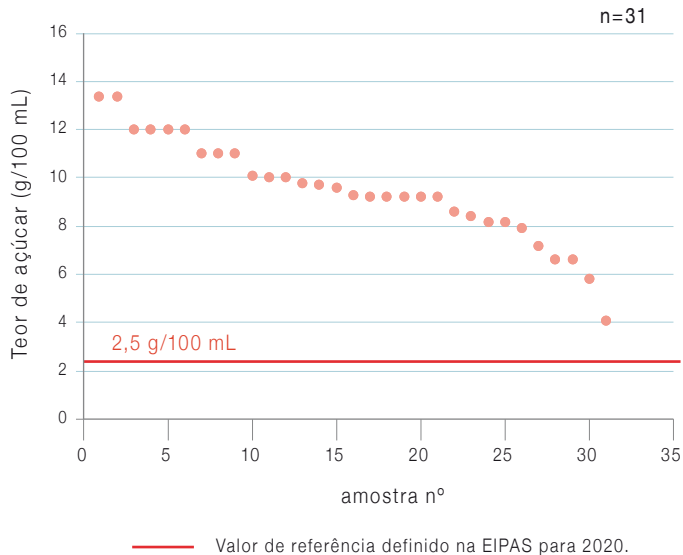
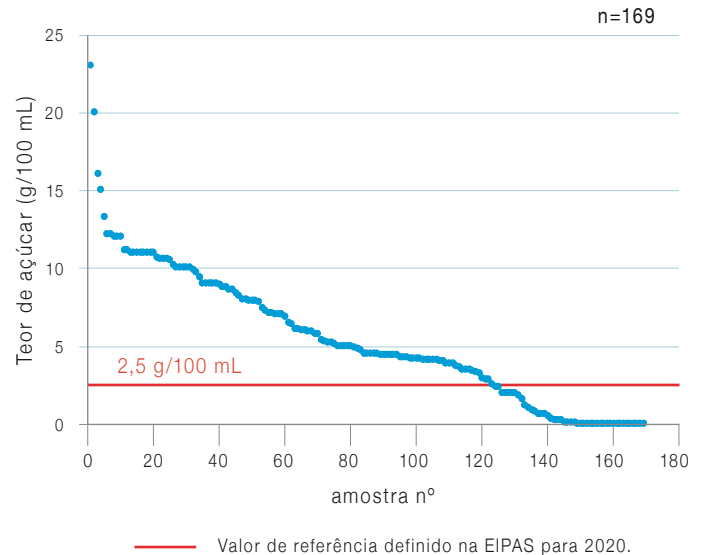


Gráfico 4: ⬇ Teor de açúcar em refrigerantes.



limite desejável para os alimentos líquidos preconizado pela EIPAS, 2,5 g/100 mL. No comércio eletrônico apenas uma marca dispunha de dados para o cálculo da massa específica, sendo o seu valor de 1,07 g de iogurte por cada mL.

O estudo realizado em 2018 revelou para os iogurtes sólidos e líquidos medianas de 12,0 e 12,1 g/100 g, respetivamente, o que revela um esforço da indústria no sentido da redução.

No total de 31 leites aromatizados compilados (gráfico 3), a mediana foi de 9,3 g / 100 mL e o valor mínimo observado correspondeu a 4,1 g / 100 mL, encontrando-se ainda acima do valor desejado de 2,5 g / 100 mL. Importa referir que esse valor mínimo corresponde a um único leite adoçado com stevia (adoçante natural).



Subtraindo ao açúcar total rotulado o teor de lactose, obtiveram-se os seguintes valores para as medianas: 7,7 e 7,2 g/100 g para os iogurtes sólidos e líquidos, respetivamente e 3,8 g/100 mL, para os leites aromatizados.

Importa ainda realçar que no caso dos iogurtes com fruta, para além da lactose (açúcar naturalmente presente proveniente do leite), estes contêm açúcar naturalmente presente proveniente da fruta, principalmente frutose.

No total de 169 refrigerantes considerados (gráfico 4), a mediana para o teor de açúcar foi de 4,5 g/100 mL, verificando-se que 47 cumprem as recomendações (2,5 g/100 mL), o que se traduz numa taxa de satisfação face ao preconizado na EIPAS de 28%. Nesta categoria, verificou-se que nos produtos com baixo teor de açúcar este componente foi parcial ou totalmente substituído por adoçantes.

Se recriarmos um dia alimentar, com base nos valores obtidos para as medianas, onde incluímos uma porção de leite aromatizado ao pequeno-almoço (7,6 g/200 mL), um refrigerante ao almoço (9,0 g/200 mL) e um iogurte sólido para o lanche (9,6 g/125 g), obtemos 26,2 g de açúcar que, face ao consumo limite recomendado pela OMS de 50 g de açúcares livres por dia apresenta um contributo de 52,4%. Para o cenário ideal, estes três alimentos apresentam um contributo de 104,8%, excedendo o limite diário de 25 g.

Conclusões

As medianas calculadas para o teor de açúcar dos iogurtes sólidos e líquidos (em g/100 g) e leites aromatizados (em g/100 mL) foram 11,5; 11,0 e 9,3, respetivamente e de 7,7; 7,2 e 3,8 para as mesmas categorias de produtos, excluindo a lactose. Neste contexto, considerando que a EIPAS preconiza os limites de 5 g/100 g e 2,5 g/100 mL para os alimentos sólidos e líquidos, respetivamente, o esforço para a redução do teor de açúcar adicionado terá que continuar, especialmente para as categorias dos iogurtes, o que evidencia a colaboração da indústria alimentar na melhoria dos produtos destas categorias que disponibiliza ao consumidor.

Acresce ainda que na categoria dos iogurtes sólidos, 28,5 % eram naturais ou com alguma alegação nutricional (magros,

0%) e para este conjunto a mediana do teor de açúcar total (incluindo os açúcares naturalmente presentes) foi de 5,0 g/100 g.

Para os refrigerantes obteve-se uma mediana de 4,5 g/100 mL, o que indica a necessidade de a indústria baixar este valor para se atingir a meta da EIPAS, 2,5 g/100 mL. Apesar dos refrigerantes apresentarem uma mediana do teor de açúcar inferior à dos iogurtes não significa que sejam mais saudáveis, já que não contribuem para a ingestão de nutrientes como proteína, vitaminas e minerais. Para além disso, nos refrigerantes, observou-se a presença de adoçantes, facto que poderá motivar a ocorrência de novos estudos que avaliem o impacto do aumento da exposição/consumo de adoçantes, atendendo aos limites máximos admissíveis.

Referências bibliográficas:

- (1) Organisation for Economic Co-operation and Development. Health at a Glance 2019: OECD Indicators. Paris: OECD Publishing, 2019. <https://doi.org/10.1787/4dd50c09-en>
- (2) Lopes C, Torres D, Oliveira A, et al. Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016: relatório de resultados - Parte II (versão atualizada v.1.5 setembro 2017). Porto: Universidade do Porto, 2017. <https://ian-af.up.pt/resultados>
- (3) Direção-Geral da Saúde. Perfil Nutricional - Restrições à publicidade alimentar dirigida a crianças. Lisboa: DGS, 2019. <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/perfil-nutricional-restricoes-a-publicidade-alimentar-dirigida-a-criancas-2019-pdf.aspx>
- (4) Despacho n.º 11418/2017. DR 2ª série de 2017-12-29, nº 249:29595-8. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). <https://dre.pt/pesquisa/-/search/114424591/details/normal?l=1>
- (5) Vargues AL, Fernandes P, Brazão R, et al. Monitorização do teor de açúcar em alimentos disponíveis no mercado português: contributo para promover uma alimentação saudável. Boletim Epidemiológico Observações. 2018;7(22):10-12. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5583>

Monitorização da energia e dos teores de açúcar e sal em cereais de pequeno-almoço e bolachas disponíveis no mercado português, 2019

Monitoring sugar, salt and energy content of breakfast cereals and biscuits available in the Portuguese market, 2019

Paulo Fernandes, Andreia Lopes, Roberto Brazão, M. Graça Dias

paulo.fernandes@insa.min-saude.pt

Unidade de Observação e Vigilância. Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

Tendo em conta a associação universalmente estabelecida entre o consumo excessivo de açúcar e de sal com o desenvolvimento de doenças crónicas, foi aprovada em Portugal a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS), assente na promoção de um padrão de alimentação saudável que, entre outros objetivos, pretende uma redução progressiva do consumo diário de açúcar e de sal por parte da população em geral. O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge tendo como missão contribuir para os ganhos em saúde pública, através do seu Departamento de Alimentação e Nutrição, monitoriza dados relativos aos géneros alimentícios presentes no mercado português, nomeadamente os referentes à composição nutricional. Os dados utilizados neste trabalho foram recolhidos durante o ano de 2019 nas lojas *online* de hipermercados presentes em Portugal, e referem-se à energia e aos teores de açúcar e de sal de bolachas e cereais de pequeno-almoço. As medianas de valores encontrados para as bolachas foram de 470 kcal/100 g para a energia, de 25,0 g/100 g para o açúcar e de 0,7 g/100 g para o sal. Para os cereais de pequeno-almoço as medianas foram de 391 kcal/100 g para a energia, de 21,0 g/100 g para o açúcar e de 0,5 g/100 g para o sal. Comparando os valores obtidos com os valores preconizados na EIPAS, 98,3% das bolachas e 89,2% dos cereais de pequeno-almoço estavam rotulados com teores de sal e/ou açúcar superiores aos desejáveis.

_Abstract

Taking into account the universally established association between the excessive consumption of sugar and salt with the development of chronic diseases, the Integrated Strategy for the Promotion of Healthy Eating (EIPAS) was approved in Portugal, based on the promotion of a healthy eating pattern that, among other objectives, aims at a progressive reduction in the daily intake of sugar and salt by the general population. The National Institute of Health Dr Ricardo Jorge with a mission to contribute to the gains in public health, through its Department of Food and Nutrition, it monitors data related to foodstuffs present in the Portuguese market, namely those related to nutritional composition. The data used in this work was collected during the year 2019 in the hypermarket online stores present in Portugal, and refer to the energy and the sugar and salt content of biscuits and breakfast cereals. The median values found for biscuits were 470 kcal/100 g for energy, 25.0 g/100 g for sugar and 0.7g/100 g for salt. For breakfast cereals the medians were 391 kcal/100g for energy, 21.0 g/100 g for sugar and 0.5 g/100 g for salt. Comparing the values obtained with the values recommended in EIPAS, 98.3% of the biscuits and 89.2% of the breakfast cereals were labeled with higher than desirable levels of salt and/or sugar.

_Introdução

Os resultados obtidos pelo Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, 2015-2016 (IAN-AF) reportam um consumo médio nacional de açúcares simples de 84 g/dia. Destes, 35g/dia correspondem a açúcares livres. Cerca de 2,5 milhões de portugueses (24%) consomem açúcares livres acima do limite recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (10% do aporte energético), sendo esta prevalência superior nos adolescentes (48,7%) e nas crianças (40,7%) ⁽¹⁾.

O mesmo estudo revela que, em média, os portugueses consomem 7,4 g de sal por dia. Aproximadamente 3,7 milhões de mulheres (63,2%) e 4,4 milhões de homens (88,9%) apresentam uma ingestão de sódio acima do nível máximo tolerado (2300 mg/dia).

Quanto ao excesso de peso, o IAN-AF indica que cerca de 5,9 milhões de portugueses (quase 6 em cada 10) têm excesso de peso (pré-obesidade e obesidade).

Para a promoção da saúde, a OMS reforça que adultos que pratiquem uma dieta rica em frutos e cereais e pobre em gorduras, açúcar e sal apresentam menor risco de desenvolver uma ou mais doenças cardiovasculares e certos tipos de cancro ⁽²⁾.

Assim, no contexto português, a Estratégia Integrada para a Alimentação Saudável (EIPAS), em vigor desde 30 de dezembro de 2017, incentiva a reformulação dos géneros alimentícios presentes no mercado nacional, com o objetivo de reduzir o consumo de alguns componentes alimentares, nomeadamente açúcar e sal. Esta Estratégia estabelece teores máximos de açúcar de 5 g/100 g para alimentos sólidos e teores máximos de sal de 0,2 g/100 g para sopas e pratos principais e de 0,3 g/100 g para os restantes alimentos ⁽³⁾.



O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge tendo como missão contribuir para os ganhos em saúde pública, através do seu Departamento de Alimentação e Nutrição, monitoriza dados relativos aos géneros alimentícios presentes no mercado português, nomeadamente os referentes à composição nutricional, contribuindo para, com o conhecimento da realidade nacional, apoiar as autoridades de saúde na definição e avaliação das medidas de saúde pública relacionadas com a alimentação.

_Objetivo

Monitorizar a energia e os teores de açúcar e sal nas categorias de alimentos cereais de pequeno-almoço e bolachas disponíveis no mercado português. Procedeu-se à comparação dos teores de sal e açúcar obtidos na monitorização dos produtos com as metas preconizadas para 2020, pela Estratégia Integrada para a Alimentação Saudável.

_Material e métodos

Procedeu-se à recolha dos teores de açúcar, de sal e o valor energético dos produtos correspondentes às categorias alimentares cereais de pequeno-almoço e bolachas. Esta recolha de dados foi efetuada através da consulta da informação constante dos rótulos disponibilizados por duas cadeias de supermercados a operar no mercado português nas respetivas lojas *online*. A recolha de dados ocorreu durante o ano de 2019.

Os valores obtidos foram comparados com as recomendações apresentadas na EIPAS, de teor de açúcar de 5 g/100 g e de teor de sal de 0,3 g/100 g.

Para avaliar a relação entre os teores de sal e açúcar em bolachas foram excluídos os dois valores mais elevados de teor de sal (>3,0 g/100 g), por se considerarem *outliers*.

_Resultados e discussão

Recolheram-se os dados de composição relativos à energia, teor de açúcar e de sal de 702 bolachas e de 193 cereais de pequeno-almoço. Destes só foram considerados os que apresentavam, na informação nutricional *online*, valores para os três parâmetros indicados.

Bolachas

O número total de bolachas consideradas para este trabalho foi 594 das 702 inicialmente identificadas, correspondendo a 15,4% de produtos que não apresentam a informação nutricional completa para os parâmetros considerados: energia, açúcar e sal.

Foram determinados os parâmetros estatísticos média, mediana, máximo e mínimo dos teores de energia, açúcar e sal, em bolachas, para o conjunto das 594 amostras consideradas ([tabela 1](#)).

Tabela 1: Média, mediana, máximo e mínimo dos teores de energia, açúcar e sal, em bolachas (n=594).

	Energia (kcal/100 g)	Açúcar (g/100 g)	Sal (g/100 g)
Média	465	22,9	0,9
Mediana	470	25,0	0,7
Máximo	848	66,0	11,0
Mínimo	91	0,0	0,0

Relativamente ao teor de açúcar ([gráfico 1](#)), tendo-se observado uma mediana de 25,0 g/100 g, superior ao objetivo proposto na EIPAS de 5 g de açúcar/100 g.

No que respeita ao teor de sal ([gráfico 2](#)), tendo-se obtido a mediana de 0,7 g/100 g, também superior ao objetivo proposto na EIPAS de 0,3 g de sal/100 g.

Foi também avaliado o valor energético (energia), em que se verifica uma mediana de 470 kcal/100 g. No entanto, a EIPAS não define um limite máximo para a energia.

Da totalidade dos produtos considerados, na categoria bolachas, 113 (19,0%) cumprem a recomendação da EIPAS de teor máximo de açúcar de 5 g/100 g, 77 (13,0%) cumprem a recomendação teor máximo de sal de 0,3 g/100 g. No entanto, apenas 10 (1,7%) cumprem simultaneamente ambos os teores máximos (açúcar e sal) preconizados pela EIPAS.

No [gráfico 3](#) estão representados os teores de sal e açúcar para cada amostra de bolachas.



Gráfico 1: Teor de açúcar em bolachas.

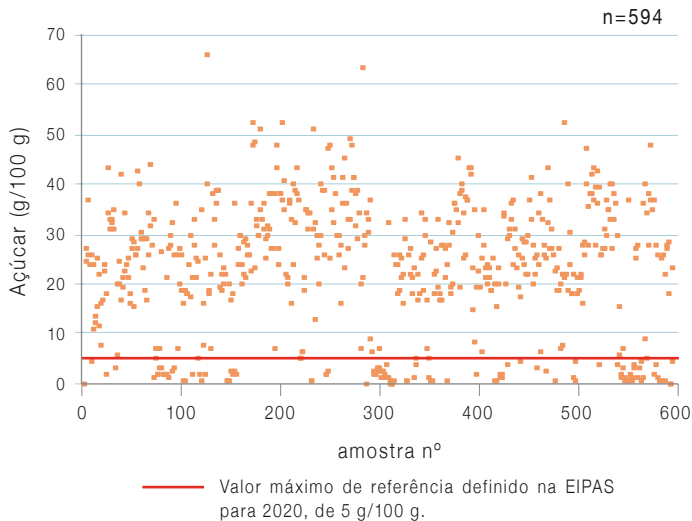


Gráfico 2: Teor de sal em bolachas.

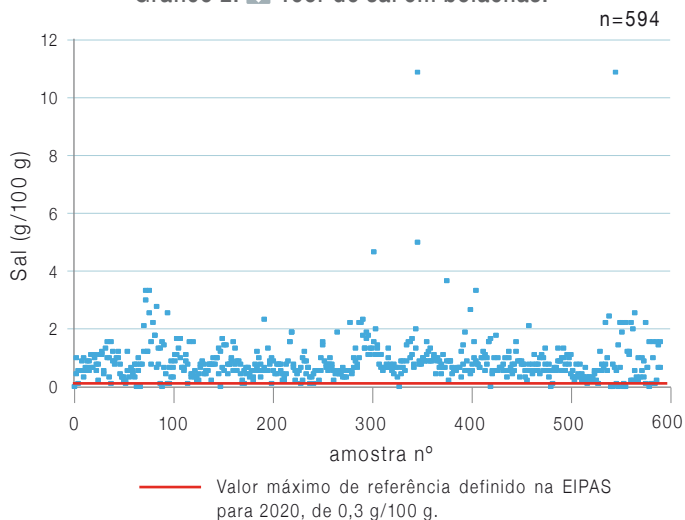
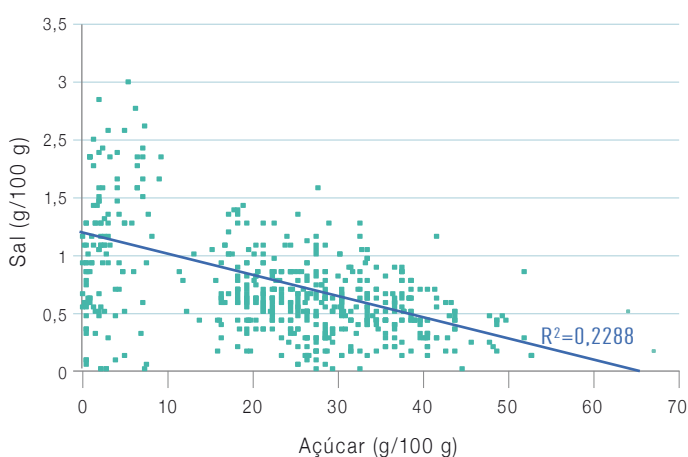


Gráfico 3: Relação entre o teor de açúcar e o teor de sal em bolachas.



Aparentemente existe uma relação inversa (não linear, $r^2 = 0,2288$) entre o teor de sal e o de açúcar. No [gráfico 3](#) encontra-se a representação gráfica desta relação.

Cereais de pequeno-almoço

O número total de cereais de pequeno-almoço considerados para este trabalho foi de 167 das 193 amostras inicialmente identificadas, correspondendo a 13,5% de produtos que não apresentam a informação nutricional completa para os parâmetros considerados: energia, açúcar e sal.

Foram determinados os parâmetros estatísticos média, mediana, máximo e mínimo dos teores de energia, açúcar e sal, em cereais de pequeno-almoço, para o conjunto das 167 amostras consideradas ([tabela 2](#)).

Tabela 2: Média, mediana, máximo e mínimo dos teores de energia, açúcar e sal, em cereais de pequeno-almoço (n=167).

	Energia (kcal/100 g)	Açúcar (g/100 g)	Sal (g/100 g)
Média	395	19,7	0,6
Mediana	391	21,0	0,5
Máximo	504	48,0	3,0
Mínimo	114	0,7	0,0

Relativamente ao teor de açúcar ([gráfico 4](#)), com a mediana de 21,0 g/100 g, bastante superior ao objetivo proposto na EIPAS de 5 g/100 g.

No que respeita ao teor de sal ([gráfico 5](#)), com a mediana de 0,5 g/100 g, também superior ao objetivo proposto na EIPAS de 0,3 g de açúcar/100 g.

Foi também avaliado o valor energético (energia), em que se verifica uma mediana de 391 Kcal/100 g. No entanto, a EIPAS não define um limite máximo para a energia.

Da totalidade dos produtos considerados, na categoria cereais de pequeno-almoço, 25 (15,0%) cumprem a recomendação da EIPAS do teor máximo de açúcar de 5 g/100 g, 63 (37,7%) cumprem a recomendação do teor máximo de sal de 0,3 g/100 g. No entanto, apenas 18 (10,8%) cumprem ambos os teores máximos (açúcar e sal) preconizados pela EIPAS.



Gráfico 4: ↓ Teor de açúcar em cereais de pequeno-almoço.

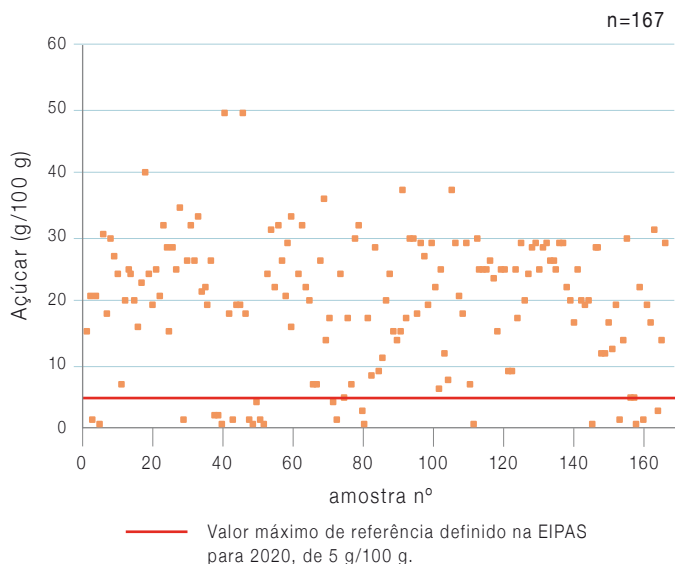
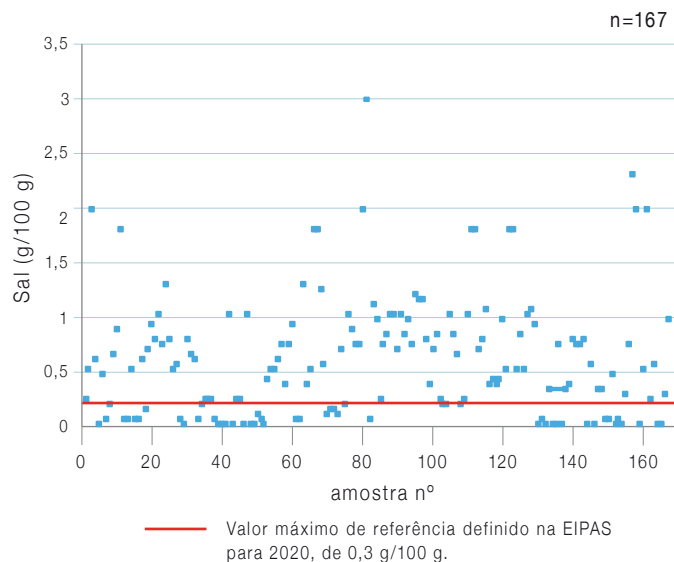


Gráfico 5: ↓ Teor de sal em cereais de pequeno-almoço.



Procurou-se ainda verificar a eventual existência de relação entre os teores de sal e de açúcar bem como a relação entre o valor energético e os teores de sal e de açúcar, mas ao contrário do que sucedeu com as bolachas, não parece haver uma relação (ajuste linear, $r^2 = 0,0198$).

Conclusões

As bolachas disponíveis no mercado eletrónico das grandes superfícies em Portugal no ano de 2019 tinham um teor de açúcar (mediana 25,0 g/100 g) ligeiramente superior ao dos cereais de pequeno-almoço (mediana 21,0 g/100 g), e bastante superior ao preconizado na EIPAS (5 g/100 g). No que respeita ao teor de sal, era também mais elevado nas bolachas, com uma mediana de 0,7 g/100 g face a 0,5 g/100 g nos cereais de pequeno-almoço, ambos superiores ao valor referido na EIPAS (0,3 g/100 g). O valor energético das bolachas era superior ao dos cereais de pequeno-almoço, com medianas de 470 e 391 kcal/100 g, respetivamente. Também a análise dos valores máximos encontrados reforça a indicação obtida da análise das medianas, apresentando-se as bolachas com teores máximos mais altos do que os cereais de pequeno-almoço para todos os parâmetros considerados.

O facto de 10,8% dos cereais de pequeno-almoço e 1,7% das bolachas apresentarem teores de açúcar e sal, simultanea-

mente, inferiores ou iguais aos valores referidos na EIPAS, demonstra que é possível atingir as metas propostas, pelo menos para algumas subcategorias destes produtos e que é desejável uma reformulação progressiva pela indústria, tendo em consideração o elevado consumo destes alimentos.

Através da recolha dos dados de rotulagem nas lojas *online* verificou-se que 15% da totalidade dos produtos selecionados não apresentavam pelo menos uma das informações necessárias para a realização deste trabalho (energia, teor de açúcar e teor de sal), obrigatórias ao abrigo do Regulamento (UE) n.º 1169/2011, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011. Esta taxa de incumprimento será potencialmente superior para estes produtos comercializados *online*, se se considerarem todos os restantes elementos obrigatórios de rotulagem.

Referências bibliográficas:

- (1) Lopes C, Torres D, Oliveira A, et al. Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016: relatório de resultados - Parte II (versão atualizada v.1.5 setembro 2017). Porto: Universidade do Porto, 2017. https://ian-af.up.pt/sites/default/files/IAN-AF%20Brochura%20de%20resultados_0.pdf
- (2) World Health Organization. Fact-sheets: Healthy Diet. Geneve: WHO, 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>
- (3) Despacho n.º 11418/2017. DR 2ª série de 2017-12-29, n.º 249:29595-8. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). <https://dre.pt/pesquisa/-/search/114424591/details/normal?l=1>

Exposição precoce a micotoxinas: o contributo dos projetos MYCOMIX e earlyMYCO

Early-life exposure to mycotoxins: the contribution of MYCOMIX and earlyMYCO projects

Paula Alvito^{1,2}, Patricia Bastos-Amador³, Elsa L. Duarte⁴, Manuela Ferreira^{3,5}, Carla Nunes⁶, Carla Martins^{1,2,6}, Ricardo Assunção^{1,2,6}

paula.alvito@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

(3) Centro Champalimaud, Fundação Champalimaud, Lisboa, Portugal

(4) Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, Universidade de Évora, Évora, Portugal

(5) Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

(6) Centro de Investigação em Saúde Pública. Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

Resumo

A exposição a contaminantes químicos nos primeiros 1000 dias de vida tem sido associada a alterações de saúde, constituindo um domínio emergente de pesquisa fundamental para o conhecimento do exposoma humano. As micotoxinas produzidas por fungos integram a lista de contaminantes químicos tóxicos presentes nos alimentos e têm efeitos carcinogénicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos e imunossupressores. A mucosa intestinal é a primeira barreira biológica encontrada pelos alimentos contaminados por micotoxinas após a ingestão, sendo pouco conhecidos os potenciais efeitos decorrentes de uma exposição humana precoce a estes contaminantes. Estudos recentes obtidos no âmbito do projeto MYCOMIX evidenciaram que as crianças portuguesas até aos 3 anos estão expostas a múltiplas micotoxinas através do consumo de alimentos à base de cereais, o que constitui um risco potencial para a sua saúde. Este estudo revelou a ocorrência de ocratoxina A, zearalenona e deoxinivalenol em, respetivamente, 65%, 48% e 44% das amostras analisadas, confirmando a exposição das crianças a várias micotoxinas através da alimentação. Em virtude da toxicidade associada a estes contaminantes e à particular vulnerabilidade deste grupo populacional, estes resultados abrem novas perspetivas de investigação e reforçam a necessidade de avaliar a exposição precoce das crianças a micotoxinas e o seu potencial impacto na saúde, o que constitui o principal objetivo do projeto earlyMYCO.

Abstract

Exposure to hazardous chemicals during the first 1000 days of life has been linked to an increased risk of a number of health disorders. Early-life exposure to chemicals is an emerging research field that needs to be explored to contribute to the understanding of human exposome. Mycotoxins are food chemical contaminants, well known for their carcinogenic, nephrotoxic, hepatotoxic and immunosuppressive effects. Intestinal mucosa is the first biological barrier encountered by ingested mycotoxins and potential consequences of an early-life exposure to these compounds is poorly documented. Recent studies obtained under the MYCOMIX project showed that Portuguese children up to 3 years old are exposed to multiple mycotoxins through consumption of cereal-based foods, which constitutes a potential health threat. This study revealed the occurrence of ochratoxin A, zearalenone and

deoxynivalenol in, respectively, 65%, 48% and 44% of the analyzed samples, confirming children exposure to several mycotoxins through food. Given the toxicity of these compounds and that children are a particularly vulnerable group, there is an urgent need to assess the impact of early-life exposure to mycotoxins and their potential impact on human health, which is the main goal of earlyMYCO project.

Introdução

A exposição a contaminantes nos primeiros 1000 dias de vida tem sido associada a alterações de saúde, constituindo um domínio emergente de pesquisa ⁽¹⁾. Os primeiros 1000 dias de vida, que incluem os primeiros três anos de vida, desde o momento da conceção até aos dois anos de idade, constituem um período determinante durante o qual ocorrem processos cruciais de desenvolvimento e crescimento da criança. O que acontece durante este período é fundamental para a saúde do lactente e criança, mas também a longo prazo para a saúde do futuro adulto, afetando o seu desenvolvimento imunitário, metabólico e a sua microbiota residente. Os avanços na investigação têm demonstrado que a exposição a determinados compostos durante a vida pré-natal ou pós-natal poderá estar associada ao desenvolvimento de doenças que incluem asma, leucemia, obesidade, doenças cardiovasculares, entre outras ⁽²⁾. É, pois, urgente avaliar o impacto da exposição precoce a contaminantes, como as micotoxinas, na saúde humana.

As micotoxinas são toxinas naturais produzidas por fungos, resistentes ao processamento industrial e culinário e podem



ter consequências para a saúde humana, estando associadas a efeitos carcinogénicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos, estrogénicos e imunotóxicos (3,4). Uma das principais vias de exposição a estes contaminantes é a alimentação pelo que se torna importante avaliar o seu impacto no trato gastrointestinal (TGI) (5). O intestino constitui o maior compartimento do sistema imunitário representando 70% das defesas imunológicas do organismo e é a primeira barreira de defesa do indivíduo encontrada pelos contaminantes presentes nos alimentos ingeridos, tais como as micotoxinas (6). Devido à sua prevalência em produtos alimentares, as micotoxinas podem afetar a homeostase intestinal, efeito muitas vezes negligenciado, podendo determinar os estados de saúde e doença (7).

_Objetivos

Neste estudo pretendeu-se quantificar os teores de 13 micotoxinas em 52 amostras de alimentos à base de cereais, destinados ao consumo para crianças, analisadas no âmbito do projeto MYCOMIX e apresentar os objetivos do projeto earlyMYCO, a fim de contribuir para avaliar os níveis de exposição de crianças a micotoxinas, durante o seu desenvolvimento e numa fase precoce da vida.

_Materiais e métodos

Para o estudo da ocorrência de micotoxinas em alimentos infantis, foram adquiridos entre 2014 e 2015, em supermercados da Área Metropolitana de Lisboa, 52 cereais e produtos derivados, comercializados principalmente para crianças: 26 cereais pequeno-almoço, 20 cereais infantis e seis bolachas. Posteriormente, procedeu-se à determinação analítica de 13 micotoxinas nestes produtos, nomeadamente, aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁), ocratoxina A (OTA), fumonisinas (FB₁, FB₂), tricotecenos (DON, nivale-nol-NIV; toxina T-2 e toxina HT-2) e zearalenona (ZEN). A determinação analítica foi efetuada por diferentes técnicas cromatográficas: as aflatoxinas e a OTA foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por fluorescência (HPLC-FLD), os tricotecenos por cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa (GC-MS), e as fumonisinas e zearalenona por cromatogra-

fia líquida com deteção por espectrometria de massa (LC-MS/MS), conforme descrito em Martins e colaboradores (8).

_Resultados e discussão

A **tabela 1** refere a percentagem de amostras positivas (teores superiores ao limite de deteção) e valores médios (µg/kg) para cada toxina nas categorias de cereais pequeno-almoço, cereais infantis e bolachas. Foram identificadas todas as toxinas analisadas com exceção da AFG₂ e das toxinas T-2 e HT-2. Quarenta e nove das 52 amostras (94%) apresentaram pelo menos uma das toxinas analisadas. O presente estudo revelou a ocorrência de OTA, ZEN e DON, respetivamente, em 65%, 48% e 44% das amostras analisadas, com teores médios máximos de 95,9 µg/kg para a DON, sendo a totalidade dos valores encontrados inferiores aos legislados (quando existentes). Estes resultados confirmam a presença de micotoxinas nos produtos alimentares vendidos na Área Metropolitana de Lisboa, no período de tempo reportado, sugerindo uma exposição das crianças estudadas a várias micotoxinas, através do consumo dos alimentos à base de cereais analisados. As micotoxinas detetadas incluíram AFTs (sobretudo AFB₁), OTA e FMs, DON, ZEN e NIV, considerados, respetivamente, como cancerígenos (grupo 1), possíveis cancerígenos (grupo 2B), e sem evidência de carcinogenicidade para humanos (grupo 3), conforme classificação da Agência Internacional de Investigação em Cancro (IARC, na sigla em inglês) (9).

Os resultados obtidos no âmbito do projeto MYCOMIX – Estudo exploratório dos efeitos tóxicos de misturas de micotoxinas em alimentos para crianças e potencial impacto na saúde (<https://www.youtube.com/watch?v=CsKaz3mt2J4>), e apresentados nesta tabela, revelaram que as crianças portuguesas até aos 3 anos de idade estão expostas a múltiplas micotoxinas através do consumo de alimentos à base de cereais (12), o que constitui um risco potencial para a sua saúde. Os resultados de avaliação da exposição e a caracterização do risco indicaram que, embora os teores de micotoxinas detetados nos alimentos analisados fossem inferiores aos legislados, a presença de algumas micotoxinas, nomeadamente de aflatoxinas (sobretudo a aflatoxina B₁, um dos



Tabela 1: Ocorrência de micotoxinas em alimentos para crianças à base de cereais, comercializados na Área Metropolitana de Lisboa e analisados no âmbito do projeto MYCOMIX.

Cereais e derivados	Cereais pequeno-almoço (n=26)				Cereais infantis (n=20)				Bolachas (n=6)				Nº total de amostras (n=52)
Micotoxinas	Amostras positivas (%)	Média (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Teor máximo admissível (µg/kg) ⁽¹⁰⁾	Amostras positivas (%)	Média (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Teor máximo admissível (µg/kg) ⁽¹⁰⁾	Amostras positivas (%)	Média (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Teor máximo admissível (µg/kg) ⁽¹⁰⁾	Amostras positivas (%)
AFB ₁	19 (73%)	0,036	0,130	2,0	0	ND	ND	0,10	0	ND	ND	2,0	19 (37%)
AFB ₂	12 (46%)	0,007	0,011	–	1 (5%)	NA	0,002	–	0	ND	ND	–	13 (25%)
AFG ₁	1 (4%)	NA	0,017	–	2 (10%)	0,014	0,016	–	0	ND	ND	–	3 (6%)
AFG ₂	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	0
AFM ₁	3 (12%)	0,017	0,024	–	8 (40%)	0,068	0,190	–	0	ND	ND	–	11(21%)
AFTs	19 (73%)	NA	NA	–	9 (45%)	NA	NA	–	0	NA	NA	–	28 (54%)
OTA	18 (69%)	0,047	0,100	3,0	10 (50%)	0,061 ⁽¹¹⁾	0,263 ⁽¹¹⁾	0,50	6 (100%)	0,086	0,134	3,0	34 (65%)
FB ₁	15 (58%)	22,00	67,00	–	7 (35%)	0,44	0,86	–	0	ND	ND	–	22 (42%)
FB ₂	10 (39%)	5,10	14,00	–	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	10 (19%)
FMs	15 (58%)	NA	NA	200	7 (35%)	NA	NA	–	0	NA	NA	–	22 (42%)
ZEN	19 (73%)	1,20	5,61	50	6 (30%)	0,48	0,98	20	0	ND	ND	50	25 (48%)
DON	16 (62%)	95,9	207,8	500	4 (20%)	41,8	71,0	200	3 (50%)	43,8	73,3	500	23 (44%)
NIV	1 (4%)	NA	27,1	–	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	1 (2%)
T-2	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	0
HT-2	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	0

ND, não detetado; NA, não aplicável; AFM₁, aflatoxina M₁; AFB₁, aflatoxina B₁; AFB₂, aflatoxina B₂; AFG₁, aflatoxina G₁; AFG₂, aflatoxina G₂; AFTs, aflatoxinas; OTA, ocratoxina A; FB₁, fumonisina B₁; FB₂, fumonisina B₂; FMs, fumonisinas; DON, deoxinivalenol; NIV, nivalenol; T-2, toxina T-2; HT-2, toxina HT-2; ZEN, zearalenona.

mais potentes hepatotóxicos conhecidos), poderiam estar associadas a um risco significativo para a saúde das crianças ^(12,13).

Verificou-se ainda que os valores mais elevados de ingestão diária eram atribuídos à micotoxina desoxinivalenol (DON), que se sabe ter efeitos imunológicos e gastrointestinais, o que reforça a necessidade de avaliar o impacto das micotoxinas no TGI, em particular em populações vulneráveis como as crianças.

A toxicidade das micotoxinas detetadas nos produtos alimentares, associada ao facto de as crianças constituírem uma faixa particularmente vulnerável da população, conduziu à necessidade urgente de desenvolver um novo projeto que visasse avaliar o impacto na saúde da exposição precoce das crianças a estes contaminantes químicos. Neste sentido, está em curso o projeto earlyMYCO – Exposição precoce a micotoxinas e potencial impacto na saúde. Segundo a hipótese colocada no projeto, a exposição a micotoxinas tem impacto no desenvolvimento do sistema imunitário intestinal do feto e



do lactente, na defesa intestinal contra agentes patogénicos e no estabelecimento da microbiota intestinal. Assim, este projeto irá integrar a avaliação da exposição a micotoxinas de pares mãe-filho(s) através da biomonitorização, avaliação do impacto de micotoxinas no sistema imunitário intestinal e microbiota intestinal através de ensaios toxicológicos *in vivo* (em murganhos/ratinhos), e caracterização do risco e impacto na saúde associados à exposição a estes contaminantes, reunindo dados toxicológicos de exposição e *in vivo*. Estes tópicos constituirão os três principais pilares deste projeto, conforme ilustrado no quadro conceptual (figura 1).

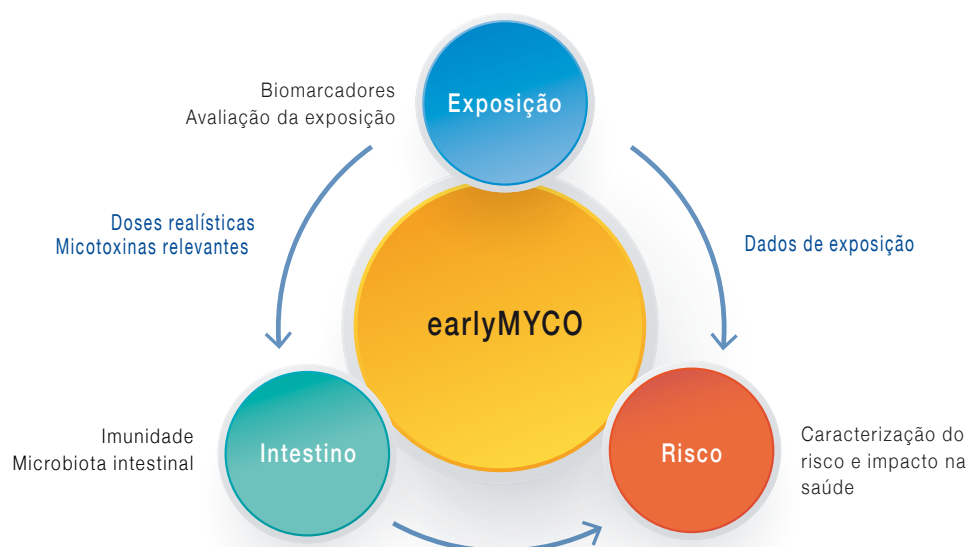
Por forma a avaliar esta hipótese, o projeto earlyMYCO pretende responder a várias questões: i) estarão as grávidas e lactentes até aos 6 meses de idade expostos a micotoxinas? ii) Esta exposição representa um risco para a sua saúde? iii) A exposição precoce a micotoxinas produz alterações no desenvolvimento do sistema imunitário gastrointestinal? e iv) Qual é a carga de doença (*burden of disease*) atribuída a esta exposição? Para responder a estas questões, serão desenvolvidas atividades em cinco domínios: i) recrutamento de grávidas e lactentes, colheita de alimentos e amostras biológicas; ii) avaliação da exposição a micotoxinas na população recrutada; iii) ensaios experimentais *in vivo* para avaliar os

efeitos da exposição precoce a micotoxinas no sistema imunitário gastrointestinal; iv) abordagem metagenómica para avaliar os efeitos da exposição precoce a micotoxinas na microbiota intestinal; e v) integração final dos dados epidemiológicos e experimentais para caracterizar o risco e impacto na saúde associado à exposição precoce a micotoxinas.

_Conclusões

Os resultados obtidos no âmbito do projeto MYCOMIX confirmaram a exposição das crianças portuguesas a várias micotoxinas, como AFTs (sobretudo AFB₁), OTA e FMs, DON, ZEN e NIV, compostos classificados pela IARC relativamente à sua atividade carcinogénica em humanos. Face à toxicidade associada a estas micotoxinas, investigação futura deverá permitir confirmar o cenário obtido neste projeto. Adicionalmente, o projeto MYCOMIX identificou a DON como a micotoxina com valores mais elevados de ingestão diária através do consumo de produtos à base de cereais. Dada a associação habitualmente identificada entre a exposição a esta micotoxina e os efeitos para a saúde, estes resultados sugerem uma possível ocorrência de alterações ao nível do sistema imunitário e gastrointestinal nos indivíduos expostos. As crianças constituem uma população particularmente vulnerável, pelo

Figura 1: ➡ Descrição conceptual do Projeto earlyMYCO.





que a sua proteção deverá constituir uma prioridade relativamente à implementação de medidas de proteção da saúde pública. Os resultados obtidos abrem assim novas perspectivas para a investigação da exposição humana a micotoxinas e o seu impacto na saúde num período precoce da vida, objetivo do presente projeto earlyMYCO.

Financiamento:

Projeto MYCOMIX, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/DTP-FT0/0417/2012).

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do projeto earlyMYCO (PTDC/MEDTOX/28762/2017) e do CESAM (UIDP/50017/2020+UIDB/50017/2020).

Artigo baseado no original publicado em:

Assunção R, Martins C, Vasco E, Jager A, Oliveira C, Cunha SC, Fernandes JO, Nunes B, Loureiro S, Alvito P. *Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins – An overview of risk assessment under MYCOMIX project*. Food Chem Toxicol. 2018;118:399-408. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.040>

Referências bibliográficas:

- (1) Moore TG, Arefadib N, Deery A, et al. The First Thousand Days: an Evidence Paper. Parkville, Victoria: Centre for Community Child Health, Murdoch Children's Research Institute, 2017. <https://goo.gl/Foaw1C>
- (2) Arbuckle TE, Fraser WD, Fisher M, et al. Cohort profile: the maternal-infant research on environmental chemicals research platform. Paediatr Perinat Epidemiol. 2013;27(4):415-25. <https://doi.org/10.1111/ppe.12061>
- (3) Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev. 2003;16(3):497-516. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.3.497-516.2003>
- (4) Alvito P. Alterações Do Estado de Saúde Associadas à Alimentação: Contaminação Química - Micotoxinas. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo, 2014. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2757>
- (5) Alassane-Kpembi I, Pinton P, Oswald IP. Effects of Mycotoxins on the Intestine. Toxins (Basel). 2019;11(3):159. Published 2019 Mar 13. <https://doi.org/10.3390/toxins11030159>
- (6) Grenier B, Applegate TJ. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. Toxins (Basel). 2013;5(2):396-430. <https://doi.org/10.3390/toxins5020396>
- (7) Assunção R, Alvito P, Kleiveland CR, et al. Characterization of in vitro effects of patulin on intestinal epithelial and immune cells. Toxicol Lett. 2016;250-251:47-56. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.04.007>
- (8) Martins C, Assunção R, Cunha SC, et al. Assessment of multiple mycotoxins in breakfast cereals available in the Portuguese market. Food Chem. 2018;239:132-140. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.088>
- (9) Ostry V, Malir F, Toman J, et al. Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification. Mycotoxin Res. 2017;33(1):65-73. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>
- (10) União Europeia. Regulamento (CE) n.º 1831/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. JO 20.12.2006:L 364/5-24. <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1831/oj>
- (11) Assunção R, Martins C, Dupont D, et al. Patulin and ochratoxin A co-occurrence and their bioaccessibility in processed cereal-based foods: a contribution for Portuguese children risk assessment. Food Chem Toxicol. 2016;96:205-14. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.004>
- (12) Assunção R, Martins C, Vasco E, et al. Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins - An overview of risk assessment under MYCOMIX project. Food Chem Toxicol. 2018;118:399-408. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.040>
- (13) Assunção R, Vasco E, Nunes B, et al. Single-compound and cumulative risk assessment of mycotoxins present in breakfast cereals consumed by children from Lisbon region, Portugal. Food Chem Toxicol. 2015;86:274-81. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.017>

Métodos para estudos populacionais de associação genótipo-fenótipo com base em genes candidatos

Methods for candidate gene genotype-phenotype association studies in populations

Susana David^{1,2}

suzana.david@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Instituto de Investigação do Medicamento, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Resumo

Os estudos populacionais de associação genótipo-fenótipo com base em genes candidatos (*Candidate gene Association Studies* – CGAS) conhecem um recente incremento resultante das abordagens baseadas na sequenciação de nova geração. Este artigo resume os princípios gerais do método CGAS que tem vindo a contribuir para a identificação de variantes genéticas causais e para a nossa compreensão da arquitetura genética das doenças humanas.

Abstract

Population based genotype-phenotype association studies using the candidate gene approach (*Candidate Gene Association Studies* – CGAS) have seen a recent increase resulting from the use of next generation sequencing methodologies. This article summarizes the general principles of CGAS, that have contributed to the identification of causal genetic variants and to our understanding of the genetic architecture of human diseases.

Introdução

Os estudos populacionais de associação genótipo-fenótipo com base em genes candidatos (*Candidate gene Association Studies* – CGAS), tais como os estudos de associação do genoma completo (*Whole genome Association Studies* – WGAS), integram o âmbito da epidemiologia genética, uma vasta área de interface científica nas Ciências da Saúde. Estes estudos têm vindo a contribuir significativamente para a identificação de variantes genéticas causais e para o aumento da nossa compreensão da arquitetura genética das doenças humanas.

Vários fatores contribuem para o recente incremento da utilização do CGAS em estudos populacionais, sendo que um dos maiores incentivos resulta das abordagens baseadas na

sequenciação de nova geração (*Next generation sequencing* – NGS), que se têm revelado eficazes na determinação das sequências de ADN dos genes (regiões codificantes, regiões flanqueadoras, locais de *splicing* e locais regulatórios) e de regiões não codificantes. Este avanço tecnológico foi determinante para a genética humana na encruzilhada da investigação em genética clínica com as abordagens baseadas em estudos populacionais.

Objetivo

Este artigo resume os princípios gerais do método CGAS aplicado a estudos populacionais como um incentivo para esta abordagem no contexto favorável atual.

Método CGAS

CGAS versus WGAS

Estudos de associação genótipo-fenótipo recorrem tipicamente a métodos de CGAS ou WGAS. Ambas as abordagens resultaram em importantes contributos para o conjunto de modificadores genéticos hoje conhecidos em medicina humana. Considerando que WGAS é uma estratégia de associação livre de hipóteses *a priori* e não direcionada para a totalidade do genoma, a abordagem CGAS do gene candidato é racional na medida em que o(s) gene(s) e a(s) variante(s) são selecionados com base numa hipótese *a priori* sobre a sua implicação causal na doença (7). Estes estudos envolvem a genotipagem destes genes candidatos em grupos de indivíduos com fenótipos cuidadosamente definidos, e a análise funcional subsequente de variantes identificadas como estando em associação.



Etapas na realização de CGAS

Existem várias etapas críticas para os CGAS (figura 1). Estas incluem a elaboração do protocolo científico, o projeto de estudo, a definição de fenótipo, a seleção dos genes candidatos, a seleção de variantes candidatas, a análise de haplótipos e de desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium* – LD), a estimativa do tamanho de amostra, a significância estatística e valor-*p*, o controle de qualidade dos dados de genotipagem, a análise exploratória dos dados (AED), os testes de associação estatística e a subsequente análise funcional. Estas etapas são seguidamente detalhadas:

■ O protocolo científico

O protocolo científico, estabelecido antes da realização dos testes de associação, deve especificar a pergunta científica e os objetivos, o desenho do estudo, a hipótese *a priori* e a lógica do estudo, incluindo a definição do(s) fenótipo(s) e

a seleção dos genes candidatos e/ou variantes. Deve ainda incluir os testes estatísticos que serão utilizados na análise de associação, a estimativa do tamanho da amostra e a análise do seu poder estatístico.

■ Desenho do estudo

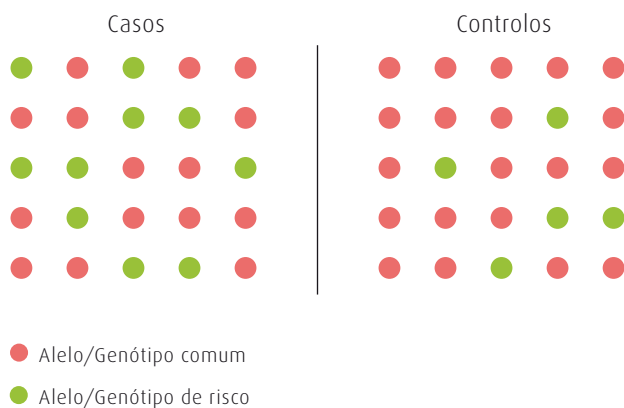
Quer a abordagem seja a de um estudo de caso-controlo ou de coorte, indivíduos afetados são comparados a indivíduos não afetados. Os estudos de caso-controlo são retrospectivos, sendo menos caros e de duração mais curta do que os estudos de coorte. Por sua vez, estes últimos são geralmente prospectivos e de longa duração. A implicação de variantes genéticas na doença requer que o alelo de risco seja mais frequente, do que seria de esperar apenas pelo acaso, no grupo de indivíduos afetados em comparação com o grupo de indivíduos não afetados (figura 2).

Figura 1: ⬇ Etapas dos estudos populacionais de associação genótipo-fenótipo com base em genes candidatos.





Figura 2: Implicação de variantes genéticas na doença – alelo de risco é mais frequente no grupo de indivíduos afetados (casos) do que no grupo de indivíduos não afetados (controles).



Definição de fenótipo

O objetivo dos CGAS é detetar a base molecular de uma doença ou ainda das suas demais características biológicas podendo ser traduzidas em termos fenotípicos, como recentemente exemplificámos (12). A seleção do fenótipo é uma etapa decisiva porque diferentes definições de fenótipo podem levar a resultados diferentes (11). Da mesma forma, para garantir o sucesso de um estudo poderá não ser suficiente garantir apenas um tamanho de amostra adequado para os testes a realizar. Será também necessário todo o cuidado para reduzir a heterogeneidade nas amostras, resultante, por exemplo, da origem geográfica da população, de fatores ambientais e de diferenças entre grupos de doentes, e das opções de tratamento entre hospitais e serviços hospitalares. Os controles (grupo de indivíduos não afetados) são selecionados de forma a serem o mais parecidos possível com os casos (grupo de indivíduos afetados), relativamente a todos os atributos relevantes, exceto no caso de não serem afetados ou serem afetados mas de forma diferente. Limitar a definição da doença a um subfenótipo com base em características clínicas particulares também pode ser útil para reduzir a heterogeneidade. Têm sido utilizadas com sucesso várias soluções para enriquecer o alelo de risco no grupo dos casos em estudo, incluindo a seleção de formas mais graves da doença, *i.e.*, "fenótipos extremos", a seleção de

formas "proximais" da função do gene (mais "biológicas"), ou de formas relacionadas com o início precoce da doença em que se pode esperar uma maior penetrância da variante (proporção de indivíduos portadores do genótipo que também expressam a característica associada) (figura 2).

Seleção de genes candidatos

Tal como a definição do fenótipo, a seleção criteriosa de genes candidatos é um dos maiores desafios na utilização de CGAS. Como suporte nas estratégias de seleção, várias ferramentas de bioinformática estão disponíveis (8). Estas incluem ferramentas para pesquisar informações disponíveis na literatura e analisar as vias biológicas participantes, para a priorização dos genes, a análise funcional dos genes e das suas variantes e para explorar correlações entre genótipos e fenótipos. Aqui referimos o Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) ® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), que compila relações genótipo – fenótipo conhecidas (2). Para uma análise abrangente, que fornece informações gerais sobre a estrutura do gene, a expressão, as variantes transcritas, as proteínas codificadas, os elementos reguladores, os polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs) e a conservação evolutiva, referimos o Ensembl (<http://www.ensembl.org>) (5) e o UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) (6).

Seleção de variantes genéticas candidatas

A seleção de genes candidatos é frequentemente associada à seleção de variantes genéticas candidatas. O 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/>) (1) e a sua atualizada montagem do genoma humano, GRCh38 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/>) é um recurso importante que fornece aos investigadores frequências de alelos de SNPs num catálogo que abrange variantes de várias populações humanas.

Análise de haplótipos e desequilíbrio de ligação (LD)

O genoma humano contém um número importante de SNPs com tendência para a co-segregação, *i.e.*, serem herdados em conjunto, de modo que é conceptualmente possível selecionar um número limitado de SNPs, ou SNPs "marcadores" (*tag* SNPs), que, na sua totalidade, vão reter a grande parte



da variabilidade genética do conjunto (4,9). Um haplótipo é um conjunto de alelos em variantes genéticas, num único cromossoma, que estão suficientemente próximos para serem herdados em conjunto. O desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium* – LD) refere o facto de alelos específicos das variantes genéticas poderem co-ocorrer no mesmo haplótipo numa frequência maior de que a esperada ao acaso (10). Uma associação genótipo-fenótipo pode ser direta, quando o *locus tag* representa a própria mutação causal do fenótipo de doença em apreço, ou indireta, quando este está próximo e co-segrega com o *locus* da doença. No caso de uma associação indireta, para que a associação entre o alelo marcador e o estado da doença seja observada, os alelos da doença e do *locus tag* devem estar em LD.

■ Estimativa do tamanho da amostra

No teste estatístico, a análise de poder pode ser utilizada para obter uma estimativa do tamanho mínimo da amostra necessário para detetar uma associação, dado o nível de significância desejado, o tamanho do efeito esperado e o poder estatístico (*i.e.*, a probabilidade de detetar um efeito, se houver um efeito verdadeiro presente para detetar).

■ Significância estatística e valor-*p*

O valor-*p* (*p-value*), ou a probabilidade calculada num teste de hipótese, é a probabilidade de obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que a estatística observada, assumindo a hipótese nula como verdadeira. O resultado do teste é considerado estatisticamente significativo quando o valor de *p* é inferior a um nível predefinido de significância, ou probabilidade de um erro de tipo I, alfa (geralmente definido como 0,05).

■ Controlo de qualidade dos dados de genotipagem

A qualidade dos dados da genotipagem é fundamental para o sucesso de um CGAS. A qualidade do DNA é, claramente, um fator importante para garantir a qualidade da genotipagem. No entanto, como os atuais procedimentos de atribuição de SNP são automatizados, podem ser propensos à introdução de genótipos errôneos. Uma das principais advertências sobre esta situação é a não satisfação dos pressupostos

de Hardy-Weinberg (*Hardy-Weinberg equilibrium* – HWE). Assim, a verificação do HWE é frequentemente utilizada no sentido de alertar para possíveis problemas na qualidade da genotipagem.

■ Análise exploratória dos dados

A análise exploratória dos dados (AED) é uma etapa fundamental utilizada para identificar tendências nos dados, bem como possíveis deficiências no conjunto de dados. A AED inclui a avaliação da qualidade dos dados de genotipagem e é útil na seleção de estratégias para aumentar a potência do estudo, por exemplo, reduzindo o número de testes a efetuar. Pode assim ser evitado o problema dos testes múltiplos que ocorre quando muitos testes de hipótese são realizados sobre a mesma amostra, o que pode levar a um aumento de resultados falso positivos (11).

■ Testes estatísticos

Os métodos estatísticos para testar uma possível associação estão rigorosamente descritos (11). Assim, a implicação de variantes genéticas na doença requer que o alelo de risco seja mais frequente, do que aquilo que seria de esperar apenas pelo acaso, no grupo de indivíduos afetados (casos) em comparação com o grupo de indivíduos não afetados (controles). Inversamente, a frequência da variante deverá ser mais baixa no grupo controlo (indivíduos não afetados), bem como na população geral em que o estudo se realiza, assumindo um valor consistente com o tipo de hereditariedade proposto. Em regra, os resultados das análises estatísticas devem ser relatados com a medida do efeito correspondente e o intervalo de confiança apropriado para a medida de efeito subjacente.

■ Meta-análise

A meta-análise é um elemento de uma revisão sistemática, embora nem todas as revisões sistemáticas incluam uma meta-análise. A meta-análise é um método estatístico de análise de uma grande coleção de resultados de vários estudos científicos independentes. A meta-análise pode ser um recurso, com boa relação custo-benefício, para integrar os resultados de vários estudos e aumentar o seu poder estatístico.



■ *Análise funcional*

Quando o critério de significância estatística de uma associação, não é suficiente para implicar uma relação de causalidade, será necessário realizar uma compilação abrangente de evidências de fontes genéticas, bioinformáticas e experimentais para a validação da hipótese causal (7).

■ *Conclusão*

A epidemiologia genética, por meio da seleção de “novos” genes e variantes candidatos, a análise funcional destes e a análise das vias biológicas em que participam, tem vindo a aumentar a nossa compreensão das doenças humanas. A utilização generalizada dos estudos de associação genótipo-fenótipo, CGAS e WGAS, mudou o paradigma dos estudos convencionais de agregação familiar para os estudos populacionais. Houve, assim, uma evolução dos conceitos Mendelianos, de base monogénica com total penetrância e uma relação causal clara, para a integração de distúrbios complexos resultantes de componentes poligénicos ou monogénico geneticamente heterogêneos mas fisiologicamente homogêneos, de baixa penetrância (3). Espera-se que num futuro próximo estes desenvolvimentos possam ainda contribuir para novas intervenções em saúde, incluindo no diagnóstico, na previsão do risco de doença, na prevenção, na tomada de decisões terapêuticas, na avaliação da resposta terapêutica e no prognóstico, assim como no cumprimento das metas de saúde pública (iniciativa da OMS Human Genomics in Global Health, <https://www.who.int/genomics/about/en/>).

- (5) Hubbard TJP, Aken BL, Ayling S, et al. Ensembl 2009. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(suppl 1):D690–D697. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn828>
- (6) Kuhn RM, Karolchik D, Zweig S, et al. The UCSC Genome Browser Database: update 2009. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(suppl 1):D755–D761. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn875>
- (7) MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature.* 2014;508(7497):469–476. <https://doi.org/10.1038/nature13127>
- (8) Patnala R, Clements J, Batra J. Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools. *BMC Genet.* 2013;14:39. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-39>
- (9) Stram DO. Tag SNP selection for association studies. *Genet Epidemiol.* 2004;27(4):365–74. <https://doi.org/10.1002/gepi.20028>
- (10) Wall JD, Pritchard JK. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2003;4(8):587–597. <https://doi.org/10.1038/nrg1123>
- (11) Ziegler A, König IR, Pahlke F. *A Statistical Approach to Genetic Epidemiology: Concepts and Applications.* 2nd ed. Weinheim : Wiley-VCH, 2010.
- (12) David S, Aguiar P, Antunes L, et al. Variants in the non-coding region of the TLR2 gene associated with infectious subphenotypes in pediatric sickle cell anemia. *Immunogenetics.* 2018;70(1):37–51. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-1013-7>

Referências bibliográficas:

- (1) 1000 Genomes Project Consortium; Abecasis GR, Auton A, Auton A, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature.* 2012;491(7422):56–65. <https://doi.org/10.1038/nature11632>
- (2) Amberger J, Bocchini C, Hamosh A. A new face and new challenges for Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®). *Hum Mutat.* 2011;32(5):564–67. <https://doi.org/10.1002/humu.21466>
- (3) Casanova JL, Abel L. The human genetic determinism of life-threatening infectious diseases: genetic heterogeneity and physiological homogeneity?. *Hum Genet.* 2020;139(6-7):681–94. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02184-w>
- (4) Chapman JM, Cooper JD, Todd JA, et al. Detecting disease associations due to linkage disequilibrium using haplotype tags: a class of tests and the determinants of statistical power. *Hum Hered.* 2003;56(1-3):18–31. <https://doi.org/10.1159/000073729>

Síndrome de quilomicronemia familiar em Portugal, agosto 2020

Familial chylomicronemia syndrome in Portugal, August 2020

Ana Catarina Alves^{1,2}, Sílvia Sequeira³, Oana Moldovan⁴, Henedina Antunes⁵, Esmeralda Martins⁶, Rute Gonçalves⁷, João Sequeira Duarte⁸, António Guerra^{9,10}, Miguel Salgado¹¹, Aida Azevedo¹², Ana Gaspar¹³, Isabel Palma¹⁴, Quitéria Rato¹⁵, Mafalda Bourbon^{1,2}

mafalda.bourbon@insa.min-saude.pt

(1) Grupo de Investigação Cardiovascular. Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Promoção da Saúde e Doenças Crónicas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Biosystems & Integrative Sciences Institute. Faculty of Sciences, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(3) Unidade de Doenças Metabólicas. Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(4) Serviço de Genética Médica. Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

(5) Consulta de Gastrenterologia. Hepatologia e Nutrição – Serviço de Pediatria, Hospital de Braga, Braga, Portugal

(6) Unidade de Doenças Metabólicas. Centro Materno Infantil do Norte, Centro Hospitalar Universitário do Porto, Porto, Portugal

(7) Serviço de Pediatria, Hospital Dr. Nélio Mendonça, Funchal, Madeira, Portugal

(8) Serviço Endocrinologia. Hospital Egas Moniz, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental, Lisboa, Portugal

(9) Serviço de Pediatria. Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal

(10) Centro de Investigação em Tecnologias e Serviços de Saúde. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal

(11) Serviço de Pediatria. Hospital Senhora da Oliveira, Guimarães, Portugal

(12) Serviço de Pediatria. Centro Hospital do Médio Ave, Vila Nova de Famalicão, Portugal

(13) Serviço de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

(14) Serviço de Endocrinologia. Hospital Santo António, Centro Hospitalar do Porto, Porto, Portugal

(15) Serviço de Cardiologia. Hospital de São Bernardo, Centro Hospitalar de Setúbal, Setúbal, Portugal

Resumo

A síndrome de quilomicronemia familiar (FCS) é uma doença rara, com hereditariedade recessiva, envolvendo o metabolismo das lipoproteínas. Caracteriza-se por um aumento acentuado dos triglicéridos (TGs) e quilomicras no plasma. Os doentes apresentam plasma lipémico, pancreatite recorrente, xantomas eruptivos, hepatoesplenomegalia e lipemia retiniana. O presente estudo tem como objetivo a caracterização molecular de indivíduos com quadro clínico de FCS. Até à data foram referenciados a este estudo 26 indivíduos com diagnóstico clínico de FCS. O estudo inclui uma análise bioquímica do perfil lipídico e uma análise molecular dos 5 genes envolvidos. Foi possível identificar uma possível causa genética para a doença em 8/17 casos índice que apresentam variantes potencialmente patogénicas nos genes *LPL*, *APOC2* e *LMF1*. Em 7 doentes só foi identificada uma variante genética em heterozigotia no gene *LPL* e *APOA5*, desconhecendo-se qual o seu impacto no metabolismo da *LPL*. Dois doentes têm estudo genético negativo e 9 ainda se encontram em estudo. Os doentes com FCS devem ser identificados o mais precocemente possível, a fim de minimizar ou prevenir os efeitos nefastos desta condição. Nas situações em que temos diagnóstico molecular, este permite um diagnóstico preciso e uma melhor gestão das morbilidades, contribuindo para uma melhoria do prognóstico.

Abstract

Familial chylomicronemia syndrome (FCS) is a rare recessive disorder, involving lipoprotein metabolism. It is characterized by a severe increase in plasma triglycerides (TGs) and chylomicrons. Patients have lipemic plasma, recurrent pancreatitis, eruptive xanthomas, hepatosplenomegaly

and retinal lipemia. The aim of the present study is the molecular characterization of individuals with a clinical diagnosis of FCS. To date, 26 individuals with a clinical diagnosis of FCS have been referred to this study. The study includes a biochemical analysis of the lipid profile and a molecular analysis of the 5 genes involved. A possible genetic cause for the disease was identified in 8/17 index cases that present potentially pathogenic variants in *LPL*, *APOC2* and *LMF1* genes. In 7 patients, only one genetic variant in heterozygosity was identified in *LPL* and *APOA5* genes, and its impact on *LPL* metabolism is unknown. Two patients have a negative genetic study and 9 are still under study. FCS patients should be identified as early as possible in order to minimize or prevent the harmful effects of this condition. In situations where we have a molecular diagnosis, this allows for a correct diagnosis and better management of morbidities, contributing to an improvement in the prognosis.

Introdução

A síndrome de quilomicronemia familiar (FCS) é uma doença rara, com hereditariedade recessiva, envolvendo o metabolismo das lipoproteínas ⁽¹⁾. Caracteriza-se por um aumento acentuado dos triglicéridos (TGs) e quilomicras no plasma. Os doentes apresentam plasma lipémico, pancreatite recorrente, xantomas eruptivos, hepatoesplenomegalia e lipemia retiniana ⁽²⁾. A pancreatite induzida por níveis muito eleva-



dos de TGs está associada a uma evolução clínica grave e a pior prognóstico do que os com outras causas ⁽²⁾. Por este motivo, é importante identificar-se a etiologia da hipertrigliceridemia, de modo a efetuar-se o diagnóstico correto o mais precocemente possível e a iniciar-se o tratamento adequado.

A FCS é geralmente causada por mutações bialélicas no gene *LPL*, que codifica a lipoproteína lípase, ou menos frequentemente nos genes que codificam para a apolipoproteína C2 (*APOC2*), apolipoproteína A5 (*APOA5*), fator de maturação da lípase (*LMF1*) ou à proteína-1 de ligação ao HDL com âncora GPI (*GPIHBP1*), que codificam cofatores da LPL ou para proteínas de interação ⁽²⁾.

A prevalência da FCS é desconhecida, contudo a prevalência da deficiência em LPL e *APOC2* foi estimada em 1:1 000 000 (<http://www.orpha.net/>).

_Objetivo

O presente estudo tem como objetivo a caracterização molecular de indivíduos com quadro clínico de síndrome de quilomicronemia familiar (FCS). Nesta publicação são apresentados os casos de FCS já estudados bem como os que se encontram, até agosto de 2020, ainda em estudo no Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis (DPS), do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA).

_Métodos

Critérios de inclusão

Os critérios clínicos estabelecidos para inclusão no estudo da FCS são: i) triglicéridos acima de 800 mg/dL, ii) idade inferior a 40 anos, iii) exclusão de causas secundárias de hipertrigliceridemia (como outros distúrbios metabólicos ou consumo excessivo de álcool) e iv) a presença de pelo menos uma das seguintes situações:

- a) Resistência a restrição lipídica na dieta associada à terapia hipolipemiante;
- b) Presença de quilomicras e/ou VLDL no plasma;

- c) História clínica de pelo menos um episódio de pancreatite nos últimos 10 anos;
- d) Presença de xantomas eruptivos e/ou lipemia retiniana e/ou hepatoesplenomegalia.

No entanto, optámos por incluir também no estudo doentes com idade inferior a 65 anos de idade, com valores de TGs acima de 600 mg/dL, sem critérios de exclusão devidos a causas secundárias de hipertrigliceridemia (referidas acima) e que apresentassem resistência ao tratamento. Esta cláusula foi estabelecida para melhor caracterizar o perfil de doentes portugueses com o diagnóstico clínico de FCS.

Estudo bioquímico

No âmbito deste estudo, o perfil lipídico de cada caso index, incluindo marcadores da rotina da química clínica (colesterol total (CT), colesterol LDL (LDL-C), colesterol HDL (HDL-C) e TGs, ApoA1, ApoB e Lp(a)) e outros marcadores mais específicos (ApoA2, ApoC2, ApoC3, ApoE e sdLDL), são analisados no DPS, INSA. O perfil lipídico básico é determinado com recurso a ensaios comerciais num equipamento automático, modelo COBAS Integra 400 Plus (Roche). O perfil lipídico mais específico é determinado também por ensaios comerciais, mas no equipamento Dayotna (Randox). O doseamento destes parâmetros específicos encontra-se em transição para o COBAS Integra 400 Plus (Roche).

Estudo molecular

Os genes *LPL*, *APOC2*, *LMF1*, *APOA5* e *GPIHBP1* são sequenciados por Sequenciação de Nova Geração (NGS) com um painel de genes alvo no DPS, INSA. Nos casos referenciados ao DPS, INSA há mais tempo, apenas os genes *LPL* e *APOC2* foram estudados por PCR e sequenciação de Sanger, e os casos negativos por esta metodologia encontram-se de momento a ser sequenciados por NGS. Todas as alterações encontradas por NGS são posteriormente confirmadas por sequenciação de Sanger.

O estudo dos familiares é realizado sempre que possível.



_Resultados

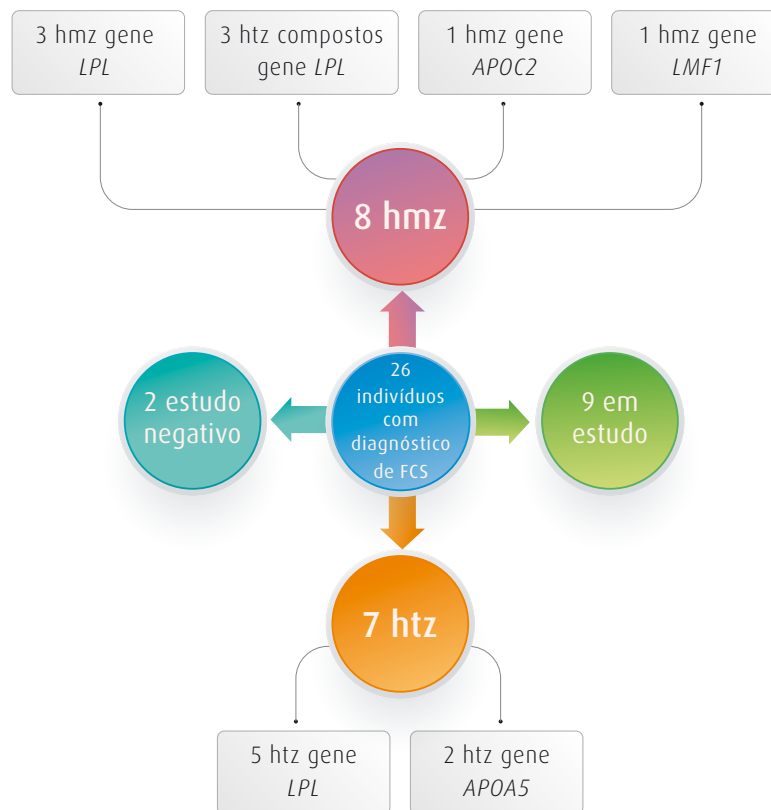
Até agosto de 2020, este estudo incluiu 26 indivíduos com diagnóstico clínico de FCS ([tabela 1](#)). Em 8 doentes foi identificada uma causa genética para a doença ([figura 1](#)):

- 3 são homozigotos para variantes no gene *LPL*, sendo 2 c.[644G>A];[644G>A]/ p.[(Gly215Glu)];[(Gly215Glu)] e 1 c.[701C>T];[701C>T]/ p.[(Pro234Leu)];[(Pro234Leu)];
- 3 são heterozigotos compostos para o gene *LPL* (c.[644G>A];[1030A>G]/p.[(Gly215Glu)];[(Ser286Gly)]; c.[644G>A];[953A>G]/ p.[(Gly215Glu)];[(Asn318Ser)] e c.[590G>A];[1030A>G]/ p.[(Arg197His)];[(Ser286Gly)];
- 1 é homozigoto para a variante (c.[175T>G];[175T>G]/ p.[(Tyr37Asp)];[(Tyr37Asp)]) no gene *APOC2*;
- 1 é homozigoto para a variante c.[725A>T];[725A>T] p.[Tyr242Phe];[Tyr242Phe] no gene *LMF1*.

Em 7 doentes com um fenótipo grave e concentração de TGs superior a 700 mg/dL, incluindo 2 que manifestaram pancreatite recorrente, só foi possível identificar uma variante em heterozigotia nos genes *LPL* e *APOA5* ([tabela 1](#) e [figura 1](#)). Cinco variantes no gene *LPL* já foram descritas em doentes com FCS em homozigotia ou heterozigotia composta ([3-8](#)), sendo que apenas a variante c.1030A>G/p.(Ser286Gly) não foi descrita anteriormente. As variantes nos genes *LMF1*, *APOA5* e *APOC2*, não foram descritas anteriormente.

Não foram encontradas variantes nos 5 genes associados à FCS em 2 doentes com fenótipo clínico de FCS e 9 casos ainda se encontram em estudo para os genes *LMF1*, *GPIHBP1* e *APOA5*.

Figura 1: 📄 Resumo dos indivíduos estudados com diagnóstico de síndrome de quilomicronemia familiar (FCS).



Hmz – homozigoto; htz – heterozigoto



Tabela 1: Características clínicas dos casos índice em estudo.

ID	Idade	Valores lipídicos (mg/dL) na referência ao estudo				Valores lipídicos (mg/dL) determinados no INSA								Pancreatite	Trat. atual	Diagnóstico molecular	Ref.
		CT	LDL	HDL	TGs	Lp(a)	ApoA1	ApoB	ApoA2	ApoC2	ApoC3	ApoE	sdLDL				
I	45	419	*	*	1095	8,0	145,0	99,0	40,3	10,0	13,9	4,1	38,6	Não	Não	Gene APOA5: c.995_998delACAG/p.(Asp332Valfs*5)	Este estudo
II	33	204	70	34	616	15,0	140,0	77,0	35,1	11,8	25,1	8,7	35,3	Não	Estatina/fibratos	Gene LPL: c.953A>G/p.(Asn318Ser)	4
III	47	790	*	20	2140	8,0	146,0	147,0	25,1	29,5	37,2	12,0	52,4	Não	Não	Gene LMF1: c.[725A>T];[725A>T]p.[Tyr242Phe];[Tyr242Phe]	Este estudo
IV	13	148	13	19	923	21,0	98,0	58,0	25,5	0,1	33,6	17,7	10,3	Não	Não	Gene APOC2: c.[175T>G];[175T>G]/p.[(Tyr37Asp)];[(Tyr37Asp)]	Este estudo
V	39	231	*	25	757	14,0	154,0	31,0	27,5	4,9	7,3	3,5	9,8	Não	Não	Gene LPL: c.[644G>A];[953A>G]/p.[(Gly215Glu)];[(Asn318Ser)]	3,4
VI	26	753	97	32	7801	13,0	105,0	82,0	**	**	**	**	**	Não	Estatina/fibratos	Em estudo	-
VII	58	301	175	43	787	53,6	141,0	79,5	**	**	**	**	**	Não	Estatina/fibratos	Gene LPL: c.953A>G/p.(Asn318Ser)	4
VIII	14	139	*	8	1156	8,0	75,0	30,0	14,9	3,2	12,9	6,0	10,9	Sim	Não	Gene LPL: c.[644G>A];[1030A>G]/p.[(Gly215Glu)];[(Ser286Gly)]	3
IX	<1	497	*	19	5262	<8	18,0	240,0	**	**	**	**	**	Não	Não	Em estudo	
X	11	320	*	30	3615	18,0	82,0	43,0	12,2	6,9	8,1	8,0	6,9	Não	Fibratos	Gene LPL: c.[590G>A];[1030A>G]/p.[(Arg197His)];[(Ser286Gly)]	7
XI	34	114¥	19¥	12¥	686¥	8,0	77,0	42,0	24,7	3,1	8,5	2,5	15,1	Sim	Estatina/fibratos	Gene LPL: c.[644G>A];[644G>A]/p.[(Gly215Glu)];[(Gly215Glu)]	3
XII	43	299	97	45	864	9,0	214,0	116,0	42,6	24,8	54,3	16,6	31,6	Sim	Fibratos	Em estudo	
XIII	31	858	*	*	4371	12,0	120,0	63,0	33,6	8,3	7,9	3,4	12,8	Sim	Fibratos	Gene LPL: c.836T>G/p.(Leu279Arg)	6
XIV	57	575	382	*	737	31,0	142,0	65,0	**	**	**	**	**	?	Fibratos	Em estudo	
XV	61	296	62	43	1352	48,0	139,0	155,0	**	**	**	**	**	?	Estatina/fibratos	Em estudo	
XVI	11	292	42	52	2093	39,0	93,0	64,0	21,2	7,1	10,0	4,6	19,7	Sim	Estatina/fibratos	Gene LPL: c.644G>A/p.(Gly215Glu)	3
XVII	64	640	*	20	3260	1,8	123,0	97,0	21,7	18,7	25,0	8,0	31,1	Não	Não	Em estudo	
XVIII	32	1282	*	40	6221	9,9	108,0	180,0	44,8	29,5	35,4	16,0	59,0	Sim	Não	Em estudo	
XIX	37	293	*	33	2542	79,9	112,4	86,3	43,6	24,7	54,3	34,8	18,6	?	Não	Em estudo	
XX	43	315	*	*	1110	**	**	**	**	**	**	**	**	?	Estatina/fibratos	Em estudo	
XXI	52	116¥	47¥	27¥	365¥	**	116,0	66,0	**	**	**	**	**	Não	Estatina/fibratos	Estudo negativo	
XXII	<1	1208	*	*	24129	**	**	**	**	**	**	**	**	Não	Não	Gene LPL: c.[644G>A];[644G>A]/p.[(Gly215Glu)];[(Gly215Glu)]	3
XXIII	40	127	7	6	1824	**	**	**	**	**	**	**	**	Sim	Estatina/fibratos	Gene LPL: c.[701C>T];[701C>T]/p.[(Pro234Leu)];[(Pro234Leu)]	8
XXIV	44	272	*	85	737	**	**	**	**	**	**	**	**	Não	Estatina/fibratos	Gene LPL: c.953A>G/p.(Asn318Ser)	4
XXV	1	192	*	19	1158	**	**	**	**	**	**	**	**	Não	Não	Gene APOA5: c.995_998delACAG/p.(Asp332Valfs*5)	Este estudo
XXVI	17	354	39	22	4283	**	**	**	**	**	**	**	**	Sim	Não	Estudo negativo	

Idade (anos); CT – colesterol total (mg/dL); LDL – lipoproteína de baixa densidade (mg/dL); HDL – lipoproteína de alta densidade (mg/dL); TG – triglicéridos (mg/dL); * Valor impossível de determinar através de cálculo; ** Não foi possível determinar o valor durante o estudo; ? sem informação; ¥ valores em tratamento; INSA – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge; trat – tratamento; ref – referência.

Em negrito estão assinalados os doentes que são homozigotos (homozigoto verdadeiro ou heterozigoto composto). Os valores recomendados pelas Sociedades Científicas internacionais e pelo *National Cholesterol Education Program guidelines* (2019) para o perfil lipídico são: CT <200 mg/dL; LDL <130 mg/dL; HDL >40 mg/dL e TGs <150 mg/dL; ApoA1 >120 mg/dL; ApoB <90 mg/dL; Lp(a) <50 mg/dL.

No que se refere aos marcadores do perfil lipídico mais específicos os valores recomendados pelo fabricante (Randox, www.randox.com) são: ApoA2 entre 25,1 e 34,5 mg/dL; ApoC2 entre 1,6 e 4,2 mg/dL; ApoC3 entre 5,5 e 9,5 mg/dL; ApoE entre 2,7 e 4,5 mg/dL e sdLDL < 35mg/dL.



_Discussão

Foi possível identificar uma causa para a doença em 8/17 casos índice com o estudo dos 5 genes completo. Em outros 7 doentes só foi identificada uma variante genética em heterozigotia, desconhecendo-se qual o seu impacto no metabolismo da LPL. Para clarificar estas situações iremos proceder ao estudo enzimático da LPL nestes indivíduos, para verificar qual o nível de atividade enzimática residual (9). A possibilidade de variantes em heterozigotia em genes associados a doenças recessivas serem a causa do fenótipo tem sido descrita para outras patologias. Os estudos de atividade enzimática da LPL poderão contribuir para esta discussão. Destes 7 doentes, 2 já tiveram pancreatite e apresentam valores muito altos de TGs, sendo casos muito sugestivos de FCS, mas que a genética não consegue, até à data, explicar.

Uma vez que foi encontrada uma alteração ainda não descrita no gene *LMF1*, iremos desenvolver estudos funcionais para investigar qual o efeito desta variante no metabolismo da LPL (10,11). Irá procurar-se caracterizar a variante não descrita encontrada em homozigotia no gene *APOC2* e a variante não descrita encontrada em heterozigotia no gene *LPL* pelo estudo da atividade enzimática da LPL nos doentes portadores das mesmas.

Os doentes com fenótipo clínico de FCS, mas sem uma mutação causal identificada, deverão continuar em estudo até se encontrar a causa da hipertrigliceridemia. É possível que nestes doentes estejam envolvidas variantes em genes que ainda não foram relacionados com a patologia.

_Conclusão

Os doentes com FCS devem ser identificados o mais precocemente possível, a fim de minimizar ou prevenir os efeitos nefastos desta condição. Nas situações em que temos diagnóstico molecular, este permite um diagnóstico preciso e uma melhor gestão das morbilidades, contribuindo para uma melhoria do prognóstico.

O estudo genético é importante, embora o estado atual do conhecimento ainda não nos permita caracterizar 100% dos casos de FCS. A investigação nesta área é essencial pois

provavelmente haverá mais genes envolvidos na génese da FCS e a sua identificação permitirá caracterizar mais doentes, compreender melhor a patologia e desenvolver estratégias terapêuticas adequadas.

Agradecimentos e financiamento:

Aos técnicos a exercer ou que já exerceram funções na Unidade de Diagnóstico e Referência do DPS, INSA a realização do estudo bioquímico (TSDT Suza Almeida, TSDT Guida Duarte, TS Margarida Vaz e TSS Marta Alvim). À investigadora Maria Luís Cardoso a revisão do manuscrito.

O estudo da FCS encontra-se presentemente financiado pela Akcea Therapeutics (2020-2021), o que permitirá o estudo de um maior número de doentes nestes anos.

Referências bibliográficas:

- (1) Burnett J, Hooper A, Hegele R. Familial Lipoprotein Lipase Deficiency. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. (eds). GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1308/>
- (2) Moulin P, Dufour R, Aversa M, et al. Identification and diagnosis of patients with familial chylomicronaemia syndrome (FCS): expert panel recommendations and proposal of an "FCS score." *Atherosclerosis*. 2018;275:265-272. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.814>
- (3) Reina M, Brunzell J, Deeb S. Molecular basis of familial chylomicronemia: mutations in the lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II genes. *J Lipid Res*. 1992;33(12):1823-32. <https://www.jlr.org/content/33/12/1823.long>
- (4) Zhang H, Henderson H, Gagne SE, et al. Common sequence variants of lipoprotein lipase: standardized studies of in vitro expression and catalytic function. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1302(2):159-66. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(96\)00059-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(96)00059-8)
- (5) Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med*. 2012;272(2):185-196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2012.02516.x>
- (6) Chan L, Mak Y, Tomlinson B, et al. Compound heterozygosity of Leu252Val and Leu252Arg causing lipoprotein lipase deficiency in a Chinese patient with hypertriglyceridemia. *Eur J Clin Invest*. 2000;30(1):33-40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2000.00587.x>
- (7) Wright WT, Young IS, Nicholls DP, et al. Genetic screening of the LPL gene in hypertriglyceridaemic patients. *Atherosclerosis*. 2008;199(1):187-192. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.10.029>
- (8) Ma Y, Henderson HE, Monsalve M V., et al. A mutation in the human lipoprotein lipase gene as the most common cause of familial chylomicronemia in french Canadians. *N Engl J Med*. 1991;324(25):1761-1766. <https://doi.org/10.1056/NEJM199106203242502>
- (9) Woollett LA, Beitz DC, Hood RL, et al. An enzymatic assay for activity of lipoprotein lipase. *Anal Biochem*. 1984;143(1):25-29. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90552-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90552-9)
- (10) Surendran RP, Visser ME, Heemelaar S, et al. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J Intern Med*. 2012;272(2):185-196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2012.02516.x>
- (11) Wu MJ, Wolska A, Roberts BS, et al. Coexpression of novel furin-resistant LPL variants with lipase maturation factor 1 enhances LPL secretion and activity. *J Lipid Res*. 2018;59(12):2456-2465. <https://doi.org/10.1194/jlr.D086793>

Prevalência de nados-vivos com síndrome de Down: indicador conjunto da gravidez tardia e das políticas de diagnóstico pré-natal entre 2011-2017

Down syndrome livebirth prevalence: joint indicator of late pregnancy and prenatal diagnosis policies between 2011-2017

Paula Braz¹, Ausenda Machado¹, Carla Ramalho^{2,3}, Carlos Matias Dias¹

paula.braz@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(2) Serviço de Obstetrícia, Centro Hospitalar de São João, Porto, Portugal.

(3) Departamento de Ginecologia-Obstetrícia e Pediatria. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

_Resumo

Indicadores são instrumentos de medida que permitem construir um resumo quantitativo que reflita, direta ou indiretamente, o estado de saúde da população e das políticas de saúde, assim como medem o efeito das intervenções. Na área das anomalias congénitas, o indicador "Prevalência nados-vivos com síndrome de Down" pretende medir o efeito conjunto da gravidez tardia e do impacto das políticas de diagnóstico pré-natal. Apresentam-se os resultados desse indicador para os anos de 2011 a 2017, utilizando os dados do Registo Nacional de Anomalias Congénitas. Foram notificados 1012 nascimentos com síndrome de Down, dos quais 82,5% foram diagnosticados no período pré-natal. Dos 266 que nasceram vivos, 66,5% foram diagnosticados ao nascer e 33,4% foram diagnosticados durante a gravidez através de estudo cromossómico. A realização de exames invasivos, após a suspeita de síndrome de Down, foi recusada pelos progenitores em 20,7% casos. Fatores morais, éticos ou religiosos podem estar associados à não realização de exames invasivos, sendo necessários mais estudos a nível nacional sobre esta temática. Este estudo evidencia uma aplicação em saúde pública dos dados do Registo Nacional de Anomalias Congénitas, observando-se um impacto positivo da disponibilidade de diagnóstico pré-natal na vigilância da gravidez ao permitir o diagnóstico pré-natal de 82,5% de todos os casos com síndrome de Down.

_Abstract

An indicator is a quantitative or qualitative measure of how close we are to achieving the health status of the population, or to measure the effect of a policy intervention. In the congenital anomalies field, the "Prevalence of live births with Down Syndrome" reflects the combined effect of delayed childbearing age and prenatal diagnosis policies. We used data from the National Registry of Congenital Anomalies between 2011 and 2017. The analyses included 1012 registered cases with Down syndrome of which 82.5% had been prenatally diagnosed. Among the 266 live births, 66.5% were diagnosed at birth and 33.4% were diagnosed during pregnancy and confirmed by karyotype analysis. Invasive prenatal procedures such as amniocentesis or chorionic villus sampling were refused by 20.7% of parents. Cultural factors may be associated with the decision of not perform invasive prenatal testing, but more studies are needed at national level to better understand this topic. This paper describes the contribution of the National Registry of Congenital Anomalies data to build public

health indicators. This indicator shows a positive impact of prenatal diagnosis policy on pregnancy surveillance when 82.5% of all cases of Down syndrome during pregnancy.

_Introdução

A forma mais frequente da síndrome de Down, ou trissomia 21, é a trissomia livre e resulta da não-disjunção acidental do par 21 durante a meiose, levando à presença de um cromossoma extra em todas as células ⁽¹⁾. Esta é uma das anomalias congénitas (AC) mais frequentes a nível mundial, afetando 1 em cada 750 nascimentos ⁽¹⁾. A prevalência aumenta com a idade materna, mas alguns indicadores morfológicos (como a translucência da nuca) e bioquímicos (como a proteína plasmática associada à gravidez ou a fração livre da gonadotrofina coriónica), permitem identificar e definir com mais precisão as gestações com risco aumentado de se estar perante um feto com esta situação clínica ⁽¹⁾.

Portugal tem desenvolvido políticas de diagnóstico pré-natal (DPN) desde 1997 ⁽²⁾. O DPN oferece um conjunto de procedimentos não invasivos (ecografia fetal, rastreios bioquímicos) e invasivos (amniocentese ou biópsia de vilosidades coriónicas) que permitem avaliar a probabilidade, ou diagnosticar, se um embrião ou um feto está afetado por uma AC. O DPN tem como objetivos: a) identificar marcadores de risco para a presença de uma AC; b) diagnosticar a presença de uma AC; c) produzir informação útil para apoiar os profissionais no ato de informar e preparar os pais para o nascimento de uma criança com uma AC; d) permitir o tratamento *in utero*, ou programar o parto num



centro especializado; e) permitir a opção pela interrupção médica da gravidez (3).

Os procedimentos invasivos têm um risco de perda fetal de 0,3% (4) com a vantagem de permitirem o diagnóstico da síndrome de Down durante a gravidez.

Desde 2011 que o Registo Nacional de Anomalias Congénitas (RENAC) contribui para a construção de indicadores consensualizados a nível europeu, que visam avaliar o impacto tanto das AC na saúde pública como de algumas medidas preventivas sobre as AC (5,6). Os indicadores são instrumentos de medida que permitem a construção de um resumo quantitativo que reflita, direta ou indiretamente, o estado de saúde da população e o impacto das políticas de saúde e intervenções delas decorrentes (7). Um desses indicadores – Prevalência de nados-vivos com síndrome de Down – utilizado na área das AC, tem como finalidade medir o efeito conjunto da gravidez tardia e o impacto das políticas de diagnóstico pré-natal no número de nascimentos vivos com síndrome de Down (5).

_Objetivo

É objetivo deste estudo apresentar os resultados em Portugal do indicador “Prevalência de nados-vivos com síndrome de Down” para os anos de 2011 a 2017, obtidos através dos dados reportados ao Registo Nacional de Anomalias Congénitas.

_Material e métodos

São notificados ao RENAC todos os casos com anomalias estruturais *major* associadas, ou não, a anomalias *minor*, assim como as anomalias cromossómicas observadas em:

1. Nados-vivos, sempre que detetadas até ao final do período neonatal;
2. Fetos mortos com idade gestacional igual ou superior a 20 semanas;
3. Fetos submetidos a interrupção médica da gravidez (IMG), após o diagnóstico de uma AC grave, independentemente da idade gestacional.

São notificados os nascimentos com AC de mulheres residentes no Continente e nas Regiões Autónomas dos Açores e da Madeira (8).

Os dados recolhidos são anónimos e apenas o médico notificador em cada serviço hospitalar, tem acesso ao processo clínico, através de um número único de registo local (8).

A taxa de prevalência de nados-vivos (NV) com síndrome de Down registados no RENAC nos anos 2011 a 2017 foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Prevalência} = (\text{NV com S. Down} / \text{Total de nascimentos}) \times 1000 \text{ nascimentos}$$

A taxa de prevalência foi, ainda, estratificada pela idade materna à data do nascimento (<35 anos e ≥35 anos). O ponto de corte foi estabelecido tendo em consideração o que é habitualmente utilizado pelos vários estudos, corroborado pela constatação de que a prevalência de síndrome de Down se mantém superior no grupo etário com idade ≥35 anos (9,10).

_Resultados

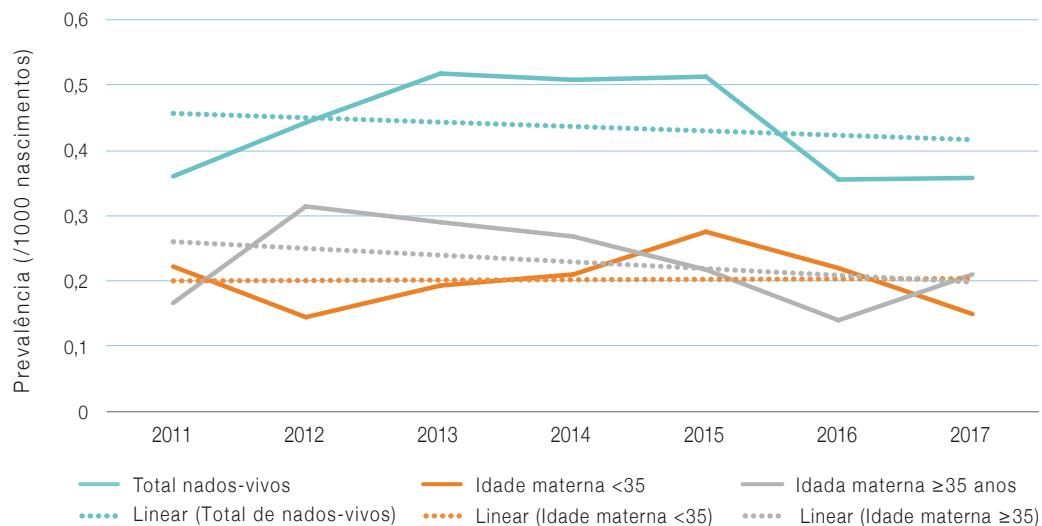
Foram notificados 1012 nascimentos (nados-vivos, fetos mortos e fetos resultantes de interrupção médica da gravidez) com diagnóstico de síndrome de Down, dos quais 835 (82,5%) foram diagnosticados no período pré-natal. Dos 266 (26,3%) casos que nasceram vivos, 177 (66,5%) foram diagnosticados ao nascer e 89 (33,4%) foram diagnosticados durante a gravidez através de estudo cromossómico.

O indicador “Prevalência (/1000 nascimentos) de nados-vivos com síndrome de Down”, distribuído de acordo com a idade materna à data do parto entre os anos de 2011 e 2017, encontra-se descrito no [gráfico 1](#).

Observou-se uma ligeira redução da prevalência total de nados-vivos com síndrome de Down entre 2011 e 2017. Relativamente à distribuição da prevalência de nados-vivos por idade materna ≥35 anos à data do parto, observou-se também uma ligeira redução no período em estudo.



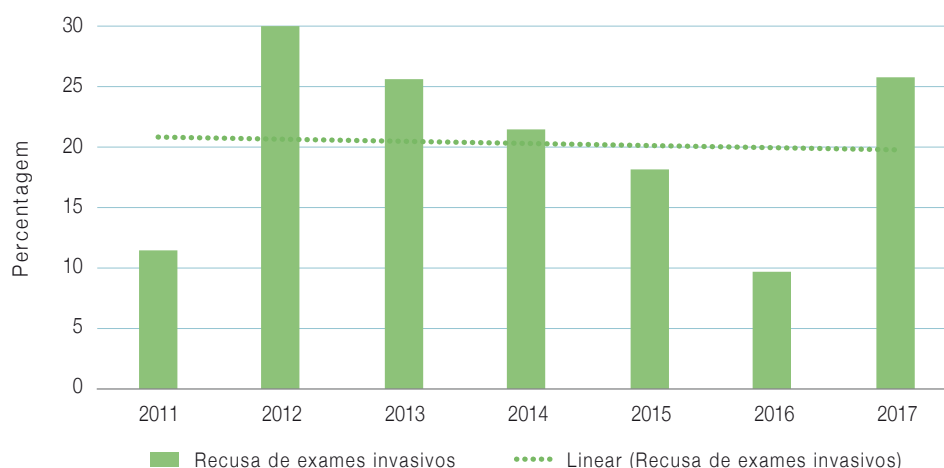
Gráfico 1: ▾ Prevalência (/1000 nascimentos) de nados-vivos com síndrome de Down, de acordo com idade materna na altura do parto, observada nos casos reportados ao Registo Nacional de Anomalias Congénitas, nos anos de 2011 a 2017.



Em 55 (20,7%) casos de recém-nascidos com síndrome de Down, os progenitores recusaram realizar exames invasivos que fariam o diagnóstico durante a gravidez. A evolução desta recusa ao longo dos anos encontra-se descrita no [gráfico 2](#).

Verifica-se uma variação da proporção de recusas, contudo observa-se que em 4 dos 7 anos em análise, esta recusa foi superior a 20%.

Gráfico 2: ▾ Evolução da proporção de recusas em realizar exames invasivos de entre os nados-vivos com síndrome de Down, observada nos casos reportados ao Registo Nacional de Anomalias Congénitas nos anos de 2011 a 2017.



Discussão

A evolução do indicador “Prevalência de nados-vivos com síndrome de Down” ao longo do tempo, revelou de uma forma geral, um impacto positivo das políticas de DPN na deteção desta AC, tendo identificado 82,5% dos casos durante a gravidez.

A análise deste indicador tem algumas limitações. Nomeadamente, a comparação dos resultados nacionais com o mesmo indicador a nível europeu, pois as políticas de DPN são diferentes nos vários países. Por exemplo, na Irlanda e em Malta não é permitida a interrupção da gravidez por mal-



formação fetal, enquanto que nos restantes países pode ser realizada, pelo menos até às 24 semanas de gestação (5).

A utilização da “Prevalência de nados-vivos com síndrome de Down” como indicador único da gravidez tardia não parece ser representativo da realidade nacional, uma vez que os dados que constam dos relatórios periódicos do RENAC sugerem que uma grande proporção de gravidezes com esta situação clínica é interrompida (8). Para complementar a análise deste indicador, será agora necessário analisar os dados das interrupções de gravidez, respetiva idade materna e comparar outras variáveis como o local de residência da grávida.

De entre os recém-nascidos com síndrome de Down cujo diagnóstico só foi feito depois do nascimento, verificou-se uma proporção importante, 20,7%, em que os progenitores recusaram a realização de exames invasivos que permitiriam o diagnóstico pré-natal. Estudos internacionais indicam que a recusa é mais frequente em gestações resultantes de procriação medicamente assistida ou em mulheres com risco aumentado pela idade, mas cujo resultado do rastreio pré-natal reduziu esse risco (11). Outras características maternas, como a recusa de interrupção da gravidez ou convicções religiosas têm, também, sido associadas à recusa de realização de exames invasivos (12).

Na análise dos resultados deste estudo é importante referir que se pode verificar subnotificação dos casos com síndrome de Down notificados ao RENAC, o que pode influenciar também as variações observadas na percentagem de recusa na realização de exames invasivos. Estas variações podem também ser consequência dos pequenos números reportados.

_Conclusão

Estes resultados evidenciam uma aplicação em saúde pública dos dados notificados ao Registo Nacional de Anomalias Congénitas, tendo-se verificado um impacto positivo das políticas de diagnóstico pré-natal na vigilância da gravidez. Fatores morais, éticos ou religiosos dos progenitores podem estar associados à realização de exames pré-natais, sendo necessário mais estudos para melhor compreender a realidade nacional.

Referências bibliográficas:

- (1) Instituto Nacional Francês de Saúde e Investigação Médica. Orphanet - O portal para as doenças raras e os medicamentos [online]. Disponível em: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=PT&Expert=870 [consult. 22/7/2020].
- (2) Despacho n.º 5411/97 (2.ª Série) de 8 de julho. DR n.º 180, 2ª Série 1997-08-06:9509-10. Estruturação do sector de diagnóstico pré-natal, princípios e orientações. <https://dre.pt/application/conteudo/713569>
- (3) Abramsky L, Chapple J (eds). Prenatal Diagnosis: the human side. London: Chapman and Hall, 1994.
- (4) Salomon LJ, Sotiriadis A, Wulff CB, et al. Risk of miscarriage following amniocentesis or chorionic villus sampling: systematic review of literature and updated meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2019 Oct;54(4):442-451. doi: 10.1002/uog.20353. <https://doi.org/10.1002/uog.20353>
- (5) Khoshnood B, Greenlees R, Loane M, et al.; EUROCAT Project Management Committee; EUROCAT Working Group. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. 2011;91(Suppl 1):S16-22. doi: 10.1002/bdra.20776. <https://doi.org/10.1002/bdra.20776>
- (6) Martin S, De la Cruz J, Lanzoni M, et al. Transfer of the central database and coordinating activities of EUROCAT to the JRC-EUROCAT: Network of population-based registries for the epidemiological surveillance of congenital anomalies in Europe. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2016. <http://dx.doi.org/10.2788/9404>
- (7) Matias Dias C, Freitas M, Briz T. Indicadores de saúde: Uma visão de saúde pública, com interesse em Medicina Geral e Familiar. *Rev Port Med Geral e Fam.* 2007;23:439-50. <https://www.rpmgf.pt/ojs/index.php/rpmgf/article/view/10388> <http://dx.doi.org/10.2788/9404>
- (8) Braz P, Machado A, Matias Dias C. Registo Nacional de Anomalias Congénitas - 5 anos de vigilância em Portugal: 2011-2015. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2018. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/6209>
- (9) Braz P, Machado A, Matias Dias C. Maternal age and congenital anomalies: 11 years of the national registry of congenital anomalies. (Poster - 8th European Public Health Conference, 2015). <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/3197>
- (10) Loane M, Morris J, Addor M, et al. Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(1):27-33. doi: 10.1038/ejhg.2012.94. Epub 2012 Jun 20. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.94>
- (11) Lichtenbelt KD, Schuring-Blom GH, van der Burg N, et al. Factors determining uptake of invasive testing following first-trimester combined testing. *Prenat Diagn.* 2013;33(4):328-33. doi: 10.1002/pd.4067. Epub 2013 Feb 18. <https://doi.org/10.1002/pd.4067>
- (12) Crombag NMTH, Boeije H, Iedema-Kuiper R, et al. Reasons for accepting or declining Down syndrome screening in Dutch prospective mothers within the context of national policy and healthcare system characteristics: a qualitative study. *BMC Pregnancy Childbirth* 2016;16(1):121. <https://doi.org/10.1186/s12884-016-0910-3>

Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE): ixodídeos e bactérias patogénicas detetadas em Portugal continental durante o ano de 2019

Vector Surveillance Network (REVIVE): ixodids and pathogenic bacteria detected in mainland Portugal during 2019

Maria Sofia Nuncio¹, Ana Sofia Santos¹, Isabel Lopes de Carvalho¹, Rita de Sousa¹, Hugo Osório¹, Maria Margarida Santos-Silva^{1†}, Maria João Alves¹; Equipa REVIVE²

sofia.nuncio@insa.min-saude.pt

(1) Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa Portugal

(2) Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Alentejo, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte, Portugal

† In memoriam

_Resumo

A Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE) resulta da colaboração entre instituições do Ministério da Saúde (Direção-Geral da Saúde, Administrações Regionais de Saúde, Instituto dos Assuntos Sociais e da Saúde da Madeira, Direção Regional de Saúde dos Açores e Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge). A Rede divide-se em duas vertentes, REVIVE-mosquitos e REVIVE-carras. Neste artigo apresentam-se, de forma resumida, os resultados obtidos em 2019 no âmbito do REVIVE-carras. Este programa, que existe há nove anos, tem como principais objetivos monitorizar a atividade de artrópodes hematófagos; caracterizar as espécies e sua ocorrência sazonal; identificar agentes patogénicos importantes em saúde pública, a densidade dos vetores, o nível de infeção e monitorizar a introdução de espécies exóticas. Das atividades desenvolvidas em 2019, destaca-se: a participação das cinco Administrações Regionais de Saúde que realizaram colheitas de carras em 166 concelhos; nos 2409 ixodídeos colhidos não foi identificada a presença de espécies exóticas; em 982 carras foi pesquisada a presença de borrelíias e rickettsias, tendo sido observada a prevalência média de 2% e 22%, respetivamente, sobretudo em carras colhidas a parasitar humanos. O REVIVE-carras continua a contribuir para um conhecimento sistemático da fauna de ixodídeos de Portugal, e do seu potencial papel de vetor, constituindo uma componente dos programas de vigilância epidemiológica indispensável à avaliação do risco de transmissão de doenças potencialmente graves.

_Abstract

The Vector Surveillance Network (REVIVE) results from the collaboration between institutions of the Ministry of Health (Directorate-General for Health, Regional Health Administrations, Institute of Social Affairs and Health of Madeira, Regional Directorate of Health of the Azores and National Institute of Health Dr Ricardo Jorge). It is divided into two areas, REVIVE-mosquitoes and REVIVE-ticks. In this article, the results obtained in 2019 in the context of REVIVE-ticks are summarized. This program, which has completed nine years, aims to monitor the activity of blood-sucking arthropods; to characterize the species and their seasonal occurrence; to identify important pathogens in public health, the density of the vectors, the level of infection and monitor the introduction

of exotic species. Among the activities developed in 2019 stands out: the participation of the five Regional Health Administrations that carried out tick harvesting in 166 municipalities; in the 2409 ixodids collected, the presence of exotic species was not identified; in 982 ticks, the presence of borrelia and rickettsiae was investigated, with an average prevalence of 2% and 22%, respectively, especially in ticks harvested when parasitizing humans. REVIVE-ticks continues to contribute to a systematic knowledge of the fauna of ixodids in Portugal, and its potential role as a vector, constituting a component of epidemiological surveillance programs indispensable to assess the risk of transmission of potentially serious diseases.

_Introdução

A Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE) resulta da colaboração entre instituições do Ministério da Saúde (Direção-Geral da Saúde, Administrações Regionais de Saúde, Instituto dos Assuntos Sociais e da Saúde da Madeira, Direção Regional de Saúde dos Açores e Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge). A Rede divide-se em duas vertentes, REVIVE-mosquitos e REVIVE-carras.

Os ixodídeos, vulgarmente designados por carras, são artrópodes vetores que parasitam um vasto número de animais. A sua perpetuação na natureza depende da alimentação (refeições sanguíneas) que realizam para manter o seu ciclo de vida enquanto parasitas. As carras podem parasitar o Homem acidentalmente e, se estiverem infetadas, transmitir os agentes infecciosos enquanto efetuam a sua alimentação.



Atualmente, conhecem-se 889 espécies de carraças que se subdividem em duas famílias principais: Ixodidae e Argasidae ⁽¹⁾. A família mais importante, no que diz respeito à transmissão de agentes infecciosos, é a família Ixodidae. Em Portugal conhecem-se 22 espécies de carraças pertencentes a esta família e entre as doenças mais importantes causadas por agentes transmitidos por ixodídeos salientam-se a febre escaro nodular e a borreliose de Lyme.

A maioria das espécies com interesse em medicina humana e animal pertence à família Ixodidae. As espécies pertencentes a este grupo apresentam um escudo quitinoso rígido, na parte anterior da superfície dorsal das larvas, ninfas e fêmeas. Nos machos, este escudo ocupa toda a superfície dorsal.

A lista atualizada de espécies de carraças presentes em Portugal engloba 22 espécies: *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776), *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794), *Haemaphysalis hispanica* (Gil Collado, 1938), *Haemaphysalis inermis* (Birula, 1895), *Haemaphysalis punctata* (Canestrini & Fanzago, 1878), *Hyalomma lusitanicum* (Koch, 1844), *Hyalomma marginatum* (Koch, 1844), *Ixodes acuminatus* (Neumann, 1901), *Ixodes arboricola* (Schulze & Schlottke, 1930), *Ixodes bivari* (Dias, 1990), *Ixodes canisuga* (Johnston, 1849), *Ixodes frontalis* (Panzer, 1798), *Ixodes hexagonus* (Leach, 1815), *Ixodes inopinatus* (Estrada-Peña, Nava & Petney, 2014), *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), *Ixodes simplex* (Neumann, 1906), *Ixodes ventalloi* (Gil Collado, 1936), *Ixodes vespertilionis* (Koch, 1844), *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* (Say, 1821), *Rhipicephalus bursa* (Canestrini & Fanzago, 1878), *Rhipicephalus pusillus* (Gil Collado, 1938) e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Latreille, 1806).

Em Portugal, as duas espécies de carraças mais importantes em termos de saúde pública são *Rhipicephalus sanguineus*, vetor de *Rickettsia conorii* e *Ixodes ricinus*, vetor de *Borrelia burgdorferi* s.l. Recentemente, e após o surgimento de casos de febre hemorrágica Crimeia-Congo em Espanha ⁽³⁾, as espécies *Hyalomma lusitanicum* e *Hyalomma marginatum* também foram incluídas nesta lista.

As doenças associadas a carraças constituem um problema em saúde pública humana e animal, não só pela gravidade de algumas patologias, mas também pelo facto de muitas vezes surgirem com carácter epidémico, podendo ocasionar surtos, caso não sejam implementadas medidas de controlo (quadro 1).

Em Portugal estão identificadas algumas destas doenças ⁽²⁾ que existem paralelamente na bacia do mediterrâneo.

_Objetivo

Neste artigo apresentam-se, de forma resumida, os resultados obtidos relativos a ixodídeos e bactérias patogénicas detetadas em Portugal continental durante o ano de 2019, o âmbito da rede de vigilância REVIVE-carraças.

_Material e métodos

Num programa de vigilância de carraças é necessário assegurar a realização de colheitas ao longo do ano, uma vez que existem carraças que estão ativas nos meses de inverno (p. ex. *I. ricinus*) e outras que estão ativas sobretudo nos meses de verão (p. ex. *R. sanguineus*). Igualmente, as colheitas foram realizadas na fase de vida livre (sobre a vegetação) e na sua fase parasitária (sobre o hospedeiro).

Os locais, assim como a periodicidade da amostragem, foram selecionados pelas Administrações Regionais de Saúde (ARs), tendo como critério principal a proximidade à população humana, o historial da presença de carraças, a ocorrência de doenças associadas, o impacto nas atividades humanas e a acessibilidade do local, assim como a experiência adquirida em anos anteriores no âmbito do REVIVE.

Colheita de carraças em fase de vida livre (vegetação)

A colheita das carraças na vegetação foi realizada pelo método de arrastamento da bandeira que consiste na passagem de um pano turco, de cor branca sobre a vegetação a uma velocidade constante em linhas de aproximadamente 100 m. As carraças foram recolhidas com o auxílio de pinças e colocadas em tubos plásticos com tampa de rosca, jun-



Quadro 1: ⚠ Agentes etiológicos transmitidos por ixodídeos presentes ou em risco de emergir em Portugal.

Agente patogénico	Doença	Espécie de ixodídeo vetor
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Anaplasmoze humana	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. ventralloii</i>
<i>Babesia divergens</i>	Babesiose	<i>Ixodes</i> spp.
<i>B. afzelii</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ix. scapularis</i>
<i>B. bissettii</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes</i> spp.
<i>B. garinii</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes</i> spp.
<i>B. lusitaniae</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>B. spielmanii</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes</i> spp.
<i>B. turdi</i>	—	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ix. frontalis</i>
<i>B. valaisiana</i>	Borreliose de Lyme	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ix. persulcatus</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	Febre Q	Várias espécies
<i>Francisella tularensis</i>	Tularémia	Várias entre as quais <i>Ixodes ricinus</i> , <i>Dermacentor reticulatus</i>
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	Sem denominação	<i>Hyalomma marginatum</i>
<i>R. conorii</i>	Febre escaro-nodular	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>R. helvetica</i>	Sem denominação	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>R. massiliae</i>	Sem denominação	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>R. monacensis</i>	Sem denominação	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>R. sibirica mongolitimonae</i>	LAR*	<i>Hyalomma</i> spp., <i>Rhipicephalus pusillus</i>
<i>R. slovaca</i>	TIBOLA†	<i>Dermacentor marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i>
Vírus da Febre Hemorrágica Crimeia-Congo	Febre hemorrágica	<i>Hyalomma</i> spp.
Vírus Eyach	Sem denominação	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. ventralloii</i>
Vírus TBE	Encefalite	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Haemaphysalis punctata</i>

* LAR - *Lymphangitis-associated rickettsiosis*; † TIBOLA - *Tick-borne lymphadenopathy*

tamente com algumas ervas, para garantir a sobrevivência das carraças até chegarem ao laboratório. Nestas colheitas foram registadas as temperaturas mínimas e máximas, humidade relativa e dados de georreferência.

Colheita de carraças em fase de vida parasitária (sobre o hospedeiro)

A colheita e remoção de carraças foi realizada em diferentes hospedeiros e com o auxílio de pinças ou manualmente. Para maximizar este tipo de colheita, foi sugerido às ARSs que contactassem os veterinários das respetivas zonas de forma a obterem a sua colaboração.

As amostras foram enviadas para o Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (CEVDI/INSA) em tripla embalagem, de acordo com a recomendação do comité de peritos da Organização das Nações Unidas, por correio ou entregues em mão, acondicionadas em malas refrigeradas e até três dias após colheita.

Os exemplares recebidos no laboratório foram identificados com base em chaves taxonómicas, separados de acordo com a espécie, género, data e local de colheita e foram guardados a -80°C para posterior utilização no estudo de agentes infecciosos, nomeadamente bactérias dos géneros

Rickettsia e *Borrelia*. Estes dois géneros foram escolhidos uma vez que englobam as bactérias que, no Homem, causam doença grave, respetivamente a febre escaro-nodular e a borreliose de Lyme.

Depois de identificada a espécie, cada carraça foi individualmente lavada e extraído o DNA pelo método de hidrólise com solução de amónia. Posteriormente foram feitos *pools* de DNA com uma a cinco carraças da mesma colheita, espécie e estado evolutivo. Este método foi utilizado para as carraças colhidas da vegetação ou de hospedeiros-animais. As carraças removidas de humanos, pela sua importância, foram estudadas individualmente recorrendo à extração de DNA com um *kit* comercial. A pesquisa de DNA de *Rickettsia* e *Borrelia* foi realizada pela técnica de PCR convencional e PCR *nested* e as amostras positivas foram posteriormente sequenciadas para a confirmação e identificação da espécie bacteriana (4). Os resultados da identificação e análise de carraças removidas de humanos foram enviados para a autoridade local responsável pelo envio da amostra.

Em caso de identificação de espécies de ixodídeos exóticos e/ou invasores e de amostras positivas para agentes patogénicos, o CEVDI informa imediatamente os responsáveis de cada região de saúde e a Direção-Geral da Saúde.

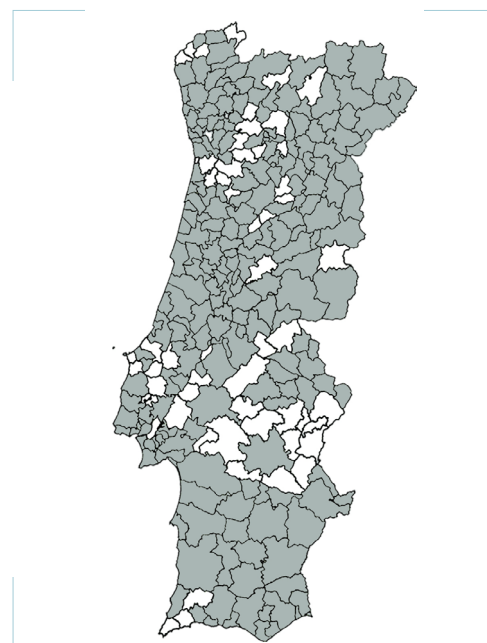
Resultados

Os resultados obtidos em 2019 encontram-se detalhados no relatório REVIVE 2019 (5). Resumidamente, as colheitas de carraças foram realizadas em 166 concelhos de cinco Administrações Regionais de Saúde, nomeadamente Algarve, Alentejo, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte (figura 1).

Das 1088 colheitas realizadas, 439 foram feitas no Homem, 267 no cão, 85 em outros animais (fase parasitária) e 297 fase de vida livre (na vegetação, vestuário, residências, paredes, habitações, solo, etc.) (5).

No total foram capturadas e identificadas 2409 carraças, pertencentes a cinco géneros e distribuídas por 12 espécies, nomeadamente, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma lusitanicum*, *H.*

Figura 1: Portugal – Concelhos onde foram realizadas colheitas em 2019.



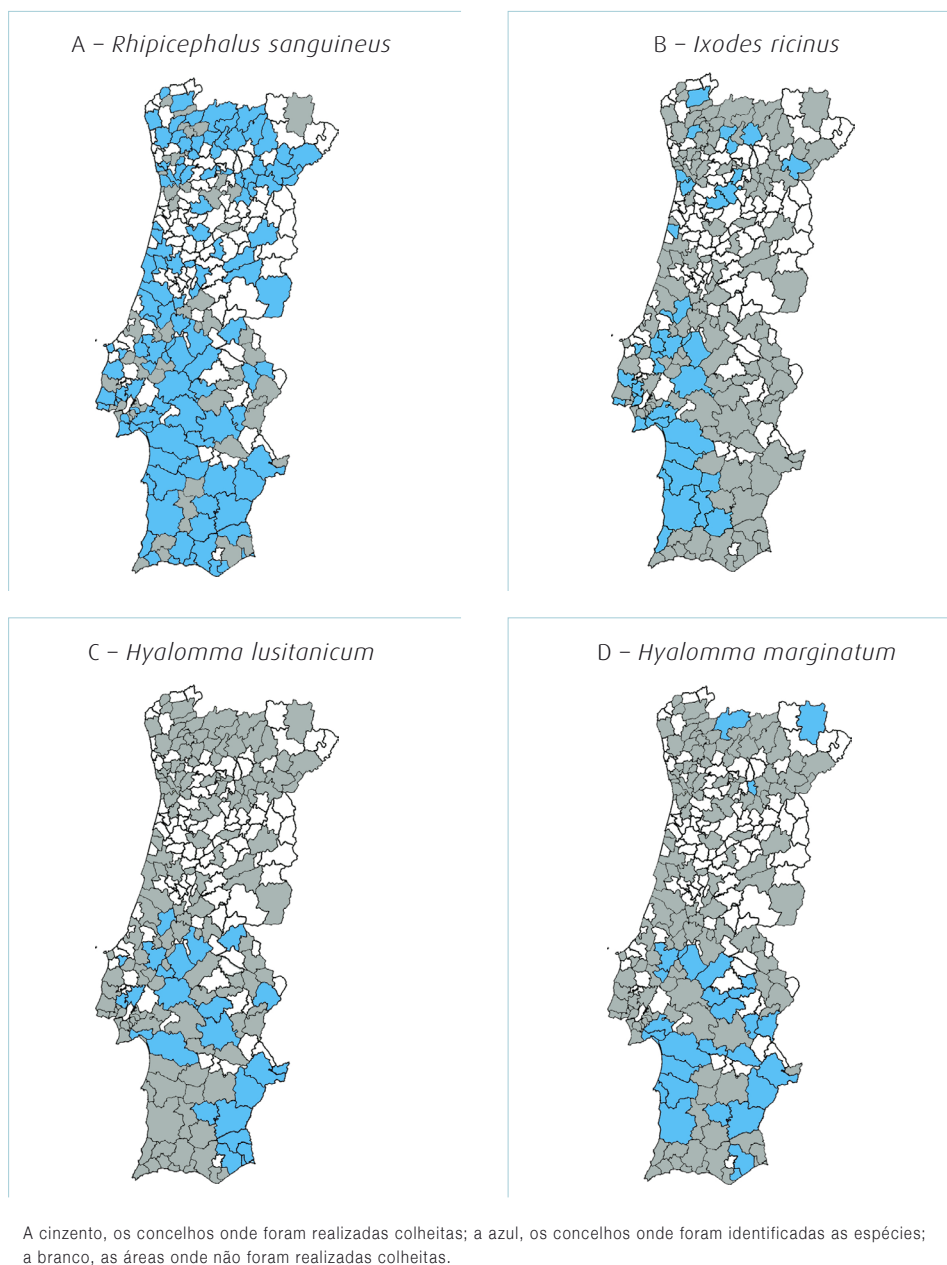
A cinzento, os concelhos onde foram realizadas colheitas; a branco, as áreas onde não foram realizadas colheitas.

marginatum, *Ixodes frontalis*, *I. hexagonus*, *I. ricinus*, *I. ventralloi*, *Rhipicephalus bursa*, *R. pusillus* e *R. sanguineus*.

De acordo com a sua abundância relativa e importância em saúde humana, apresentam-se os mapas de presença/ausência das quatro espécies com maior potencial enquanto vetores de agentes patogénicos para o Homem, *R. sanguineus*, *R. sanguineus* (rickettsias), *I. ricinus* (borrélias), *H. lusitanicum* e *H. marginatum* (vírus da febre hemorrágica Crimeia-Congo) (figura 2).

Com abundâncias relativas inferiores a 1% foram assinaladas em 2019 as espécies ixodológicas *H. punctata*, *I. frontalis*, *I. hexagonus* e *I. ventralloi*, sendo que anos anteriores foram identificadas outras espécies com abundâncias relativas igualmente baixas, nomeadamente *Amblyomma americanum*, *I. canisuga* e *R. annulatus*. Com abundâncias relativas inferiores a 3% assinalam-se ainda as espécies *R. bursa* e *R. pusillus*. As abundâncias determinadas para estas espécies

Figura 2: Portugal – Distribuição geográfica das espécies com maior potencial para transmitirem agentes patogénicos ao Homem, capturados no âmbito do REVIVE em 2019.



podem estar condicionadas por vários fatores, tais como, a época em que foram realizadas as colheitas e/ou os animais rastreados podendo não refletir a verdadeira abundância de algumas destas espécies. Apesar da abundância relativa ser baixa, algumas destas espécies têm particular importância em saúde pública uma vez que são vetores de agentes etiológicos para o Homem, como é o caso de *R. pusillus*, vetor competente de *R. sibirica mongolitimonae*.

No REVIVE 2019 foram identificadas 10 espécies ixodológicas a parasitar o Homem, nomeadamente *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma lusitanicum*, *H. marginatum*, *Ixodes frontalis*, *I. hexagonus*, *I. ricinus*, *I. ventralis*, *Rhipicephalus bursa* e *R. sanguineus*, contrastando com as nove espécies identificadas no REVIVE 2018. No total foram removidos 476 ixodídeos de humanos em 2019.



Todas as espécies identificadas já tinham sido identificadas a parasitar o Homem em Portugal continental. Apesar de não terem sido identificadas espécies exóticas no Homem, destaca-se a deteção de um ixodídeo importado de um país da União Europeia, identificado como *Ixodes* spp. e detetado a parasitar um indivíduo recém-chegado a Portugal.

A parasitar animais domésticos ou silváticos foram identificadas nove espécies ixodológicas, nomeadamente *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *H. marginatum*, *Ixodes hexagonus*, *I. ricinus*, *Rhipicephalus bursa*, *R. pusillus* e *R. sanguineus*.

No total foram removidos 1661 ixodídeos de animais, representando uma diminuição de 23% face a 2018. Todas as espécies já tinham sido anteriormente identificadas a parasitar animais em Portugal continental.

Em 2019 foram ainda identificadas na fase de vida livre seis espécies ixodológicas, designadamente, *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *H. marginatum*, *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus bursa* e *R. sanguineus*, contrastando com as oito identificadas em 2018. No total foram capturados 272 ixodídeos na fase de vida livre. Todas as espécies já tinham sido anteriormente identificadas na vegetação em Portugal continental.

Para a pesquisa de borrélias e rickettsias foram analisados 982 (40,7%) ixodídeos do total de exemplares capturados, distribuídos por 12 espécies e provenientes de 141 concelhos de norte a sul de Portugal. Aproximadamente 10% dos exemplares colhidos em animais ou em fase de vida livre foram selecionados para pesquisa de agentes etiológicos, com base na capacidade vetorial que determinadas espécies têm para transmitir borrélias e rickettsias. No caso dos exemplares removidos do Homem, todos os ixodídeos foram testados individualmente.

Do total de ixodídeos em estudo, 161 (16,3%) foram positivos na deteção de DNA de *Rickettsia* e 18 (1,8%) para a presença de DNA de *Borrelia*.

As amostras positivas, provenientes de 70 concelhos, pertenciam a quatro espécies de ixodídeos – *D. marginatus*, *H. marginatum*, *I. ricinus* e *R. sanguineus*. *I. ricinus* foi a espécie em que foi detetado maior número de exemplares

positivos. A ausência de caracteres distintivos em 17 ixodídeos positivos condicionou a identificação à espécie, sendo apenas mencionados os géneros a que pertenciam (*Dermacentor* spp., *Hyalomma* spp. e *Ixodes* spp.) (quadro 2).

No total foram detetadas oito espécies de rickettsias: *Rickettsia aeschlimannii*, *R. conorii*, *R. helvetica*, *R. massiliae*, *R. monacensis*, *R. sibirica mongolitimonae*, *R. raoulti* e *R. slovaca*.

R. massiliae foi a espécie mais prevalente (n=59; 36%), seguido de *R. monacensis* (n=51; 31,6%). *R. conorii* e *R. mongolitimonae* foram as espécies menos prevalentes, tendo sido detetadas apenas em duas e em uma amostra, respetivamente. Contudo, esta distribuição está de acordo com o que se conhece relativamente à maior prevalência de espécies de rickettsias menos patogénicas nos ixodídeos comparativamente com espécies patogénicas como *R. conorii*.

Durante 2019, destaca-se a deteção de três espécies de *Rickettsia* já associadas a casos de doença em Portugal: *R. conorii*, agente etiológico da febre escaro nodular, *R. sibirica mongolitimonae*, agente de LAR e *R. slovaca*, agente responsável de TIBOLA.

Relativamente à deteção de *Borrelia*, foram identificadas quatro genoespécies de borrélias: *B. afzelii*, *B. aligera*, *B. lusitaniae* e *B. turdi*; apenas *B. afzelii* e *B. lusitaniae* estão associadas a doença no Homem. A espécie de *Borrelia* mais prevalente na amostra analisada foi *B. lusitaniae* (n=14; 82%), sendo na região do Alentejo onde se verificou a maior prevalência.

No âmbito do REVIVE, em 2019 foram detetadas pela primeira vez *B. aligera* e *B. turdi*. Até ao momento, estas genoespécies de borrélia apenas tinham sido detetadas em carraças que parasitavam aves, não havendo qualquer registo de estarem implicadas na etiologia de doença no Homem (6,7).

Foram ainda identificadas carraças coinfectadas com *B. lusitaniae* e *R. monacensis* (n=4) e *B. lusitaniae* e *R. helvetica* (n=3). Estas coinfeções já foram detetadas em anos anteriores e o seu impacto na transmissão ao Homem continua por esclarecer.



Quadro 2: ⬇ Espécies de *Rickettsia* e *Borrelia* detetadas em Ixodídeos colhidos em hospedeiros e na vegetação no âmbito do REVIVE 2019.

		Fase parasitária			Fase de vida livre	
Agentes identificados (situação em Portugal)	Espécies de Ixodídeos	Homem	Cão	Outros animais	Vegetação e outros	Total
Associados a doença no Homem						
<i>B. afzelii</i>	<i>Ixodes</i> spp.	1				1
<i>B. lusitaniae</i>	<i>Ixodes</i> spp.	1				1
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	13				13
<i>Borrelia</i> spp.	<i>I.ricinus</i>	1				1
<i>R. conorii</i>	<i>R. sanguineus</i>		2			2
<i>R. mongolitimonae</i>	<i>H. marginatum</i>			1		1
<i>R. slovaca</i>	<i>D. marginatus</i>	4				4
Doença ainda não assinalada ‡						
<i>B. aligera</i>	<i>Ixodes</i> spp.	1				1
<i>B. turdi</i>	<i>I. ricinus</i>	1				1
<i>R. aeschlimannii</i>	<i>H. marginatum</i>	14			1	15
<i>R. aeschlimannii</i>	<i>H. spp.</i>	1				1
<i>R. aeschlimannii</i>	<i>R. sanguineus</i>	1	1			2
<i>R. helvetica</i>	<i>I. ricinus</i>	17				17
<i>R. helvetica</i>	<i>Ixodes</i> spp.	4				4
<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i>	31	15	5	8	59
<i>R. monacensis</i>	<i>I. ricinus</i>	40			1	41
<i>R. monacensis</i>	<i>Ixodes</i> spp.	9				9
<i>R. monacensis</i>	<i>R. sanguineus</i>	1				1
<i>R. raoulti</i>	<i>D. marginatus</i>	3			1	4
<i>R. raoulti</i>	<i>Dermacentor</i> spp.	1				1

† alguns destes agentes patogénicos têm sido associados a casos pontuais de doença no Homem em outras regiões geográficas.

Discussão e conclusões

Nos nove anos de implementação do programa REVIVE-Ixodídeos realizaram-se 10 218 colheitas de ixodídeos em 234 concelhos de Portugal continental, tendo sido identificados 51995 ixodídeos de 14 espécies autóctones e uma exótica – *A. americanum*, assim como a importação da Europa central de seis ixodídeos da espécie *I. ricinus* e um *Ixodes* spp. a parasitar indivíduos que se deslocaram a Portugal ou que regressaram de viagens ao estrangeiro.

Desde o início que este programa tem contribuído para o conhecimento ecoepidemiológico de espécies de vetores, a sua distribuição geográfica, período de atividade e abundância, assim como para o esclarecimento do seu papel como vetor de agentes de doença para o Homem. Infelizmente ainda não foram recebidas amostras provenientes das Regiões Autónomas da Madeira e dos Açores.

Em 2019, entre janeiro e dezembro, realizaram-se 1088 colheitas de ixodídeos em 166 concelhos de Portugal conti-



mental. No laboratório foram identificados 2409 ixodídeos pertencentes a 12 espécies, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma lusitanicum*, *H. marginatum*, *I. frontalis*, *I. hexagonus*, *I. ricinus*, *I. ventralloii*, *R. bursa*, *R. pusillus* e *R. sanguineus*.

A pesquisa de borrelíias e rickettsias permitiu a identificação de agentes patogénicos para o Homem como, *R. conorii*, *R. mongolitimonae*, *R. slovaca*, *B. lusitaniae* e *B. afzelii*.

Os resultados de 2019 apresentados realçam o papel que o programa REVIVE - Ixodídeos tem na monitorização dos agentes patogénicos que circulam nos ixodídeos e que podem causar doença no Homem e da importância em identificar e sinalizar as áreas geográficas onde se encontram os vetores infetados. É ainda de realçar a deteção em 2019 de um ixodídeo importado de um país da União Europeia, a parasitar um indivíduo recém-chegado a Portugal, que demonstra, mais uma vez, a importância desta rede de vigilância epidemiológica na deteção da introdução de vetores e agentes infecciosos importados ou exóticos.

A identificação dos principais fatores ecológicos que condicionam a presença/ausência de determinada espécie num dado local ou época do ano também têm sido analisados e agora, passados nove anos, começam a ser suficientemente robustos para permitirem a sua análise estatística e o desenvolvimento de modelos de predição em termos de presença/ausência.

O reforço das capturas realizadas em humanos, que se deve à colaboração dos profissionais de saúde dos centros de saúde e hospitais, foi relevante para a confirmação que o contacto do Homem com os ixodídeos é mais frequente do que habitualmente referido em estudos realizados em Portugal. Este facto também está de acordo com outros estudos que referem o aumento da incidência das doenças transmitidas por carraças, não só em Portugal, como em toda a Europa.

O REVIVE tem contribuído para um conhecimento sistemático da fauna de culicídeos e de ixodídeos de Portugal, e do seu potencial papel de vetor na transmissão de agentes patogénicos, constituindo uma componente dos programas de vigilância epidemiológica indispensável à avaliação do

risco de transmissão de doenças potencialmente graves. As informações produzidas têm sido utilizadas para informar e alertar as autoridades de saúde pública competentes, que têm a responsabilidade de planificar e implementar medidas de prevenção e/ou mitigação que previnam a ocorrência de surtos de doenças transmitidas por carraças.

Agradecimento:

A todos os profissionais do País envolvidos no projeto REVIVE, pela colaboração no trabalho de campo e de registo. Lista completa da equipa em: REVIVE – Culicídeos e Ixodídeos: relatório 2019, pp. 55-60. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7107>

Referências bibliográficas:

- (1) Guglielme AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, et al. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*. 2010;2528(1):1–28. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2528.1>
- (2) Silva MM, Santos AS, Formisinhos P, et al. Carraças associadas a patologias infecciosas em. *Acta Med Port*. 2006;19(1):39-48. <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/907/580>
- (3) Fillâtre P, Revest M, Tattevin P. Crimean-Congo hemorrhagic fever: an update. *Med Mal Infect*. 2019;49(8):574-585. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.09.005>. [Erratum *Med Mal Infect*. 2020;50(1):95-96. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.11.004>]
- (4) de Carvalho IL, Milhano N, Santos AS, et al. Detection of *Borrelia lusitaniae*, *Rickettsia* sp. IRS3, *Rickettsia monacensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* collected in Madeira Island, Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008;8(4):575-9. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0245>
- (5) Santos AS, Lopes de Carvalho I, Sousa R, et al. Revive 2017 Carraças. In: REVIVE 2019 - Culicídeos e Ixodídeos. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2020. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7107>
- (6) Norte AC, Araújo PM, da Silva LP, et al. Characterization Through Multilocus Sequence Analysis of *Borrelia turdi* Isolates from Portugal. *Microb Ecol*. 2016;72(4):831-39. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0660-1>
- (7) Norte AC, Margos G, Becker NS, et al. Host dispersal shapes the population structure of a tick-borne bacterial pathogen. *Mol Ecol*. 2020;29(3):485-501. <https://doi.org/10.1111/mec.15336>

_Monitorização do mosquito invasor *Aedes albopictus* em Portugal pela Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE), 2017-2019

Monitoring of the invasive mosquito Aedes albopictus in Portugal by the Vector Surveillance Network (REVIVE), 2017-2019

Hugo Costa Osório¹, Fátima Amaro¹, Líbia Zé-Zé¹, Manuel Silva¹, Maria João Alves¹; Equipa REVIVE²

hugo.osorio@insa.min-saude.pt

(1) Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Alentejo, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte; Instituto dos Assuntos Sociais e da Saúde da Madeira, Portugal

_Resumo

O mosquito *Aedes albopictus*, conhecido vulgarmente como Mosquito Tigre Asiático, é um mosquito invasor procedente da região Ásia-Pacífico. Esta espécie é importante em saúde pública e veterinária devido ao seu papel na transmissão de diversos agentes patogénicos, nomeadamente os arbovírus chikungunya, dengue e Zika. Introduzido e estabelecido ao longo da costa mediterrânica europeia, incluindo Espanha desde 2004, este mosquito vetor tem sido responsável pelos surtos autóctones de arbovírus que têm ocorrido na Europa desde 2007. Em Portugal, o *Ae. albopictus* foi detetado pela primeira vez no âmbito da Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE) em dois eventos de introdução independentes, na região norte em 2017 e no Algarve em 2018. O presente estudo teve como objetivo caracterizar a distribuição geográfica e atividade sazonal da espécie invasora *Ae. albopictus* em Portugal. A vigilância ativa foi significativamente incrementada pela REVIVE após estas deteções. Foram utilizadas armadilhas específicas para mosquitos adultos (*Biogents Sentinel traps*) e para as fases imaturas (*Ovitrap*s) para determinar a sua distribuição geográfica e sazonal, abundância e avaliar o processo de estabelecimento e dispersão da espécie a nível regional e nacional. Estes dados são indispensáveis no planeamento estratégico de medidas de controlo vetorial para evitar a dispersão das populações de mosquitos vetores e prevenir surtos de doenças associadas a *Ae. albopictus*.

_Abstract

The mosquito *Aedes albopictus*, also known as the Asian Tiger Mosquito, is an invasive mosquito from the Asia-Pacific region. This species is important in public and veterinary health due to its role in the transmission of several pathogens, namely the arboviruses chikungunya, dengue and Zika. Introduced and established along the European Mediterranean coast, including Spain since 2004, this vector mosquito has been responsible for the autochthonous arboviruses outbreaks that have been occurring more and more frequently in the European region since 2007. In Portugal, *Ae. albopictus* was detected for the first time by the Vector Surveillance Network (REVIVE) in two independent introduction events, in the northern region in 2017 and Algarve in 2018. The aim of the present study was to characterize the geographic distribution and seasonal activity of the invasive species *Ae. albopictus* in Portugal. Active surveillance was significantly increased by the REVIVE after these detections. Specific traps were used for adult mosquitoes (*Biogents Sentinel traps*) and for the immature

stages (*ovitraps*) to determine its geographical and seasonal distribution, abundance and evaluate its way of establishment and dispersion at a regional and national level. These data are necessary in the strategic planning of vector control measures to avoid the dispersion of these populations of vectors and prevent outbreaks of vector-borne diseases.

_Introdução

A importância dos mosquitos e doenças associadas tem vindo a aumentar nas últimas duas décadas na Europa, principalmente devido à introdução e estabelecimento de mosquitos invasores exóticos do género *Aedes*. Estes mosquitos vetores são competentes na transmissão de agentes patogénicos, como os vírus chikungunya, dengue e Zika, para os quais os mosquitos autóctones, reconhecidos na fauna natural da região, não são competentes. As espécies de mosquitos invasores têm uma elevada capacidade de colonizar novos territórios e estão extremamente bem-adaptadas às atividades humanas. São introduzidas em novas regiões pelo transporte global de bens comerciais, nomeadamente o comércio internacional de pneus para recauchutagem e plantas.

O mosquito *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) representa um exemplo de como uma espécie exótica pode ser introduzida e disseminada numa nova região geográfica. Nas últimas décadas, esta espécie foi disseminada pelo mundo, encontrando-se atualmente amplamente distribuída (1,2). O sucesso desta expansão resultou principalmente das atividades de transporte de mercadorias no comércio global, através das quais os ovos de *Ae. albopictus* foram passivamente transportados em pneus usados e plantas ornamen-



tais de regiões infestadas para novas regiões. O transporte de mosquitos adultos por via terrestre proporcionou, posteriormente, um modo de dispersão passiva após o estabelecimento do mosquito nas novas regiões (3,4).

Na Europa, *Ae. albopictus* foi detetado, pela primeira vez, na Albânia em 1979 (5) e após introdução e estabelecimento na Itália, na década de 90, rapidamente disseminou pela maioria dos países da orla mediterrânea, já se tendo estabelecido em 19 deles (6,7). Portugal esteve sempre na lista das regiões com condições apropriadas para a sua introdução e estabelecimento (2). No âmbito da Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE), o *Ae. albopictus* foi detetado pela primeira vez, em dois eventos de introdução independentes, na região norte em 2017 e no Algarve em 2018 (8,9).

Na Europa, a transmissão autóctone de arbovírus, como chikungunya e dengue, relacionada com a presença de *Ae. albopictus*, ocorre desde 2007 (10,11). Mais recentemente, surtos de chikungunya foram relatados em França em 2010 (12,13), 2014 (14) e 2017 (15), e novamente, em Itália em 2017 (16). Casos de dengue autóctone causados pelos serótipos 1 e 2 de dengue também foram relatados em 2010 na Croácia e na França (17,18) e na França em 2013 (19), 2014 (20) e 2015 (21). Em 2018, foram confirmados 12 casos de dengue autóctone na União Europeia, seis na Espanha (cinco na região de Múrcia e um na Catalunha) e seis na França (cinco casos em Saint Laurent du Var, e um caso em Montpellier) (22). Mais recentemente, em agosto de 2020, foi registado o primeiro surto autóctone de dengue em Itália (23). Em Portugal ainda não foram reportados casos de doença associados a transmissão de agentes por *Ae. albopictus*.

A prevenção de doenças associadas a vetores depende, em grande parte, de controlo vetorial eficaz e sustentável. As evidências têm mostrado que o envolvimento da comunidade nas políticas de saúde ambiental é também um fator crucial para a obtenção de melhores resultados na supressão das populações de vetores. No entanto, a caracterização espacial (geográfica) e temporal (sazonal) das populações de *Ae. albopictus* que é obtida pelas atividades de monitorização ativa é necessária antes de qualquer estratégia de intervenção. Estes dados são obtidos através de monitorização ento-

mológica contínua e permanente, com o objetivo de caracterizar a fenologia e a distribuição das populações-alvo de vetores e permitem a elaboração de estratégias de controlo ajustadas que suprimindo a população de mosquitos previnem surtos de doenças associadas (16,24,25).

Em Portugal, a REde de Vigilância de Vetores (REVIVE) criada em 2008 por protocolo entre as Administrações Regionais de Saúde, Direção-Geral da Saúde e Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, é responsável pela monitorização de mosquitos vetores e pesquisa de arbovírus com impacto em saúde pública. A vigilância de mosquitos é realizada de maio a outubro e, para dar cumprimento ao Regulamento Sanitário Internacional, em pontos de entrada, como aeroportos, portos, áreas de armazenamento, empresas de recauchutagem de pneus e regiões fronteiriças, onde a monitorização decorre todo o ano (26).

_Objetivo

Caracterização da distribuição geográfica e atividade sazonal da espécie invasora *Aedes albopictus* em Portugal entre 2017-2019, no âmbito da Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE).

_Materiais e métodos

Monitorização da REVIVE nas áreas-alvo e colheita de mosquitos

As colheitas de mosquitos vetores foram realizadas no âmbito do REVIVE em propriedades públicas e privadas com conhecimento e permissão do responsável. As amostras de vetores foram enviadas para o Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas e identificadas usando as chaves de identificação de Ribeiro e Ramos (27) e Schaffner e colaboradores (28).

Após a deteção da espécie *Ae. albopictus*, foram estabelecidas estações de monitorização permanentes, em ambas as regiões-alvo. Na região Norte – Penafiel foram utilizadas sete *Biogents sentinel traps* (BGS) e 34-73 armadilhas de ovos (*ovitrap*s) durante o período 2017-2019. Na região Algarve – Loulé (LAO 1), freguesias de Quarteira e Almancil – foram utilizadas oito BGS e 30-36 *ovitrap*s durante o mesmo



período. As armadilhas foram inspecionadas semanalmente durante todo o ano para a presença de mosquitos adultos e ovos. Nas *ovitrap*s positivas, o papel de oviposição ou os imaturos de mosquito identificados, larvas e pupas, foram colocados em tubos de colheita e enviados ao laboratório para processamento. No local, um novo papel de oviposição e água foram colocados após a limpeza da *ovitrap*. Relativamente aos mosquitos adultos capturados nas armadilhas BGS, estes foram aspirados, transferidos vivos para tubos de colheita e enviados ao laboratório.


Pesquisa de arbovírus

Considerando sua importância como vetores para vários arbovírus importantes, os mosquitos adultos foram selecionados e analisados por PCR em tempo real para chikungunya, dengue e vírus Zika usando os *kits* RealStar[®] RT-PCR (Altona Diagnostics GmbH, Hamburgo, Alemanha) e por

Pan-flavi NS5 RT-PCR convencional para incluir outros flavivírus (29,30).

_Resultados

Na região norte, o mosquito *Aedes albopictus* foi identificado no concelho de Penafiel (LAU 1), nas freguesias de Guilhufe e Urrô (LAU 2), numa fábrica de recauchutagem de pneus com comércio internacional. Na região do Algarve, o mosquito *Ae. albopictus* foi identificado no concelho de Loulé (LAU 1), inicialmente em Vilamoura (Quarteira, LAU 2) e posteriormente em Vale do Garrão, Vale do Lobo e Quinta do Lago (Almancil, LAU 2) (figura 1).

Figura 1:  Regiões onde foi identificada a presença e atividade do mosquito *Aedes albopictus* em Portugal desde a sua primeira deteção em 2017: concelho de Penafiel (LAU 1), nas freguesias de Guilhufe e Urrô (LAU 2) e Loulé (LAU 1), nas freguesias de Quarteira e Almancil (LAU 2).

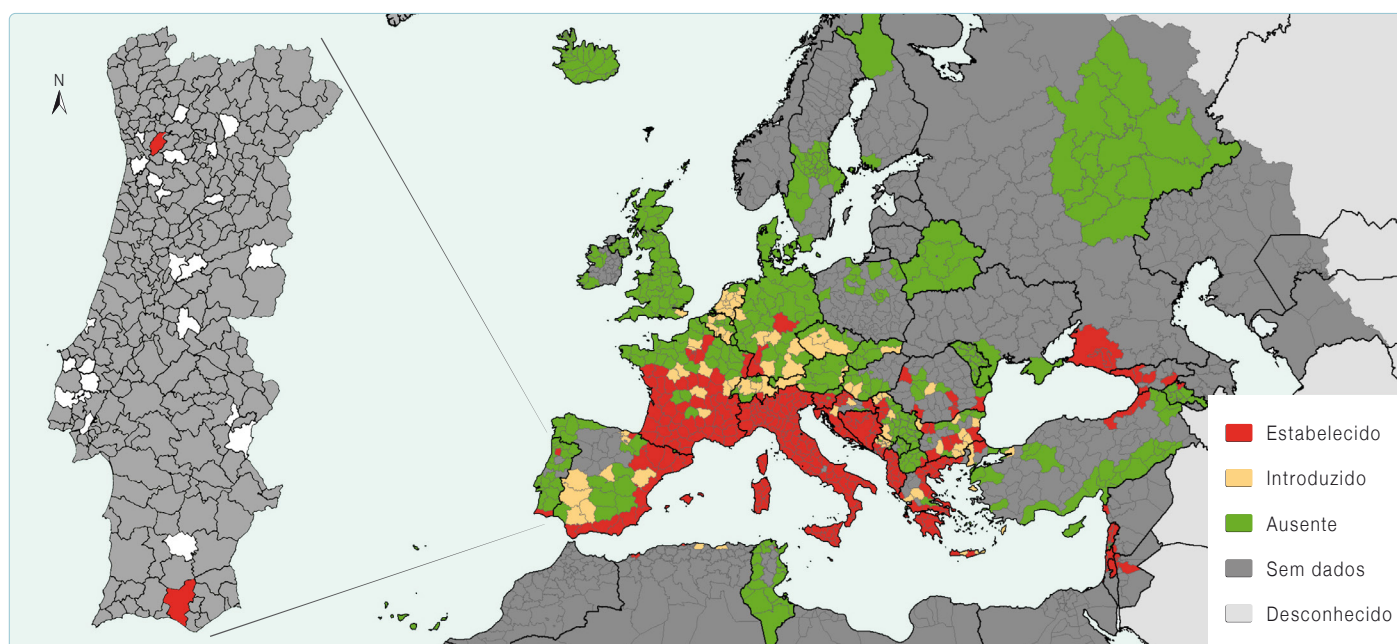


Figura adaptada de: ECDC, 2020, <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>; Relatório REVIVE 2019, <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7107>



Região Norte

A primeira deteção na região norte foi a 4 de setembro de 2017. No período 2017-2019 foram identificados um total de 147 mosquitos adultos e 342 imaturos. O período de atividade sazonal do mosquito corresponde a maio-outubro, com picos de abundância entre agosto e outubro. No período novembro-abril não foi detetada atividade por dois anos consecutivos (gráfico 1).

Relativamente à sua distribuição geográfica, em 2017, o mosquito *Ae. albopictus* foi encontrado apenas no interior do perímetro da fábrica. Em 2018, foi detetado fora do perímetro da fábrica pela primeira vez, situação que se manteve em 2019 (figura 2).

Gráfico 1: Número total de *Aedes albopictus* (larvas e adultos) coletados na região norte de Portugal, no período 2017-2019.

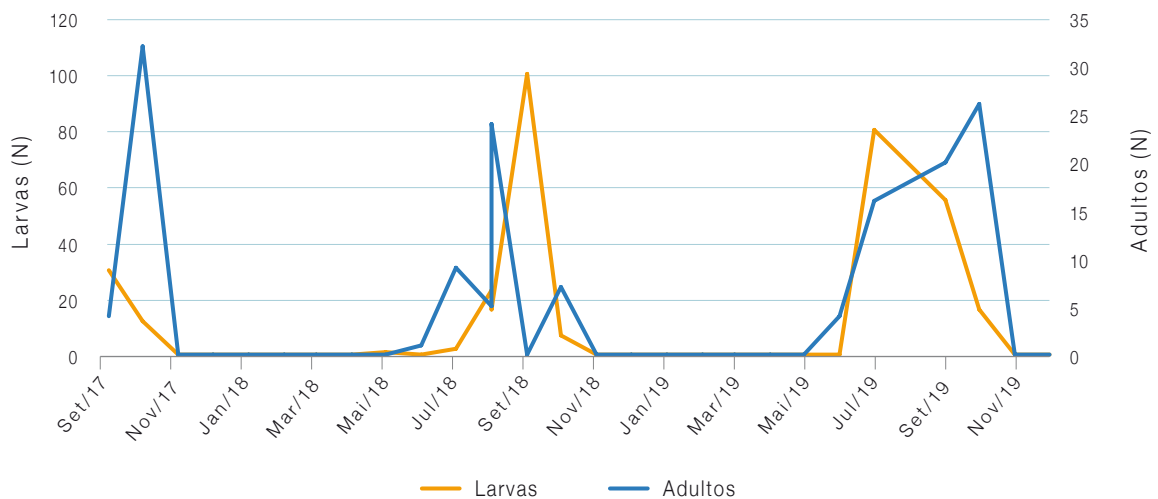
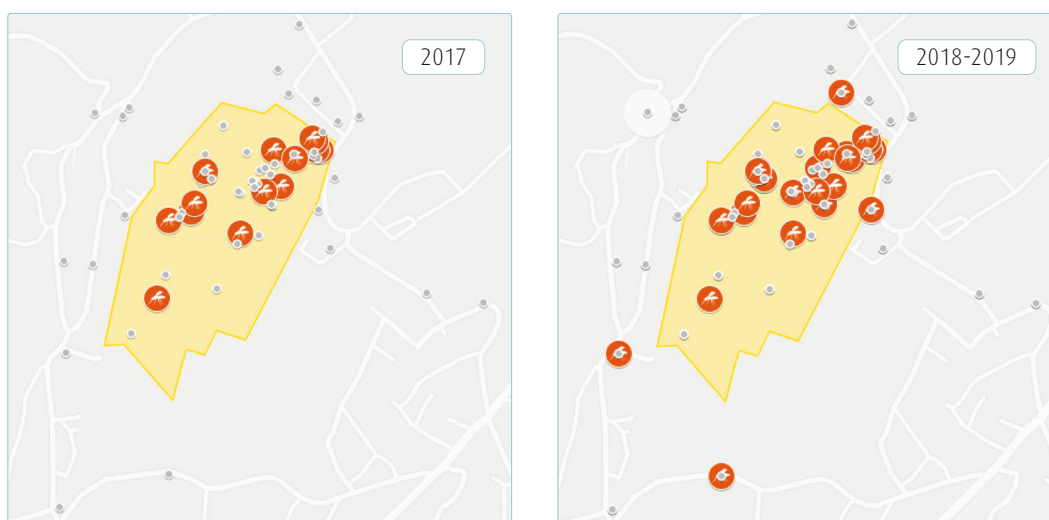


Figura 2: Dispersão do mosquito *Ae. albopictus* para fora do perímetro das instalações da fábrica de recauchutagem de pneus, no período 2017-2019.



A amarelo, área da fábrica; pontos cinzentos, locais de monitorização (negativos); círculos laranja, locais de monitorização (positivos).



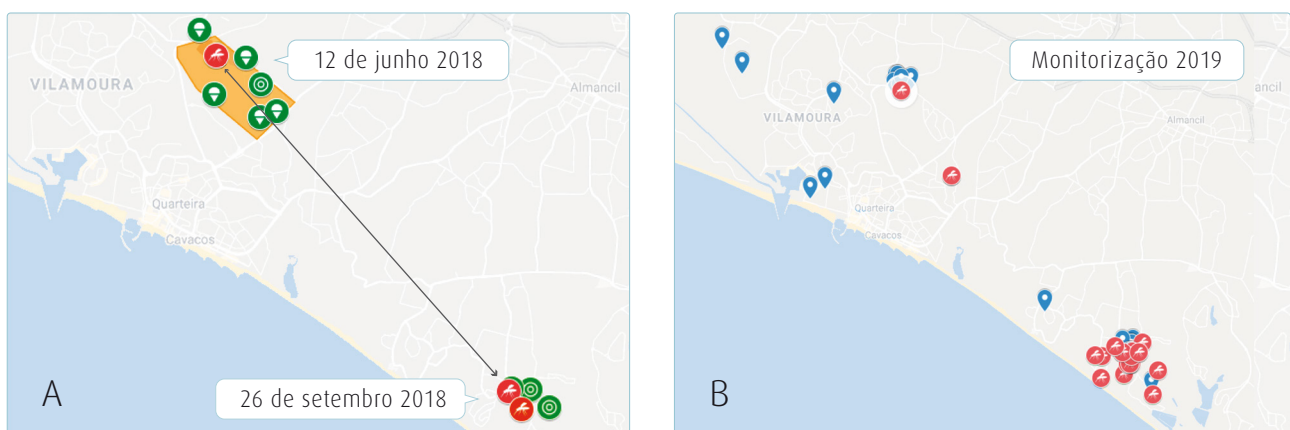
Região do Algarve

No âmbito da REVIVE, o mosquito *Ae. albopictus* foi detetado pela primeira vez a 12 de julho de 2018 em Quarteira, Loulé e foram coletados um total de 453 mosquitos adultos, 530 larvas e 19004 ovos no período 2018-2019. A 26 de setembro de 2018 o mosquito foi detetado pela primeira vez em Almancil (figura 3).

Durante 2019, foi avaliada a sazonalidade e abundância da população de *Ae. albopictus* com base no número de ovos e de mosquitos adultos coletados. Foram identificados 19004

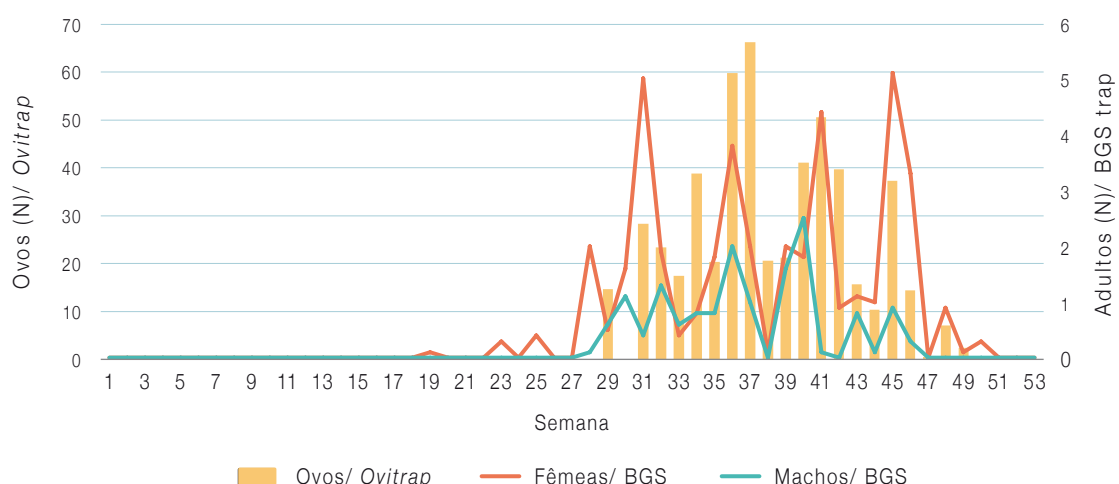
ovos e 449 adultos, 330 fêmeas e 119 machos. O primeiro dia em que se detetou atividade de *Ae. albopictus* foi 9 de maio (semana 19) e o último registo a 16 de dezembro (semana 50) (gráfico 2). O pico de abundância de *Ae. albopictus* foi identificado nos meses de setembro a novembro, correspondendo setembro ao mês com maior número de ovos contados nas *ovitraps* (semana 36-39, n=6949) e novembro o mês com maior número de mosquitos adultos coletados nas armadilhas BGS (semana 45-48, n=74 fêmeas).

Figura 3: A – Detecção do mosquito *Ae. albopictus* inicialmente em Quarteira (12 de junho) e posteriormente em Almancil (LAU 2) a 26 de setembro 2018. B – Estações de monitorização e atividade de *Ae. albopictus* em 2019.



A amarelo, a área inicialmente monitorizada; Estações de monitorização (8 *Biogents sentinel traps* (BGS) e 30-36 *ovitraps*): Negativos à presença de *Ae. albopictus* – pontos verdes (A – 2018) e azuis (B – 2019); Positivos à presença de *Ae. albopictus* – pontos vermelhos.

Gráfico 2: Número de *Aedes albopictus* (fêmeas, machos e ovos) por armadilha, por semana durante 2019.





Em relação à pesquisa de arbovírus, foram analisados 160 mosquitos fêmeas, 53 da região norte e 107 da região do Algarve. O vírus chikungunya e flavivírus patogénicos não foram detetados nas amostras testadas. No entanto, no Algarve foram detetados flavivírus específicos de inseto (ISF) em três *pools*.

_Discussão

O mosquito *Aedes albopictus* encontra-se atualmente estabelecido e em expansão geográfica nas regiões identificadas. Os dados obtidos pela REVIVE promovem, a nível nacional e internacional, a análise do processo de estabelecimento e dispersão no sentido de identificar áreas de risco para a ocorrência de surtos autóctones associados à presença do mosquito. De acordo com o que temos vindo a observar nos últimos dez anos na Europa, a área de distribuição desta espécie vai não só rapidamente aumentar a nível nacional, com a infestação de outras regiões, como também vai aumentar a sua abundância, caso não sejam tomadas medidas de controlo vetorial que suprimam as populações de mosquitos e atrasem ou impeçam a sua dispersão.

Um estudo filogeográfico baseado na análise do mitogenoma e no gene da Citocromo C oxidase (COI) de mosquitos coletados em Portugal em 2017 e 2018, permitiu identificar uma elevada variabilidade genética, dentro e entre as populações de mosquitos a norte e sul do país, compatível com as populações de mosquitos existentes na Europa ⁽³¹⁾. Estes resultados sustentam a ocorrência de vários eventos de introdução, e a análise da sequência do mitogenoma indica ainda uma possível migração de *Ae. albopictus* dentro do país, da localidade de introdução a norte para a região do Algarve.

Os dados de monitorização em ambas as regiões mostram que os meses de setembro a novembro são quando a população se encontra mais abundante e em maior atividade, sendo consequentemente maior o risco de transmissão de agentes e ocorrência de surtos de doença. O período de atividade na região do Algarve é maior (até dezembro) que na região norte, o que muito provavelmente se deve às condições ambientais, particularmente ao efeito da temperatura

na atividade do mosquito. Estudos indicam que quando a média da temperatura mínima aumenta para valores superiores a 13°C as populações de mosquitos na Europa entram em atividade ⁽³²⁾. Este marcador ambiental pode facilitar as tomadas de decisão relativamente à determinação do período de monitorização e atividades de controlo vetorial.

Portugal é uma região de risco para a circulação de doenças associadas a mosquitos, podendo o vírus ser introduzido por um viajante infetado regressado de uma região endémica e posteriormente transmitido localmente pelas populações de *Ae. albopictus*. No Algarve, devido a ser um ponto turístico de grande afluência, recebendo visitantes potencialmente infetados, esta preocupação é acrescida. O risco de ocorrência das doenças associadas a estas espécies de mosquito invasoras aumenta inevitavelmente com a sua presença. No entanto, outros fatores condicionam a circulação dos agentes patogénicos, como a abundância das populações de mosquitos e as condições ambientais, significando que a presença do mosquito por si só não é determinante para a ocorrência de surtos de doença. Mas, em concordância com os exemplos que temos vindo a assistir em vários países europeus, tem de ser feito um esforço considerável e de acordo com uma gestão integrada de ações de monitorização entomológica, vigilância epidemiológica e controlo vetorial ⁽⁴⁾. O envolvimento comunitário, com informação e esclarecimento às populações, como também com a promoção de ações que envolvam a comunidade no controlo dos mosquitos, são indispensáveis nesta lógica de gestão integrada de vetores ⁽³³⁾. A primeira abordagem em qualquer programa de controlo de mosquitos baseia-se na eliminação/ redução de criadouros que é acessível e deve ser praticada pela comunidade. O controlo de mosquitos, particularmente das espécies invasoras, depende de todos. Só com vigilância entomológica e epidemiológica, ações de controlo vetorial efetivas e envolvimento comunitário será possível manter baixo o risco de e doenças associadas a mosquitos em Portugal e noutros países europeus.

A monitorização das populações de vetores pela REVIVE é indispensável no processo de prevenção de doenças associadas a mosquitos. O REVIVE tem contribuído, desde 2008,



para o conhecimento sobre as espécies de vetores presentes nas regiões, a sua distribuição e abundância, assim como para o esclarecimento do seu papel como vetor de agentes de doença e monitorizar as espécies invasoras com importância em saúde pública.

Conclusões

A monitorização pela rede REVIVE é essencial para a deteção atempada e monitorização de mosquitos invasores que promova a ação imediata das autoridades de saúde locais. A presença do mosquito vetor *Ae. albopictus*, espécie exótica e com características invasoras, nas regiões norte e sul de Portugal, representa uma situação de risco acrescido para a saúde pública que vai exigir um esforço de monitorização constante e medidas de controlo eficazes que impeçam a dispersão deste mosquito para outras regiões.

Agradecimento:

A todos os profissionais do País envolvidos no projeto REVIVE, pela colaboração no trabalho de campo e de registo. Lista completa da equipa em: REVIVE – Culicídeos e Ixodídeos: relatório 2019, pp. 55-60. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7107>

Referências bibliográficas:

- (1) Paupy C, Delatte H, Bagny L, et al. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect.* 2009;11(14-15):1177-85. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
- (2) Kraemer MUG, Reiner RC Jr, Brady OJ, et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol.* 2019;4(5):854-63. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>
- (3) Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, et al. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7(1):76-85. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0562>
- (4) Vaux A, Johnston C, Dallimore T, et al. Working towards a co-ordinated approach to invasive mosquito detection, response and control in the UK. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(14):5166. <https://doi.org/10.3390/ijerph17145166>
- (5) Adhami J, Reiter P. Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc.* 1998;14(3):340-43. <https://doi.org/10.1016/j.jamca.1998.03.005>
- (6) European Centre for Disease Control. Development of *Aedes albopictus* risk maps. Stockholm: ECDC, 2009. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/development-aedes-albopictus-risk-maps>
- (7) Medlock JM, Hansford KM, Versteir V, et al. An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. *Bull Entomol Res.* 2015;105(6):637-63. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000103>
- (8) Osório HC, Zé-Zé L, Neto M, et al. Detection of the Invasive Mosquito Species *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Portugal. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(4):820. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040820>
- (9) Marabuto E, Rebelo MT. The Asian tiger mosquito, *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), a vector of dengue, chikungunya and zika viruses, reaches Portugal (Diptera: Culicidae). *Zootaxa.* 2018;4413(1):197-200. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4413.1.10>
- (10) Angelini R, Finarelli AC, Angelini P, et al. Chikungunya in north-eastern Italy: a summing up of the outbreak. *Euro Surveill.* 2007;12(11):e071122-2. <https://doi.org/10.2807/esw.12.47.03313-en>
- (11) Rezza R, Nicoletti L, Angelini R, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 2007;30:1840-6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61779-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61779-6)
- (12) Grandadam M, Caro V, Plumet S, et al. Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):910-13. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101873>
- (13) Vega-Rua A, Zouache K, Caro V, et al. High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PLoS One.* 2013;8(3):e59716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059716>
- (14) Delisle E, Rousseau C, Broche B, et al. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill.* 2015;20(17):21108. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.17.21108>
- (15) Calba C, Guerbois-Galla M, Franke F, et al. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(39):17-00647. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00647>
- (16) Manica M, Guzzetta G, Poletti P, et al. Transmission dynamics of the ongoing chikungunya outbreak in Central Italy: from coastal areas to the metropolitan city of Rome, summer 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(44):17-00685. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.44.17-00685>
- (17) Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, et al. Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill.* 2011;16(9):19805. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19805>
- (18) La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(39):19676. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19676>
- (19) Marchand E, Prat C, Jeannin C, et al. Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Euro Surveill.* 2013;18(50):20661. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.50.20661>
- (20) Giron S, Rizzi J, Leparc-Goffart I, et al. New occurrence of autochthonous cases of dengue fever in southeast France, August-September 2014. *Bull Epidemiol Hebd (Paris).* 2015;13-14:217-23.
- (21) Succo T, Leparc-Goffart I, Ferré JB, et al. Autochthonous dengue outbreak in Nîmes, South of France, July to September 2015. *Euro Surveill.* 2016;21(21):30240. doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.21.30240>
- (22) European Centre for Disease Control. Dengue - Annual Epidemiological Report for 2018. Stockholm: ECDC, 2019. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/dengue-annual-epidemiological-report-2018>
- (23) Lazzarini L, Barzon L, Foglia F, et al. First autochthonous dengue outbreak in Italy, August 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(36):2001606. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.36.2001606>
- (24) Tisseuil C, Velo E, Bino S, et al. Forecasting the spatial and seasonal dynamic of *Aedes albopictus* oviposition activity in Albania and Balkan countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018;12:e0006236. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006236>
- (25) Heinisch M, Diaz-Quijano FA, Chiaravallotti-Neto F, et al. Seasonal and spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a municipal urban park in São Paulo, SP, Brazil. *Acta trop.* 2019;189:104-13. Epub 2018 Sep 30. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.011>
- (26) Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac. Relatório REVIVE 2019 – Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2020. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7107>
- (27) Ribeiro H, Ramos, HC. Identification Keys of the Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Continental Portugal, Açores and Madeira. *Eur Mosq Bull.* 1999;3:1-11.



- (28) Schaffner F, Angès G, Geoffroy B, et al (eds). The mosquitoes of Europe: an identification and training programme. Paris: IRD éditions, 2001.
- (29) Briese T, Jia XY, Huang C, et al. Identification of a Kunjin/ West Nile-like flavivirus in brains of patients with New York encephalitis. *Lancet*. 1999;354(9186):1261-62. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)04576-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)04576-6) [Erratum in: *Lancet* 1999 Nov 6;354(9190):1650]
- (30) Briese T, Rambaut A, Pathmajeyan M, et al. Phylogenetic analysis of a human isolate from the 2000 Israel West Nile virus epidemic. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(5):528-31. <https://doi.org/10.3201/eid0805.010324>
- (31) Zé-Zé L, Borges V, Osório HC, et al. Mitogenome diversity of *Aedes (Stegomyia) albopictus*: detection of multiple introduction events in Portugal and potential within-country dispersal. *bioRxiv*. Epub 2020.02.12. <https://doi.org/10.1101/2020.02.12.945741>
- (32) Roiz D, Rosà R, Arnoldi D, et al. Effects of temperature and rainfall on the activity and dynamics of host-seeking *Aedes albopictus* females in northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010;10(8):811-16. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0098>
- (33) Bartumeus F, Oltra A, Palmer JRB. Citizen Science: a Gateway for Innovation in Disease-Carrying Mosquito Management? *Trends Parasitol*. 2018;34(9):727-29. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.04.010>

Prevalência da perturbação do espectro do autismo na região Centro de Portugal: um estudo no âmbito do projeto ASDEU

Prevalence study of autism spectrum disorder in the região Centro of Portugal: the ASDEU project

Célia Rasga ^(1,2), João Xavier Santos ^(1,2), Cátia Café ⁽³⁾, Alexandra Oliveira ⁽³⁾, Frederico Duque ⁽³⁻⁶⁾, Ana Nunes ⁽²⁾, Guiomar Oliveira ⁽³⁻⁵⁾, Astrid Moura Vicente ^(1,2)

astrid.vicente@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas, Faculdade de Ciência, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(3) Unidade de Neurodesenvolvimento e Autismo. Centro de Desenvolvimento da Criança. Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

(4) Clínica Universitária de Pediatria. Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

(5) Centro de Neurociências e Biologia Celular - Instituto de Imagem Biomédica e Ciências da Vida. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

(6) Centro de Imagem Biomédica e Investigação Translacional, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

_Resumo

A prevalência da perturbação do espectro do autismo (PEA) em crianças foi estimada na região Centro de Portugal, no âmbito do projeto *Autism Spectrum Disorders in the European Union* (ASDEU). A metodologia de estudo baseou-se no rastreio de crianças entre os 7 e 9 anos matriculadas, no ano letivo de 2016/2017, em escolas primárias desta região. O rastreio incluiu todas as escolas com unidades de apoio especializado para crianças com problemas de neurodesenvolvimento e cerca de 10% das escolas regulares, selecionadas aleatoriamente. A sinalização das crianças foi feita pelos professores com recurso a um questionário estruturado, previamente validado, após consentimento parental. O diagnóstico foi feito através de avaliação clínica e funcional direta por equipa clínica especializada. Foram rastreadas 13 690 crianças de 173 escolas. A prevalência estimada para a PEA na região Centro foi de 0,5% (IC95% 0,3-0,7). Nas escolas com unidades de apoio especializado para autismo, observou-se uma prevalência substancialmente mais elevada de 3,3% (IC95% 2,7-3,9), indicando que a maioria das crianças está a receber o apoio educativo mais indicado. A prevalência de PEA na região Centro foi comparável a outros países envolvidos no projeto ASDEU, tendo-se, no entanto, observado assimetrias regionais na Europa.

_Abstract

The prevalence of Autism Spectrum Disorder (ASD) was analyzed in children from the região Centro of Portugal, as part of the 'Autism Spectrum Disorders in the European Union' (ASDEU) project. The study methodology was based on the screening of children aged 7 to 9 in approximately 10% of primary schools, randomly selected, and including all schools with special support units for children with neurodevelopmental problems. Teachers identified children with potential ASD-related behavior using a structured questionnaire, the 'Teacher Nomination Form', upon parental consent. The nomination was followed by a clinical and functional evaluation by an expert clinical team for diagnosis. A total of 13 690 children from 173 participating schools were screened. The prevalence of ASD in região Centro was 0.5% (95% CI 0.3-0.7). In schools with special support units for autism, a substantially higher prevalence of 3.3% (95% CI 2.7-3.9) was observed, indicating that the majority of children with ASD were receiving the most adequate educational support. The prevalence of ASD in região Centro was comparable to other countries involved in the ASDEU project, with regional asymmetries observed across Europe.

_Introdução

A Perturbação do Espectro do Autismo (PEA) é uma perturbação do neurodesenvolvimento caracterizada por alterações persistentes na comunicação e interação social e pela presença de padrões repetitivos e restritos de comportamentos, interesses ou atividades ^(1,2).

Em 1966, seguindo os critérios pioneiros de Leo Kanner ⁽³⁾, um primeiro estudo epidemiológico estimou a prevalência do autismo em cerca de 1 em cada 2500 crianças (0,04%) ⁽⁴⁾. Em Portugal continental e nos Açores, no ano escolar de 1999/2000, a prevalência do autismo foi estimada em 0,092% e 0,156%, respetivamente. ⁽⁵⁾ Múltiplos estudos desde meados da década de 90 reportaram consistentemente prevalências de autismo mais elevadas ^(6,7), sendo notória também a sua variabilidade geográfica ^(7,8). A utilização de metodologias de estudo heterogéneas tem dificultado uma comparação direta dos resultados, e consequentemente a definição de um quadro abrangente da distribuição da prevalência da PEA em termos globais. No sentido de obviar este problema, o projeto *Autism Spectrum Disorders in the European Union* (ASDEU), financiado pela Comissão Europeia, levou a cabo o estudo da prevalência da PEA em regiões de 12 países da Europa (Dinamarca, Finlândia, Itália, Espanha, Portugal, Polónia, Roménia, Bulgária, França, Áustria, Islândia e Irlanda), utilizando metodologias melhor padronizadas.

_Objetivo

O objetivo deste estudo foi estimar a prevalência da perturbação do espectro do autismo na região Centro de Portugal, no âmbito do projeto ASDEU.



_Material e métodos

A população-alvo deste estudo foi composta por crianças de ambos os sexos e de qualquer etnia, com idades compreendidas entre os 7 e os 9 anos, a frequentar o ensino básico no ano escolar de 2016/2017, na região Centro de Portugal.

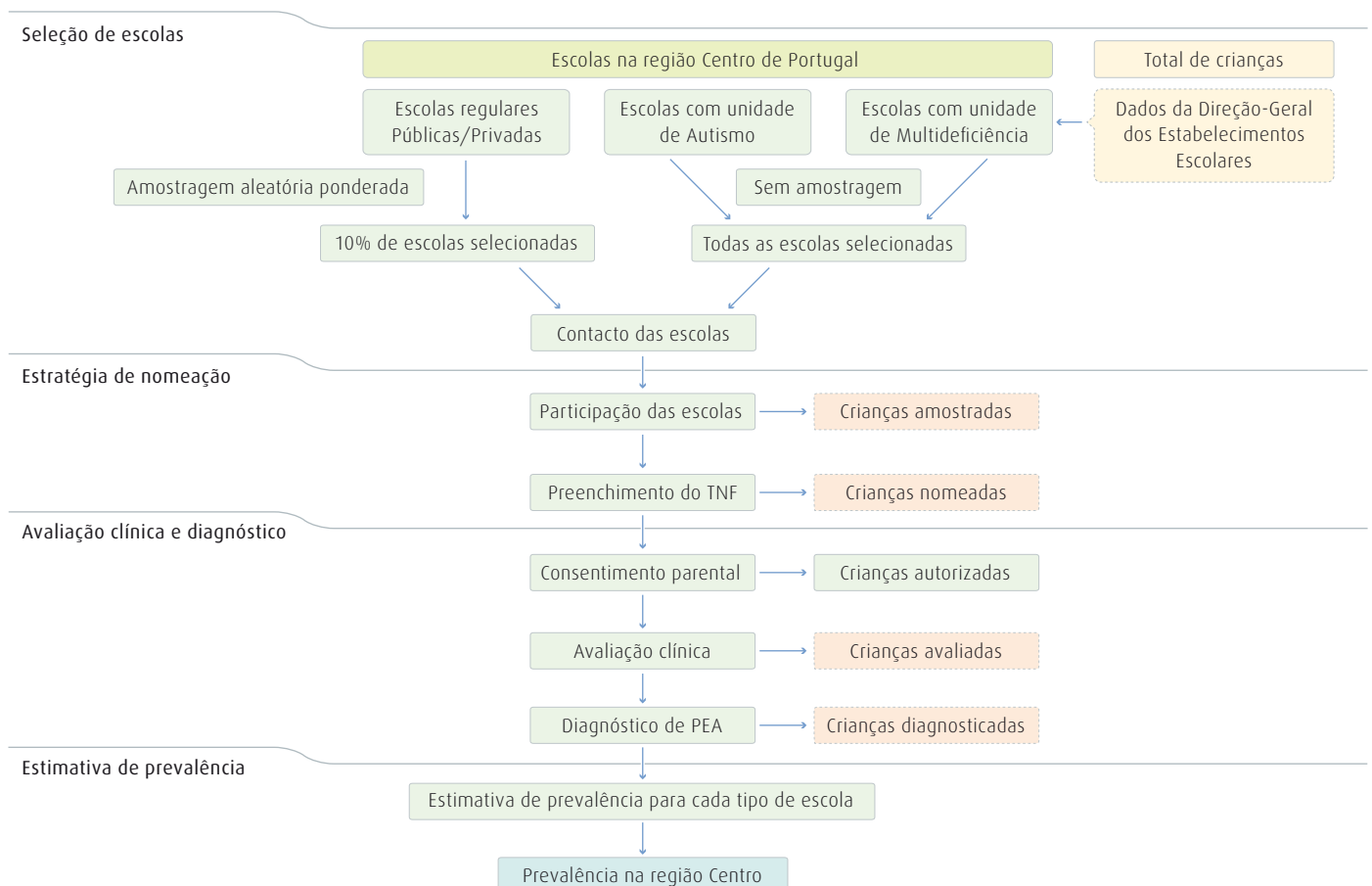
A partir dos dados fornecidos pela Direção-Geral dos Estabelecimentos Escolares, foram selecionadas para rastreio todas as escolas com 'Unidades de educação estruturada para apoio e inclusão de alunos com PEA' (UA, n=41) ou 'Unidades de apoio especializado para a educação de alunos com multideficiência e cegueira ou surdez congénita' (UM, n=34) e ainda, através de seleção aleatória, cerca de 10% das escolas públicas ou privadas sem UA ou UM (escolas regulares) da região Centro (n=122).

Toda a documentação necessária à participação no estudo foi enviada às escolas selecionadas, incluindo notas informa-

tivas para os professores e declarações de consentimento para participação. Para o rastreio das crianças nas escolas utilizou-se um questionário, designado *Teacher Nomination Form* (TNF) (9), previamente traduzido e validado. Este formulário solicita aos professores que indiquem se um ou mais dos seus alunos (até 4) apresenta uma ou mais de seis características de comportamento associadas à PEA descritas. As crianças nomeadas pelos professores foram incluídas no estudo após consentimento informado por escrito dos pais, obtido através escola.

Para diagnóstico da PEA, as crianças nomeadas foram avaliadas por equipa clínica de referência na região Centro, utilizando instrumentos de diagnóstico standardizados e cumprindo critérios da DSM-V¹.

Figura 1: 📄 Fluxograma resumindo as fases do estudo da prevalência da PEA na região Centro de Portugal.





A prevalência da PEA (P) foi calculada para cada tipo de escola através do algoritmo:

$$P = \frac{a}{n} \frac{d}{e}$$

em que n, a, e, d correspondem respetivamente ao número de crianças amostradas, nomeadas, avaliadas e diagnosticadas em cada tipo de escola. A prevalência global (Pt) foi estimada através da fórmula:

$$P_t = \frac{\sum_i (N_i P_i)}{N_t}$$

em que o numerador representa a soma dos produtos da população total em cada tipo de escola (N1, N2, N3) pela prevalência calculada para cada tipo de escola (P1, P2, P3) e Nt representa a população total.

A [figura 1](#) descreve o fluxograma para as diferentes fases do estudo.

_Resultados

De um total de 77 717 alunos entre os 7 e 9 anos de idade, matriculados no ano escolar de 2016/2017 nas escolas da região Centro, este estudo abrangeu 13 690 alunos, cerca de 18% da população nesta faixa etária. A taxa global de resposta das escolas foi de 88%, após vários ciclos de contactos por *email*, telefone e algumas visitas presenciais (taxas de reposta de 91%, 88% e 76% para as escolas sem unidades de apoio especializado, com UA ou com UM, respetivamente). A [figura 2](#) resume os dados das várias fases do estudo.

Utilizando o TNF, os professores nomearam um total de 195 alunos (1,4% dos alunos rastreados), incluindo 60, 114 e 21 alunos de escolas regulares, com UA ou com UM, respetivamente. Foram obtidas autorizações dos pais ou responsáveis legais de 96 (49%) das crianças nomeadas para participar

Figura 2: Resultados nas várias fases do estudo – rastreio, diagnóstico e prevalência.

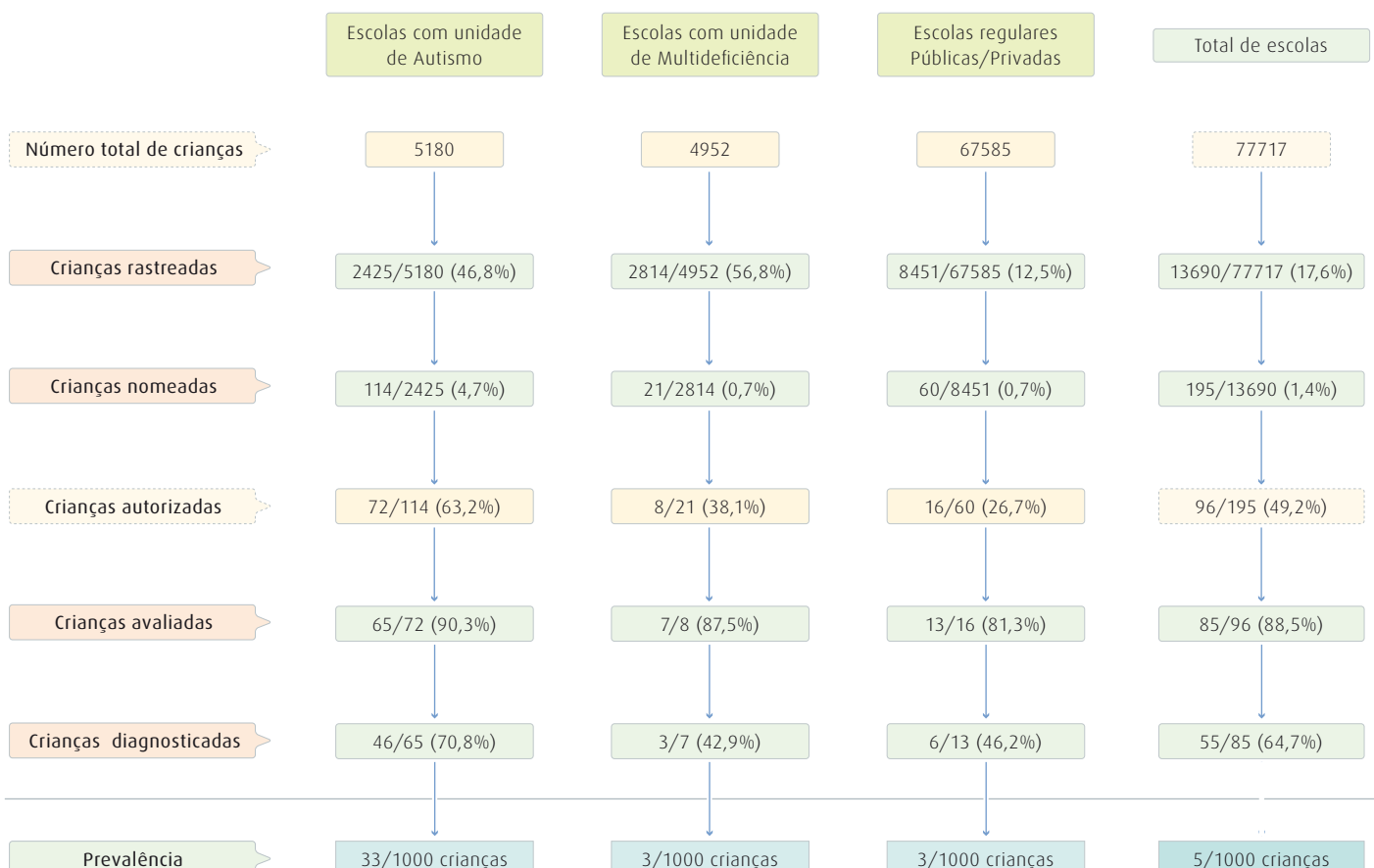




Tabela 1:  Prevalência da PEA na região Centro de Portugal, global e nas três tipologias de escolas analisadas, no ano letivo de 2016/2017.

	N	n	a	e	d	P (%)	σ^2	IC 95% Limite Inferior	IC 95% Limite Superior
Escolas primárias sem unidades de apoio especializado	67 585	8 451	60	13	6	0,3	1,16x10-06	0,1	0,5
Escolas primárias com Unidades de Autismo	5 180	2 425	114	65	46	3,3	1,01x10-05	2,7	3,9
Escolas primárias com Unidades Multideficiência	4 952	2 814	21	7	3	0,3	2,00x10-06	0,04	0,6
Total	77 717	13 690	195	85	55	0,5	9,27x10-07	0,3	0,7

N – população total de crianças entre os 7 e 9 anos de idade matriculadas em escolas da região Centro de Portugal; n – número de crianças amostradas; a – número de crianças nomeadas; e – número de crianças avaliadas; d – número de crianças diagnosticadas; P – prevalência; σ^2 – variância

na fase de avaliação clínica do estudo. No total foram avaliadas 85 (89%) crianças com autorização parental, distribuídas pelas várias tipologias de escolas como indicado na [figura 2](#). O diagnóstico de PEA foi confirmado em 55 das 85 crianças avaliadas (64,7%), nomeadamente em 6, 46 e 3 crianças de escolas regulares, com UA e com UM, respetivamente.

A prevalência de PEA global na região Centro foi de 0,5% (IC95% 0,3-0,7) ([tabela 1](#)). A prevalência foi significativamente mais elevada nas escolas com UA (3,3%) do que nas escolas regulares ou com UM (0,3% em ambas as tipologias), indicando que a maioria das crianças com PEA da região Centro estava matriculada em programas educacionais que lhes proporcionariam melhores oportunidades de desenvolvimento.

Discussão e conclusão

A variabilidade na prevalência entre escolas com várias tipologias, cerca de 6 vezes mais elevada em escolas com UA, mostram que na região Centro as crianças com autismo nesta faixa etária estão na sua maioria a receber o apoio educacional mais indicado para a sua perturbação, o que se poderá traduzir, a longo prazo, num prognóstico mais favorável. Estas unidades prestam apoios diferenciados, com respostas educativas específicas que melhoram a qualidade de vida das crianças com PEA, potenciando a sua autonomia, interação e comunicação. De notar que o número de novos diagnósticos foi mais baixo nas escolas com UA do que nas

escolas regulares ou com UM, indicando que a maioria das crianças com diagnóstico prévio de PEA estavam adequadamente encaminhadas pelos serviços de referência.

Os resultados na região Centro são comparáveis à estimativa de prevalência em vários dos países do estudo ASDEU cuja metodologia de rastreio se baseou no TNF, nomeadamente no País Basco (Espanha), região de Varsóvia (Polónia) ou na Roménia, com prevalências de 0,59%, 0,69% e 0,72% ([10,11](#)), respetivamente. A prevalência foi mais baixa na região de Plovdiv (Bulgária) (0,27%) ([11](#)) e mais elevada na região de Pisa (Itália) (1,15%) ([12](#)). Apesar do ênfase numa metodologia harmonizada para o estudo ASDEU, esta não foi conseguida na sua totalidade mesmo na fase de rastreio, com regiões a omitirem o TNF e/ou a utilizarem o *Social Communication Questionnaire* (SCQ) preenchido pelos pais ([11](#)). O projeto ASDEU incluiu ainda estimativas de prevalência baseadas na análise de registos em França, Dinamarca, Finlândia e Islândia, que variaram entre 0,48% e 3,3% ([13](#)). No global, não foi possível encontrar um padrão de prevalências associado a abordagens específicas. A obtenção de intervalos de confiança mais estreitos sugere que a análise de registos, possivelmente devido à maior dimensão da população alvo, a utilização do TNF e melhores taxas de resposta de professores e pais permitem uma maior precisão nas estimativas. As razões para a variabilidade regional de prevalências observada no estudo ASDEU, incluindo de ordem social, cultural,



ambiental ou as práticas educacionais ou médicas, devem ser melhor investigadas (7,8,11,14-16).

A prevalência da PEA encontrada na região Centro foi superior à reportada relativamente ao ano escolar de 1999/2000 (5), que foi de 0,125% na região Centro. A metodologia utilizada nesse estudo epidemiológico foi muito semelhante à presente, mas alargada a todo o Portugal continental e Açores. Na altura foram encontradas assimetrias regionais marcadas na prevalência, com estimativas mais elevadas na região Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Açores. O aumento na prevalência, em Portugal e a nível global, poderá estar relacionado com as alterações nos critérios de diagnóstico, que com a DSM-V expandiram o conceito de autismo e são mais inclusivos em termos de apresentação clínica. No primeiro estudo foi também notória a ausência de nomeações de crianças com nível funcional mais elevado, sugerindo que o conhecimento dos professores sobre comportamentos no espetro do autismo evoluiu ao longo desta década através de mais recursos, formação e informação. A maior consciencialização para a PEA de familiares e profissionais de saúde e educação e, finalmente, fatores de ordem social, biológica ou ambiental poderão ainda contribuir para o aumento da prevalência globalmente observado (7,8).

Dada a importância do conhecimento da prevalência da PEA para a adequada programação de recursos educacionais e de saúde, será importante estender este estudo a nível nacional, assim como a sua repetição periódica. Finalmente, o foco deveria ser alargado em termos de faixa etária, uma vez que as opções de vida e os recursos disponíveis são muito limitadas após a transição para a idade adulta e requerem urgente programação.

Agradecimentos:

A todas as famílias, professores e outros profissionais de educação que participaram no estudo; à Direção-Geral dos Estabelecimentos Escolares pela cedência dos dados sobre escolas.

Financiamento:

O projeto ASDEU foi financiado pelo *Directorate-General of Health and Consumers of the European Union* (DG-SANCO), ref.º: SANCO/2014/C2/035.

Referências bibliográficas:

- (1) American Psychiatric Association ; Associação Brasileira de Psiquiatria (trad.). M294 Manual diagnóstico e estatístico de transtornos DSM-5. Porto Alegre: Artmed, 2014. http://dislex.co.pt/images/pdfs/DSM_V.pdf
- (2) Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. *Lancet*. 2018;392(10146):508-20. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)31129-2)
- (3) Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nerv. Child*.1943;2:217-50. http://www.neurodiversity.com/library_kanner_1943.pdf
- (4) Lotter V. Epidemiology of autistic conditions in young children. *Soc Psychiatry*. 1966;1(3):124-35. <https://doi.org/10.1007/BF00584048>
- (5) Oliveira G, Ataíde A, Marques C, et al. Epidemiology of autism spectrum disorder in Portugal: prevalence, clinical characterization, and medical conditions. *Dev Med Child Neurol*. 2007;49(10):726-33. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2007.00726.x>
- (6) Fombonne E. Epidemiology of pervasive developmental disorders. *Pediatr Res*. 2009;65(6):591-8. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e31819e7203>
- (7) Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, et al. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res*. 2012;5(3):160-79. <https://doi.org/10.1002/aur.239>
- (8) Baxter AJ, Brugha TS, Erskine HE, et al. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol Med*. 2015;45(3):601-613. <https://doi.org/10.1017/s003329171400172x>
- (9) Hepburn SL, DiGuseppi C, Rosenberg S, et al. Use of a teacher nomination strategy to screen for autism spectrum disorders in general education classrooms: a pilot study. *J Autism Dev Disord*. 2008;38(2):373-82. <https://doi.org/10.1007/s10803-007-0404-2>
- (10) Fuentes J, Basurko A, Isasa I, et al. The ASDEU autism prevalence study in northern Spain. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2020. Epub 2020 May 9 [ahead of print].
- (11) Autism Spectrum Disorders in the European Union (ASDEU) [Em linha]. Disponível em: www.ASDEU.eu
- (12) Narzisi A, Posada M, Barbieri F, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder in a large Italian catchment area: a school-based population study within the ASDEU project. *Epidemiol Psychiatr Sci*. 2018;29:e5. <https://doi.org/10.1017/s2045796018000483>
- (13) Delobel-Ayoub M, Saemundsen E, Gissler M, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorder in 7-9-Year-Old Children in Denmark, Finland, France and Iceland: A Population-Based Registries Approach Within the ASDEU Project. *J Autism Dev Disord*. 2020;50(3):949-59. <https://doi.org/10.1007/s10803-019-04328-y>
- (14) Bachmann CJ, Gerste B, Hoffmann F. Diagnoses of autism spectrum disorders in Germany: time trends in administrative prevalence and diagnostic stability. *Autism*. 2018;22(3):283-90. <https://doi.org/10.1177/1362361316673977>
- (15) Coe H, Ouellette-Kuntz H, Lloyd JE, Kasmara L, Holden JJ, Lewis ME. Trends in autism prevalence: diagnostic substitution revisited. *J Autism Dev Disord*. 2008;38(6):1036-1046. <https://doi.org/10.1007/s10803-007-0478-x>
- (16) Hansen SN, Schendel DE, Parner ET. Explaining the increase in the prevalence of autism spectrum disorders: the proportion attributable to changes in reporting practices. *JAMA Pediatr*. 2015;169(1):56-62. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2014.1893>

ficha técnica_

_Título: Boletim Epidemiológico Observações

_Periodicidade: Quadrimestral

_ISSN: 0874-2928, 2182-8873 (em linha)

_Numeração: 2ª série

Volume 9, número 27

maio - agosto 2020

_Diretor

Fernando de **Almeida**, Presidente do Conselho Diretivo do INSA

_Editores

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia

Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

_Conselho Editorial Científico

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia

Luciana **Costa**, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis

Jorge **Machado**, Departamento de Doenças Infecciosas

Manuela **Cano**, Departamento de Saúde Ambiental

Maria João **Silva**, Departamento de Genética Humana

Rita **Batista**, Departamento de Alimentação e Nutrição

Peter **Jordan**, Conselho Científico do INSA

_Coordenação técnica Elvira **Silvestre**, Biblioteca da Saúde

_Composição e paginação Francisco **Tellechea**, Biblioteca da Saúde
(segundo layout inicial de Nuno Almodovar Design, Lda.)

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2020.

Reprodução autorizada desde que a fonte seja citada, exceto para fins comerciais.

Isento de Registo na ERC ao abrigo do Decreto-Regulamento 8/99 de 9 de junho artº 12º nº1 a).

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Av. Padre Cruz, 1649-016 **Lisboa, Portugal**

Tel.: (+351) 217 519 200

Fax: (+351) 217 529 400

E-mail: info@insa.min-saude.pt

www.insa.pt