

Observações

— Boletim Epidemiológico

editorial

Sequenciação de Nova Geração

Tecnologia de ponta no INSA para apoio à identificação e caracterização de surtos, situações de emergência e à decisão clínica

Os avanços recentes nas tecnologias de sequenciação de ácidos nucleicos, associados à progressiva diminuição dos seus custos, têm permitido aos laboratórios de Microbiologia Clínica utilizar, de forma cada vez mais frequente, a técnica de Sequenciação Total do Genoma (vulgarmente referenciada na literatura por *Whole Genome Sequencing* - WGS). De facto, esta tecnologia tem emergido como uma ferramenta de ponta para complementar e/ou substituir as tradicionais metodologias da Microbiologia Clínica, influenciando o diagnóstico, a monitorização epidemiológica e as atividades de investigação/desenvolvimento de virtualmente todos os agentes patogénicos (desde vírus e bactérias a fungos e parasitas). Permite, por exemplo, num período normalmente compreendido entre 12h e 2 dias, sequenciar o genoma completo de microrganismos, não só a partir de culturas puras, como também, em determinadas condições, diretamente de amostras clínicas. Esta última aplicação reveste-se de particular importância quando os microrganismos em causa não são cultiváveis em meios *in vitro* (ex. *Treponema pallidum*, agente causador da sífilis), ou cujo crescimento demora vários dias (ex. *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose).

nesto número

Editorial

Sequenciação de Nova Geração: tecnologia de ponta no INSA para apoio à identificação e caracterização de surtos, situações de emergência e à decisão clínica p 01
João Paulo Gomes

Artigos Breves

Sequenciação de Nova Geração

- 1 Sequenciação de Nova Geração no apoio à decisão de transplante pulmonar num doente com fibrose quística p 03
Leonor Silveira, Ana Casimiro, Margarida Pinto, Vítor Borges, João Paulo Gomes, Mónica Oleastro
- 2 *Burkholderia pseudomallei*: primeiro caso de melioidose em Portugal p 05
Ana Pelerito, Alexandra Nunes, Susana Coelho, Cátia Piedade, Paulo Paixão, Rita Cordeiro, Daniel Sampaio, Luís Vieira, João Paulo Gomes, Sofia Núncio
- 3 Sequenciação Total do Genoma aplicada ao estudo de caracterização de uma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* isolada de pus de drenagem de abscesso hepático p 07
Maria João Simões, Aida Pereira, João Carlos Rodrigues, Tiago Pertucci, Inês Maury, Frederico E. Santo, Vítor Borges, João Paulo Gomes
- 4 Isolamento de *Helicobacter pullorum* de carne de frango: características de um patógeno emergente de origem alimentar p 09
Vítor Borges, Andrea Santos, Cristina Belo Correia, Margarida Saraiva, Luís Vieira, Daniel A. Sampaio, João Paulo Gomes, Mónica Oleastro

Doenças Evitáveis por Vacinação

- 5 Tosse convulsa em Portugal: análise retrospectiva de casos clínicos suspeitos de infeção por *Bordetella pertussis* no período 2010-2014 p 12
Maria Augusta Santos, Brígida Pereira, Cristina Furtado
- 6 Diagnóstico laboratorial do sarampo em Portugal, 2011- 2013 p 17
Paula Palminha, Elsa Vinagre, Rita Cordeiro, Carlos Ribeiro, Carla Roque
- 7 Rubéola congénita em Portugal entre 2009 e 2015 p 21
Paula Palminha, Elsa Vinagre, Carlos Ribeiro, Teresa Lourenço, Carla Roque
- 8 Apresentação clínica dos casos de síndrome gripal em Portugal: gripe e outros vírus respiratórios p 24
Ana Paula Rodrigues, Ausenda Machado, Baltazar Nunes, Pedro Pechirra, Raquel Guiomar
- 9 Vacinação antigripal da população portuguesa na época 2014/2015: estudo na amostra ECOS p 26
Mafalda Sousa Uva, Rita Roquette, Baltazar Nunes, Carlos Matias Dias
- 10 Efetividade da vacina antigripal entre 2009 e 2015 em Portugal p 29
Patrícia Conde, Ausenda Machado, Pedro Pechirra, Ana Paula Rodrigues, Paula Cristóvão, Inês Costa, Raquel Guiomar, Baltazar Nunes
- 11 Aplicação de um teste preliminar a um folheto informativo sobre o estudo da efetividade da vacina antigripal contra formas graves de gripe p 33
Maria Moitinho de Almeida, Ana João Santos, Ausenda Machado

Entre as principais aplicações da tecnologia de WGS nos laboratórios de Microbiologia Clínica referem-se: i) o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico através da identificação por WGS de sequências genómicas específicas de microrganismos causadores de determinadas patologias (1,2); ii) a caracterização genómica detalhada do microrganismo infeccioso, nomeadamente através da identificação de fatores de virulência, toxinas, e genes ou mutações associados à resistência a fármacos (3-5); e iii) a tipagem molecular de estirpes isoladas no âmbito de surtos hospitalares ou na comunidade, permitindo a identificação de cadeias de transmissão e de fontes de contaminação (6,7). Um dos grandes exemplos a nível mundial de aplicação da tecnologia de WGS em termos de estudos epidemiológicos consistiu na caracterização relâmpago de uma estirpe de *Escherichia coli* enteroagregativa e especialmente virulenta, causadora do gigantesco surto de diarreia e síndrome hemolítica urémica, ocorrido na Alemanha em 2011, com mais de 4000 casos e 50 mortes (8).

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) adquiriu recentemente um equipamento de sequenciação de nova geração, o qual tem permitido inequivocamente um “virar de página” em termos de progresso tecnológico e de serviços oferecidos à comunidade médico-científica. Neste âmbito, refere-se, por exemplo, a participação do INSA como instituição responsável pelas atividades laboratoriais de WGS no âmbito de um projeto europeu de grande dimensão que visa estabelecer a tecnologia de WGS como ferramenta de vigilância e investigação epidemiológica de agentes patogénicos transmitidos por alimentos. A nível nacional, o exemplo mais evidente, amplamente divulgado na comunicação social, consistiu na contribuição decisiva do INSA para a caracterização da estirpe responsável pelo surto da Doença dos Legionários que ocorreu em 2014 em Vila Franca de Xira (constituindo o segundo maior surto a nível mundial), tendo possibilitado também a identificação da potencial fonte de contaminação. No entanto, a caracterização de estirpes de *Klebsiella pneumoniae* associadas a um abscesso do fígado, bem como a caracterização da diversidade microbiana em infeções oportunistas de estirpes de *Burkholderia* spp. e/ou *Pseudomonas aeruginosa* em doentes

com fibrose quística, não são de menor relevo. Alguns dos artigos que se seguem neste *Boletim Epidemiológico Observações* descrevem precisamente exemplos de aplicação com sucesso da tecnologia de WGS no INSA na área das doenças infecciosas. Na sua qualidade de Laboratório de Referência, o INSA está naturalmente disponível para estabelecer colaborações científicas relevantes no domínio da Saúde, envolvendo para tal equipas especializadas tanto no domínio da bioinformática como da sequenciação de nova geração.

João Paulo Gomes

Responsável da Unidade de Investigação e do Núcleo de Bioinformática
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA

Contactos para WGS:

João Paulo Gomes:	Luís Vieira:
j.paulo.gomes@insa.min-saude.pt	luis.vieira@insa.min-saude.pt
tel. 217 519 241	tel. 217 519 440

Referências bibliográficas:

- (1) Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31-46. Epub 2009 Dec 8.
- (2) Millar BC, Xu J, Moore JE. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. *Curr Issues Mol Biol.* 2007;9(1):21-39. Review. www.horizonpress.com/cimb/v/v9/21.pdf
- (3) Chen Y, Johnson JA, Pusch GD, et al. The genome of non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S demonstrates the presence of pathogenic mechanisms that are distinct from those of O1 *Vibrio cholerae*. *Infect Immun.* 2007;75(5):2645-7. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1865779/
- (4) Chen PE, Willner KM, Butani A, et al. Rapid identification of genetic modifications in *Bacillus anthracis* using whole genome draft sequences generated by 454 pyrosequencing. *PLoS One.* 2010;5(8):e12397. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012397>
- (5) Chin CS, Sorenson J, Harris JB, et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N Engl J Med.* 2011;364(1):33-42. Epub 2010 Dec 9. www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1012928
- (6) McAdam PR, Templeton KE, Edwards GF, et al. Molecular tracing of the emergence, adaptation, and transmission of hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(23):9107-12. www.pnas.org/content/109/23/9107.long
- (7) Lewis T, Loman NJ, Bingle L, et al. High-throughput whole-genome sequencing to dissect the epidemiology of *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital outbreak. *J Hosp Infect.* 2010;75(1):37-41. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670110000289
- (8) Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med.* 2011;365(8):709-17. www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa106920

Sequenciação de Nova Geração no apoio à decisão de transplante pulmonar num doente com fibrose quística

Leonor Silveira¹, Ana Casimiro², Margarida Pinto³, Vítor Borges¹, João Paulo Gomes¹, Mónica Oleastro¹

monica.oleastro@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Departamento de Pediatria Médica. Unidade de Pneumologia, Hospital D. Estefânia.

(3) Laboratório de Microbiologia, Centro Hospitalar de Lisboa Central.

Introdução

O complexo *Burkholderia cepacia* (*Burkholderia cepacia* complex, Bcc) constitui um grupo heterogéneo de bactérias que inclui cerca de 20 espécies bacterianas relacionadas. Estas são ubíquitas na natureza, sendo encontradas em ambientes naturais como o solo, água, rizosferas, animais e produtos agrícolas (1).

Estas bactérias são, no entanto, patogénicas para o Homem, tendo um impacto clínico relevante nos doentes com fibrose quística (FQ), estando associadas a um pior prognóstico e diminuição da esperança de vida destes doentes (2). Nas amostras respiratórias destes doentes são frequentemente isoladas as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e mais recentemente assistiu-se a um aumento das infeções por espécies pertencentes ao Bcc (3). Estas infeções são particularmente graves nos doentes com FQ, podendo levar ao desenvolvimento de uma septicemia fulminante com paragem respiratória aguda, tratando-se de um quadro clínico conhecido como *cepacia syndrome* (4). De entre as espécies pertencentes ao Bcc, as mais frequentemente encontradas em doentes com FQ são *B. multivorans* e *B. cenocepacia*.

Uma das opções terapêuticas mais importantes para minorar a doença pulmonar avançada em doentes com FQ é o transplante pulmonar, cujo sucesso é, no entanto, dependente do agente causador da infeção respiratória. Mais especificamente, a infeção com *B. cenocepacia* leva a uma sobrevivência a curto e longo prazo significativamente mais baixa do que a infeção com outras espécies do

complexo, pelo que aqueles doentes são normalmente excluídos de serem considerados para transplante pulmonar (5). Assim, é indispensável a avaliação adequada das infeções por Bcc, bem como a discriminação das espécies, antes da decisão clínica de considerar o transplante pulmonar uma opção terapêutica viável para o tratamento de um doente com FQ.

A correta identificação das espécies do Bcc é um desafio para o laboratório de microbiologia, já que os métodos convencionais, baseados em testes bioquímicos ou de espetrometria de massa não têm acuidade suficiente para distinguir para lá do género bacteriano (6). Assim, torna-se necessário recorrer a técnicas moleculares, baseadas em ácidos nucleicos, tal como a tecnologia de Sequenciação de Nova Geração.

Objetivo

Neste estudo reportamos a aplicação desta tecnologia no contexto de apoio à decisão clínica de transplante pulmonar num doente com FQ.

Caso clínico

Trata-se de um doente de 16 anos de idade com o diagnóstico de FQ, homocigótico para a mutação CFTR Δ F508. Os pais são não consanguíneos e são ambos saudáveis. A gravidez foi de termo, parto e período neonatal sem intercorrências. O peso à nascença era de 3860g e apresentava índice de Apgar 9/10. Em criança não apresentava intolerâncias alimentares, mas mostrava má evolução ponderal com início precoce. Teve os primeiros sintomas respiratórios e entéricos aos 4 meses; o diagnóstico de FQ foi feito aos 8 meses na sequência de internamento por bronquiolite aguda, hipoxemia e desnutrição. Apresentava provas do suor com valores elevados (120 e 119mmol/L) e o diagnóstico foi confirmado por estudo genético. Desde criança, o doente teve múltiplos internamentos por exacerbações respiratórias e má nutrição. É um doente diabético com necessidade de insulina desde os 15 anos, apresenta cifoescoliose, polisinusopatia, desnutrição e depressão graves. O doente sofre de insuficiência respiratória crónica (FVC 31,9% em 2014), com retenção de CO₂ (55/107) e hipoxemia (O₂ a 8L/min),

tendo realizado múltiplos ciclos de antibioterapia de largo espectro, com vista à erradicação de agentes respiratórios e para proteção da degradação da função pulmonar, no entanto sem melhoria clínica.

Do ponto de vista microbiológico, aos 3 anos teve o primeiro isolamento de *P. aeruginosa* na expetoração, atualmente apenas com sensibilidade intermédia à ciprofloxacina. Aos 4 anos teve o primeiro isolamento de Bcc na expetoração; atualmente a estirpe é multiresistente.

_Aplicação da tecnologia de Sequenciação de Nova Geração para apoio à decisão clínica

Isolados bacterianos deste doente foram enviados para o Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), para identificação precisa das espécies bacterianas causadoras da infeção respiratória. Após a extração de DNA, procedeu-se à utilização de métodos de tipagem molecular tradicionais, bem como à Sequenciação Total do Genoma (*Whole Genome Sequencing – WGS*). A identificação inequívoca das espécies bacterianas foi realizada por comparação com sequências depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), através da ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Foi possível identificar uma estirpe de *P. aeruginosa*, bem como uma estirpe de *B. contaminans*. A frequência de identificação desta espécie de *Burkholderia* spp. tem vindo a aumentar nos últimos anos, nomeadamente em Portugal e em Espanha (7, 8).

Atualmente, o doente encontra-se em fase terminal da sua doença, com insuficiência respiratória crónica, com febre recorrente há 6 meses e broncorreia purulenta abundante; dependente de O₂ e com necessidade de ventilação não invasiva 24h/dia; coexiste a desnutrição grave, diabetes, depressão e retrações musculares que quase impedem a marcha. A sua única oportunidade é o transplante pulmonar. Esta opção foi acordada em reunião multidisciplinar, tendo em conta as espécies bacterianas identificadas.

Referências bibliográficas:

- (1) Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* 2003;5(9):719-29
- (2) Chiappini E, Taccetti G, de Martino M. Bacterial lung infections in cystic fibrosis patients: an update. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(6):653-4.
- (3) Govan JR, Brown AR, Jones AM. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol.* 2007;2(2):153-64.
- (4) Mahenthiralingam E, Baldwin A, Vandamme P. *Burkholderia cepacia* complex infection in patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol.* 2002;51(7):533-8.
- (5) De Soyza A, Meachery G, Hester KL, et al. Lung transplantation for patients with cystic fibrosis and *Burkholderia cepacia* complex infection: a single-center experience. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29(12):1395-404.
- (6) Fehlberg LC, Andrade LH, Assis DM, et al. Performance of MALDI-ToF MS for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(2):126-8.
- (7) Coutinho CP, Barreto C, Pereira L, et al. Incidence of *Burkholderia* contaminants at a cystic fibrosis centre with an unusually high representation of *Burkholderia cepacia* during 15 years of epidemiological surveillance. *J Med Microbiol.* 2015;64(8):927-35.
- (8) Medina-Pascual MJ, Valdezate S, Carrasco G, et al. Increase in isolation of *Burkholderia* contaminants from Spanish patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(2):150-6. Epub 2014 Oct 12.
www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14000329

Burkholderia pseudomallei: primeiro caso de melioidose em Portugal

Ana Pelerito¹, Alexandra Nunes¹, Susana Coelho², Cátia Piedade², Paulo Paixão², Rita Cordeiro¹, Daniel Sampaio³, Luís Vieira³, João Paulo Gomes¹, Sofia Núncio¹

ana.pelerito@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Hospital da Luz, Lisboa.

(3) Departamento de Genética Humana, INSA.

_ Introdução

Burkholderia pseudomallei é uma bactéria de Gram negativo que pode ser naturalmente encontrada no solo e em águas estagnadas (1). Tem sido classificada como agente de bioterrorismo devido ao elevado risco de aerolização, à sua baixa dose infecciosa e à elevada taxa de mortalidade (2, 3).

B. pseudomallei é o agente responsável pela melioidose, uma grave infeção adquirida por ingestão, inalação ou inoculação (4), sendo caracterizada por diversas manifestações clínicas, incluindo pneumonia e sépsis (3). É uma doença endémica no sudoeste asiático, norte da Austrália e outras regiões tropicais (3).

_ Objetivo

Este estudo apresenta o primeiro caso de melioidose em Portugal, revelando o importante papel da metodologia de Sequenciação Total do Genoma para a correta identificação e caracterização da estirpe isolada.

_ Caso clínico

Em janeiro de 2011, uma paciente de 62 anos deu entrada no Hospital da Luz com um quadro de artrite bilateral dos joelhos e edema simétrico dos membros inferiores, com 4 dias de evolução, sem febre quantificada mas com episódios de sudorese noturna. Soube-se que tinha realizado uma viagem à Tailândia em outubro de 2010, durante um período de chuva intensa naquela região. Um mês depois, a paciente desenvolveu uma lombociatalgia esquer-

da, resistente à terapêutica analgésica. Três semanas antes da admissão no hospital, a paciente apresentava uma massa lombar esquerda e uma lesão pustulosa no mento. Uma semana depois, após uma consulta de dermatologia, eram visíveis lesões ulceradas na fase posterior e lateral externa da perna direita, tendo-lhe sido administrado amoxicilina/clavulanato e mupirocina durante 5 dias. Quatro dias antes da admissão no hospital, apresentava dor articular dos joelhos e articulação tibio-társica esquerda, com edema e sinais inflamatórios, condicionando impotência funcional, bem como um edema simétrico até aos joelhos dos membros inferiores. Após internamento, foi-lhe diagnosticado: i) um tumor com ~15cm no maior eixo, de contorno irregular, móvel nos planos, com consistência pouco elástica e sem flutuação; ii) artrite dos joelhos, com derrame articular ligeiro; iii) artrite da tibio-társica esquerda; e iv) duas lesões cutâneas na perna direita sugestivas de eritema nodoso.

Os resultados laboratoriais mostraram uma anemia média e parâmetros inflamatórios elevados. Ressonâncias magnéticas abdominais e pélvicas revelaram duas lesões semelhantes: uma de carácter expansivo (14x11cm) na região glútea esquerda com osteomielite envolvendo o íliaco homolateral, e uma contralateral com menor dimensão (5cm).

_ Aplicação da tecnologia de Sequenciação de Nova Geração para apoio à decisão clínica

O isolamento da bactéria *B. pseudomallei* foi feito a partir de uma hemocultura e do pus da lesão glútea esquerda. A identificação foi feita pelo sistema Vitek 2 (bioMérieux), tendo a confirmação da espécie sido feita por PCR em tempo real com sondas de hidrólise (5). A paciente foi tratada com meropenem intravenoso durante 14 dias, o que levou à regressão das lesões cutâneas bem como das artrites.

Tendo em conta a resistência da estirpe isolada (aqui designada como PtBps01) ao antibiótico de primeira linha, trimetoprim/sulfametoxazol (SXT), foi administrada alternativamente uma terapia oral com amoxicilina/clavulanato (terapêutica de segunda linha). A lesão glútea direita foi drenada após dois meses

de tratamento, tendo sido mantida esta terapia de erradicação durante sete meses até total resolução do processo infeccioso.

De modo a caracterizar a estirpe PtBps01, foi realizada Sequenciação Total do Genoma usando o equipamento MiSeq (Illumina), seguida de uma análise genómica comparativa com sequências de estirpes de *B. pseudomallei* (disponíveis no GenBank) representativas de vários grupos de genomas. O genoma "draft" de PtBps01 contém 7,117,230bp com um conteúdo em GC de 68,2%. Análises filogenéticas envolvendo tanto o core-genoma como o pan-genoma, agruparam a estirpe portuguesa com isolados do sudoeste asiático, sugerindo tratar-se de um caso importado da Tailândia. De facto, a estirpe PtBps01 apresentou uma proximidade genética com o conhecido isolado Tailandês 1106a, revelando uma similaridade >99% no core-genoma. PtBps01 contém dois prófagos intactos de 40.7Kb e 25.1Kb, ambos compreendendo 30 genes com homologia com outros fagos de *Burkholderia*. Nenhum plasmídeo foi encontrado em PtBps01.

Dado que a resistência ao SXT é raramente observada (6-8), procedeu-se à investigação da base genética potencialmente associada a esta resistência na estirpe PtBps01, focando em particular os mecanismos envolvendo a bomba de efluxo BpeEF-OprC, a qual foi demonstrada conferir resistência ao SXT (9). No entanto, nenhuma mutação foi encontrada, o que sugere que a resistência bacteriana tenha origem num mecanismo ainda desconhecido.

A análise de *multilocus sequence typing* (MLST) revelou o perfil alélico 1-4-2-3-8-4-3, correspondendo ao tipo ST376. De acordo com bases de dados públicas de *B. pseudomallei*, nenhum isolado europeu descrito até à data apresentou este perfil. De facto, ST376 parece ser restrito ao sudoeste asiático, tal como foi previamente observado em amostras de água recolhidas na Tailândia na década de 60 (10), bem como em isolados clínicos obtidos, em 2012, de um paciente de Laos com parotidite supurativa e de dois pacientes da Malásia com melioidose.

_Conclusão

Em conclusão, o historial de viagem em conjunto com os dados obtidos por Sequenciação Total do Genoma da estirpe isolada, sugerem claramente que este primeiro caso português de melioidose resulta de uma importação da Tailândia. Considerando que os sintomas desta doença não são patognomónicos (podendo o quadro clínico ser confundido com outras situações, como a tuberculose), este caso vem reforçar a necessidade de se incluir a melioidose no diagnóstico diferencial de quadros infecciosos em viajantes regressados de zonas endémicas.

Referências bibliográficas:

- (1) Currie BJ. Melioidosis: an important cause of pneumonia in residents of and travellers returned from endemic regions. *Eur Respir J*. 2003;22(3):542-50. <http://erj.ersjournals.com/content/22/3/542.long>
- (2) Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, et al. Public health assessment of potential biological terrorism agents. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(2):225-30. <http://wwwnc.cdc.gov/eid/>
- (3) Limmathurotsakul D, Peacock SJ. Melioidosis: a clinical overview. *Br Med Bull*. 2011;99:125-39.
- (4) Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):383-416. Review. Erratum in: *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):533. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC15831829/
- (5) Cuadros J, Gil H, Miguel JD, et al. Case report: melioidosis imported from West Africa to Europe. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(2):282-4. www.ajtmh.org/content/85/2/282.long
- (6) Saiprom N, Amornchai P, Wuthiekanun V, et al. Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* from Thailand. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45(5):557-9. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857915000564
- (7) Dance DA, Davong V, Soeng S, et al. Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(4):368-9. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857914001976
- (8) Wuthiekanun V, Cheng AC, Chierakul W, et al. Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(6):1029-31. <http://jac.oxfordjournals.org/content/55/6/1029.long>
- (9) Podnecky NL, Rhodes KA, Schweizer HP. Efflux pump-mediated drug resistance in *Burkholderia*. *Front Microbiol*. 2015;6:305. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00305/full>
- (10) McCombie RL, Finkelstein RA, Woods DE. Multilocus sequence typing of historical *Burkholderia pseudomallei* isolates collected in Southeast Asia from 1964 to 1967 provides insight into the epidemiology of melioidosis. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2951-62. <http://jcm.asm.org/content/44/8/2951.long>

Sequenciação Total do Genoma aplicada ao estudo de caracterização de uma estirpe de *Klebsiella pneumoniae* isolada de pus de drenagem de abscesso hepático

Maria João Simões¹, Aida Pereira², João Carlos Rodrigues¹,
Tiago Pertucci², Inês Maury², Frederico E. Santo², Vítor Borges¹,
João Paulo Gomes¹

j.paulo.gomes@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Serviço de Doenças Infecciosas. Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Lisboa Norte.

Introdução

Klebsiella pneumoniae é um bacilo de Gram negativo, capsulado, da família *Enterobacteriaceae*, ubiqüitária no ambiente e que pode colonizar o Homem e outros animais. É um patógeno responsável por pneumonia adquirida na comunidade, particularmente em indivíduos alcoólicos (1) e por infeções urinárias. Contudo, a grande maioria das infeções ocorre em meio hospitalar, em doentes imunocomprometidos com co-morbilidades graves como diabetes mellitus ou obstrução pulmonar crónica (2). Em meados da década de 80 emergiu uma estirpe hiper-virulenta de *K. pneumoniae*, primeiramente identificada em Taiwan (em 1985) e na Coreia, e posteriormente dispersa por outros países do sudeste asiático, tipicamente associada a abscesso hepático adquirido na comunidade (3, 4). Atualmente esta é a etiologia mais frequente de abscesso hepático, considerada endémica em Taiwan e na Coreia e emergente em várias regiões do globo (5).

A estirpe hiper-virulenta de *K. pneumoniae* associada a abscesso hepático na comunidade apresenta uma típica hiper-mucoviscosidade em cultura em meio sólido, estando normalmente associada ao serotipo capsular K1 (menos frequentemente K2), à sequência tipo (ST) 23 e, entre outros, pode possuir fatores de virulência tais como os codificados pelos genes *rmpA* (*regulator of the mucoid phenotype*) e *magA* (*mucoviscosity associated gene A*) (6, 7) e o sideróforo aerobactina (8, 9).

Objetivo

O presente estudo teve como objetivo o completo esclarecimento de um caso de abscesso hepático adquirido na comunidade, tendo para tal sido solicitada aos laboratórios do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) a caracterização de uma estirpe de *K. pneumoniae* isolada do pus de drenagem, de uma doente internada num hospital da região de Lisboa.

Material e métodos

A estirpe de *K. pneumoniae* foi isolada em meio sólido no laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Santa Maria, e enviada para o INSA para posterior caracterização genética. Após extração do DNA, procedeu-se à Sequenciação Total do Genoma (*Whole Genome Sequencing – WGS*) no equipamento MiSeq (Illumina), usando uma profundidade de cobertura média superior a 70 vezes. Para a montagem bioinformática do genoma recorreu-se ao software Velvet. A sequência do genoma foi posteriormente analisada com vista: i) à determinação *in silico* da ST, usando o esquema de “Multilocus sequence typing” (MLST) gerido pelo Instituto Pasteur (França) (<http://bigsdb.web.pasteur.fr/>); ii) à previsão *in silico* do tipo capsular, tirando partido de um método de genotipagem *wzc* descrito recentemente (10); e iii) à pesquisa de fatores de virulência normalmente associados às estirpes de *K. pneumoniae* causadoras de abscesso hepático. O estudo de diferenciação fenotípica de subpopulações de *K. pneumoniae* foi realizado no INSA com base na hiper-mucoviscosidade das colónias reisoladas em meio de gelose de sangue, avaliada pela técnica de formação de filamento.

Resultados e discussão

A estirpe recebida no INSA apresentava-se em cultura pura em meio de Macconkey, com hiper-mucoviscosidade. Os resultados de WGS confirmaram, como esperado, tratar-se de uma estirpe de *K. pneumoniae*. A análise bioinformática da sequência do genoma permitiu caracterizar a estirpe como pertencente ao ST23 e

com provável serótipo capsular K1, e identificar também múltiplos fatores de virulência. Estas características permitem inferir que a estirpe em estudo se assemelha geneticamente aos clones virulentos de *K. pneumoniae* normalmente associados ao abscesso hepático (4, 9). Dados preliminares da previsão *in silico* de genes associados à resistência a antibióticos identificaram os genes que codificam as bombas de efluxo OqxAB (11), as quais se associam à diminuição da susceptibilidade às quinolonas. Curiosamente, os resultados de WGS sugeriram ainda não se tratar de uma cultura pura, mas sim de uma mistura de clones de *K. pneumoniae*.

De acordo com a literatura, as colónias de *K. pneumoniae* associada a abscesso hepático na comunidade têm um teste de filamento positivo, sendo a hiper-mucoviscosidade definida pela formação de um filamento superior a 5 cm (7). Neste sentido, procedeu-se ao reisolamento em meio sólido da estirpe em estudo para diferenciação fenotípica de supostas sub-populações identificadas por WGS, tendo-se confirmado a presença de três tipos de colónias com diferentes resultados do teste de formação de filamento: 0,5cm, 3cm e 10cm. Estão em curso atualmente novas análises de WGS dirigidas a cada um dos tipos de colónias, com vista ao estabelecimento de uma associação entre características genómicas e os fenótipos observados. Será também efetuado um estudo mais detalhado sobre a presença de genes/mutações associados à resistência a antibióticos, com posterior confirmação fenotípica.

Conclusão

Esta forma distinta de doença invasiva por *K. pneumoniae* responsável por abscesso hepático na comunidade, descrita inicialmente na Ásia, tem emergido com uma distribuição global. A diabetes mellitus e a presença dos dois tipos capsulares específicos da bactéria, predispõem ao desenvolvimento do abscesso hepático e das complicações extrahepáticas: bacterémia, meningite, endoftalmite, e necrosante fascite. De salientar que a doente em estudo não apresentava nenhum fator de risco o que torna o presente caso particularmente invulgar. O diagnóstico atempado e o tratamento antimicrobiano adequado, combinado com drenagem percutânea do

abscesso, aumentam a sobrevivência e previnem o aparecimento das complicações. Desconhece-se se a população asiática é mais propensa a esta infeção, bem como os principais reservatórios para o desenvolvimento de estirpes de *K. pneumoniae* altamente virulentas.

O presente estudo ilustra a potencialidade da WGS para uma rápida identificação e caracterização de estirpes relevantes em termos clínicos, gerando uma multiplicidade de resultados num curto espaço de tempo.

Referências bibliográficas:

- (1) Jong GM, Hsiue TR, Chen CR, et al. Rapidly fatal outcome of bacteremic Klebsiella pneumoniae pneumonia in alcoholics. *Chest*. 1995;107(1):214-7.
- (2) Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589-603. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88898/
- (3) Wang JH, Liu YC, Lee SS, et al. Primary liver abscess due to Klebsiella pneumoniae in Taiwan. *Clin Infect Dis*. 1998;26(6):1434-8. <http://cid.oxfordjournals.org/content/26/6/1434.long>
- (4) Chung DR, Lee SS, Lee HR, et al.; Korean Study Group for Liver Abscess. Emerging invasive liver abscess caused by K1 serotype Klebsiella pneumoniae in Korea. *J Infect*. 2007;54(6):578-83. Epub 2006 Dec 18.
- (5) Struve C, Roe CC, Stegger M, et al. Mapping the Evolution of Hypervirulent Klebsiella pneumoniae. *MBio*. 2015;6(4):e00630. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4513082/
- (6) Yu WL, Ko WC, Cheng KC, et al. Comparison of prevalence of virulence factors for Klebsiella pneumoniae liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(1):1-6.
- (7) Fang CT, Chuang YP, Shun CT, et al. A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med*. 2004;199(5):697-705. <http://jem.rupress.org/content/199/5/697.long>
- (8) Chung DR, Lee HR, Lee SS, et al. Evidence for clonal dissemination of the serotype K1 Klebsiella pneumoniae strain causing invasive liver abscesses in Korea. *J Clin Microbiol*. 2008;46(12):4061-3. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2593285/
- (9) Lin JC, Koh TH, Lee N, et al. Genotypes and virulence in serotype K2 Klebsiella pneumoniae from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan. *Gut Pathog*. 2014;6:21. <http://gutpathogens.biomedcentral.com/articles/10.1186/1757-4749-6-21>
- (10) Pan YJ, Lin TL, Chen YH, et al. Capsular types of Klebsiella pneumoniae revisited by wzc sequencing. *PLoS One*. 2013;8(12):e80670. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3857182/
- (11) Rodríguez-Martínez JM, Díaz de Alba P, Briales A, et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(1):68-73. Epub 2012 Sep 25. <http://jac.oxfordjournals.org/content/68/1/68.long>

Isolamento de *Helicobacter pullorum* de carne de frango: características de um patogénio emergente de origem alimentar

Vítor Borges¹, Andrea Santos², Cristina Belo Correia³, Margarida Saraiva³, Luís Vieira⁴, Daniel A. Sampaio⁴, João Paulo Gomes¹, Mónica Oleastro²

monica.oleastro@insa.min-saude.pt

(1) Núcleo de Bioinformática; (2) Laboratório Nacional de Referência de Infeções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(3) Unidade de Referência. Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

(4) Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Genética Humana, INSA.

Introdução

A carne e os produtos à base de carne são importantes fontes de infeções intestinais nos humanos. Entre os agentes patogénicos intestinais mais comuns destacam-se as bactérias *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* enterohemorrágica ou produtora de verotoxinas (EHEC ou VTEC). No entanto, as infeções entéricas podem também ser causadas por algumas espécies do género *Helicobacter* spp., nomeadamente a bactéria de Gram negativo *Helicobacter pullorum*. Esta tem sido detetada quer em aves domésticas, quer em amostras humanas (1,2). Em particular, destacam-se o seu isolamento de carcaças de aves domésticas (possivelmente devido à contaminação durante os processos de abate) e a sua associação com casos de gastroenterite (1) ou de doença inflamatória crónica do intestino ou do fígado no Homem (3).

Neste sentido, a bactéria *H. pullorum* tem sido apontada como um agente patogénico emergente causador de doenças transmitidas por alimentos (2,4-6). No entanto, a falta de métodos para a deteção de *H. pullorum* e as dificuldades associadas à sua cultura têm provavelmente resultado no subdiagnóstico das infeções associadas. Por outro lado, até hoje, apenas foi sequenciado o genoma de uma estirpe de *H. pullorum* (7), pelo que o conhecimento das características genéticas potencialmente mediadoras de adaptação ou virulência deste agente patogénico emergente é ainda limitado.

Objetivo

Este estudo apresenta a primeira descrição do isolamento de *H. pullorum* em amostras de carne de frango crua, revelando o importante papel da metodologia de Sequenciação Total do Genoma para a correta identificação e caracterização das estirpes isoladas.

Materiais e métodos

Amostras alimentares, isolamento, identificação e teste de suscetibilidade a antimicrobianos

No âmbito do Plano de Inspeção dos Géneros Alimentícios (PIGA) da Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, foram colhidas amostras de carne de 15 diferentes produtores. As amostras foram sujeitas a: i) pré-enriquecimento seguindo as orientações preconizadas na ISO 10272-1:2006; ii) incubação a 37±1°C durante 4 a 6h, seguida de 44±4h a 41.5±1°C em condições microaerófilas com hidrogénio (Anoxomat™, MART Microbiology BV, Brachten, Holanda); iii) filtração com membrana de celulose (0.65µm); e iv) cultura em agar Columbia, enriquecido com sangue de ovelha a 5% (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França). Posteriormente, através de subcultura em placas de gelose de sangue, selecionaram-se colónias de bacilos com forma espiralada, de Gram negativo e oxidase positivos. Colónias não características de *Campylobacter* spp. foram identificadas como *H. pullorum* através de PCR e sequenciação de Sanger do gene que codifica o 16S rRNA, usando oligonucleótidos universais (8,9). Procedeu-se ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos, determinando a concentração mínima inibitória (CMI) de três antibióticos (ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina) através do método E-test.

Sequenciação Total do Genoma e análises de genómica comparativa

Após extração, o DNA das estirpes de *H. pullorum* isoladas no presente estudo foi sujeito à técnica de Sequenciação Total do Genoma no equipamento MiSeq (Illumina) disponível no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). O genoma das estirpes foi obtido através da montagem bioinformática das sequências geradas (usando o software Velvet), tendo-se usado profundidades de cobertura entre

135x e 195x. Por forma a obter uma visão detalhada da diversidade genética entre estirpes de *H. pullorum*, realizaram-se múltiplas análises bioinformáticas de comparação genómica usando as sequências obtidas, bem como a sequência do único genoma de *H. pullorum* (estirpe MIT 98-5489) disponível até à data (7).

Resultados e discussão

O presente estudo constitui a primeira descrição do isolamento de *H. pullorum* em amostras de carne de frango crua. Foram isoladas estirpes de *H. pullorum* de quatro das 17 amostras analisadas. Três estirpes foram obtidas de carcaças de frango refrigeradas, e a quarta estirpe foi isolada de uma preparação de carne crua de frango temperada (tabela 1). Estes resultados sugerem que a bactéria *H. pullorum* poderá ser transmitida por alimentos, e apresenta risco de transmissão zoonótica, tal como sucede com *Campylobacter* spp., atualmente o principal agente bacteriano enteropatogénico para o Homem a nível mundial. Por outro lado, demonstrou-se a eficácia da aplicação de um método de filtração com membrana para o isolamento de *H. pullorum* a partir de amostras de carne. Este dado é relevante uma vez que se considera que as dificuldades de cultura deste microrganismo fastidioso e o uso inapropriado de meios e condições de cultura têm levado à subdetecção, e consequente subvalorização de *H. pullorum* como um agente patogénico.

As estirpes isoladas foram sujeitas a testes de suscetibilidade aos antibióticos comumente usados para tratar infeções causadas por *Campylobacter* e *Helicobacter*. Todas as estirpes mostraram

ser resistentes à ciprofloxacina, uma estirpe foi também resistente à eritromicina, e outra à tetraciclina (tabela 1). Foi possível associar os fenótipos de resistência à ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina a mutações genéticas nos genes *gyrA*, *23S rRNA* e *16S rRNA*, respetivamente, tal como previamente descrito (7,10). Excepcionalmente, a mutação no gene *gyrA* que confere resistência à ciprofloxacina não foi detetada numa estirpe resistente a este antibiótico. A pesquisa de mutações em outros alvos genéticos, como o gene *gyrB*, foi inconclusiva, pelo que é expectável que a base molecular de resistência envolva outros mecanismos (ex. bombas de efluxo), tal como demonstrado para *Campylobacter* spp. (11). De um modo geral, embora não estejam descritos estudos de suscetibilidade a antimicrobianos incluindo um número alargado de isolados de *H. pullorum*, o presente estudo, bem como os de outros autores (10,12) apontam para a importância da avaliação do perfil de resistência do agente patogénico emergente *H. pullorum*.

Este estudo permitiu ainda libertar e analisar quatro novos genomas de estirpes de *H. pullorum* (até à data estava apenas disponível o genoma de uma estirpe - MIT 98-5489 (7)). O tamanho do genomas das estirpes isoladas variou entre 1.7 e 2.1 Mb (tabela 1), revelando elevada similaridade (>98%) nas regiões genómicas comuns, mas sendo pautado por regiões genómicas muito polimórficas. Destacam-se um gene que codifica para uma proteína da membrana externa (PME), potencialmente com importantes propriedades antigénicas (13), e um gene que codifica uma potencial citotoxina

Tabela 1: Origem, tamanho do genoma e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das quatro estirpes de *H. pullorum* isoladas de amostras de carne de frango crua.

Estirpe	Origem	Tamanho do genoma (Mb)	Suscetibilidade a antimicrobianos (Concentração Mínima Inibitória em mg/L; R - resistente)		
			Ciprofloxacina	Eritromicina	Tetraciclina
229313/12	Carcaça de frango refrigerada	1.69	>32 (R)	0.25	0.25
229334/12	Preparação de carne crua de frango temperada	2.13	>32 (R)	0.125	0.5
229336/12	Carcaça de frango refrigerada	1.81	>32 (R)	>256 (R)	0.38
229254/12	Carcaça de frango refrigerada	1.81	>32 (R)	0.25	>256 (R)

com padrões estruturais semelhantes ao da citotoxina vacuolizante do agente patogénico gástrico *H. pylori*. Quer a PME, pelo seu potencial envolvimento em variação antigénica, quer esta potencial citotoxina, poderão contribuir para a virulência e capacidade de adaptação de *H. pullorum*, pelo que constituem alvos de estudo promissores.

Entre as regiões genómicas não partilhadas por todas as estirpes inclui-se um *cluster* de genes que codificam o sistema de secreção do tipo VI (SST6). Este sistema é utilizado pelas bactérias de Gram negativo para “injeção” de proteínas nas células eucariotas alvo com vista à sua manipulação (14), constituindo um reconhecido mecanismo de virulência. Por exemplo, em *C. jejuni* tem-se associado a infeção com estirpes que possuem o SST6 com uma apresentação gastrointestinal mais severa (15, 16).

Conclusão

Os dados apresentados indicam que o agente patogénico emergente *H. pullorum* poderá ser transmitido aos humanos através do contacto/consumo de carne, pelo que se sugere a expansão das estratégias de vigilância dos produtos alimentares. Adicionalmente, através da aplicação da tecnologia de Sequenciação Total do Genoma, foi possível incrementar o nosso conhecimento sobre a variabilidade entre estirpes de *H. pullorum*, tendo-se apontado várias características genéticas potencialmente mediadoras de virulência e adaptação.

Este artigo corresponde a uma versão reduzida em português do artigo: Borges V, Santos A, Correia CB, et al. *Helicobacter pullorum* isolated from fresh chicken meat: antibiotic resistance and genomic traits of an emerging foodborne pathogen. *Appl Environ Microbiol*. 2015 Dec 1;81(23):8155-63.

Referências bibliográficas:

- (1) Steinbrueckner B, Haerter G, Pelz K, et al. Isolation of *Helicobacter pullorum* from patients with enteritis. *Scand J Infect Dis*. 1997;29(3):315-8.
- (2) Ceelen L, Decostere A, Verschraegen G, et al. Prevalence of *Helicobacter pullorum* among patients with gastrointestinal disease and clinically healthy persons. *J Clin Microbiol*. 2005;43(6):2984-6. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1151964/
- (3) Pellicano R, Ménard A, Rizzetto M, et al. *Helicobacter* species and liver diseases: association or causation? *Lancet Infect Dis*. 2008;8(4):254-60.
- (4) Atabay HI, Corry JE, On SL. Identification of unusual *Campylobacter*-like isolates from poultry products as *Helicobacter pullorum*. *J Appl Microbiol*. 1998;84(6):1017-24. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.1998.00435.x/full>
- (5) Zanon RG, Rossi M, Giacommucci D, et al. Occurrence and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pullorum* from broiler chickens and commercial laying hens in Italy. *Int J Food Microbiol*. 2007;116(1):168-73.
- (6) González A, Piqueres P, Moreno Y, et al. A novel real-time PCR assay for the detection of *Helicobacter pullorum*-like organisms in chicken products. *Int Microbiol*. 2008;11(3):203-8.
- (7) Shen Z, Sheh A, Young SK, et al. Draft genome sequences of six enterohepatic *Helicobacter* species isolated from humans and one from rhesus macaques. *Genome Announc*. 2014;2(5). pii: e00857-14. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4161742/
- (8) Ferreira S, Júlio C, Queiroz JA, et al. Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(3):220-5. Epub 2013 Nov 27.
- (9) Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(2):625-30. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167828/
- (10) Pasquali F, Rossi M, Manfreda G, Zanon R. Complete nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Helicobacter pullorum* and identification of a point mutation leading to ciprofloxacin resistance in poultry isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30(3):222-8.
- (11) Ge B, McDermott PF, White DG, et al. Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3347-54. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1196287/
- (12) Mohamed M, Ibrahim R, Shahata M, et al. *Helicobacter pullorum* among Poultry in Assiut-Egypt: Genetic Characterization, Virulence and MIC. *Int J Poult Sci*. 2010; 9(6):521-526. <http://mail.livedna.net/qredirect.php?doi=ijps.2010.521.526&linkid=pdf>
- (13) Zhang Q, Meitzler JC, Huang S, et al. Sequence polymorphism, predicted secondary structures, and surface-exposed conformational epitopes of *Campylobacter* major outer membrane protein. *Infect Immun*. 2000;68(10):5679-89. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC101523/
- (14) Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell Host Microbe*. 2014;15(1):9-21. Epub 2013 Dec 11. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmcid/2433297/
- (15) Bleumink-Pluym NM, van Alphen LB, Bouwman LI, et al. Identification of a functional type VI secretion system in *Campylobacter jejuni* conferring capsule polysaccharide sensitive cytotoxicity. *PLoS Pathog*. 2013;9(5):e1003393. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3667781/
- (16) Harrison JW, Dung TT, Siddiqui F, et al. Identification of possible virulence marker from *Campylobacter jejuni* isolates. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(6):1026-9. wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/6/13-0635_article

_Tosse convulsa em Portugal: análise retrospectiva de casos clínicos suspeitos de infeção por *Bordetella pertussis* no período 2010-2014

Maria Augusta Santos¹, Brigida Pereira¹, Cristina Furtado²

m.augusta.santos@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência de *Bordetella Pertussis*. (2) Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica, Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

_Introdução

A tosse convulsa é uma doença infecciosa do trato respiratório, cujo agente etiológico é *Bordetella pertussis*, afetando com um maior grau de gravidade os lactentes e crianças jovens. Esta doença persiste a nível mundial e constitui um problema global de grande importância em Saúde Pública, quer pelo seu grau de contagiosidade quer pela elevada taxa de letalidade, uma vez que continua a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo, no âmbito das doenças evitáveis pela vacinação (1).

Nos últimos anos e apesar da introdução da vacinação ter permitido a diminuição acentuada da incidência da doença (2), tem-se assistido a um aumento de casos de tosse convulsa em países desenvolvidos que apresentam elevadas coberturas vacinais, principalmente em lactentes com idades inferiores a 6 meses, mas também em adolescentes e adultos (3-7), facto que indica a elevada efetividade da vacina em prevenir a doença, mas não a transmissão do seu agente causal, entre a população (8).

Em Portugal e apesar da existência de uma elevada taxa de cobertura vacinal, o padrão reemergente da tosse convulsa tem sido semelhante ao dos outros países desenvolvidos, assinalando-se um pico relevante de casos notificados em 2012. Este pico de padrão endémico detetado, apesar de apresentar um nível de endemicidade sustentada, evidencia no entanto que a bactéria *Bordetella pertussis* permanece em circulação, pelo que é necessário conhecer a real situação epidemiológica da infeção provocada por este agente etiológico, como

também caracterizar a estirpe circulante, através de estudo de perfis genéticos.

No âmbito do seu core de funções, o Laboratório Nacional de Referência de *Bordetella pertussis* do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) no Porto colabora na vigilância epidemiológica da tosse convulsa em Portugal, confirmando todos os casos que lhe são enviados com clínica sugestiva e efetivando a notificação laboratorial dos casos positivos detetados para a Direção-Geral da Saúde.

O diagnóstico laboratorial para confirmação de caso clínico de tosse convulsa é predominantemente molecular utilizando-se para o efeito pelo menos dois dos alvos preconizados, IS 481 e *ptxA-Pr*, apesar da existência de outras técnicas nomeadamente técnicas microbiológica e imunológica.

_Objetivo

Analisar retrospectivamente os resultados laboratoriais dos casos clínicos suspeitos de tosse convulsa enviados ao Laboratório Nacional de Referência de *Bordetella pertussis* do INSA no Porto para confirmação laboratorial no período 2010-2014, tendo como finalidade alertar não só para a necessidade de conhecer-se melhor a real incidência da tosse convulsa nos grupos etários com idade superior a 13 anos, bem como de caracterizar geneticamente as estirpes circulantes em Portugal.

_Material e métodos

Foram analisados os dados demográficos disponíveis dos 512 doentes elegíveis para o período entre 2010 e 2014. As amostras recebidas no INSA para confirmação de infeção por *Bordetella pertussis* foram predominantemente secreções nasofaríngeas (70%) para estudo molecular, isolados (1%) para identificação e soros (29%) para deteção de anticorpos anti-Toxina pertússica.

No âmbito da identificação, os isolados foram cultivados em placas de Bordet-Gengou, das quais foi retirado inócuo para identificar através de provas bioquímicas e quando necessário foram utilizados antissoros monoclonais.

Relativamente à deteção de anticorpos anti-Toxina pertússica classe IgG e classe IgA, os 29% de soros foram submetidos a uma reação imunoenzimática, na qual foi utilizado como antigénio um marcador, a Toxina pertússica que pela sua grande especificidade confirma contacto com *B. pertussis*, sendo a concentração final de anticorpos detetada expressa em UI/ml.

Nos 70% de secreções nasofaríngeas, procedeu-se à extração de ADN que posteriormente foi amplificado efetuando-se duas reações independentes de PCR em tempo real, nas quais foram pesquisados individualmente, o alvo IS 481 e a *ptxA-Pr*, sendo que este alvo por ser de grande especificidade confirma infeção por *Bordetella pertussis*.

Resultados e discussão

No período compreendido entre o início de janeiro de 2010 e o final de dezembro de 2014 foram enviados ao Laboratório Nacional de Referência de *Bordetella pertussis* produtos biológicos de 512 doentes com suspeita clínica de infeção por *Bordetella pertussis*, dos quais 5 (1%) isolados para estudo fenotípico, 150 (29%) soros para estudo imunológico e os restantes 357 (70%) secreções nasofaríngeas para estudo molecular.

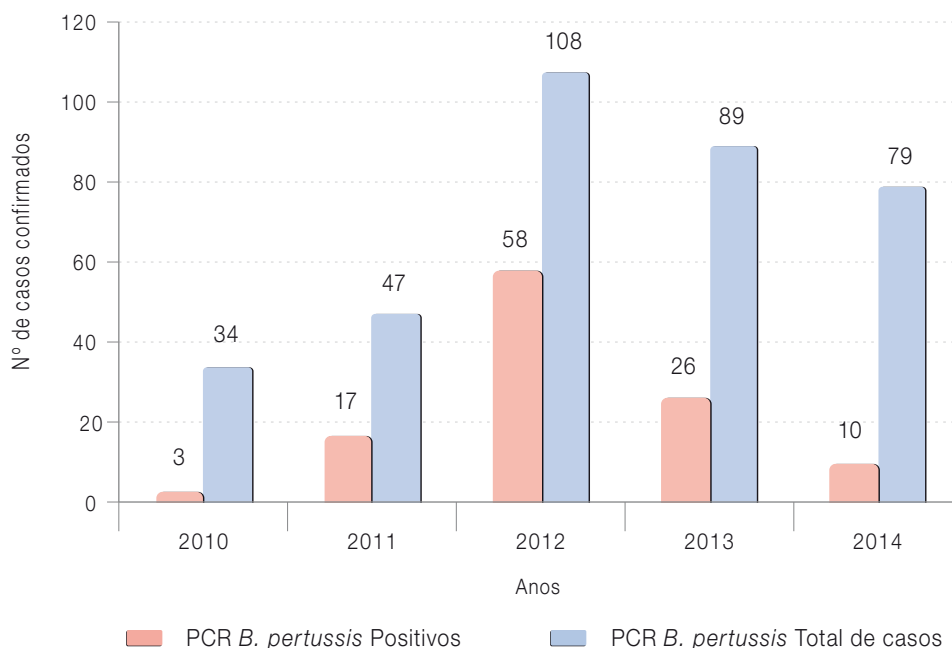
Todas as amostras recebidas para estudo imunológico e submetidas a técnica imunoenzimática, não evidenciaram contacto recente com *Bordetella pertussis* quer pela baixa concentração detetada de anticorpos anti-Toxina pertússica classes IgG e IgA, quer pela inexistência de uma segunda amostra (fase convalescente) que permitiria evidenciar um aumento significativo de anticorpos anti-Toxina pertússica ou seja uma seroconversão.

O mesmo foi constatado no estudo fenotípico, no qual não foi caracterizado nenhum isolado como sendo *Bordetella pertussis*.

Contudo nas 357 amostras de secreções nasofaríngeas enviadas para estudo molecular pela técnica de PCR em tempo real, confirmaram-se 114 (31,9%) casos de infeção por *Bordetella pertussis* (gráfico 1).

Entre 2010 e 2012 observou-se um aumento progressivo de casos suspeitos para confirmação laboratorial, respetivamente 34 em 2010, 47 casos em 2011 e 108 casos em 2012, seguindo-se um decréscimo nos dois anos subsequentes (gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição dos casos de tosse convulsa identificados por PCR, 2010-2014.



artigos breves_ n. 5

Esta tendência crescente do número de casos suspeitos de tosse convulsa acompanhou o aumento da frequência de casos confirmados pelo laboratório no triénio 2010-2012, ou seja 8,8% (3/34) em 2010 dos casos suspeitos foram positivos, pois evidenciaram contacto recente com *Bordetella pertussis*, 36,2% (17/47) em 2011 e 53,7% (58/108) em 2012, diminuindo no biénio 2013-2014 respetivamente para 29,2% (26/89) e 12,6% (10/79). Quanto à distribuição trimestral dos casos confirmados de infeção por *Bordetella pertussis*, observou-se que o seu predomínio ocorreu no terceiro trimestre dos anos civis em estudo (gráfico 2).

Salienta-se que apesar de não serem enviados ao INSA todos os casos clínicos suspeitos para confirmar, esta tendência crescente de casos de tosse convulsa confirmados no Laboratório Nacional de Referência de *Bordetella pertussis*, foi igualmente observada através do Sistema de Doenças de Declaração Obrigatória (DDO) da Direção-Geral da Saúde (DGS) (tabela 1).

À semelhança do observado a nível mundial, a distribuição dos 114 casos de tosse convulsa, confirmados laboratorialmente no INSA entre 2010-2014, evidenciou que a infeção por *B. pertussis* foi

Tabela 1: Distribuição dos casos de tosse convulsa notificados ao sistema DDO e confirmados no INSA, 2010-2014.

Anos	Nº casos DDO	Nº casos INSA
2010	14	3 (21,4%)
2011	32	17 (53,1%)
2012	225	58 (25,8%)
2013	114*	26 (22,8%)
2014	70*	10 (14,3%)

*dados provisórios, Direção-Geral da Saúde, setembro 2015.

predominante na faixa etária inferior a 6 meses de idade, sendo que 13,2% (15/114) pertenciam ao grupo etário com idade inferior a 1 mês, 51,7% (59/114) ao grupo etário entre 1-2 meses e 29,8% (34/114) ao grupo etário entre os 3 e 6 meses, o que corresponde a uma percentagem global de 94,7% (108/114). Em relação aos restantes 6 casos dos 114 casos confirmados, o que corresponde a 5,3%, verificou-se que 3,5% (4/114) pertenciam ao grupo de idades entre 1-2 anos e 1,8% (2/114) ao grupo etário superior a 13 anos de idade (gráfico 3).

Gráfico 2: Distribuição trimestral de casos de tosse convulsa, confirmados por PCR em tempo real, 2010-2014.

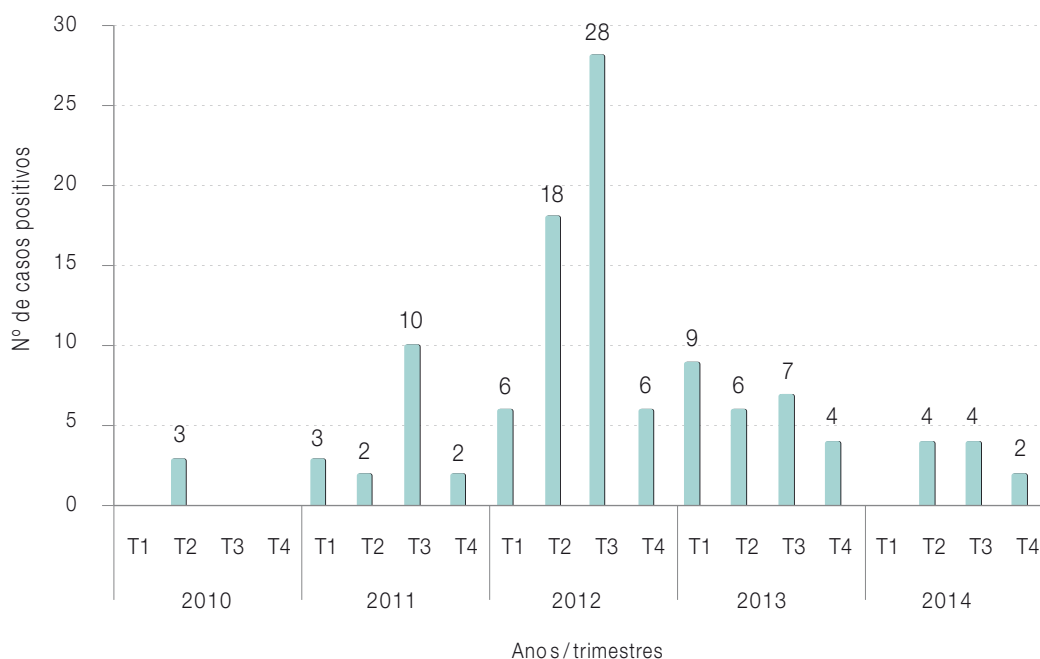
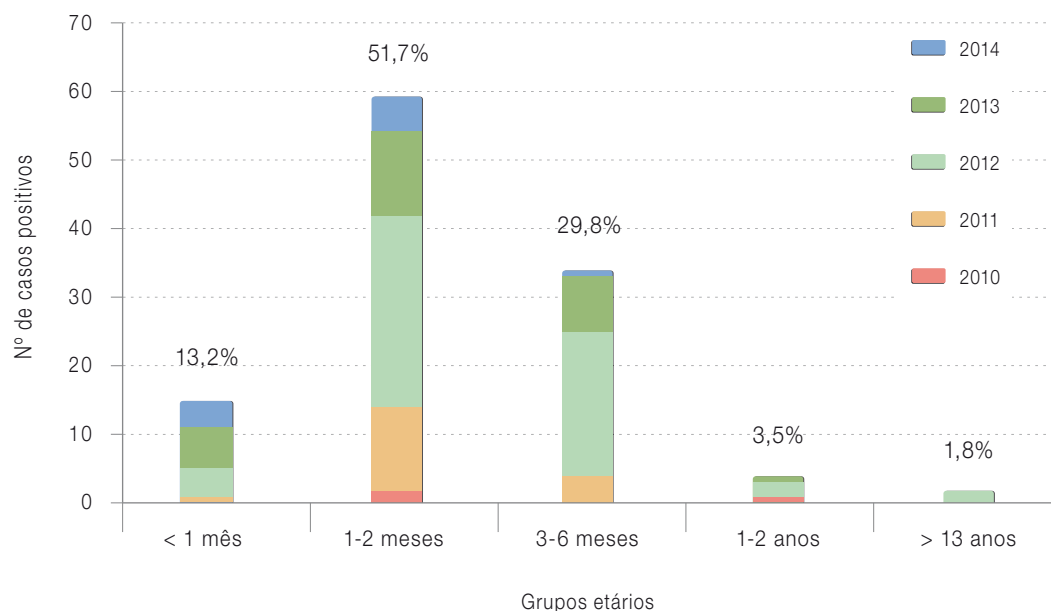


Gráfico 3: Distribuição por grupo etário de casos de tosse convulsa confirmados no INSA, 2010-2014.



Embora o número de casos positivos detetados na faixa etária superior a 13 anos seja baixo, é um facto que existem e que devem ser sempre investigados em qualquer diagnóstico clínico presuntivo considerando a sua expressão muitas vezes atípica (9).

Conclusões

Apesar da diminuição do número de casos de tosse convulsa observada nos dois anos subsequentes ao pico endémico de 2012 (tabela 1), esta doença continua a ser um problema de Saúde Pública, pelo que a sua monitorização constante não pode ser descurada. Esta constatação reforça a necessidade de ser mantido um sistema ativo de vigilância epidemiológica de base molecular, porquanto é necessário não só conhecer a real incidência da infeção por *B. pertussis* nas crianças mas também nos adolescentes e adultos, como é crucial estudar os perfis genéticos das estirpes circulantes em Portugal.

Por outro lado e existindo evidências na Europa, como em outros continentes de mutações nas estirpes de *Bordetella pertussis*, associadas a expansões clonais, circulando predominantemente os tipos *ptxA1*, *ptxP3*, *fim3-2*, bem como *prn2* e *prn3* que terão

contribuído para o ressurgimento da tosse convulsa (10-12), há necessidade urgente de uma vigilância contínua da população bacteriana em circulação e da monitorização dos seus polimorfismos, nomeadamente em Portugal.

Em conclusão e no sentido de possibilitar conhecer-se o grau de virulência da estirpe, a taxa de falência vacinal e melhor caracterizar a epidemiologia da tosse convulsa, considera-se indispensável assegurar a colheita de amostras clínicas que permitam o isolamento do agente etiológico e subsequente estudo do seu genoma para deteção de possíveis mutações.

Agradecimentos

Aos médicos pelo envio de amostras clínicas ao INSA para confirmação laboratorial. À Direção-Geral da Saúde pelo sistema integrado de vigilância epidemiológica instituído.

Referências bibliográficas:

- (1) Crowcroft NS, Stein C, Duclos P, et al. How best to estimate the global burden of pertussis? *Lancet Infect Dis.* 2003;3(7):413-8.
- (2) Centers for Disease Control and Prevention. Pertussis--United States, 1997-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002;51(4):73-6.
www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5104a1.htm
- (3) Nteyayabo B, De Serres G, Duval B. Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22(1):22-7.
- (4) Celentano LP, Massari M, Paramatti D, et al.; EUVAC-NET Group. Resurgence of pertussis in Europe. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24(9):761-5.
- (5) World Health Organization. Immunization surveillance, assessment and monitoring: Data, statistics and graphics by subject [Em linha] [consult.11/12/2015].
http://apps.who.int/immunization_monitoring/data/data_subject/en/index.html
- (6) Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):326-82. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1082800/
- (7) Heining U. Recent progress in clinical and basic pertussis research. *Eur J Pediatr.* 2001;160(4):203-13.
- (8) Wearing HJ, Rohani P. Estimating the duration of pertussis immunity using epidemiological signatures. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):e1000647.
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2763266/
- (9) Güriş D, Strebel PM, Bardenheier B, et al. Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990-1996. *Clin Infect Dis.* 1999;28(6):1230-7.
- (10) Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, et al. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(8):1206-13.
wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/8/08-1511_article
- (11) Zeddeman A, van Gent M, Heuvelman CJ, et al. Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill.* 2014;19(33). pii: 20881.
www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20881
- (12) Schmidtke AJ, Boney KO, Martin SW, et al. Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935-2009. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(8):1248-55
wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/8/12-0082_article

Diagnóstico laboratorial do sarampo em Portugal, 2011-2013

Paula Palminha, Elsa Vinagre, Rita Cordeiro, Carlos Ribeiro, Carla Roque

paula.palminha@insa.min-saúde.pt

Laboratório Nacional de Referência de Doenças Evitáveis pela Vacinação.
Departamento de Doenças Infeciosas, INSA.

Introdução

O sarampo é uma doença grave, altamente contagiosa causada por um vírus da família Paramyxovirinae (1).

O vírus do sarampo transmite-se por via aérea, através de gotículas de aerossóis ou por contacto direto com as secreções respiratórias de indivíduos infetados. A infeção é adquirida ao nível do trato respiratório ou da conjuntiva (1).

Após um período de incubação de 10-11 dias o paciente desenvolve sintomas prodrómicos de febre, mal-estar, coriza, conjuntivite e tosse. As manchas de koplik, patognomónicas para o sarampo, aparecem na mucosa bucal e labial inferior e a erupção maculopapular generalizada surge cerca de 4 dias após a exposição (1). As complicações mais frequentes incluem infeções bacterianas secundárias, pneumonia, encefalite, panencefalite esclerosante subaguda e purpura trombocitopenia. Na gravidez a infeção pelo vírus do sarampo pode dar origem a aborto espontâneo ou parto prematuro (1).

Em 2005, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu como meta a eliminação do sarampo e da rubéola e a prevenção da rubéola congénita na Região Europeia até 2010 (2). Portugal aderiu a esta iniciativa, desenvolvendo para o efeito, um conjunto de ações, coordenadas pela Direção-Geral da Saúde (DGS), que incluíam a confirmação laboratorial de todos os casos suspeitos de sarampo a realizar no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) (3).

Em 2010, e apesar das medidas adotadas pelos vários países, o sarampo reemergiu com mais de 30 000 casos notificados na Região Europeia (4).

Em setembro de 2010, os países da Região Europeia da OMS aprovaram uma resolução em que renovaram o seu compromisso em acelerar as ações necessárias à eliminação do sarampo, rubéola e rubéola congénita nesta região até 2015 (5). No entanto, o sarampo continuou a disseminar-se e em 2013 foram declarados 10271 casos de sarampo em 30 Estados-Membros EU/EFA (*European Union/European Free Alliance*), 91% dos quais ocorreram na Alemanha, Itália, Holanda, Roménia e Reino Unido (6).

Em 2013, a DGS publicou o Programa Nacional de Eliminação do Sarampo que inclui quatro áreas de intervenção: vacinação; vigilância clínica, epidemiológica e laboratorial dos casos possíveis e gestão de casos e surtos (7).

Em 2014, a Comissão Europeia Regional de Verificação para a Eliminação do Sarampo e Rubéola concluiu que a transmissão endémica do sarampo e da rubéola está interrompida desde o final de 2012 em Portugal.

Objetivo

Este estudo tem como objetivo descrever os casos prováveis de sarampo enviados ao INSA para confirmação laboratorial entre 2011 e 2013 em Portugal.

Material e métodos

Para efeitos do presente estudo e de acordo com a Norma n.º 006/2013 de 02/04/2013 da DGS em vigor (7), consideraram-se as seguintes definições de caso:

- *Caso possível de sarampo* – indivíduo que apresenta um quadro clínico de febre superior a 38°C, exantema maculopapular e pelo menos um dos seguintes sintomas: tosse, coriza ou conjuntivite (8).

artigos breves_ n. 6

- *Caso confirmado de sarampo* – indivíduo que apresenta um quadro clínico de caso possível com confirmação laboratorial da infeção por isolamento do agente viral ou deteção do RNA do vírus por RT-PCR ou seroconversão das imunoglobulinas da classe G em duas amostras de soros colhidas com 1 semana de intervalo e/ou, ainda, pela deteção de IgM específica para o vírus (8).
- *Caso provável de sarampo* – indivíduo que apresenta um quadro clínico de caso possível com ligação epidemiológica a um caso confirmado (7).

O diagnóstico laboratorial de sarampo foi realizado através da deteção de imunoglobulinas da classe G (IgG) e M (IgM) específicas e pela pesquisa do RNA viral por RT-PCR em tempo real. A determinação genotípica foi efetuada por técnicas de sequenciação do cDNA. O isolamento do vírus do sarampo foi realizado em todas os produtos biológicos com resultado positivo por RT-PCR.

Deteção de anticorpos	A deteção de imunoglobulinas da classe G e M específicas para o vírus do sarampo foi realizada por ensaio imunoenzimático EIA utilizando os reagentes Enzygnost® Anti-Measles-virus/IgG e Enzygnost® Anti-Measles-virus/IgM, de acordo com as recomendações da OMS (9).
Identificação do RNA viral	A deteção do RNA do vírus do sarampo foi realizada por RT-PCR em tempo real, utilizando para o efeito reagentes comerciais. A extração de RNA foi realizada no equipamento automático.
Genotipagem	A determinação do genótipo foi realizada pela análise da sequência dos 450 nucleótidos que codificam os 150 aminoácidos da nucleoproteína (N), de acordo com as recomendações da OMS. O cDNA foi sintetizado utilizando o <i>kit</i> comercial da Nanogen ELItecGroup e amplificado por nested-PCR, utilizando os primers Mn5 e Mn6 (10) e Nf1a e Nr7a (11). Os fragmentos de cDNA purificados foram sequenciados com os primers Nf1a e Nr7a.
Isolamento viral	O isolamento do vírus do sarampo foi realizado em tubo por inoculação de 400 µl de urina ou fluidos orais em células VerohSLAM (12). A incubação processou-se a 37°C com 5% de CO ₂ . Foi efetuada observação diária para identificação do efeito citopático (CPE), característico do vírus do sarampo.

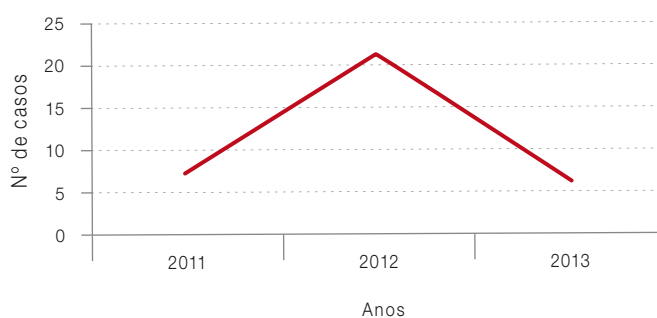
_Resultados

Entre 2011 e 2014, e no âmbito do Programa Nacional de Eliminação do Sarampo, o INSA recebeu amostras biológicas (34 soros, 18 urinas e 18 fluidos orais) de 34 casos possíveis de sarampo para confirmação laboratorial.

Dos 34 casos possíveis de sarampo, trinta e dois casos (94%) eram indivíduos de nacionalidade portuguesa, dois dos quais residentes em outros países da União Europeia (França e Reino Unido) e três com história de viagens recentes para fora de Portugal.

A distribuição dos casos possíveis de sarampo por idade indicou que 44% (15/34) ocorreram na população adulta. Quanto à distribuição por ano de diagnóstico verificaram-se 7 casos possíveis em 2011, 21 em 2012 e 6 em 2013 (gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição do número de casos possíveis de sarampo, por ano de diagnóstico (2011-2013).



Em Portugal, entre 2011 e 2013, o diagnóstico laboratorial confirmou oito dos 34 casos possíveis de sarampo (23.5%). Um caso (2,9%) sem confirmação laboratorial foi classificado como provável face à ligação epidemiológica a um caso confirmado.

Os dois casos (28,6%, 2/7) de sarampo confirmados em 2011 eram casos importados: um jovem adulto de nacionalidade portuguesa residente França e uma criança com 11 meses de nacionalidade angolana. Os genótipos identificados foram respetivamente D4 e B3.1. Nenhum destes casos deu origem a casos secundários.

Em 2012 ocorreram cinco (23.8%; 5/21) casos de sarampo confirmados e um caso provável com ligação epidemiológica a um caso confirmado, como anteriormente descrito. Todos os casos de sarampo ocorreram em indivíduos de nacionalidade portuguesa. Os casos confirmados laboratorialmente eram indivíduos não vacinados, três dos quais foram importados, oriundos do Reino Unido, Angola e China. Um destes casos importados originou um surto com um caso secundário numa criança de 11 meses de idade, um terciário numa criança de cinco meses e um caso provável num adulto com 31 anos de idade vacinado em Portugal, de acordo com a investigação epidemiológica levada a efeito.

O genótipo do vírus do sarampo no caso importado do Reino Unido foi D4 Manchester. No caso da China foi o genótipo H1, o qual foi igualmente detetado no caso terciário do surto acima referido. Em relação ao caso importado de Angola e ao caso secundário resultante do caso importado da China só foi possível confirmar a presença e concentração de imunoglobulina de classe M (IgM) específica para o vírus do sarampo.

Dos 6 casos prováveis de sarampo notificados em 2013 apenas um foi confirmado numa mulher de 27 anos de nacionalidade alemã, Este caso não originou casos secundários e o genótipo identificado foi o D8.

_Discussão

Durante os anos em análise foram notificados nove casos de sarampo (oito casos confirmados e um provável) em Portugal.

Os casos notificados em 2011 e em 2013 foram importados e nenhum deu origem a casos secundários.

Em 2012 houve três casos importados, tendo um deles sido responsável por um surto.

Dos casos notificados, 75% (6/8) foram em indivíduos adultos e os restantes em crianças sem idade para serem vacinadas.

Os genótipos determinados neste estudo ligam os casos de sarampo aos países onde a infeção ocorreu. De facto, os genótipos D4, D4 Manchester e D8 são endémicos na Europa e circulavam respetivamente em França em 2011, no Reino Unido em 2012 e na Alemanha em 2013. O genótipo H1 detetado no caso importado da China, é também endémico neste país.

_Conclusão

Em Portugal, a vacina monovalente contra o sarampo (VAS) foi introduzida no Plano Nacional de Vacinação em 1974 tendo sido substituída pela vacina tríplice contra o sarampo, parotidite e rubéola (VASPR) em 1989. Contudo, os casos de sarampo que ocorreram em Portugal nestes 3 anos (2011-2013) mostraram a existência de indivíduos adultos não imunes. Este facto, alerta para a necessidade de se reforçar a vacinação nesta população, nomeadamente em situações de deslocação ao estrangeiro, desde que não haja vacinação anterior ou registo da doença. Acrescente-se que durante o período em estudo não se observaram casos autóctones entre a população portuguesa.

Agradecimentos

À coordenadora do Programa de Eliminação do Sarampo, Dra. Teresa Fernandes (Direção de Serviços de Prevenção da Doença e Promoção da Saúde/ DGS). À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Griffin DE. Measles Virus. In Knipe DM, Howley PM (eds). Fields virology. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2007.pp. 1551-86.
- (2) Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection: WHO European Region strategic plan 2005-2010. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2005. www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0008/79028/E87772.pdf
- (3) Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa n.º 10/DSCS/DPCD, de 05/06/2008. Vacinação complementar contra o sarampo. www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/circular-normativa-n-10dscsdpcd-de-05062008.aspx
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. European monthly measles monitoring (EMMO), July 2011. Stockholm: ECDC, 2011. (ECDC/Surveillance Report; vol. 2). www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/2011_July_Measles_Monthly_Monitoring.pdf
- (5) World Health Organization. Global measles and rubella: strategic plan 2012–2020. Geneva: WHO, 2012. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44855/1/9789241503396_eng.pdf
- (6) European Centre for Disease Prevention and Control. Measles and Rubella Monitoring, April 2014. Stockholm: ECDC, 2014. (ECDC/Surveillance Report). www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/measles-rubella-monitoring-april-2014.pdf
- (7) Direção-Geral da Saúde. Norma n.º 006/2013, de 02/04/2013. Programa Nacional de Eliminação do Sarampo. Integrado no Programa Nacional de Eliminação do Sarampo e da Rubéola. www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0062013-de-02042013.aspx
- (8) Ministério da Saúde. Direção-Geral da Saúde. Despacho n.º 5681-A/2014, de 21 de abril. DR 2.ª série (parte c), n.º 82, de 29 de abril de 2014: 11374-(2)-(20). Notificação obrigatória de doenças transmissíveis e outros riscos em saúde pública. Retificado pela Declaração de retificação n.º 609-A/2014, de 1 de junho. DR 2.ª Série(parte c), n.º 113, de 16 de junho de 2014. <https://dre.pt/application/file/25697650>
- (9) World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis of measles virus infection. 2nd ed. Geneva: WHO, 2007. www.who.int/ihr/elibrary/manual_diagn_lab_mea_rub_en.pdf
- (10) Kremer JR, Nkwemba E, Bola Oyefolu AO, et al. Measles virus strain diversity, Nigeria and Democratic Republic of the Congo. Emerg Infect Dis. 2010;16(11):1724-30. wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/11/pdfs/10-0777.pdf
- (11) Santibanez S, Tischer A, Heider A, et al. Rapid replacement of endemic measles virus genotypes. J Gen Virol. 2002;83(Pt 11):2699-708
- (12) Yasumura Y, Kawakita M. The research for the SV40 by means of tissue culture technique. Nippon Rinsho. 1963;21:1201-19.

Rubéola congénita em Portugal entre 2009 e 2015

Paula Palminha, Elsa Vinagre, Carlos Ribeiro, Teresa Lourenço, Carla Roque

paula.palminha@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Doenças Evitáveis pela Vacinação,
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução

A rubéola é causada por um vírus da família *Togaviridae*, género *Rubivirus*. É uma doença benigna caracterizada por uma erupção macular acompanhada por febre baixa, dores articulares, faringite e adenopatias cervicais. A infeção pode ser em alguns casos assintomática contudo torna-se grave quando ocorre durante a gravidez (1).

As propriedades teratogénicas do vírus da rubéola foram descobertas pela primeira vez na Austrália em 1941 por Gregg que associou a ocorrência de rubéola durante a gravidez com a presença de cataratas congénitas (1). Um recém-nascido com síndrome de rubéola congénita poderá apresentar malformações do tipo *major* (cataratas, glaucoma congénito, doença cardíaca, surdez, microcefalia, retinopatia), do tipo *minor* (purpura, trombocitopenia, esplenomegalia icterícia nas primeiras 24h de vida) ou apresentar um quadro assintomático ao nascer, em que depois podem surgir manifestações clínicas como surdez parcial ou atraso psicomotor mais tardiamente (2).

A gravidade da infeção fetal está relacionada com o tempo de gestação em que a infeção materna ocorre, sendo mais grave no período da organogénese (1º primeiro trimestre de gravidez), devido ao elevado tropismo do vírus para os tecidos fetais (2).

Em Portugal, a prevenção da rubéola congénita começou em 1982 com a introdução da vacina contra a rubéola no Programa Nacional de Vacinação Português (PNV) e imunização das adolescentes com idades entre 11-13 anos e mulheres adultas não imunes. A se-

gunda prevenção da doença começou em 1987, com a administração universal de uma dose única da vacina contra o sarampo, a parotidite e a rubéola (VASPR) aos 15 meses de vida, seguindo-se a introdução, em 1990, de duas doses de VASPR para crianças com 15 meses e 11-13 anos. Em 2001, a segunda dose da vacina foi antecipada para os 5-6 anos (3). Em 2012, a idade de administração da primeira dose foi antecipada para os 12 meses (4).

A introdução da vacina contra a rubéola no PNV deu origem a uma diminuição expressiva dos casos notificados de rubéola e rubéola congénita não se tendo verificado qualquer caso de rubéola congénita entre 1995 e 2008 em Portugal (5).

Objetivo

Analisar os resultados do diagnóstico laboratorial de casos suspeitos de rubéola congénita recebidos no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre 2009 e 2015, ao abrigo do Programa de Eliminação do Sarampo, da Rubéola e da Rubéola Congénita na Região Europeia da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Material e métodos

Para efeitos do presente trabalho constituíram fonte de dados todos os hospitais que participaram na vigilância laboratorial dos casos suspeitos de rubéola congénita, no âmbito do Programa de Eliminação do Sarampo, da Rubéola e da Rubéola Congénita na Região Europeia da OMS, e que no período em estudo enviaram ao INSA amostras clínicas de casos suspeitos de rubéola congénita para confirmação laboratorial.

Definição de caso: Consideraram-se as seguintes definições de caso:

- **Clínica** – Considera-se um caso de rubéola congénita quando são verificadas pelo menos duas das complicações referidas em a) ou uma das referidas em a) e outra em b): a) Cataratas, glaucoma congénito, doença cardíaca, surdez, retinopatia; b) Purpura, esplenomegalia, microcefalia, atraso mental, meningoencefalite, icterícia 24h após o nascimento (6).

artigos breves_ n. 7

- **Laboratorial** – Considera-se um caso confirmado de rubéola congénita sempre que se isolar o vírus da rubéola num produto biológico ou sempre que se detetar o RNA deste vírus por RT-PCR e/ou sempre que se verificar a deteção de IgM específica para este vírus (6).

População em estudo: Foram estudados todos os casos prováveis de rubéola congénita enviados ao INSA entre 2009 e 2015, num total de 71 crianças.

Métodos: O diagnóstico laboratorial foi realizado por deteção do RNA do vírus da rubéola. Em 2 casos foi igualmente realizada a pesquisa de anticorpos IgM.

Deteção de anticorpos	A deteção de imunoglobulinas G (IgG) contra o vírus da rubéola foi realizada por ensaio imunoenzimático ELFA. A pesquisa de imunoglobulinas M (IgM) foi efetuada por ensaio imunoenzimático EIA utilizando os reagentes <i>Enzygnost®</i> , de acordo com as recomendações da OMS (7).
Identificação do RNA viral	A deteção do RNA do vírus da rubéola foi realizada por RT-PCR em tempo real utilizando para o efeito reagentes comerciais, de acordo com as instruções do fabricante. A extração de RNA foi realizada no equipamento automático.

Resultados

Foram estudadas 71 crianças entre 2009 e 2015. As mães de 68 crianças eram de nacionalidade portuguesa, duas de países do leste europeu e uma de nacionalidade cabo-verdiana. Setenta crianças eram recém-nascidas e uma tinha 7 meses de vida à data do diagnóstico.

Durante o período em estudo foram analisados produtos biológicos (urina, exsudado da orofaringe e fluidos orais) de 71 casos

prováveis de rubéola congénita para deteção do RNA do vírus da rubéola. Destes, 68 eram crianças assintomáticas, cujas mães tinham anticorpos IgM para o vírus da rubéola na altura do parto sem diagnóstico prévio de infeção pelo vírus da rubéola.

Os restantes 3 casos apresentaram um quadro sintomático, cumprindo a definição de caso estabelecida. Duas das mães referiram exantema durante a gravidez (quadro 1).

Quadro 1: Distribuição do número de casos possíveis de rubéola congénita por ano de diagnóstico e de acordo com a sintomatologia e informação clínica materna disponível.

Ano	Casos Sintomáticos			Casos Assintomáticos			Total de casos estudados
	Deteção RNA viral positiva (n)	Deteção RNA viral negativo (n)	Sintomatologia Materna	Deteção RNA viral positivo (n)	Deteção RNA viral negativos (n)	Sintomatologia Materna	
2009	1	0	Exantema no 1º trimestre	0	10	Sem sintomatologia e IgM positiva	11
2010	1	0	Sem sintomatologia	0	24		25
2011	0	0	—	0	7		7
2012	0	0	—	0	9		9
2013	0	0	—	0	2		2
2014	0	0	—	0	5		5
2015	1	0	Rubéola no 1º trimestre	0	11		12
Total	3	0		0	68		71

Em 2009, o caso de rubéola congénita correspondeu a um recém-nascido do sexo masculino, nascido em Lisboa e filho de mãe portuguesa não vacinada, com suspeita de rubéola às 12 semanas de gravidez com resultados laboratoriais inconclusivos e sem viagens para fora do território português, referindo apenas uma deslocação aos Açores. Após o nascimento a criança manifestou prostração, cianose peitoral, palidez generalizada, púrpura trombocitopenia, tendo desenvolvido exantema na região dorsal com duração de 3 dias.

Em 2010, a criança com rubéola congénita diagnosticada tinha 7 meses de idade e nacionalidade e residência em Cabo Verde. Apresentava, à data do diagnóstico, cardiopatia congénita, cataratas, défice auditivo e atraso psico-motor. A mãe não referiu qualquer tipo de doença exantemática durante a gestação nem vacina contra a rubéola.

O caso confirmado em 2015, refere-se a um recém-nascido do sexo feminino, nascido em Lisboa de filho de mãe com nacionalidade portuguesa e residência em Luanda, que contraiu rubéola no primeiro trimestre de gravidez. A criança tinha um quadro clínico de cataratas, microcefalia com múltiplas calcificações cerebrais e icterícia nas primeiras 24h de vida.

_Discussão

Durante os últimos 7 anos, Portugal notificou 3 casos de rubéola congénita, dois dos quais apresentavam malformações do tipo *major* e um do tipo *minor*.

Dois casos de rubéola congénita resultaram de infeções sintomáticas em mulheres não vacinadas.

Dos 3 casos identificados, 2 foram importados do continente africano e um foi autóctone, uma vez que a mãe não viajou para fora do território nacional e não foi possível estabelecer nenhuma ligação epidemiológica entre a infeção materna e o contacto com um caso importado.

_Conclusão

Apesar das elevadas taxas de cobertura vacinal existentes nos últimos anos, Portugal notificou em 2009 um caso autóctone de rubéola congénita, após um interregno de 13 anos. Este facto, mostra, só por si, que a prevenção e a vigilância ativa da rubéola não pode ser minimizada, sendo fundamental assegurar que todas as mulheres que pretendam engravidar saibam o seu estado imunitário em relação ao vírus da rubéola e sejam vacinadas sempre que necessário, tendo em conta que a vacinação é, até à data, o único método disponível para evitar a rubéola congénita.

Agradecimentos

Aos hospitais, que participaram na vigilância laboratorial dos casos suspeitos de rubéola congénita no âmbito do Programa de Eliminação do Sarampo, da Rubéola e da Rubéola Congénita na Região Europeia da OMS. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Banatvala JE, Brown DW. Rubella. *Lancet*. 2004;363(9415):1127-37.
- (2) Best JM. Rubella. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2007;12(3):182-92.
- (3) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Vacinação. Lisboa: DGS, 2000.
- (4) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Vacinação. Lisboa: DGS, 2013.
- (5) Direção-Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória 2000-2004 Lisboa: DGS, 2005. www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/doencas-de-declaracao-obrigatoria-2000-2004.aspx
- (6) Ministério da Saúde. Direção-Geral da Saúde. Despacho n.º 5681-A/2014, de 21 de abril. DR 2.ª série (parte c), n.º 82, de 29 de abril de 2014: 11374-(2)-(20). Notificação obrigatória de doenças transmissíveis e outros riscos em saúde pública. Retificado pela Declaração de retificação n.º 609-A/2014, de 1 de junho. DR 2.ª Série (parte c), n.º 113, de 16 de junho de 2014. <https://dre.pt/application/file/25697650>
- (7) World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis of measles virus infection. 2nd ed. Geneva: WHO, 2007. www.who.int/ihr/library/manual_diagn_lab_mea_rub_en.pdf

Apresentação clínica dos casos de síndrome gripal em Portugal: gripe e outros vírus respiratórios

Ana Paula Rodrigues¹, Ausenda Machado¹, Baltazar Nunes¹, Paula Cristovão², Pedro Pechirra², Raquel Guiomar²

ana.rodrigues@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Epidemiologia, INSA.

(2) Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução e objetivo

A apresentação clínica das infeções respiratórias por influenza não permite distinguir estas infeções de outras infeções víricas respiratórias. A apresentação clínica e os valores preditivos da definição de caso de síndrome gripal variam em função dos vírus respiratórios em circulação em cada época ⁽¹⁾ e da idade dos doentes ^(2,3).

Este artigo pretende avaliar, com base nos dados do Programa Nacional de Vigilância de Gripe (PNVG) ⁽⁴⁾, se os casos de síndrome gripal por influenza apresentam um quadro clínico mais grave quando comparados com os casos de síndrome gripal por outros vírus respiratórios e com os casos negativos para os vírus respiratórios em análise.

Material e métodos

Todos os casos de síndrome gripal, notificados no âmbito do PNVG entre a época 2010/2011 e 2013/2014, foram classificados de acordo com o número de sinais e sintomas apresentados aquando da colheita de exsudado nasofaríngeo (< 8 sintomas; ≥ 8 sintomas). Foram considerados os sinais e sintomas usados como critérios da definição de caso de síndrome gripal usada pelo PNVG ⁽⁴⁾.

Comparou-se a apresentação clínica, definida com base no número de sintomas apresentados pelos doentes, dos casos positivos para vírus influenza com os casos de síndrome gripal

positivos para outros vírus respiratórios ⁽⁴⁻⁷⁾ e com os casos negativos usando um modelo de regressão logística multivariada ajustada para o grupo etário (ou idade ano a ano no caso da análise desagregada por grupo etário) e época gripal. Para as épocas 2010/2011 e 2011/2012, os casos para os quais foram identificados mais do que um vírus na amostra respiratória foram excluídos por poderem apresentar uma sintomatologia atípica. Na época 2013/2014, apenas os casos negativos para gripe foram testados para outros vírus respiratórios. Na análise estatística foi considerado o nível de significância de 5%.

Resultados

Entre as épocas 2010/2011 e 2013/2014 foram notificados laboratorialmente 2.808 casos de síndrome gripal, dos quais 44 (dois ou mais agentes virais respiratórios) foram excluídos por corresponderem a casos de infeções mistas. Dos 2.764 casos válidos, 1.252 (45,3%) foram positivos para influenza, 507 (36,4%) foram positivos para outros vírus respiratórios e nos restantes (18,3%) não foi identificado nenhum dos vírus respiratórios pesquisados (casos pan-negativos).

Os casos de gripe apresentam maior probabilidade de apresentarem 8 ou mais sintomas do que os casos positivos para outros vírus respiratórios ou do que os casos negativos (tabela 1).

No entanto, quando estratificado por grupo etário, tal só se verifica quando se comparam os casos de gripe com os casos negativos, nos indivíduos com idade entre os 15 e os 64 anos. Salienta-se no entanto, que abaixo dos 4 anos de idade a estimativa pontual do OR, quando comparados os casos de gripe com os casos pan-negativos, é elevada (1,90) embora não significativa.

Tabela 1: Comparação da apresentação clínica dos casos de gripe com os casos de síndrome gripal por outros vírus respiratórios que não gripe e com os casos pan-negativos segundo o grupo etário.

Grupo etário (anos)	Casos com ≥ 8 sintomas n (%)	Grupo referência: pan-negativos			Grupo referência: outros vírus respiratórios		
		ORa	IC 95%	p-value	ORa	IC 95%	p-value
0-4	8 (6,2)	1,90	0,19-19,04	0,58	1,97	0,35 - 11,2	0,45
5-14	72 (24,1)	1,31	0,69-2,49	0,41	1,41	0,63 - 3,22	0,40
15-44	416 (34,8)	1,71	1,30-2,25	<0,001	1,32	0,94 - 1,86	0,10
45-64	244 (34,7)	1,92	1,34-2,76	<0,001	1,09	0,70 - 1,71	0,70
≥ 65	108 (27,8)	1,36	0,80-2,31	0,26	1,00	0,53 - 1,87	0,996
Total*	863 (31,2)	1,64	1,36-1,99	<0,001	1,29	1,02 - 1,61	0,03

* Inclui 48 casos sem informação quanto à idade. ORa=Odds Ratio ajustado para época gripal e idade (ou grupo etário).

Conclusões

Estes resultados estão de acordo com o menor valor preditivo positivo da definição de síndrome gripal nos grupos etários extremos (2,3), dada a maior frequência de apresentações atípicas, diferentes padrões de imunidade e possível influência do estado vacinal na apresentação clínica.

Estes resultados sugerem a necessidade de, com base nos dados da vigilância da gripe, definir o conjunto de sinais e sintomas com maior valor preditivo positivo para gripe de acordo com o grupo etário.

Referências bibliográficas:

- (1) Jiang L, Lee VJ, Lim WY, et al. Performance of case definitions for influenza surveillance. Euro Surveill. 2015;20(22):21145. www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21145
- (2) Center for Disease Control and Prevention. Clinical signs and symptoms of influenza: influenza prevention & control recommendations [Em linha]. [consult. em 25/8/2015]. www.cdc.gov/flu/professionals/acip/clinical.htm
- (3) Yang TU, Cheong HJ, Song JY, et al. Age- and influenza activity-stratified case definitions of influenza-like illness: experience from hospital-based influenza surveillance in South Korea. PLoS One. 2014;9(1):e84873. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0084873>
- (4) Gonçalves P, Pechirra P, Conde P, et al. Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2010/2011. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2012. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/1009>
- (5) Gonçalves P, Pechirra P, Conde P, et al. Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2011/2012. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2013. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/1183>
- (6) Guiomar R, Conde P, Cristóvão P, et al. Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2012/2013. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge IP, 2013. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/1732>
- (7) Guiomar R, Conde P, Cristóvão P, et al. Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2013/2014. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2390>

Vacinação antigripal da população portuguesa na época 2014/2015: estudo na amostra ECOS

Mafalda Sousa Uva, Rita Roquette, Baltazar Nunes, Carlos Matias Dias

mafalda.uva@insa.min-saude.pt

Departamento de Epidemiologia, INSA.

Introdução

A vacina antigripal sazonal (VAGS) é a principal medida de proteção contra a gripe e complicações associadas. Em Portugal, a Direção-Geral da Saúde (DGS) emite anualmente recomendações para a prescrição da vacina antigripal a grupos-alvo ⁽¹⁾ prioritários, com risco mais elevado de desenvolvimento de complicações associadas à gripe. Adicionalmente, desde a época 2012/2013, o Ministério da Saúde disponibiliza gratuitamente a vacina antigripal à população portuguesa com 65 ou mais anos de idade ⁽¹⁾.

Neste contexto, a monitorização da taxa de cobertura da população pela VAGS, principalmente nos grupos-alvo, permite estudar a evolução deste indicador ao longo do tempo e fornecer, aos decisores, informação útil para o delineamento e ajustamento de estratégias de prevenção com vista a uma maior efetividade da intervenção.

Objetivos

Este artigo pretende estimar a taxa de cobertura pela VAGS da população portuguesa na época gripal de 2014/2015 e caracterizar a prática da VAGS relativamente ao local de vacinação.

Material e métodos

Delineou-se um estudo transversal, de prevalência, tendo como população alvo os residentes em Portugal Continental. O inquérito foi realizado por entrevista telefónica à amostra de famílias ECOS

(Em Casa Observamos Saúde) ^(2,3), em dezembro de 2014. Esta amostra aleatória é constituída por Unidades de Alojamento (UA) contactáveis por telefone fixo ou móvel, estratificada por Região do Continente, com alocação homogénea. Em cada agregado, foi inquirido apenas um elemento, com 18 ou mais anos de idade, que prestou informação sobre si próprio e sobre os restantes elementos do agregado.

Os resultados foram ponderados, de acordo com o número de «alojamentos clássicos» distribuídos por NUTS II ⁽⁴⁾ e para a cobertura de rede telefónica fixa e móvel nos alojamentos e na população portuguesa do Continente ^(5,6). Os ponderadores foram, finalmente, calibrados por pós estratificação para a distribuição da população portuguesa do Continente por sexo e grupo etário, em 2013 (estimativas do Instituto Nacional de Estatística - INE) ^(7,8). Todos os cálculos foram realizados com recurso ao programa estatístico *SPSS Statistics 22* ⁽⁹⁾.

Resultados e discussão

Obtiveram-se 2176 questionários válidos dos residentes naquelas UA, correspondendo a 79,2% do total de indivíduos existentes nas UA da amostra.

A cobertura bruta da população portuguesa pela VAGS na época de 2014/2015 atingiu o valor de 17,1% (IC95%: 14,1% a 20,7%) (gráfico 1) que é pontualmente equivalente ao estimado na época anterior 17,1% (IC95%: 14,4% a 20,1%) ⁽¹⁰⁾.

A cobertura pela VAGS na população com 65 ou mais anos de idade foi 50,9% (IC95%: 40,2% a 61,5%), o que representa um aumento absoluto de 1% em comparação com a estimativa de cobertura pela VAGS, obtida através da amostra ECOS para este grupo etário, na época anterior 2013/2014 de 49,9% (IC95%: 41,5% a 58,2%). Esta diferença, apesar de não significativa, reflete a manutenção da tendência crescente da cobertura da população pela VAGS, iniciada na época de 2012/2013 (gráfico 1) ⁽¹⁰⁾.

Gráfico 1: ↘ Evolução da cobertura da vacina antigripal sazonal entre 1998-1999 e 2014-2015, por grupo etário (10).

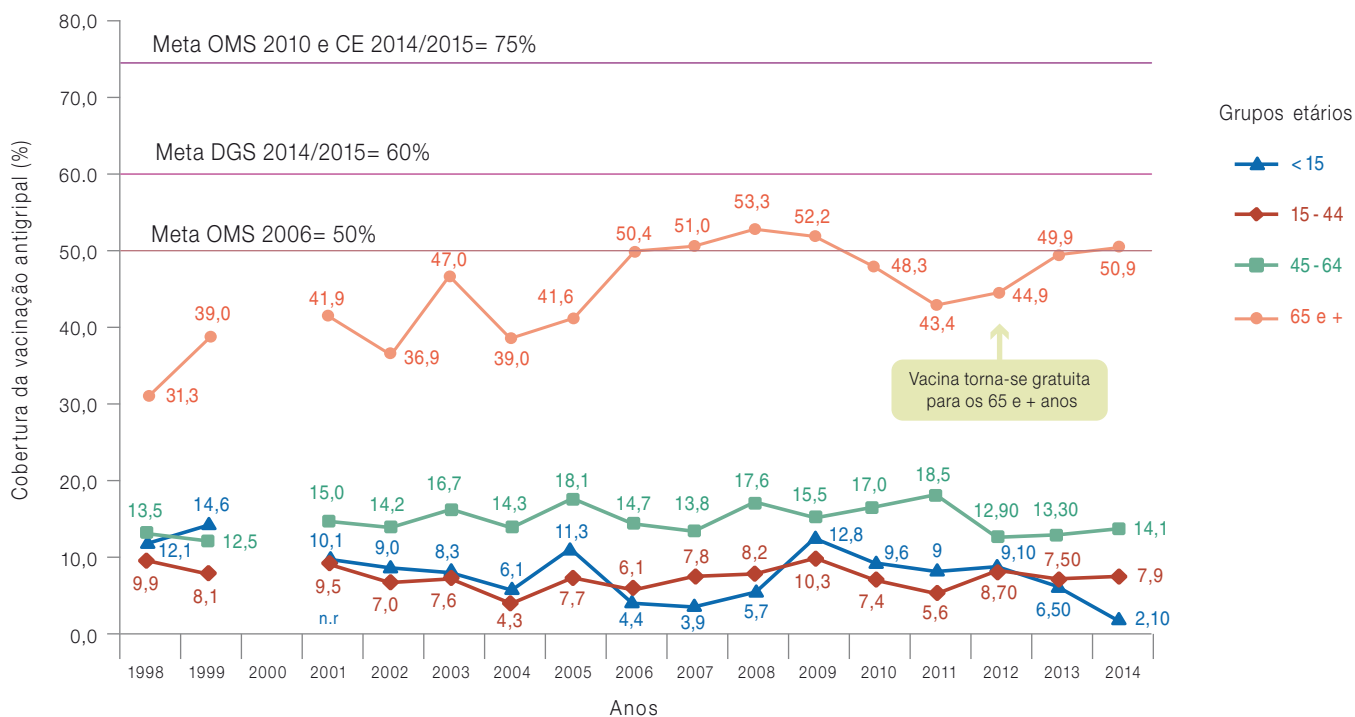
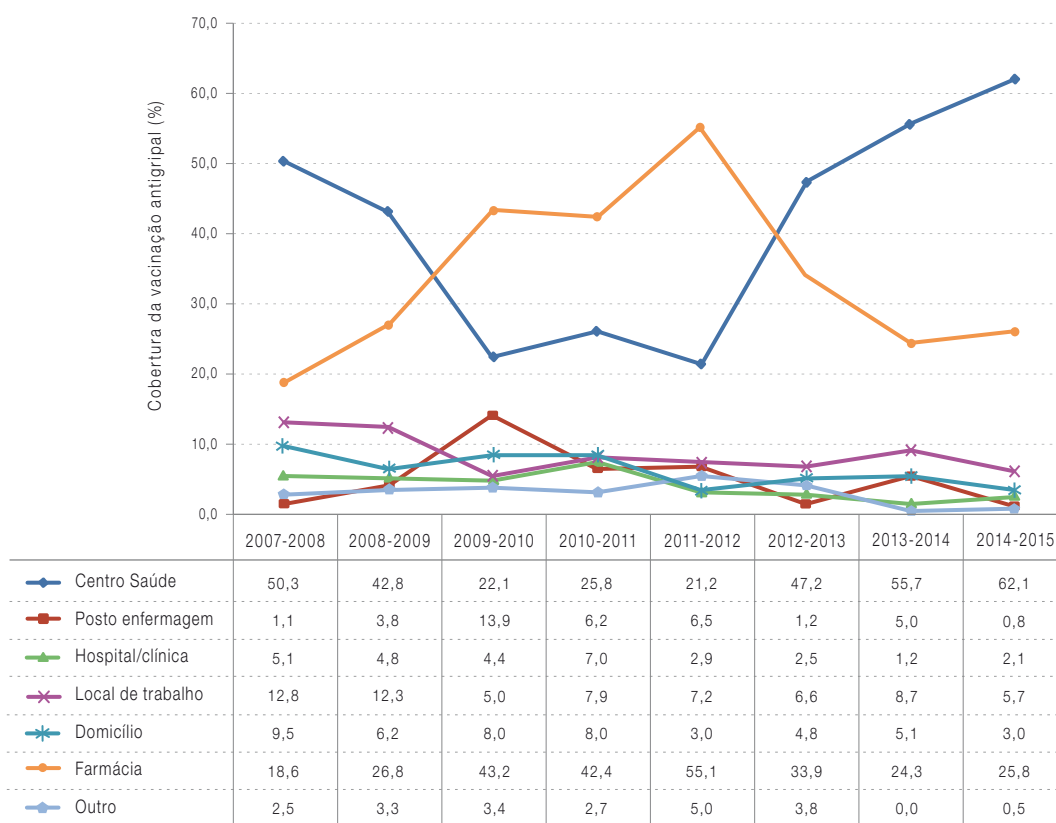


Gráfico 2: ↘ Evolução da cobertura da vacina antigripal entre 2007-2008 e 2014-2015, por local de vacinação (10).



A vacinação antigripal sazonal decorreu, principalmente, nos Centros de Saúde do Serviço Nacional de Saúde (SNS), 62,1% de todos os respondentes (75,3% dos respondentes com 65 e mais anos), seguido pela farmácia, 25,8% dos respondentes (18,8% dos respondentes com 65 e mais anos), o que representa uma inversão da distribuição observada desde o início da autorização da administração das vacinas nas farmácias iniciada em 2008 ⁽¹¹⁾ (gráfico 2). Essas estimativas atuais refletem, assim, uma aproximação ao padrão observado na época 2007/2008, o que por certo pode estar relacionado com a gratuidade da vacina antigripal para a população portuguesa com 65 ou mais anos de idade, disponível apenas nos Centros de Saúde do SNS ⁽¹⁾.

Conclusões

Os resultados do estudo ECOS relativos à época gripal 2014/2015 indicam um aumento na cobertura de VAGS nos indivíduos com 65 e mais anos, o que reflete, à semelhança da época anterior (2013/2014), a alteração da tendência decrescente de cobertura da população pela VAGS, iniciada na época de 2009/2010. Tal parece estar relacionado com o início da gratuidade das vacinas para a população idosa, iniciada na de 2012/2013.

Apesar deste aumento, afigura-se importante manter e reforçar as estratégias de promoção da vacinação pela população portuguesa, com vista a atingir a meta de 60% de cobertura vacinal da população idosa assumida para época 2014/2015 ⁽¹²⁾.

Referências bibliográficas:

- (1) Direção-Geral da Saúde. Orientação nº 013/2012, de 21/09/2013. Vacinação contra a gripe com a vacina trivalente na época 2012/2013. www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i017781.pdf
- (2) Observatório Nacional de Saúde. Em Casa, pelo telefone, Observamos Saúde. Descrição e avaliação de uma metodologia. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2003. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2406>
- (3) Observatório Nacional de Saúde. Em Casa, pelo telefone, Observamos Saúde: descrição e avaliação de uma metodologia. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2010. www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Documents/Epidemiologia/pro_ecos_ecptos.onsa.pdf
- (4) Instituto Nacional de Estatística. Censos 2011-Resultados provisórios. XV Recenseamento Geral da População e V Recenseamento Geral da Habitação. Lisboa: INE, 2011. http://censos.ine.pt/xportal/xmain?xpid=CENSOS&xpgid=ine_censos_publicacoes
- (5) Autoridade Nacional de Comunicações. Inquérito ao Consumo de Comunicações Electrónica: população residencial - Dezembro de 2009. Lisboa: ANACOM, 2010. www.anacom.pt/render.jsp?contentId=1026814#Vm7NMdKLRR2
- (6) European Commission. E-Communications Household Survey: report 2011. Brussels: EC, 2012. (Special Eurobarometer 381). http://ec.europa.eu/public_opinion/archives/ebs/ebs_381_en.pdf
- (7) Instituto Nacional de Estatística. [Estimativas da população residente, por idade, segundo o sexo e NUTS II em 2012] [Em linha] [consult. 22/10/2015]. www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0001277&contexto=bd&selTab=tab2
- (8) Kennedy C. Evaluating the effects of screening for telephone service in dual frame RDD surveys. *Public Opin Quart.* 2007; 71(5):750-71.
- (9) IBM SPSS Statistics V22.0. IBM United States Software Announcement 213-309, dated August 13, 2013. www-01.ibm.com/common/ssi/rep_ca/9/897/ENUS213-309/ENUS213-309.PDF
- (10) Nunes B, Branco MJ. Vacinação antigripal da população portuguesa em 2013/2014: cobertura e características do acto vacinal. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014. <http://hdl.handle.net/10400.18/3121>
- (11) Ministério da Saúde. Portaria n.º 1427/2007, de 2 de novembro. DR 1ª série, nº 211: 7991-92. Regula as condições e os requisitos da dispensa de medicamentos ao domicílio e através da Internet. <https://dre.pt/application/file/629339>
- (12) Direção-Geral de Saúde. Orientação nº 016/2014, de 24/09/2014. Vacinação contra a gripe com a vacina trivalente para a época 2014/2015. www.dgs.pt/directrices-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0162014-de-24092014.aspx

Efetividade da vacina antigripal entre 2009 e 2015 em Portugal

Patrícia Conde^{1,2}, Ausenda Machado², Pedro Pechirra¹, Ana Paula Rodrigues², Paula Cristóvão¹, Inês Costa¹, Raquel Guiomar¹, Baltazar Nunes²

baltazar.nunes@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Departamento de Epidemiologia, INSA.

Introdução

É conhecido que as epidemias de gripe são responsáveis por excessos de mortalidade e internamentos hospitalares (1-3). Aos indivíduos com resposta imunitária deficitária/diminuída a uma infeção, em particular os doentes crónicos e os idosos, está associado um risco acrescido de desenvolver complicações quando infetados pelo vírus da gripe (4). Desde 2008, os Departamentos de Epidemiologia e de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) têm participado no projeto Europeu multicêntrico IMOVE (IMOVE - *Monitoring influenza vaccine effectiveness during influenza seasons and pandemics in the European Union*) (5), através do projeto EuroEVA (Efetividade da Vacina Antrigripal na Europa – componente portuguesa), que pretende estimar a efetividade da vacina antigripal sazonal e pandémica durante e após a época de gripe. O conhecimento da efetividade da vacina antigripal (EV) é essencial para avaliar o efeito da vacina na mitigação da doença. As modificações contínuas do vírus influenza tornam necessária a reformulação da composição da vacina antigripal sazonal em todas as épocas e, conseqüentemente, as estimativas de EV de anos anteriores não podem ser consideradas em anos subsequentes, sendo, por isso, necessário estimar a efetividade para cada vacina sazonal. Entre 2009 e 2015, a cobertura da vacina sazonal, na população portuguesa em geral, variou entre 16,3% na época 2012/2013 e 19,5% na época 2009/2010 (6-9). A cobertura vacinal da vacina pandémica, também administrada em 2009/2010, foi de 3,3% (6).

Objetivo

Este trabalho tem como objetivo apresentar as estimativas da EV da vacina sazonal trivalente observadas em Portugal, em indivíduos de todas as idades, no período entre 2009 e 2015.

Materiais e métodos

Foi utilizado um delineamento caso-controlo, onde os casos de síndrome gripal (SG), com resultado laboratorial positivo para o vírus influenza são comparados com os casos de SG com resultado laboratorial negativo para gripe (controlos).

Os indivíduos com sinais e sintomas de SG (critério UE) (10) foram selecionados em consulta com o médico de família (MF). De 2009 até à época de gripe de 2011/2012 foram incluídos no estudo todos os casos SG com 65 ou mais anos. Desde 2012/2013 passaram a ser incluídos todos os casos de SG com 60 ou mais anos. Durante todo o período em estudo, semanalmente foram selecionados apenas 2 casos de utentes com outras idades (cada MF tem um dia da semana para recrutar casos, selecionando no dia estabelecido os 2 primeiros casos SG que recorrem à sua consulta).

A informação demográfica, características clínicas do SG, estado vacinal e potenciais fatores de confundimento (história tabágica, presença de doenças crónicas, estado funcional, nível educacional, número de consultas de MF nos últimos 12 meses) foi obtida através de um questionário desenhado para o efeito.

Foram considerados como vacinados os casos SG que receberam uma dose da vacina trivalente, pelo menos 14 dias antes do início dos sintomas (11).

A efetividade da vacina (EV) foi estimada através da fórmula $EV=1-OR$, sendo OR o *odd ratio* de estar vacinado no grupo caso vs grupo controlo, ajustado para potenciais variáveis de confundimento através de modelos de regressão logística não condicional. Os fatores de confundimento foram analisados e incluídos no modelo sempre que o OR bruto foi alterado em pelo menos 10% após ajustamento pelo método de Mantel Haenszel.

artigos breves_ n. 10

_Resultados

Entre 2009 e 2015, o período de vigilância da gripe decorreu em cada época, entre a semana 40 (outubro) de um ano e a semana 20 (maio) do ano seguinte (quadro 1).

No período em estudo, os vírus influenza em circulação foram semelhantes às estirpes incluídas na vacina antigripal trivalente, exceto nas épocas 2011/2012, 2012/2013 e 2014/2015, em que circularam vírus que se diferenciaram das estirpes vacinais (quadro 1).

Quadro 1: Períodos epidémicos, estirpes do vírus da gripe em circulação e estirpes vacinais para o período em estudo (2009-2015).

Época gripal	Máxima atividade gripal (semana)	Período epidémico (semanas)	Vírus da gripe detetados (tipo/subtipo)	% deteção	Caraterização genética das estirpes em circulação	Estirpes vacinais (vacina trivalente)
2009/2010	47/2009	44/2009-50/2009	A(H3)			A/Brisbane /10/2007
			A(H1) sazonal			A/Brisbane/59/2007
			B	7,0	B (linhagem não determinada)	B/Brisbane/60/2008
			A(H1)pdm09	93,0	A/California/7/2009	A/California/7/2009 ^a
2010/2011	52/2010	50/2010-5/2011	A(H3)	1,1	A/Perth/16/2009	A/Perth/16/2009
			A(H1)pdm09	55,7	A/California/7/2009	A/California/7/2009
			B	42,7	B/Brisbane/60/2008 (Victoria)	B/Brisbane/60/2008 (Victoria)
2011/2012	10/2012	4/2012-12/2012	A(H3)	97,7	A/Perth/16/2009	A/Perth/16/2009
			A(H1)pdm09			A/California/7/2009
			B	2,3	B/Bangladesh/3333/2007 e B/Brisbane/3/2007 (Yamagata)	B/Brisbane/60/2008 (Victoria)
2012/2013	10/2013	4/2013-11/2013	A(H3)	6,4	A/Victoria/361/2011	A/Victoria/361/2011
			A(H1)pdm09	42,3	A/California/7/2009	A/California/7/2009
			B	51,3	B/Massachusetts/02/2012 e B/Wisconsin/1/2010 (Yamagata)	B/Wisconsin/1/2010 (Yamagata)
2013/2014	4/2014	2/2014-8/2014	A(H3)	38,8	A/Texas/50/2012	A/Texas/50/2012
			A(H1)pdm09	59,7	A/California/7/2009	A/California/7/2009
			B	1,3	B/Massachusetts/02/2012 (Yamagata)	B/Massachusetts/02/2012 (Yamagata)
2014/2015	1/2015	1/2015-8/2015	A(H3)	29,8	A/Hong Kong/5738/2014	A/Texas/50/2012
			A(H1)pdm09	4,2	A/California/7/2009	A/California/7/2009
			B	66,0	B/Phuket/3073/2013 (Yamagata)	B/Massachusetts/02/2012 (Yamagata)

a= estirpe incluída na vacina pandémica 2009 monovalente. A cor amarela assinala as estirpes em circulação que diferem da estirpe vacinal na referida época de vigilância.

Tabela 1: ⬇ Efetividade da vacina antigripal bruta e ajustada para o período em estudo (2009-2015) (12-17).

Época gripal	n	EV população total (bruta)	IC95%	EV população total (ajustada)	IC95%
2009/2010	188	33% ^a	(-59,0 - 72,0)	29% ^{a-b}	(-254,0 - 86,0)
2010/2011	253	79,4%	(43,4 - 93,5)	58,2% ^c	(-60,7 - 89,1)
2011/2012	273	59,2%	(21,1 - 79,4)	48,8% ^d	(0,0 - 73,8)
2012/2013	392	78,8%	(51,6 - 91,7)	68,8% ^e	(23,9 - 87,2)
2013/2014	143	67,9%	(10,3 - 88,8)	50,2% ^f	(-59,5 - 84,5)
2014/2015	249	72,2%	(43,1 - 86,7)	63,4% ^g	(16,2 - 84,0)

A EV foi ajustada para diferentes fatores e para cada época gripal. a= dados relativos apenas à vacina trivalente, não inclui a EV da vacina pandémica monovalente de 2009/2010. b= grupo etário, toma vacina sazonal na época 2008/2009, doença crónica, visitas ao MF, nº coabitantes, pertencer à lista do MF, mês de início de sintomas. c= grupo etário, toma vacina pandémica e sazonal na época 2009/2010, doença crónica, grupo-alvo da vacina, mês de início de sintomas. d= nº de coabitantes e mês de início de sintomas. e= grupo etário, doença crónica, nº coabitantes e mês início sintomas. f= grupo etário, nº coabitantes e mês início sintomas. g= grupo etário, doença crónica e mês de início dos sintomas.

O número de doentes de SG notificados no âmbito do projeto Euro-EVA entre 2009 e 2015 e a EV bruta e ajustada para os potenciais fatores de confundimento estão apresentados na **tabela 1**.

Os valores da efetividade da vacina antigripal trivalente considerados baixos/moderados, inferiores ou iguais a 50% (**tabela 1**), com ajustamento aos fatores de confundimento, foram registados em 3 épocas. Em 2009/2010 o valor da efetividade da vacina antigripal foi de 29% (IC95%: -254,0% a 86,0%), em 2011/2012 foi de 48,8% (IC95%: 0,0% a 73,8%) e em 2013/2014 foi de 50,2% (IC95%: -59,5% a 84,5%).

Nas restantes três épocas em estudo, os valores da efetividade vacinal ajustada foram mais elevados: 58,2% (IC95%: -60,7% a 89,1%) em 2010/2011, 68,8% (IC95%: 23,9% a 87,2%) em 2012/2013, 63,4% (IC95%: 16,2% a 84,0%) na época 2014/2015 (**tabela 1**). Apenas nas 2 últimas épocas referidas, os valores da efetividade vacinal apresentaram significado estatístico (**tabela 1**).

Em relação à vacina monovalente para o vírus da gripe A(H1) pandémico, administrada nas épocas 2009/2010 e 2010/2011, não foi possível obter estimativas da EV, porque não terem sido detetados casos de SG confirmados laboratorialmente e vacinados para o vírus pandémico na época 2009/2010 e ao número reduzido de vacinados selecionados na época 2010/2011.

_Discussão e conclusão

De uma forma geral, os valores de efetividade da vacina antigripal encontrados neste trabalho são concordantes com os resultados obtidos por outros estudos (18-19).

Nas épocas gripais entre 2009 e 2015, a efetividade da vacina antigripal apresentou valores baixos a moderados (entre 29% e 69%), sendo que as épocas com valores de EV mais elevados foram aquelas em que os vírus do tipo B predominaram ou tiveram uma representação expressiva entre os diferentes (sub)tipos de vírus em circulação.

Na época 2009/2010 verificou-se uma baixa efetividade da vacina antigripal devido à circulação de um novo vírus da gripe do subtipo A(H1), não estando este vírus incluído na vacina da referida época.

Na maioria das épocas, a dimensão da amostra (que variou entre 143 e 392 casos de SG), foi um fator limitante não permitindo a obtenção de estimativas mais precisas, nem o cálculo de estimativas por subtipo dos vírus da gripe em circulação. Neste sentido, a equipa EuroEva tem desenvolvido esforços no sentido de aumentar o número de médicos participantes e a dimensão da amostra, indivíduos com síndrome gripal.

Um outro fator de relevo a considerar, à semelhança do que tem sido referido por outros estudos (20), passa pela necessidade da inclusão mais efetiva dos dados de caracterização antigénica e genética nos estudos de efetividade da vacina antigripal para melhor se compreender a baixa efetividade vacinal observada em algumas das épocas gripais.

Agradecimentos

Aos médicos participantes no estudo EuroEVA. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*. 2003;289(2):179-86. <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=195750>
- (2) McBean AM, Hebert PL. New estimates of influenza-related pneumonia and influenza hospitalizations among the elderly. *Int J Infect Dis*. 2004;8(4):227-35. www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971204000542
- (3) Nunes B, Viboud C, Machado A, et al. Excess mortality associated with influenza epidemics in Portugal, 1980 to 2004. *PLoS One*. 2011;6(6):e20661. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0020661>
- (4) Vaccines against influenza WHO position paper – November 2012. *Wkly Epidemiol Rec*. 2012 Nov 23;87(47):461-76. <http://www.who.int/wer/2012/wer8747.pdf>
- (5) Machado A, Rodrigues AP, Nunes B, et al. Protocol for case-control studies to measure seasonal influenza vaccine effectiveness in the European Union and European Economic Area Member States – Portuguese study site version season 2014-2015. Lisbon: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014
- (6) Branco MJ, Paixão E, Nunes B. Vacinação antigripal da população portuguesa, em 2009-2010: cobertura e algumas características do acto vacinal. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2010. <http://hdl.handle.net/10400.18/226>
- (7) Branco MJ, Nunes B. Vacinação antigripal da população portuguesa, em 2010-2011: cobertura e algumas características do acto vacinal. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2011. www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Publicacoes/Outros/Documents/Epidemiologia/RelatorioVacinaoAntiGripal_2010-2011.pdf
- (8) Nunes B, Branco MJ. Vacinação antigripal da população portuguesa, em 2011-2012: cobertura e características do acto vacinal. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2012. <http://hdl.handle.net/10400.18/1010>
- (9) Sousa-Uva M, Nunes B, Roquette R, et al. Vacinação antigripal da população portuguesa na época 2013-2014: estudo na amostra ECOS. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2013. <http://hdl.handle.net/10400.18/2327>
- (10) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Boletim de Vigilância Epidemiológica da Gripe [Em linha]. [consult. 3/12/2015] www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/Epidemiologia/Paginas/ActividadeGripal.aspx
- (11) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza case definitions [Em linha]. [consult. 3/12/2015] http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/influenza/surveillance/Pages/influenza_case_definitions.aspx
- (12) Nunes B, Guiomar R, Machado A, et al. Case control study for measuring influenza vaccine effectiveness in Portugal: final report season 2009-10. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2010. <http://hdl.handle.net/10400.18/687>
- (13) Nunes B, Machado A, Pechirra P, et al. Efectividade da vacina antigripal na época 2010-2011 em Portugal: resultados do projeto EuroEVA. *Rev Port Med Geral Fam*. 2012;28(4):271-84. www.rpmgf.pt/ojs/index.php/rpmgf
- (14) Kissling E, Valenciano M; I-MOVE case-control studies team. Early estimates of seasonal influenza vaccine effectiveness in Europe among target groups for vaccination: results from the I-MOVE multicentre case-control study, 2011/12. *Euro Surveill*. 2012;17(15):pii=20146. www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20146
- (15) Machado A, Conde P, Pechirra P, et al. Efetividade da vacina antigripal sazonal na época 2012/13: resultados do projeto EuroEVA 2012/13. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2014;3(7):22-24. <http://hdl.handle.net/10400.18/1961>
- (16) Machado A, Guiomar R, Gómez V, et al. Efetividade da vacina antigripal sazonal na época 2013/2014: resultados do projeto EuroEVA. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2014;3(10):15-18. <http://hdl.handle.net/10400.18/2377>
- (17) Machado A, Rodrigues AP, Guiomar R, et al. Influenza vaccine effectiveness in Portugal: season 2014/2015 report. Lisbon: National Health Institute Doutor Ricardo Jorge, 2015. <http://hdl.handle.net/10400.18/3176>
- (18) Darvishian M, Bijlsma MJ, Hak E, et al. Effectiveness of seasonal influenza vaccine in community-dwelling elderly people: a meta-analysis of test-negative design case-control studies. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(12):1228-39.
- (19) Osterholm MT, Kelley NS, Sommer A, et al. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(1):36-44. Epub 2011 Oct 25.
- (20) Skowronski DM, Chambers C, Sabaiduc S, et al. Integrated Sentinel Surveillance Linking Genetic, Antigenic, and Epidemiologic Monitoring of Influenza Vaccine-Virus Relatedness and Effectiveness During the 2013-2014 Influenza Season. *J Infect Dis*. 2015;212(5):726-39.

Aplicação de um teste preliminar a um folheto informativo sobre o estudo da efetividade da vacina antigripal contra formas graves de gripe

Maria Moitinho de Almeida^{1,2}, Ana João Santos²,
Ausenda Machado²

ausenda.machado@insa.min-saude.pt

(1) Agrupamento de Centros de Saúde Almada-Seixal

(2) Departamento de Epidemiologia, INSA

_Introdução

O recrutamento de participantes suficientes para estudos epidemiológicos reveste-se de uma importância assinalável, uma vez que conseguir a amostra prevista para o desenho de estudo tem implicações na potência estatística e extrapolação dos resultados para a população geral (1,2). Existem várias estratégias de comunicação e informação a potenciais participantes, sendo o contacto direto e pessoal, ou a entrega de folhetos informativos, convenientes e exequíveis (1,2). A informação transmitida através de um folheto sobre um estudo na área da saúde beneficia de um teste preliminar para verificar a sua adequação em situação real, pois não é possível antecipar a forma como irá ser recebida pela população alvo (3). Os testes preliminares consistem geralmente na aplicação do esboço do material que se pretende usar numa pequena amostra de uma população igual ou semelhante à do estudo em si (3).

No âmbito da preparação para a implementação do Estudo da Efetividade da Vacina Antigripal contra Formas Graves de Gripe em contexto hospitalar, do Projeto I-MOVE+ (*Integrated Monitoring of Vaccines in Europe*) (4), a equipa responsável criou um folheto informativo para os participantes, de forma a aumentar a adesão ao estudo e o conhecimento para a toma de decisão complementando assim a componente informativa do consentimento informado. De modo a perceber a adequação deste folheto à prática, realizou-se um teste preliminar.

_Objetivo

Este trabalho tem como objetivo apresentar os resultados da aplicação do teste preliminar ao folheto informativo sobre o estudo da efetividade da vacina antigripal contra formas graves de gripe.

_Métodos

O teste preliminar ao folheto informativo foi aplicado na sala de espera da Unidade de Saúde Pública do Agrupamento de Centros de Saúde (ACES) Almada-Seixal nos dias 20, 21 e 22 de julho de 2015. Os participantes foram utentes que recorreram àqueles serviços nos dias referidos, e foram selecionados tendo em conta a sua idade (superior a 65 anos) ou acompanhantes de pessoas com mais de 65 anos. Os utentes foram abordados por uma médica interna de Saúde Pública que, após explicação sucinta do que se pretendia, cedeu o folheto impresso a preto e branco para leitura. Em seguida realizou-se uma entrevista de modo a preencher uma grelha de avaliação.

A grelha de avaliação continha uma primeira parte que avalia a compreensão dos participantes, e uma segunda que procura estimar a adesão com base na informação disponibilizada no folheto.

Foi avaliada a compreensão de 8 tópicos principais: o objetivo do estudo, o que envolve a participação no estudo, a seleção de participantes para o estudo, os riscos, benefícios e custos em participar no estudo, a confidencialidade e os direitos dos participantes. Pediu-se que os utentes explicassem pelas próprias palavras o que entenderam em relação a cada um dos tópicos. Quando a resposta era consistente com a informação cedida, considerou-se como compreensão; quando a resposta era contrária ou inconsistente com a informação, considerou-se como não-compreensão.

Resultados

Em 23 utentes abordados, 10 recusaram-se a responder. O motivo mais frequente de não-resposta foi a “ausência dos óculos para ler”/”dificuldades visuais” (n=5); seguido da falta de tempo (n=3) e uma opinião negativa acerca da vacinação (n=2).

Dos 13 utentes que responderam, 9 eram do sexo feminino e 4 do sexo masculino. Relativamente à faixa etária, 5 dos participantes tinham menos de 65 anos; tendo os restantes idade igual ou superior a 65 anos.

Em apenas 3 tópicos se verificou uma compreensão igual ou superior a 85% (n=11 ou n=12): riscos, custos e direitos dos participantes. A compreensão do que envolve a participação no estudo e de como são selecionados os participantes foi inferior a 50%. A compreensão dos objetivos e da confidencialidade do estudo foi muito próxima dos 50%, embora ligeiramente superior (gráfico 1).

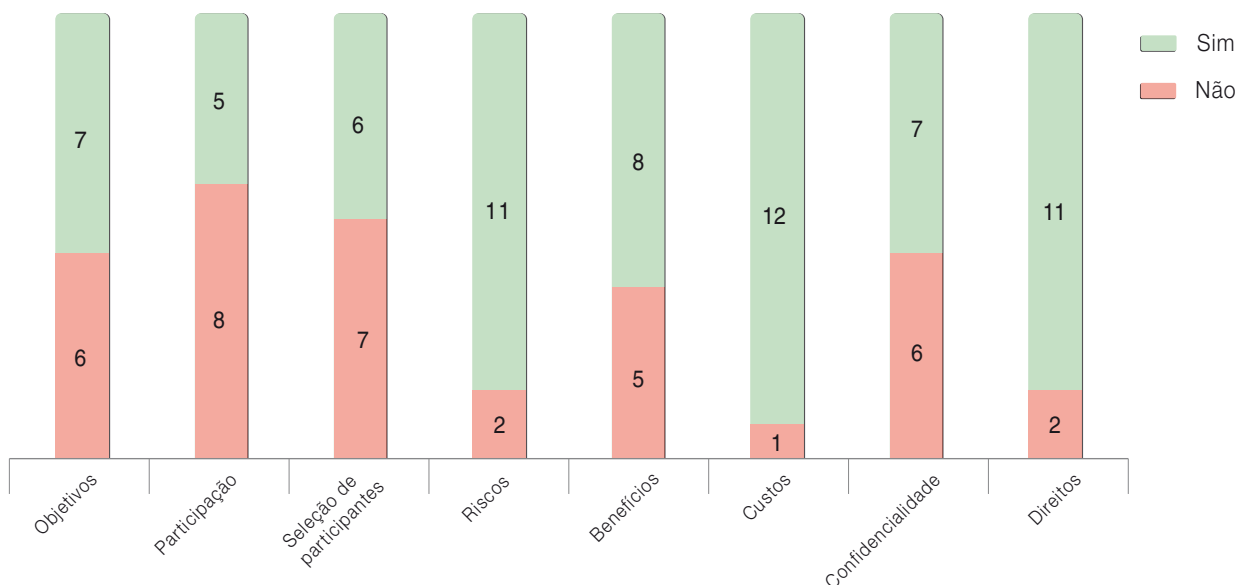
Em 13 participantes no teste preliminar, 6 referiram que aceitariam participar neste estudo e 7 recusariam aderir. Os motivos de não-adesão constam na tabela 1.

Durante as entrevistas, os participantes não referiram ter dificuldade na compreensão de palavras, termos ou expressões em particular. A única sugestão de melhoria foi a de impressão do folheto a cores em vez de preto e branco.

Tabela 1: Motivos apontados pelos participantes que recusariam aderir ao estudo.

Motivos de recusa	
“não é apologista de vacinas”	1
“não tem tempo”	1
“nunca tem gripe”	1
“toma a vacina todos os anos”	1
“vive em Braga”	1
não especifica/não responde	2
Total	7

Gráfico 1: Compreensão do folheto por parte dos participantes no pré-teste, com base nas respostas obtidas.



Discussão de resultados

O facto de metade das recusas em participar no pré-teste se dever a dificuldades relacionadas com a visão, alerta para uma realidade da população-alvo do estudo pelo que, ao ceder a informação aos potenciais participantes, se deve assegurar as condições ótimas para a leitura tendo em conta a iluminação, lentes corretivas e qualquer outro fator que possa influir.

A grande proporção de respostas que demonstraram uma não-compreensão da informação do folheto sugerem que, para o propósito de uma tomada de decisão mais e melhor informada, se beneficiará com uma linguagem mais simples e um texto mais resumido. Uma vez que a compreensão dos tópicos “riscos”, “custos” e “direitos” foi claramente superior, dever-se-á utilizar uma forma e linguagem semelhantes às utilizadas nos parágrafos correspondentes. O facto de nenhum participante ter referido alguma palavra ou expressão que não tivesse compreendido, tendo em conta os resultados anteriores, aponta para um viés da “desejabilidade social” (*social desirability*), em que o respondente não está muito motivado a revelar algo que seja socialmente mal interpretado, neste caso admitir que não compreende algum termo do folheto (3).

A baixa vontade de adesão aferida após leitura do folheto é compatível com o que sugerem outros estudos acerca do recrutamento de indivíduos para investigação (1,2). Contudo, os motivos apontados pelos inquiridos neste teste preliminar revelam uma fraca compreensão da informação contida no folheto.

Referências bibliográficas:

- (1) Schnirer L, Stack-Cutler H. Recruitment and engagement of low-income populations: service provider and researcher perspectives. [Edmonton, Alta.]: Community-University Partnership for the Study of Children, Youth, and Families, 2012. www.cup.ualberta.ca/wp-content/uploads/2011/07/Recruitment-and-Engagement-of-Low-Income-Populations1.pdf
- (2) Ngwakongwi E, King-Shier KM, Hemmelgarn BR, et al. Comparison of sampling methods for hard-to-reach francophone populations: yield and adequacy of advertisement and respondent-driven sampling. *Open Med.* 2014;8(4):e120-9. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4242789/
- (3) Keeter S. Survey Research. In: Druckman D (ed). *Doing Research: methods of inquiry for conflict analysis*. Thousand Oaks, Calif.: Sage Publications, 2005, p:123-62.
- (4) I-MOVE+ (Integrated Monitoring of Vaccines in Europe). WP2: Influenza Vaccines [Em linha]. [consult. em 5/8/2015]. www.i-moveplus.eu/wp2

ficha técnica

_ Título: Boletim Epidemiológico Observações

_ Periodicidade: Trimestral

_ ISSN: 0874-2928, 2182-8873 (em linha)

_ Numeração: 2ª série

Volume 4, número especial 6, 2015
Doenças Infecciosas

_ 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 Caniça, Conselho Científico do INSA

Manuela Cano, Departamento de Saúde Ambiental

Peter Jordan, Departamento de Genética Humana

Silvia Viegas, Departamento de Alimentação e Nutrição

_ 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 2015.

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