

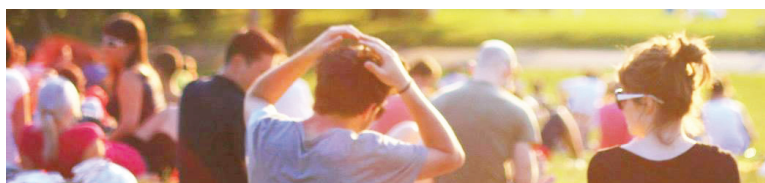


2025

número

37

2ª série



Lisboa_INSA, IP

publicação quadrimestral_janeiro - abril

ISSN: 2182-8873 (em linha)

Observações

Boletim Epidemiológico

sumário_

_Editorial

Conselho Científico do INSA: em prol da investigação científica e desenvolvimento tecnológico p03
Scientific Council of INSA: supporting scientific research and technological development
Luísa Romão, Helena Soares Costa

_Artigos breves

_Doenças infecciosas

1_Surtos de mpx em Portugal: resposta laboratorial e desafios no controlo da epidemia p05
Mpx outbreaks in Portugal: laboratory response and challenges in epidemic control

Rita Cordeiro, Rafaela Francisco, Ana Pelerito, Isabel Lopes de Carvalho, Maria Sofia Nuncio

2_Testes rápidos de antígeno e efetividade da vacina contra a COVID-19 nos cuidados de saúde primários, em Portugal: explorando o potencial de viés p12

Rapid antigen testing and COVID-19 vaccine effectiveness in primary health care in Portugal: exploring the potential for bias

Verónica Gómez, Charlotte Laniece Delaunay, Esther Kissling, Nuno Verdasca, Licinia Gomes, Raquel Guiomar, Ausenda Machado, Ana Paula Rodrigues

3_Implementação de um questionário epidemiológico a detentores de explorações caseiras de animais em Portugal p17
Implementation of an epidemiological survey targeting owners of backyard animal production systems in Portugal

Ana Esteves, Carlos Aniceto, Bruno Baroni, Sónia Ramos, Rita Ferreira, João Paulo Gomes, Ausenda Machado, Alexandra Nunes

_Alimentação e nutrição

4_Acrlamida em cereais e derivados: validação do método analítico e resultados preliminares p23

Acrylamide in cereals and cereal products: analytical method validation and preliminary results

Sandra Copeto, Susana Jesus, Inês Delgado, Inês Coelho

5_Qualidade microbiológica de “comida de rua” pronta para consumo comercializada na área metropolitana de Lisboa, Portugal p28

Microbiological quality of ready-to-eat street foods marketed in the Lisbon metropolitan area, Portugal

Maria João Barreira, Sílvia Marcos, Cristina Varela Flores, Teresa Teixeira Lopes, Isabel Bastos Moura, Cristina Belo Correia, Margarida Saraiva, Rita Batista

6_Avaliação da exposição ao mercúrio no primeiro estudo da dieta total harmonizado em Portugal p35

Assessment of mercury exposure in the first harmonized total diet study in Portugal

Elsa Vasco, Maria Graça Dias, Luísa Oliveira

_Doenças não transmissíveis e genéticas

7_Hipercolesterolemia familiar homocigótica em Portugal: caracterização de casos diagnosticados geneticamente no âmbito do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar, 1999-2023 p40

Familial hypercholesterolemia in Portugal: characterization of genetic diagnosed cases in the Portuguese Study of Familial Hypercholesterolemia, 1999-2023

Ana Margarida Medeiros, Ana Catarina Alves, Beatriz Miranda, Joana Rita Chora, Patricio Aguiar, Mário Amaro, Margarida Bruges, Sofia Ferreira, António Furtado, Ana Gaspar, Filipa Sousa Gonçalves, Goreti Lobarinhas, Guilherme Lourenço, Paula Martins, Sofia Moura Antunes, Isabel Palma, Quitéria Rato, Diogo Torres, Miguel Toscano Rico, André Travessa, Mafalda Bourbon



Instituto Nacional de Saúde
Doutor Ricardo Jorge

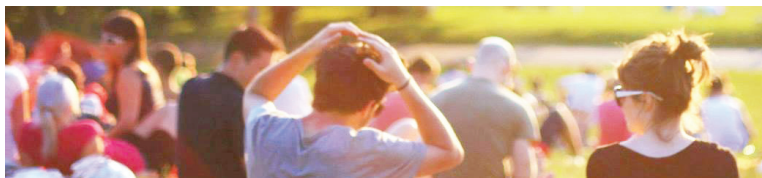


2025

número

37

2ª série



Lisboa_INSA, IP

publicação quadrimestral_ janeiro - abril

ISSN: 2182-8873 (em linha)

Observações

Boletim Epidemiológico

8_ Deficiência da descarboxilase dos L-aminoácidos aromáticos: p47
possibilidade de inclusão no Programa Nacional de Rastreio Neonatal

Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: possibility for inclusion in Portuguese Newborn Screening Program

Raquel Santos, Filipa Ferreira, Laura Vilarinho, Hugo Rocha

9_ Provas de segundo nível para o rastreio neonatal da hiperplasia p52
congénita das suprarrenais

Second tier tests for neonatal screening of congenital adrenal hyperplasia

Ana Leal, Hugo Rocha, Marlene Mota, Laura Vilarinho

10_ O ensaio do micronúcleo em células da mucosa bucal: p57
aplicabilidade em biomonitorização humana

The buccal micronucleus cytome assay: applicability in human biomonitoring

Rita Lopes Rosário, Ana Maria Tavares, Henriqueta Louro, Maria João Silva

_Mortalidade por todas as causas

11_ Monitorização da mortalidade em Portugal: evolução da p66
mortalidade por todas as causas em 2024

Monitoring mortality in Portugal: evolution of all-cause mortality during 2024

Susana Pereira da Silva, Ana Paula Rodrigues

editorial_

Conselho Científico do INSA: em prol da investigação científica e desenvolvimento tecnológico

Scientific Council of INSA: supporting scientific research and technological development

Uma das principais atribuições do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) é promover e desenvolver atividades de investigação científica e desenvolvimento tecnológico (IC&DT) contribuindo para ganhos em saúde pública (1,2).

O Conselho Científico (CC) do INSA é o órgão responsável pela apreciação e acompanhamento das atividades de IC&DT, órgão de reflexão e debate das atividades científicas do INSA, e órgão de ligação entre a estrutura de IC&DT e demais órgãos do INSA (3). Compete ao CC do INSA emitir parecer sobre o orçamento, o plano e o relatório anual de atividades, assim como exercer, em relação à carreira de investigação científica (CIC), as competências que lhe estão cometidas (3). Este órgão pronuncia-se ainda sobre todas as questões que lhe sejam submetidas pelo Conselho Diretivo (CD) da Instituição.

O CC do INSA é constituído por todos os que, a qualquer título, incluindo o de bolseiro, quer sejam cidadãos nacionais ou estrangeiros, exerçam atividade no INSA, desde que estejam habilitados com o grau de doutor ou equivalente, e tenham obtido aprovação nas provas a que se refere o n.º 2 do artigo 17.º do Decreto-Lei n.º 219/92, de 15 de outubro, alterado pelo Decreto-Lei n.º 124/99, de 20 de abril, ou, ainda, que não possuam qualquer dessas qualificações, integrem a carreira de investigação em categoria igual ou superior à de investigador auxiliar ou a carreira docente universitária em categoria igual ou superior à de professor auxiliar (3).

De acordo com as suas competências, e a título de exemplo, o CC tem promovido os "Seminários Ricardo Jorge" com o objetivo de divulgar e estimular a discussão sobre temas de interesse para as atividades do INSA, para a ciência e para

a saúde pública nacional e global. Por outro lado, a convite do CD do INSA, a presidente do CC integrou, recentemente, o júri para atribuição do "Prémio Ricardo Jorge de Saúde Pública 2024" que ocorreu no âmbito das comemorações do 125.º aniversário do INSA (1899-2024).

A atual presidência do CC do INSA, eleita em 2023, tem vindo a trabalhar com o CC e, em particular, com a Comissão Coordenadora do CC, para em conjunto, e com o apoio do Conselho Diretivo, continuar a apoiar e a dignificar a IC&DT desenvolvida no INSA. Neste contexto, interessa estimular o crescimento da CIC do INSA, nomeadamente através de novos investigadores que se empenhem em promover a excelência na prática profissional, nas diferentes áreas científicas, em prol da missão do INSA.

A nível nacional, os CCs dos Laboratórios do Estado (LEs) são representados pelo Fórum dos Conselhos Científicos dos Laboratórios do Estado (Fórum CCs LE). O Fórum CCs LE pretende promover o reforço, dinamização e valorização das atividades dos LE no contexto científico e tecnológico nacional, designadamente para analisar conjuntamente os seus problemas comuns e propor soluções adequadas (4). Uma das suas atividades mais recentes foi a sua participação ativa no processo de revisão do Estatuto da Carreira de Investigação Científica (ECIC), entretanto publicado (Lei n.º 55/2025, de 28 de abril) (5). Para isso, apresentou propostas concretas que considera fundamentais para a CIC nos LEs. Esta carreira é essencial para o cumprimento dos objetivos da política científica e tecnológica nacional por parte destes organismos.

Luísa Romão

Presidente do Conselho Científico do INSA

Helena Soares Costa

Vice-Presidente do Conselho Científico do INSA



editorial_

Referências bibliográficas:

- (1) Decreto-Lei n.º 27/2012, de 8 de fevereiro. DR, 1.ª Série, n.º 28:635-39. Lei Orgânica do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/decreto-lei/27-2012-543721>
- (2) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Plano Estratégico 2024-26. Lisboa: INSA, IP, 2024. <http://hdl.handle.net/10400.18/9229>
- (3) Regulamento n.º 349/2017, de 29 de junho. DR, 2.ª Série, n.º 124: 13196-198. Regulamento Interno do Conselho Científico do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I. P. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/regulamento/349-2017-107588430>
- (4) Fórum dos Conselhos Científicos dos Laboratórios do Estado (Fórum CCs LE) [online]. <https://sites.google.com/view/forum-ccs-le/home>
- (5) Lei n.º 55/2025, de 28 de abril. DR 1.ª Série, n.º 81:1-29. Aprova o Estatuto da Carreira de Investigação Científica e o regime comum das carreiras próprias de investigação científica em regime de direito privado. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/lei/55-2025-916177977>



Surtos de mpox em Portugal: resposta laboratorial e desafios no controlo da epidemia

Mpox outbreaks in Portugal: laboratory response and challenges in epidemic control

Rita Cordeiro^{1,2}, Raíafa Francisco^{1,3}, Ana Pelerito^{1,2}, Isabel Lopes de Carvalho^{1,2}, Maria Sofia Núncio^{1,2}

rita.cordeiro@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Instituto de Saúde Ambiental. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(3) Egas Moniz School of Health & Science, Caparica, Portugal

_Resumo

A infeção mpox, causada pelo vírus monkeypox (MPXV), tornou-se uma emergência global de saúde pública em 2022. Portugal foi um dos primeiros países a confirmar casos de infeção, o que levou à implementação de um sistema de vigilância laboratorial a nível nacional. Este estudo descreve a evolução epidemiológica de mpox em Portugal entre 2022 e 2025 e avalia o desempenho de diferentes tipos de amostras biológicas na deteção de MPXV.

No Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge foram analisadas 5610 amostras de 2802 casos suspeitos de mpox pelo método PCR em tempo real. As amostras biológicas incluíram, maioritariamente, exsudados de lesão, orofaríngeo e anal e amostras de urina. Confirmaram-se 1202 casos positivos de mpox distribuídos por três surtos, sendo o primeiro o mais expressivo (79,3%). A maioria dos casos ocorreu em homens que têm sexo com homens, entre os 20 e 39 anos de idade. As amostras de exsudados de lesão e anal apresentaram as maiores taxas de positividade (95,1% e 87,9%, respetivamente), enquanto o exsudado orofaríngeo permitiu o diagnóstico em cerca de 5% dos casos que não apresentavam lesões visíveis.

A vacinação, aliada a outras estratégias direcionadas, contribuiu para reduzir a transmissão e a severidade clínica da doença. A vigilância laboratorial contínua mostrou-se essencial para a deteção precoce dos casos, contribuindo para uma resposta rápida e eficaz no controlo dos três surtos. Estes dados reforçam a importância do desenvolvimento e da implementação de metodologias laboratoriais de diagnóstico e a adoção de medidas de vigilância dirigidas a populações vulneráveis.

_Abstract

Mpox, caused by the monkeypox virus (MPXV), became a global public health emergency in 2022. Portugal was one of the first countries to confirm cases, leading to the implementation of a national laboratory surveillance system. This study describes the epidemiological evolution of mpox in Portugal between 2022 and 2025 and evaluates the performance of different types of clinical samples for MPXV detection.

A total of 5610 samples from 2802 suspected cases were analyzed by real-time PCR at the Portuguese National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge. Most samples consisted of lesion, oropharyngeal and anal swabs and urine samples. Out of these, 1202 positive cases were confirmed, distributed across three outbreak waves, with the first being the most significant (79.3%). Most cases occurred in men who have sex with men, aged between 20 and 39 years. Lesion and anal swabs showed the highest positivity rates (95.1% and 87.9%, respectively), while oropharyngeal swabs

enabled diagnosis in approximately 5% of cases without visible lesions. Vaccination, combined with other targeted strategies, helped reduce both transmission and clinical severity. Continuous laboratory surveillance proved essential for the rapid detection of cases and contributed to the effective response to the three outbreaks. These findings highlight the importance of laboratory preparedness and focused public health measures for vulnerable populations.

_Introdução

O vírus monkeypox (MPXV), agente etiológico da infeção mpox, pertence à família *Poxviridae* e ao género *Orthopoxvirus*, que também inclui o vírus da varíola. O vírus foi isolado pela primeira vez em macacos, num laboratório de investigação, em 1958 na Dinamarca. O primeiro caso humano de mpox foi notificado em 1970 numa criança do sexo masculino com nove meses da República Democrática do Congo, África Central. A infeção mpox é uma doença zoonótica rara e endémica nos países da África Ocidental e Central, onde a interação próxima entre humanos e animais selvagens ou potenciais reservatório(s) é frequente. A transmissão ocorre, maioritariamente, através do contacto direto com lesões, fluidos corporais ou gotículas respiratórias de indivíduos ou animais infetados (1,2).

MPXV é atualmente classificado em dois clades principais: clade I (anteriormente designado *Congo Basin* clade), que inclui os subclades Ia e Ib, e clade II (anteriormente designado *West Africa* clade), que inclui os subclades IIa e IIb. Estes clades apresentam diferenças na severidade dos quadros clínicos e na virulência, sendo o clade I associado a quadros mais severos e a uma maior taxa de letalidade em comparação com o clade II (1,2,3).

Em maio de 2022, foi identificado um surto global causado por estirpes do clade IIb em vários países do mundo. Devido à rápida propagação do vírus, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou, em julho de 2022, a infeção mpox como uma Emergência de Saúde Pública de âmbito Internacional (*Public Health Emergency of International Concern*, PHEIC). Esta decisão evidenciou a necessidade de reforçar a vigilância epidemiológica e a capacidade laboratorial de resposta. A 14 de agosto de 2024, a OMS voltou a declarar a infeção mpox como uma PHEIC, devido ao aumento do número de infeções pelo MPXV clade Ib na República Democrática do Congo e pela disseminação para países vizinhos. Desde então, casos de mpox causados pelo MPXV clade I têm sido notificados fora do continente africano, geralmente associados a indivíduos com histórico de viagem a países endémicos. Até fevereiro de 2025, a OMS registou mais de 130 000 casos confirmados de mpox, em 131 países, incluindo 304 óbitos (3,4).

A apresentação clínica característica de mpox inclui um curto período prodrómico febril, seguido pelo desenvolvimento progressivo de uma erupção cutânea característica com lesões endurecidas e umbilicadas, que surgem inicialmente na cabeça ou face e progridem para os membros e tronco, mantendo o mesmo estadió evolutivo da doença. A linfadenopatia é uma manifestação típica. No entanto, nos surtos recentes, têm sido descritas apresentações atípicas, com lesões a iniciarem-se na zona genital. O diagnóstico diferencial clínico deve excluir outras doenças exantemáticas, nomeadamente a varicela (1).

O diagnóstico laboratorial de mpox é realizado, preferencialmente, utilizando testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT), como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real ou convencional. O NAAT pode ser genérico para *Orthopoxvirus* ou, de preferência, específico para MPXV. A PCR em tempo real destaca-se pela sua sensibilidade, especificidade e rapidez, sendo a metodologia de eleição na investigação laboratorial inicial. Complementarmente, a sequenciação do genoma viral permite caracterizar a dinâmica da transmissão e, assim, contribuir para a vigilância e investigação epidemiológica. A amostra biológica adequada

para confirmação laboratorial é o exsudado de lesão, sendo também recomendada a colheita de um exsudado orofaríngeo. Adicionalmente, outras amostras podem ser consideradas para investigação, tais como: exsudados genital e/ou anal, urina e sémen, dependendo das manifestações clínicas do doente (5).

A deteção precoce e a implementação rápida de medidas de controlo são fundamentais para mitigar a propagação do vírus, destacando-se a importância da existência de laboratórios de referência com capacidade para responder a emergências de saúde pública. Em Portugal, desde 2007, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) dispõe de uma Unidade especializada na Resposta a Emergências e Biopreparação (UREB), integrada no Departamento de Doenças Infecciosas, e que é o laboratório nacional de referência para a deteção de agentes patogénicos e com potencial pandémico, incluindo os *Orthopoxvirus*.

_Objetivo

O presente estudo tem como objetivo descrever a evolução epidemiológica de mpox em Portugal entre 2022 e 2025, caracterizando os principais surtos registados no país, bem como avaliar o desempenho de diferentes tipos de amostras biológicas na deteção de MPXV, com base na experiência do Laboratório Nacional de Referência - Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

_Materiais e métodos

As amostras biológicas estudadas foram colhidas de doentes com suspeita de infeção mpox, com base na observação clínica, em unidades de saúde públicas e privadas distribuídas por todo o país. Todas as amostras foram enviadas para a UREB, no INSA, para deteção de MPXV.

No total, foram analisadas 5610 amostras clínicas provenientes de 2802 doentes (gráfico 1), nomeadamente: exsudado de lesão (n=2977; 53,1%), exsudado orofaríngeo (n=2146; 38,2%), exsudado anal (n=287; 5,1%),

urina (n=99; 1,8%) e outras amostras (n=101; 1,8%), incluindo exsudados genitais e oculares, sémen, líquido cefalorraquidiano, sangue periférico, líquido pleural, soro e secreções brônquicas. O número de amostras excede o número de doentes devido à colheita múltipla para alguns doentes e ao seguimento clínico em alguns casos. Adicionalmente, amostras do mesmo doente foram colhidas e testadas nos diferentes surtos.

Inicialmente, foram priorizados os exsudados de lesão e orofaríngeo, conforme recomendação da OMS, sendo progressivamente integrados outros tipos de amostras, como exsudado anal e urina, à medida que foram evoluindo os conhecimentos técnicos sobre a infeção.

A extração de DNA viral foi realizada utilizando o *kit ANDiS Viral RNA Auto Extraction & Purification*, no sistema automatizado de extração de ácidos nucleicos ANDiS 350 (3DMed), de acordo com as recomendações do fabricante. A deteção de MPXV foi efetuada por PCR em tempo real, utilizando uma técnica *in-house* específica para a identificação do gene B7R (6). Em todas as reações foram incluídos controlos positivos, negativos e internos (gene RNaseP).

O resultado da deteção de MPXV foi definido como negativo ($Ct \geq 40$), fracamente positivo ($35 \leq Ct < 40$) e positivo ($Ct < 35$). A confirmação laboratorial da infeção por MPXV foi estabelecida com base na obtenção de pelo menos uma amostra positiva por doente por PCR.

Para a análise estatística, as características das amostras entre os grupos positivo e negativo foram comparadas utilizando o teste *Fisher's exact*, com um nível de significância de $p < 0,05$, recorrendo ao *GraphPad QuickCalcs* (7).

_Resultados

Entre maio de 2022 e fevereiro de 2025, foram identificados três surtos de mpox em Portugal. O primeiro surto, que ocorreu entre maio de 2022 e março de 2023, concentrou a maioria dos casos confirmados, com 953 casos, correspondendo a 79,3% do total. O segundo surto, ocorreu entre junho de 2023 e março de 2024 e contabilizou 229 casos (19,0%), evidenciando

uma redução face ao surto anterior. O terceiro, iniciado em junho de 2024, registou 20 casos (1,7%), até 28 de fevereiro de 2025, perfazendo um total de 1202 casos confirmados no INSA (gráfico 1, painel A).

No primeiro surto verificou-se um elevado volume de amostras processadas e uma taxa de positividade dos casos (47,0%), com o pico da frequência registada em junho de 2022. O segundo surto teve uma menor intensidade, com uma redução tanto no número de amostras processadas como no número de casos positivos (taxa de positividade = 38,0%), e apresentou uma distribuição temporal mais prolongada, em comparação com o primeiro. O terceiro surto, foi caracterizado por uma taxa de positividade bastante inferior (9%). Estes dados podem indiciar uma baixa circulação do vírus e sugerir uma fase de declínio epidemiológico e maior controlo da infeção (gráfico 1, painel B).

Globalmente, a maioria dos casos são do sexo masculino (n=1188; 98,8%), no grupo etário entre os 20-29 (n=375; 31,2%) e 30 e 39 anos (n=512; 42,6%), com idades variando entre 17 e 66 anos (mediana de 33 anos), e são principalmente homens que têm sexo com homens (HSH). Apenas 14 casos (1,2%) pertencentes ao sexo feminino foram declarados (tabela 1). Não foram notificados casos em crianças entre 0-9 anos de idade e registaram-se nove casos acima dos 60 anos (0,7%) (tabela 1).

Os casos positivos foram detetados em todas as regiões de Portugal, mas foi na região de Lisboa e Vale do Tejo (n=908; 75,5%) que se registou o maior número, seguida das regiões Norte (n=234; 19,5%) e Centro (n=29; 2,4%) (tabela 1).

artigos breves_ n. 1

Gráfico 1: Distribuição temporal do número de amostras biológicas analisadas e casos confirmados no INSA, entre 17 de maio de 2022 e 28 de fevereiro de 2025 (painel A); Distribuição do número de casos analisados, casos positivos e taxa de positividade, durante os três surtos de mpox em Portugal, entre 17 de maio de 2022 e 28 de fevereiro de 2025 (painel B).

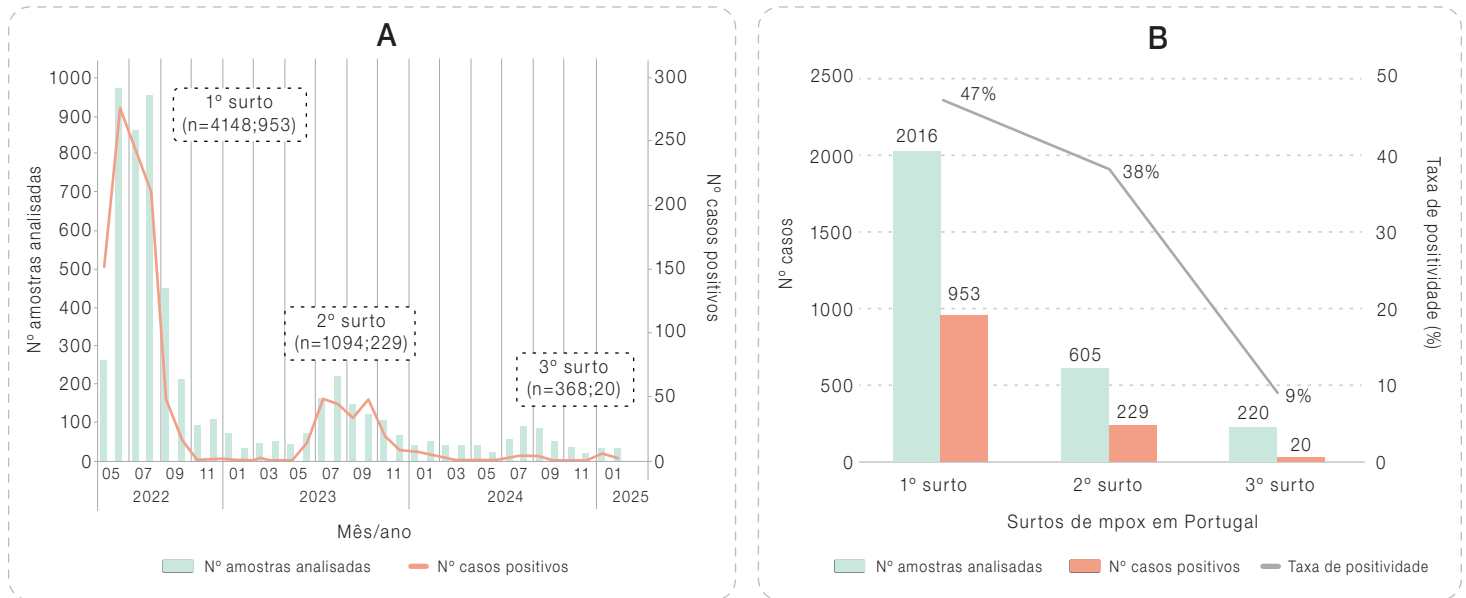


Tabela 1: Dados demográficos dos casos positivos dos três surtos de mpox ocorridos em Portugal, entre 17 de maio de 2022 e 28 de fevereiro de 2025.

Dados demográficos	Nº de casos positivos (%)			
	1º surto	2º surto	3º surto	Total
Sexo				
Masculino	944 (99,1)	225 (98,3)	19 (95,0)	1188 (98,8)
Feminino	9 (0,9)	4 (1,7)	1 (5,0)	14 (1,2)
Grupo etário				
0-9	0	0	0	0
10-19	5 (0,5)	0	0	5 (0,4)
20-29	278 (29,2)	90 (39,3)	7 (35,0)	375 (31,2)
30-39	420 (44,1)	84 (36,7)	8 (40,0)	512 (42,6)
40-49	187 (19,6)	43 (18,8)	4 (20,0)	234 (19,5)
50-59	55 (5,8)	11 (4,8)	1 (5,0)	67 (5,6)
60+	8 (0,8)	1 (0,4)	0	9 (0,7)
Região NUTS de testagem*				
Norte	158 (16,6)	69 (30,1)	7 (35,0)	234 (19,5)
Centro	27 (2,8)	2 (0,9)	0	29 (2,4)
Área Metropolitana de Lisboa	742 (77,9)	153 (66,8)	13 (65,0)	908 (75,5)
Alentejo	5 (0,5)	0	0	5 (0,4)
Algarve	17 (1,8)	0	0	17 (1,4)
Região Autónoma dos Açores	1 (0,1)	0	0	1 (0,1)
Região Autónoma Madeira	3 (0,3)	5 (2,2)	0	8 (0,7)
Total	953	229	20	1202

* A Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos (NUTS) é desenvolvida pela Eurostat e é utilizada tanto em Portugal como em toda a União Europeia para fins estatísticos. A divisão NUTS abrange as regiões NUTS I, NUTS II e NUTS III, sendo que a subcategorização complementar das Unidades Administrativas Locais é usada para diferenciar áreas locais de importância transnacional. Foi utilizada a categorização NUTS II das regiões de Portugal.

artigos breves_ n. 1

Na análise pormenorizada de cada surto, os dados revelam uma predominância do sexo masculino e dos grupos etários entre os 20-29 e 30-39 anos, com uma baixa representação de menores de 20 anos e adultos com mais de 60 anos.

A Área Metropolitana de Lisboa concentrou 77,9% (n=742) dos casos durante o primeiro surto, mantendo-se como a região mais afetada no segundo (n=153; 66,8%) e terceiro surtos (n=13; 65,0%). Em contrapartida, a região Norte registou um aumento expressivo na proporção de casos, passando de 16,6% (n=158) no primeiro surto para 30,1% (n=69) no segundo e 35,0% (n=7) no terceiro. Ao contrário dos surtos anteriores, que tiveram início na Área Metropolitana de Lisboa, o terceiro surto teve início na região Norte. As regiões do Centro, Alentejo, Algarve e as Regiões Autónomas mantiveram-se com menor frequência e pouca variação ao longo dos três surtos.

MPXV foi detetado em 2075 amostras de 1202 doentes. Para avaliar a precisão diagnóstica dos diferentes tipos de amostras na deteção de MPXV, foram analisadas todas as amostras (i.e. positivas, negativas e indeterminadas, n=2434) dos 1202 doentes com diagnóstico de mpox confirmado.

Assim, verificou-se que a taxa de positividade foi mais elevada no exsudado de lesão (n=1250/1315; 95,1%) e no exsudado

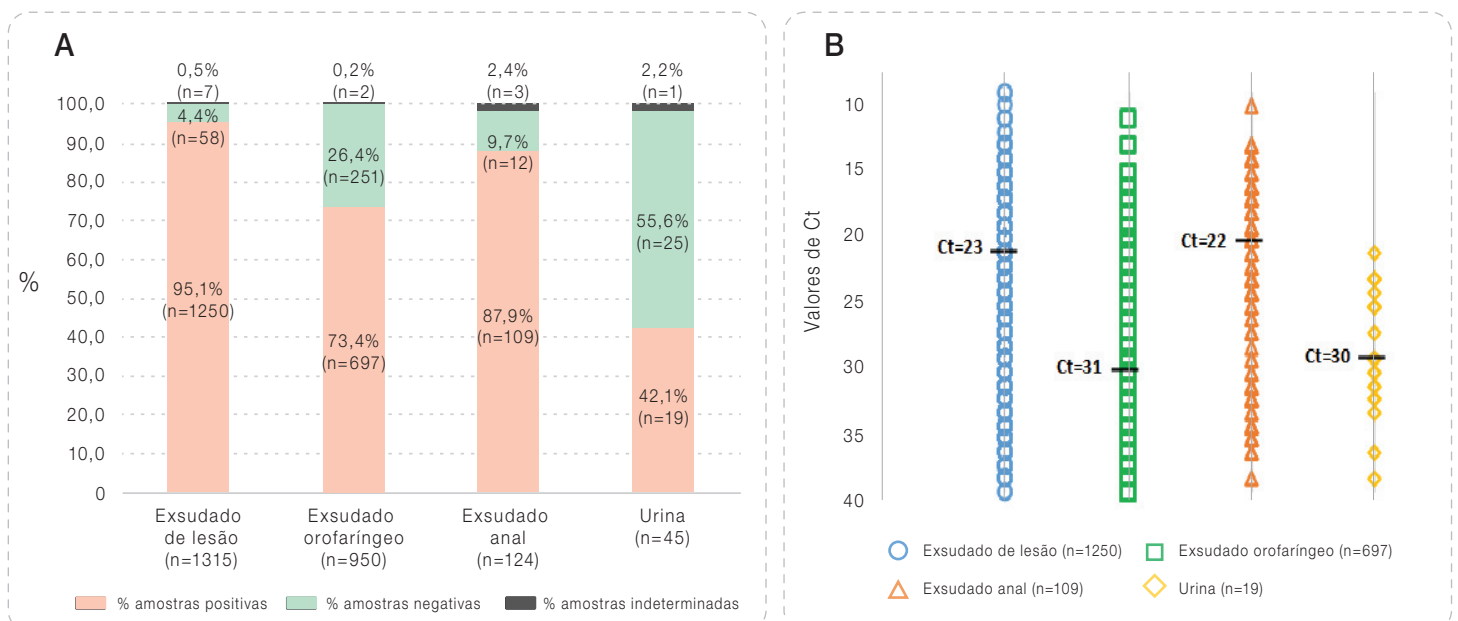
anal (n=109/124; 87,9%), quando comparada com o exsudado orofaríngeo (n=697/950; 73,4%) e urina (n=19/45; 42,2%) (gráfico 2, painel A). Verificou-se ainda uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) na taxa de positividade entre os diferentes tipos de amostra, com exceção da comparação entre exsudado de lesão e anal.

Em cerca de 5% dos casos do primeiro surto, o diagnóstico foi realizado no exsudado orofaríngeo (n=38/953; 3,9%), exsudado anal (n=5/953; 0,5%) ou em ambos os tipos de amostra (n=6/953; 0,6%) em doentes com exsudado de lesão negativo. Todas estas amostras foram colhidas no mesmo dia da amostra de lesão correspondente. Estes indivíduos foram testados por serem contactos de casos positivos para MPXV ou por apresentarem comportamentos de risco (8).

Relativamente às amostras de exsudados de lesão e anal, apresentaram valores medianos de Ct mais baixos, de Ct=23 e Ct=22, respetivamente, sugerindo cargas virais mais elevadas em comparação com os exsudados orofaríngeos (Ct=31) e urinas (Ct=30) (gráfico 2, painel B).

Estes dados reforçam o papel do exsudado de lesão e exsudado anal como amostras biológicas preferenciais para o diagnóstico laboratorial de mpox, pois evidenciam cargas virais elevadas e alta sensibilidade na deteção de MPXV.

Gráfico 2: Taxa de positividade nos diferentes tipos de amostras dos 1202 casos positivos (painel A); carga viral de MPXV nas amostras positivas (painel B), expressa em valores de Ct.





Discussão e conclusão

O primeiro caso confirmado do surto de mpox em 2022 foi notificado no Reino Unido a 6 de maio de 2022, num doente com história recente de viagem à Nigéria. Em 17 de maio de 2022, Portugal foi o segundo país a confirmar casos de mpox (9,10). Estudos posteriores revelaram que o vírus circulou silenciosamente em território nacional antes da notificação oficial, o que pode justificar o aumento abrupto dos casos iniciais (8). Um modelo matemático sugere que o vírus terá circulado 50 dias antes de ser detetado (11).

Neste estudo foram analisadas 5610 amostras de 2802 casos prováveis, tendo sido confirmada a infeção por MPXV em 1202 doentes. A caracterização genómica confirmou a presença do subclade IIb (sublinhagens B.1) ao longo dos três surtos em Portugal, sem registo de casos do clade I ou subclade Ib (12,13).

O primeiro surto destacou-se pela elevada intensidade de transmissão e rápida disseminação comunitária, exigindo uma resposta laboratorial rápida. Os surtos seguintes apresentaram um menor impacto, transmissão mais lenta e localizada o que poderá estar associado a fatores como imunidade adquirida, alterações comportamentais e estratégias de saúde pública direcionadas. O terceiro surto, iniciado na região Norte, evidenciou um declínio na circulação viral, compatível com um cenário de maior controlo epidémico.

A análise demográfica confirmou uma elevada concentração de casos HSH, jovens adultos (20-39 anos de idade), e residentes na Área Metropolitana de Lisboa, reforçando a necessidade de intervenções específicas adaptadas a esta população-alvo.

Os dados laboratoriais demonstram que o exsudado de lesão e o exsudado anal foram os tipos de amostra mais adequados para a deteção de MPXV, com taxas de positividade e cargas virais elevadas. No entanto, o exsudado orofaríngeo revelou-se uma alternativa válida, especialmente em casos sem lesões visíveis, tendo permitido o diagnóstico em cerca de 5% dos casos no primeiro surto (8). A presença de MPXV na orofaringe tem sido consistentemente documentada, sugerindo o seu potencial como via de transmissão, especialmente por contato oral direto (8,14,15).

Apesar de apresentarem menor sensibilidade, as amostras de urina demonstraram alguma utilidade no diagnóstico laboratorial (positividade de 42,2%), podendo ser consideradas como amostras complementares, especialmente em casos com manifestações clínicas atípicas.

Estes dados reforçam a importância da colheita de amostras de múltiplos locais anatómicos, sempre que possível, para aumentar a sensibilidade do diagnóstico laboratorial.

A vigilância laboratorial entre 2022 e 2025 permitiu identificar três surtos com perfis de transmissão progressivamente menos intensos. Esta evolução reflete não apenas a dinâmica natural da infeção, mas também o efeito positivo das intervenções de saúde pública, incluindo a vacinação, estratégias de rastreio e alterações comportamentais.

Modelos matemáticos indicam que a transmissão foi fortemente influenciada por comportamentos sexuais de risco, com um impacto estimado até 120X superior em subgrupos com elevada atividade sexual. Neste contexto, a vacinação demonstrou uma elevada eficiência, com indivíduos vacinados contribuindo cerca de 8X menos para a transmissibilidade e apresentando sintomas menos graves. Estes dados sugerem que a vacinação teve um papel relevante na contenção da segunda vaga (13).

Entre junho de 2022 e fevereiro de 2025, foram administradas 21 063 doses de vacina em Portugal, com 93,5% em regime de pré-exposição, abrangendo 11 771 indivíduos (16).

Apesar da redução no número de casos, a persistência do vírus na mesma população-alvo reforça a necessidade de estratégias de vigilância e prevenção sustentadas, adaptadas ao risco e integradas em sistemas de alerta e resposta rápida. A infeção mpox permanece uma infeção emergente com potencial de reemergência, pelo que países não endémicos devem manter as capacidades laboratoriais e uma vigilância ativa para atempadamente responderem a novos surtos.

Agradecimentos:

A todos os profissionais de saúde pelo apoio prestado no diagnóstico laboratorial dos casos de mpox.

Às colegas Sílvia Lopo, Raquel Neves, Maria Raquel Rocha, Paula Palminha e Maria José Borrego do DDI/INSA, pelo contributo no diagnóstico laboratório durante o primeiro surto de mpox.



Referências bibliográficas:

- (1) Antunes F, Cordeiro R, Virgolino A. Monkeypox: From A Neglected Tropical Disease to a Public Health Threat. *Infect Dis Rep*. 2022 Sep 30;14(5):772-83. <https://doi.org/10.3390/idr14050079>
- (2) Mitjà O, Gogoina D, Titanji BK, et al. Monkeypox. *Lancet*. 2023 Jan 7;401(10370):60-74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02075-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02075-X). Epub 2022 Nov 17. Erratum in: *Lancet*. 2022 Dec 3;400(10367):1926. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02414-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02414-X)
- (3) World Health Organization. Global Mpox Trends, April 4, 2025 [online] [consult. 7/4/2025]. Disponível em: https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/
- (4) World Health Organization. Multi-country outbreak of mpox, External situation report #49 - 28 March 2025 [online]. <https://www.who.int/publications/m/item/-multi-country-outbreak-of-mpox--external-situation-report--49---28-march-2025>
- (5) World Health Organization. Diagnostic testing and testing strategies for mpox: Interim guidance, 12 November 2024. Geneva: WHO, 2024. <https://doi.org/10.2471/B09166>
- (6) Shchelkunov SN, Shcherbakov DN, Maksyutov RA, et al. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J Virol Methods*. 2011 Aug;175(2):163-9. Epub 2011 May 27. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.002>
- (7) GraphPad. QuickCalcs: Analyze a 2x2 contingency table [online] [consult. 7/4/2025]. Disponível em: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>
- (8) Cordeiro R, Pelerito A, de Carvalho IL, et al. An Overview of Monkeypox Virus Detection in Different Clinical Samples and Analysis of Temporal Viral Load Dynamics. *J Med Virol*. 2024 Dec;96(12):e70104. <https://doi.org/10.1002/jmv.70104>
- (9) European Centre for Disease Prevention and Control. Monkeypox cases reported in UK and Portugal (19 May 2022) [online] [consult. 7/4/2025]. <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/monkeypox-cases-reported-uk-and-portugal>
- (10) Perez Duque M, Ribeiro S, Martins JV, et al. Ongoing monkeypox virus outbreak, Portugal, 29 April to 23 May 2022. *Euro Surveill*. 2022 Jun;27(22):2200424. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.22.2200424>
- (11) Cordeiro R, Pelerito A, de Carvalho IL, et al. Undetected circulation of monkeypox virus in Portugal estimated via mathematical modelling: Evidence for a 50-day gap before first detection. (Artigo submetido a publicação).
- (12) Borges V, Duque MP, Martins JV, et al. Viral genetic clustering and transmission dynamics of the 2022 mpox outbreak in Portugal. *Nat Med*. 2023 Oct;29(10):2509-17. Epub 2023 Sep 11. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02542-x>
- (13) Cordeiro R, Caetano CP, Sobral D, et al. Viral genetics and transmission dynamics in the second wave of mpox outbreak in Portugal and forecasting public health scenarios. *Emerg Microbes Infect*. 2024 Dec;13(1):2412635. Epub 2024 Oct 11. <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2412635>
- (14) León-Figueroa DA, Barboza JJ, Saldaña-Cumpa HM, et al. Detection of Monkeypox Virus according to The Collection Site of Samples from Confirmed Cases: A Systematic Review. *Trop Med Infect Dis*. 2022 Dec 22;8(1):4. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8010004>
- (15) Heskin J, Belfield A, Milne C, et al. Transmission of monkeypox virus through sexual contact - A novel route of infection. *J Infect*. 2022 Sep;85(3):334-363. Epub 2022 Jun 1. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.05.028>
- (16) Direção Geral da Saúde, Centro de Emergências em Saúde Pública. Mpox em Portugal e no Mundo - Informação a 28 de fevereiro de 2025. Lisboa, DGS, 2025. <https://www.dgs.pt/ficheiros-de-upload-2013/mpox-fev-2025-pdf.aspx>

Testes rápidos de antígeno e efetividade da vacina contra a COVID-19 nos cuidados de saúde primários, em Portugal: explorando o potencial de viés

Rapid antigen testing and COVID-19 vaccine effectiveness in primary health care in Portugal: exploring the potential for bias

Verónica Gómez¹, Charlotte Laniece Delaunay³, Esther Kissling³, Nuno Verdasca², Licinia Gomes², Raquel Guiomar², Ausenda Machado¹, Ana Paula Rodrigues¹

veronica.gomez@insa.min-saude.pt

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

(2) Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(3) Epiconcept, Paris, France

_Resumo

A disponibilização dos testes rápidos de antígeno (TRAg) permitiu que o diagnóstico de infeção por SARS-CoV-2 possa ser feito antes ou durante uma consulta médica. Este conhecimento pode condicionar a procura de cuidados e por outro lado, o Médico de Família (MF) pode ter informação sobre o estado de infeção antes do recrutamento do doente para os estudos de efetividade vacinal. Estudos com desenho de caso-controlo teste-negativo (TND), tradicionalmente usados para estimar a efetividade da vacina contra a COVID-19, podem assim incorrer em viés se a realização dos TRAg e a consulta com o MGF variarem consoante o estado vacinal e o resultado do autoteste. Este estudo descreve os padrões de autoteste em cuidados de saúde primários e as diferenças entre indivíduos que realizaram autoteste e não, nos cuidados de saúde primários em Portugal, avaliando o potencial de viés nos estudos de efetividade vacinal contra a COVID-19.

Foram incluídos indivíduos com 60 ou mais anos com Infeção Respiratória Aguda (IRA) que consultaram um MGF entre setembro de 2022 e maio de 2023. Foram recolhidos dados demográficos, de vacinação, testagem, sinais e sintomas e comorbilidades.

Dos 166 indivíduos incluídos (21 casos, 145 controlos), 67 (40%) realizaram TRAg. Estes foram mais frequentemente mulheres (72% vs. 67%) e mais jovens (94% entre 60-79 anos vs. 87%). Os indivíduos que realizaram autotestes tiveram uma taxa de positividade para SARS-CoV-2 de apenas 10%, comparado com 14% entre aqueles que não realizaram autoteste. Além disso, apresentavam menor prevalência de doenças crónicas (64% vs. 79%) e foram menos vacinados na campanha vacinal sazonal (39% vs. 53%).

Os resultados sugerem uma possível associação negativa entre vacinação e TRAg. A elevada proporção de indivíduos que realizaram TRAg (40%) pode gerar viés no estudo de efetividade de vacinas, reforçando a necessidade de estudos com maior dimensão e estimativas de efetividade vacinal estratificadas de acordo com esta variável.

_Abstract

Rapid antigen self-tests allow SARS-CoV-2 diagnosis without consulting a General Practitioner (GP). A test-negative design (TND) study estimating COVID-19 vaccine effectiveness may be biased if self-testing and GP consultation differ by vaccination status and self-test results. This study

describes self-testing patterns and differences between self-testers and non-self-testers in primary care in Portugal to assess potential bias.

Using TND data (September 2022-May 2023), we included patients aged 60+ with Acute Respiratory Infection (ARI) consulting a GP. GPs collected data on demographics, vaccination, self-test use, and clinical status. Cases were RT-PCR positive for SARS-CoV-2; controls were negative.

Of the 166 patients included (21 cases, 145 controls), 67 (40%) performed a self-test. These individuals were more likely to be female (72% vs. 67%) and younger (94% aged 60-79 vs. 87%). Those who self-tested had a lower SARS-CoV-2 positivity rate (10% vs. 14%), a lower prevalence of chronic conditions (64% vs. 79%), and were less frequently vaccinated in the seasonal vaccination campaign (39% vs. 53%).

Results suggest a potential negative association between vaccination and self-testing. Given the high self-testing rate (40%), bias may be significant. The small sample size limited further analysis, highlighting the need for larger studies with vaccine effectiveness estimates stratified by self-testing.

_Introdução

O desenho de caso-controlo teste negativo (TND), é recomendado na avaliação da efetividade de vacinas (EV) contra a gripe e COVID-19, sendo amplamente utilizado (1,2). Em Portugal, os estudos de EV contra a gripe têm também sido baseados no TND desde 2008 e a partir de 2021, o TND foi adaptado para estimar a EV contra a COVID-19 em diferentes contextos (3,4). No TND, os indivíduos que procuram cuidados de saúde por infeção respiratória aguda são testados laboratorialmente para um vírus respiratório de interesse (por exemplo, vírus da gripe ou SARS-CoV-2) (5). Os casos são definidos como os indivíduos com teste positivo para esse agente, enquanto os indivíduos com teste negativo são classificados como controlos. A EV é estimada comparando a proporção de vacinados

entre casos e controlos, utilizando modelos de regressão logística e com ajustamento para possíveis fatores de confundimento (5). O TND tem a vantagem de minimizar viés devido ao comportamento de procura de cuidados de saúde, uma vez que os indivíduos desconhecem o agente causador de infeção, desde que uma premissa essencial seja cumprida: os controlos devem ser representativos da população de origem dos casos em termos de vacinação (6).

A implementação clássica do TND no âmbito dos cuidados de saúde primários, resulta no desconhecimento, tanto dos indivíduos como dos médicos de família, do diagnóstico laboratorial no momento de recrutamento para estudo. Porém com a introdução dos testes rápidos de antigénio (TRAg), os indivíduos podem obter um diagnóstico de infeção por SARS-CoV-2 antes de consultar um profissional de saúde, o que pode alterar a procura de cuidados médicos e pode também influenciar o médico no recrutamento do indivíduo para o estudo de EV.

O comportamento de testagem pode variar ao longo do tempo, com as diretrizes e recomendações de saúde pública e de acordo com características individuais, como a idade ou presença de comorbilidades. Há pouca informação sobre a proporção de pessoas com sintomas de infeção respiratória aguda que utilizam autotestes, embora se estime que entre 12-21% da população geral em França tenha utilizado autotestes entre janeiro e maio de 2022 (7). Em Portugal, estes testes estão disponíveis em farmácias, supermercados ou para compra online desde 2021. O resultado do autoteste depende da sensibilidade e especificidade do kit utilizado e do procedimento de colheita da amostra (8).

Com a ampla disponibilização de TRAg, poderão ocorrer vieses de seleção nos estudos de efetividade da vacina com base no TND, tendo em conta que, por exemplo, pessoas vacinadas podem ser mais propensas a utilizar TRAg. Também, o resultado do TrAg (positivo ou negativo) pode influenciar a decisão de consultar o médico de família.

É, portanto, necessário compreender em que medida o uso de TRAg para SARS-CoV-2 influencia as estimativas de EV contra a COVID-19 em estudos TND ao nível dos cuidados de saúde primários.

_Objetivos

Descrever os padrões de uso de TRAg nos doentes recrutados para o estudo de efetividade da vacina contra COVID-19, nos cuidados de saúde primários em Portugal entre setembro de 2022 e maio de 2023, e analisar as diferenças entre indivíduos que realizaram ou não autoteste, avaliando o potencial de viés no cálculo da efetividade de vacinas.

_Material e métodos

No âmbito do estudo *Vaccine Effectiveness, Burden and Impact Studies* (VEBIS nos cuidados de saúde primários (4) foram identificados indivíduos com sintomas compatíveis de IRA (9), e recolhida amostras do exsudado nasofaríngeo. As amostras foram enviadas para o Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe (LNRVG) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Para cada participante foi preenchido um questionário epidemiológico contendo informações sociodemográficas e clínicas, incluindo a realização de TRAg antes da consulta.

Para o presente estudo, foram incluídos indivíduos com 60 ou mais anos que consultaram um médico de família com uma IRA e que pertenciam ao grupo-alvo da campanha de vacinação contra a COVID-19 no outono/inverno de 2022/2023 (10).

Foi realizada uma análise descritiva, comparando os indivíduos que realizaram um TRAg durante o atual episódio de doença que motivou a consulta com um médico de família e aqueles que não realizaram TRAg para esse episódio, segundo sexo, idade, data de início dos sintomas e data da colheita da amostra, resultado do teste RT-PCR para SARS-CoV-2, estado vacinal para a COVID-19 e para gripe, presença de doenças crónicas, positividade para outros agentes respiratórios e infeção prévia por SARS-CoV-2.

De entre os indivíduos que realizaram um TRAg para o episódio de doença, comparou-se o resultado do teste RT-PCR, na colheita realizada pelo médico de família, com o resultado do autoteste.

Foi ainda estimada a sensibilidade e especificidade dos TRAg em comparação com os testes RT-PCR realizados pelos médicos.


_Resultados

Dos 197 indivíduos inicialmente recrutados, pertencentes ao grupo etário-alvo para a vacinação (60 anos ou mais), foram excluídos 13 indivíduos vacinados nos 14 dias anteriores ao início dos sintomas, 1 residente em ERPI (Estrutura Residencial para Pessoas Idosas), 7 indivíduos testados após 10 dias do início dos sintomas e 2 devido a resultados de RT-PCR para SARS-CoV-2 em falta ou inconclusivos. Além disso, foram excluídos 8 indivíduos com data da última toma de vacina desconhecida ou não plausível.

No total, foram incluídos na análise 21 casos de COVID-19 e 145 controlos com RT-PCR negativo para SARS-CoV-2.

A informação sobre TRAg estava disponível para todos os indivíduos com IRA incluídos nesta análise. Dos 166 indivíduos incluídos, 99 (60%) não realizaram TRAg e 67 (40%) realizaram. A maior proporção de TRAg realizados ocorreu em outubro de 2022 (30%), enquanto a maior proporção de indivíduos que não realizaram TRAg foi registada em novembro de 2022 (26%) ([tabela 1](#)).

A sensibilidade estimada dos TRAg, cujo resultado foi auto referido pelos indivíduos que consultaram o médico de família, em comparação com os testes RT-PCR realizados na colheita efetuada pelo médico é de 57%, e a especificidade estimada é de 100% ([tabela 2](#)).

Tabela 2:  Comparação dos resultados do RT-PCR para SARS-CoV-2 e do autoteste entre os indivíduos que realizaram um autoteste para o episódio de doença pelo qual consultaram um médico de família, VEBIS Lot 5, Portugal, setembro 2022 - maio 2023.

Resultado do TRAg	Resultado PCR		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	4	0	4
Negativo	3	55	58
Desconhecido	0	5	5
Total	7	60	67

_Discussão

Os indivíduos que realizaram TRAg apresentaram menor probabilidade de estarem vacinados na campanha de vacinação contra a COVID-19 no outono/inverno de 2022/2023 (39% vs. 53%). Esta diferença pode dever-se à presença de doenças crónicas, uma vez que os que realizaram TRAg eram mais jovens: 94% tinham entre 60-79 anos, comparativamente a 87% dos que não realizaram autoteste – e a proporção de doenças crónicas era menor entre os que realizaram TRAg (64% vs. 79%, respetivamente). Os adultos mais velhos e aqueles com doenças crónicas apresentam uma maior cobertura vacinal em comparação com os adultos mais jovens e sem doenças crónicas.

Também foi menor a proporção de indivíduos que realizaram TRAg e que receberam a vacina contra a gripe na época 2022/2023 (35% vs. 53%, respetivamente). A toma da vacina em geral pode estar associada à realização de TRAg, embora, como a vacinação contra a gripe e contra a COVID-19 estejam correlacionadas, seja difícil dissociar essa relação.

Uma maior proporção de indivíduos que realizaram TRAg procurou atendimento médico 4-10 dias após o início dos sintomas (41% vs. 29%). Uma proporção semelhante de indivíduos que realizaram autoteste cumpria a definição de caso de síndrome gripal da EU (69% vs. 66%, respetivamente).

Os indivíduos que realizaram TRAg apresentaram uma taxa de positividade para SARS-CoV-2 por PCR ligeiramente inferior (10% vs. 14%). No entanto, considerando o resultado do autoteste como critério de positividade, a taxa foi menos de metade (6% vs. 14%). Isto pode indicar que as pessoas com um autoteste positivo são menos propensas a procurar um médico, ou pode refletir uma baixa sensibilidade do autoteste.

artigos breves_ n. 2

Tabela 1: Características dos indivíduos que realizaram um TRAg para o episódio de doença pelo qual consultaram um médico de família e daqueles que não realizaram TRAg, VEBIS, Portugal, setembro 2022 - maio 2023.

	Com TRAg (n=67)	Sem TRAg (n=99)
Número de participantes (%)	67 (40%)	99 (60%)
Teste PCR SARS-CoV-2		
Positivo	7/67 (10%)	14/99 (14%)
Negativo	60/67 (90%)	85/99 (86%)
Vacinação contra a COVID-19 (época 2022/2023)		
Sim	26/67 (39%)	52/99 (53%)
Não	41/67 (61%)	47/99 (47%)
Mediana do número de dias desde a última vacinação (IQR)	88 (38-120)	68 (45-90)
Cumprimento da definição de caso Síndrome Gripal ¹	46/67 (69%)	65/99 (66%)
Resultado do TRAg ²		
Positivo	4/62 (6%)	NA
Negativo	58/62 (94%)	NA
Idade [mediana (IQR)]	65 (62-73)	67 (64-75)
Grupo etário		
60-79 anos	63/67 (94%)	86/99 (87%)
≥80 anos	4/67 (6%)	13/99 (13%)
Sexo		
Feminino	48/67 (72%)	66/99 (67%)
Mês de início dos sintomas		
Setembro	1/67 (1%)	0/99 (0%)
Outubro	20/67 (30%)	11/99 (11%)
Novembro	15/67 (22%)	26/99 (26%)
Dezembro	11/67 (16%)	24/99 (24%)
Janeiro	7/67 (10%)	24/99 (24%)
Fevereiro	3/67 (4%)	9/99 (9%)
Março	3/67 (4%)	4/99 (4%)
Abril	6/67 (9%)	1/99 (1%)
Maió	1/67 (1%)	0/99 (0%)
Junho	0/67 (0%)	0/99 (0%)
Julho	0/67 (0%)	0/99 (0%)
Agosto	0/67 (0%)	0/99 (0%)
Presença de doença crónica	43/67 (64%)	78/99 (79%)
Diabetes	14/67 (21%)	25/99 (25%)
Imunossupressão	0/67 (0%)	0/99 (0%)
Doença cardiovascular	41/67 (61%)	66/99 (67%)
Doença pulmonar	6/67 (9%)	12/99 (12%)
Vacinação contra a gripe (época 2022/2023)	23/66 (35%)	51/97 (53%)
Positivo para outros vírus respiratórios (influenza, RSV, rinovírus, etc.)	14/67 (21%)	18/99 (18%)
Dias entre o início dos sintomas e a colheita		
0	0/67 (0%)	0/99 (0%)
1	6/67 (9%)	20/99 (20%)
2	16/67 (24%)	19/99 (19%)
3	17/67 (25%)	31/99 (31%)
4-7	25/67 (37%)	27/99 (27%)
8-10	3/67 (4%)	2/99 (2%)

¹ Início súbito + 1 sintoma sistémico + 1 sintoma respiratório; NA - Não se aplica.

² Os resultados dos autotestes são apresentados para os indivíduos que realizaram um autoteste para o episódio de doença que motivou a consulta.

_Conclusões

Desta análise exploratória do uso de TRAg prévio à consulta com o médico família, no âmbito do estudo VEBIS em cuidados de saúde primários, em Portugal, destaca-se a elevada proporção de TRAg realizada pela população do estudo VEBIS em Portugal na época 2022/2023. A possível associação negativa entre a vacinação contra a COVID-19 e a realização de TRAg, bem como entre um autoteste positivo e a não procura de cuidados médicos, indica a necessidade de investigação adicional.

Portugal continua a recolher informações sobre TRAg no âmbito do estudo VEBIS, e a repetição desta análise com dados das épocas 2023/2024 e 2024/2025, com um tamanho amostral maior, será fundamental para compreender melhor as associações e os potenciais vieses relacionados com os TRAg no estudo. Além disso, poderá ser realizada uma análise abrangendo todo o grupo-alvo da vacinação, incluindo indivíduos com idade inferior a 60 anos com doenças crónicas.

Paralelamente, a reativação do Gripenet, - componente portuguesa do Influenzanet ⁽¹¹⁾, poderá permitir aprofundar a compreensão dos potenciais vieses relacionados com a realização de TRAg na população portuguesa e sua influência na procura de cuidados de saúde.

Referências bibliográficas:

- (1) Chua H, Feng S, Lewnard JA, et al. The Use of Test-negative Controls to Monitor Vaccine Effectiveness: A Systematic Review of Methodology. *Epidemiology*. 2020 Jan;31(1):43-64. <https://www.doi.org/10.1097/EDE.0000000000001116>
- (2) Meester R, Bonte J. The test-negative design: Opportunities, limitations and biases. *J Eval Clin Pract*. 2024 Feb;30(1):68-72. Epub 2023 Jun 19. <https://doi.org/10.1111/jep.13888>
- (3) European Centre for Disease Prevention and Control. Core protocol for ECDC studies of vaccine effectiveness against hospitalisation with Severe Acute Respiratory Infection laboratory-confirmed with SARS-CoV-2 or seasonal influenza -Version 4.0. Stockholm: ECDC, 2024. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/core-protocol-VEBIS-SARI.pdf>
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. Core protocol for ECDC studies of vaccine effectiveness against symptomatic laboratory-confirmed influenza or SARS-CoV-2 infection at primary care level-Version 1.0. Stockholm: ECDC, 2023. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Core-protocol-ECDC-COVID-19-vaccine-studies-october2023.pdf>
- (5) Sullivan SG, Tchetgen Tchetgen EJ, Cowling BJ. Theoretical Basis of the Test-Negative Study Design for Assessment of Influenza Vaccine Effectiveness. *Am J Epidemiol*. 2016 Sep 1;184(5):345-53. <https://www.doi.org/10.1093/aje/kww064>
- (6) Halloran ME, Longini, IM, Struchiner, CJ. Design and analysis of vaccine studies. New York: Springer, 2010. (Statistics for Biology and Health-SBH).
- (7) Supplisson O, Charmet T, Galmiche S, et al. SARS-CoV-2 self-test uptake and factors associated with self-testing during Omicron BA.1 and BA.2 waves in France, January to May 2022. *Euro Surveill*. 2023 May;28(18):2200781. <https://www.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.18.2200781>
- (8) Schuit E, Venekamp RP, Hoof L, et al. Diagnostic accuracy of covid-19 rapid antigen tests with unsupervised self-sampling in people with symptoms in the omicron period: cross sectional study. *BMJ*. 2022 Sep 14;378:e071215. <https://www.doi.org/10.1136/bmj-2022-071215> . Erratum in: *BMJ*. 2022 Sep 16;378:o2241. <https://www.doi.org/10.1136/bmj.o2241>
- (9) European Centre for Disease Prevention and Control. Protocol for case-control studies to measure influenza vaccine effectiveness in the European Union and European Economic Area Member States. Stockholm: ECDC, 2009, pp. 1-33. http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0907_TED_Influenza_AH1N1_Measuring_Influenza_Vaccine_Effectiveness_Protocol_Case_Control_Studies.pdf
- (10) Direção-Geral de Saúde. Norma nº 008/2022 de 02/09/2022 (atualizada 29/11/2022) - Campanha de Vacinação Sazonal contra a COVID-19: Outono-Inverno 2022-2023. Lisboa: DGS, 2022. (atualizada a 29/11/2022). <https://www.dgs.pt/em-destaque/extensao-da-vacinacao-de-reforco-sazonal-covid-19-as-pessoas-entre-os-5-e-os-11-anos-com-patologias-de-risco-pdf.aspx>
- (11) Paolotti D, Carnahan A, Colizza V, et al. Web-based participatory surveillance of infectious diseases: the Influenzanet participatory surveillance experience. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Jan;20(1):17-21. <https://www.doi.org/10.1111/1469-0691.12477>

Implementação de um questionário epidemiológico a detentores de explorações caseiras de animais em Portugal

Implementation of an epidemiological survey targeting owners of backyard animal production systems in Portugal

Ana Esteves^{1,2}, Carlos Aniceto³, Bruno Baroni¹, Sónia Ramos^{2,4}, Rita Ferreira¹, João Paulo Gomes^{1,2,4}, Ausenda Machado³, Alexandra Nunes^{1,2,4}

alexandra.nunes@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Genómica e Bioinformática. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Centro de Ciência Animal e Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona - Centro Universitário de Lisboa, Lisboa, Portugal

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

(4) Investigação em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona - Centro Universitário de Lisboa, Lisboa, Portugal

Resumo

A detenção e a criação de animais em explorações caseiras podem representar um risco para a transmissão de agentes patogénicos zoonóticos e de genes de resistência a antibióticos, com impacto na saúde pública. Em Portugal, a ausência de registo de sistemas de produção caseira (SPC) dificulta a caracterização das práticas de gestão e criação de animais, assim como o perfil dos seus proprietários.

Este estudo-piloto pretende avaliar o método de amostragem dos detentores de SPC e desenvolver um questionário epidemiológico pioneiro para avaliar as condições de criação, biossegurança e riscos sanitários e ambientais em SPC.

Estruturado em cinco secções, o questionário foi disponibilizado em i) formato eletrónico e ii) em papel, tendo-se testado duas formas de divulgação: através de divulgação digital e por aplicação presencial por pontos de contacto (veterinários, inspetores sanitários e associações do setor). Até ao momento, observou-se um maior número de respostas na versão *online*, pela sua maior facilidade e abrangência de divulgação.

Apesar das limitações na distribuição dos questionários, a metodologia adotada permitirá caracterizar os SPC e os seus proprietários, contribuindo para a avaliação de possíveis riscos e o seu impacto na saúde pública. A continuidade da recolha de dados fortalecerá esta caracterização, apoiando estratégias de mitigação de riscos zoonóticos, segurança alimentar e promoção da saúde animal sob a abordagem *One Health*.

Abstract

Keeping and rearing animals on backyard farms can pose a risk for the transmission of zoonotic pathogens and antibiotic resistance genes, impacting public health. In Portugal, the lack of registration for backyard production systems (BPS) hinders the characterization of management and animal husbandry practices, as well as the profile of their owners.

This pilot study aims to evaluate the sampling method of BPS owners and develop a pioneering epidemiological questionnaire to assess breeding conditions, biosecurity, health and environmental risks in BPS.

Structured into five sections, the questionnaire was made available in i) electronic format and ii) on paper, having tested two dissemination strategies: digital distribution and face-to-face application by key contact points (veterinarians, health inspectors and sector associations). To date, the online version has received a higher number of responses due to its broader reach and ease of dissemination.

Despite limitations in questionnaire distribution, the adopted methodology will enable the characterization of BPS and their owners, contributing to the assessment of potential risks and their impact on public health. Continued data collection will strengthen this characterization, supporting strategies for mitigating zoonotic risks, ensuring food safety and promoting animal health under the *One Health* framework.

Introdução

Os sistemas de produção caseira (SPC) de animais constituem uma prática tradicional em Portugal, caracterizando-se pela criação de um número reduzido de espécies pecuárias, destinadas principalmente ao autoconsumo. No entanto, aves e leporídeos podem ser comercializados em mercados locais, conforme definido pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) (1-4). O contacto frequente entre animais e produtores (incluindo agregado familiar), a ausência de assistência veterinária e inspeção sanitária, a administração empírica de fármacos (5), o uso de dejetos animais como fertilizante agrícola e a interação com animais selvagens (6,7) são fatores críticos que aumentam o risco de disseminação de agentes patogénicos zoonóticos, incluindo bactérias multirresistentes, nestes agroecossistemas.

A ausência de regulamentação e de medidas eficazes de biossegurança nestas explorações domésticas favorece a disseminação de microrganismos patogénicos e o uso indiscriminado de antibióticos, alguns de importância crítica para a saúde humana. Estudos recentes sugerem que explorações de pequena escala podem atuar como reservatórios de genes de resistência a antibióticos, favorecendo a transferência horizontal desses genes entre microrganismos patogénicos e



artigos breves_ n. 3

o uso indiscriminado de antibióticos, alguns de importância crítica para a saúde humana. Estudos recentes sugerem que explorações de pequena escala podem atuar como reservatórios de genes de resistência a antibióticos, favorecendo a transferência horizontal desses genes entre microrganismos patogênicos e comensais (8-10). Sem programas nacionais de vigilância, a prevalência de agentes patogênicos zoonóticos nos SPC permanece desconhecida em Portugal, assim como o seu impacto na saúde animal, na segurança alimentar, no ambiente e na saúde pública, dificultando uma análise de risco adequada e a implementação de medidas de prevenção e controlo eficazes.

Dado o contacto constante entre produtores e respetivo agregado familiar (incluindo crianças), animais domésticos e vida selvagem, a avaliação dos SPC deve seguir uma abordagem *One Health* (11-13). Neste contexto, torna-se essencial caracterizar os fatores de risco, perceções e práticas dos proprietários relativamente a medidas de biossegurança, prevenção de doenças (incluindo abate obrigatório), uso de medicamentos veterinários, e gestão animal (incluindo o cumprimento de normas de bem-estar animal). Embora as explorações caseiras sejam uma prática cultural comum em Portugal, não existem dados oficiais sobre o seu número ou distribuição a nível nacional, já que o seu registo apesar de obrigatório, não é feito por rotina. Atualmente, os animais devem ser registados no Sistema Nacional de Informação e Registo Animal (2), mas o grau de cumprimento desse requisito e sua fiscalização são incertos. Consequentemente, as práticas de manejo, bem-estar animal e biossegurança nos SPC permanecem desconhecidas, sendo necessário compreender melhor a sua dinâmica para mitigar riscos sanitários e ambientais.

_Objetivo

O presente trabalho visa desenvolver e validar uma metodologia de amostragem, elaborar um questionário para futura implementação de um estudo epidemiológico piloto, pioneiro a nível nacional, dirigido a proprietários de explorações caseiras de animais. Este instrumento permitirá avaliar a saúde e o bem-estar dos animais criados em sistemas de produção caseira portugueses, bem como os potenciais riscos sanitários e ambientais associados a estes sistemas.

_Materiais e métodos

Com base em estudos internacionais (11,14-20), foi preparado um questionário estruturado e adaptado ao contexto nacional, de modo a recolher informação voluntária de proprietários de SPC de animais. O questionário é dirigido a qualquer pessoa singular (≥ 18 anos) ou coletiva que possua um número reduzido de animais de qualquer espécie pecuária (exceto espécies cinegéticas, como perdiz, coelho bravo e lebre) para lazer ou consumo familiar.

O questionário piloto é composto por 38 questões de seleção única, múltipla e respostas abertas, organizadas em seções que abordam características do inquirido, criação de animais e práticas associadas. Para avaliar a clareza e a validade do instrumento, será realizado um pré-teste com 12 inquiridos elegíveis, com diferentes níveis de escolaridade (amostragem mínima de conveniência para assegurar diversidade suficiente entre os participantes). Este pré-teste permitirá identificar potenciais problemas na conceção do questionário, dificuldades na compreensão das questões e verificar se o questionário mede eficazmente os aspetos pretendidos. A avaliação incluirá a análise da reação dos inquiridos às questões e respetivas respostas (conforme a tabela 1), uma entrevista subsequente e a recolha de outros indicadores relevantes, como o tempo necessário para completar o questionário e os procedimentos para a sua aplicação. Estas informações serão fundamentais para a revisão e otimização do questionário antes da sua implementação.

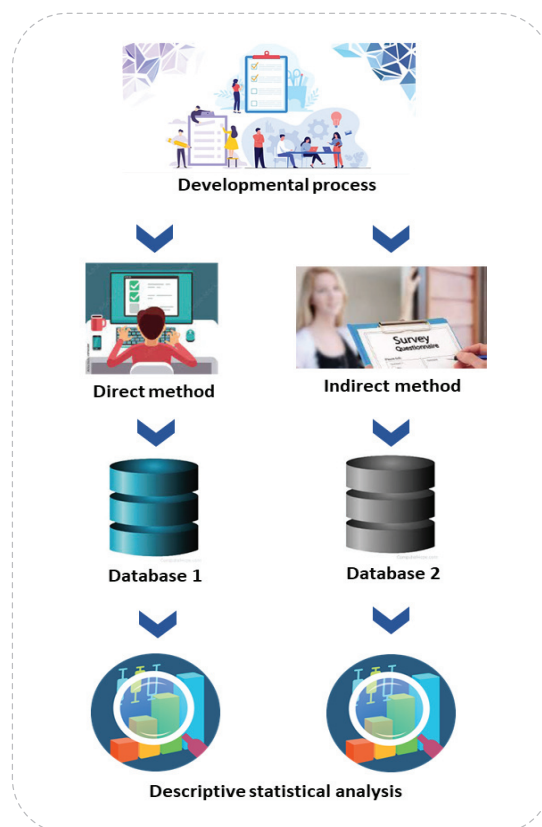
Após a validação da versão preliminar, serão efetuados os ajustes necessários para a obtenção da versão final do questionário, que será disponibilizada em formato eletrónico (através da plataforma RedCAP; versão portuguesa: <https://survey-insa.min-saude.pt/redcap/surveys/?s=9-DYRAT78XP>; versão inglesa: <https://survey-insa.min-saude.pt/redcap/surveys/index.php?s=L8C7W8WYFR>) ou em formato papel. Considerando as potenciais diferenças regionais nas práticas e perceções dos proprietários de SPC, o estudo visa uma cobertura nacional (incluindo ilhas), utilizando as regiões NUTS III como referência geográfica.

Tabela 1: Indicadores de pré-teste para avaliar a compreensão do inquirido sobre as questões do questionário.

Indicador	Comentário
1. Interrupção com resposta	Inquirido interrompe a leitura da questão com a resposta.
2. Explicação	Inquirido pede repetição ou explicação da questão, ou faz alguma afirmação indicando incerteza sobre o significado da questão.
3. Resposta adequada	Inquirido dá uma resposta que cumpre o objetivo da questão.
4. Resposta qualificada	Inquirido dá uma resposta que cumpre o objetivo da questão, mas indica incerteza sobre a precisão.
5. Resposta inadequada	Inquirido dá uma resposta que não cumpre o objetivo da questão.
6. Não sabe	Inquirido responde "Não sei" ou uma resposta equivalente.
7. Recusa responder	Inquirido se recusa a responder à questão.

Dado que o registo das SPC não é sistemático e a sua distribuição exata é desconhecida, a aplicação de uma amostragem probabilística não é viável. Assim, a recolha de dados ocorrerá por duas abordagens complementares (figura 1): 1) direta, na qual os proprietários anónimos terão acesso ao questionário eletrónico através de ações de divulgação (pontos focais, associações de produtores de animais, eventos especializados, redes sociais, *email*, etc.), preenchendo-o *online* de forma voluntária; e 2) indireta, em que o questionário será administrado presencialmente em SPC identificadas por pontos de contacto com conhecimento e atuação numa dada NUT III, que funcionarão como intermediários junto dos respetivos proprietários, assegurando a aplicação de, pelo menos, 10 questionários por NUT III, de modo a garantir uma representatividade mínima e homogénea a nível nacional (figura 2). Para tal, o presente estudo conta com a colaboração de uma vasta rede multidisciplinar de profissionais (médicos veterinários, inspetores sanitários, microbiologistas, bioinformáticos, epidemiologistas, outros profissionais da saúde humana e animal e estudantes de medicina veterinária), bem como com o apoio de organizações de bem-estar animal e associações ligadas à agricultura e à pecuária, garantindo assim a representatividade e robustez dos dados, para além de facilitar a implementação do estudo.

Figura 1: Workflow da estratégia de conceção do questionário, recolha de dados e análise estatística (21,22).



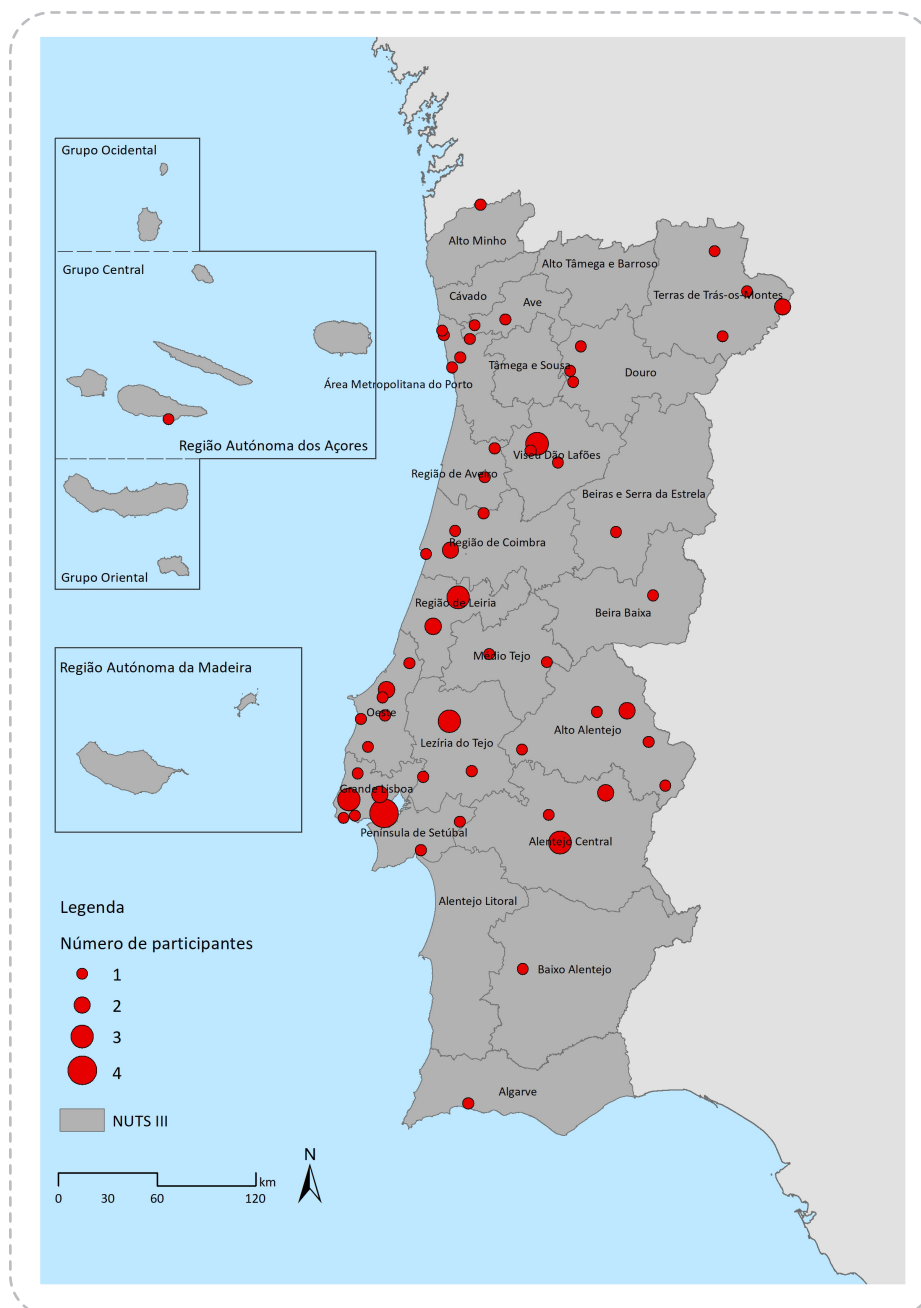


artigos breves_ n. 3

Após a validação dos dados recolhidos a partir das duas bases de dados independentes e não probabilísticas, garantindo a ausência de inconsistências e incongruências, proceder-se-á à análise estatística descritiva. Esta incluirá a distribuição de frequências bem como medidas de tendência central e dispersão, usando o software R (23).

Embora o questionário não envolva informações sensíveis, a versão final do mesmo e o procedimento para recolha de dados serão submetidos para aprovação ética e de proteção de dados à Comissão de Ética do INSA.

Figura 2: ↘ Distribuição geográfica por NUT III dos pontos focais envolvidos no presente estudo (cada círculo vermelho é proporcional ao número de SPC participantes para realização do questionário por entrevista direta).



Resultados e discussão

O questionário piloto está estruturado em cinco seções principais: 1) Dados do inquirido, 2) Caracterização da exploração, 3) Condições no local de criação, 4) Saúde e bem-estar animal e 5) Medidas de proteção e biossegurança.

De forma sucinta, a secção 'Dados do inquirido' inclui questões sobre o concelho de residência, código postal parcial, nível de escolaridade e composição do agregado familiar, não sendo solicitadas informações de identificação pessoal, como nomes completos ou códigos postais completos para garantir o anonimato dos participantes. A secção 'Caracterização da exploração' engloba perguntas sobre o número e origem dos animais detidos, atividades desenvolvidas na exploração, produtos obtidos e destino ou utilização dos produtos de origem animal. A secção 'Condições no local de criação' aborda aspetos como o alojamento, tipo de cama e alimentação dos animais, origem da água, gestão de dejetos e existência de sistemas de drenagem de esgotos. Já a secção 'Saúde e bem-estar animal' explora práticas relacionadas com a vacinação, desparasitação, tratamento de doenças, administração de medicamentos veterinários (incluindo antibióticos) e assistência veterinária. Por fim, a secção 'Medidas de proteção e biossegurança' contempla questões relacionadas com o uso de equipamentos de proteção individual (EPI), contacto com outros animais, programas de controlo de pragas, procedimentos de limpeza e desinfeção, destino do estrume e eliminação de cadáveres de animais. A recolha desta informação permitirá identificar potenciais fatores de risco associados aos SPC e analisar o conhecimento dos proprietários sobre medidas de biossegurança, cumprimento de normas de alojamento e aplicação de medidas preventivas. Além disso, possibilitará a avaliação de diferenças nas práticas de criação, suplementação alimentar e administração de medicamentos, medidas de biossegurança e tamanho do grupo de animais - fatores críticos na transmissão de doenças dentro e fora dos SPC.

Antes de aceder às perguntas, os participantes recebem informações essenciais sobre o questionário, incluindo objetivos, público-alvo, tempo estimado de preenchimento e contato da equipa responsável. São também esclarecidos sobre a nature-

za voluntária da participação e confidencialidade dos dados recolhidos, garantindo total anonimato desde a fase da recolha e processamento de dados até à divulgação ou publicação dos resultados. Adicionalmente, é disponibilizada uma ficha informativa contendo detalhes sobre o estudo, incluindo benefícios, riscos, custos associados à participação e a instituição responsável pelo estudo. O consentimento informado é obrigatório, exigindo que os inquiridos confirmem a leitura e compreensão de todas as informações fornecidas antes de prosseguir, autorizando a utilização dos dados disponibilizados.

As respostas obtidas no pré-teste indicaram que os participantes compreenderam as questões e os conceitos abordados sem dificuldades significativas.

Até ao momento, a implementação do questionário piloto resultou em n=596 respostas válidas (n=27 em papel; n=569 online), com preenchimento total ou parcial em todas as regiões NUTS III. No geral, observou-se uma adesão maior ao formato digital, um resultado consistente com estudos realizados nos EUA e em França (19,20). Embora o questionário online ofereça vantagens como maior acessibilidade e privacidade, pode enviar os resultados para indivíduos com maior literacia digital. Em contrapartida, o questionário em papel mitiga essa limitação, mas a sua distribuição depende da colaboração dos pontos de contacto e da disponibilidade dos proprietários. Ainda assim, caso a rede de pontos de contacto consiga assegurar a aplicação de, pelo menos, 10 questionários em papel por cada NUT III, será possível obter uma amostra base mínima de 260 respostas representativas da realidade nacional. Esta estratégia visa colmatar a ausência de dados prévios sobre a distribuição dos SPC, promovendo uma cobertura geográfica equilibrada e representativa. Para reforçar essa estratégia, está planeada a ampliação da divulgação do questionário através de feiras agrícolas e pecuárias.

Os resultados preliminares demonstram a viabilidade da participação dos proprietários de SPC, permitindo uma caracterização inicial destes sistemas em Portugal. No entanto, reforçar a aplicação do questionário em papel permanece essencial para garantir uma representação mais abrangente da realidade dos SPC a nível nacional.

_Conclusões

O presente estudo demonstra a viabilidade de um questionário epidemiológico pioneiro para caracterizar os sistemas de produção caseira (SPC) em Portugal, permitindo recolher dados essenciais sobre condições de criação, práticas sanitárias e biossegurança, além de avaliar riscos sanitários e ambientais. A elevada adesão ao formato online confirma a eficácia da divulgação digital, enquanto a aplicação em papel é crucial para alcançar grupos com menor literacia digital e garantir uma representação mais abrangente. Embora a ausência de uma listagem completa de produtores inviabilize uma amostragem probabilística, a metodologia adotada oferece uma visão nacional dos SPC e seus detentores, constituindo um instrumento promissor para a avaliação de riscos em saúde pública.

A validação preliminar reforça o potencial do questionário para estudos futuros, servindo de base para investigações epidemiológicas e estabelecimento de políticas sanitárias mais direcionadas. A ampliação da recolha de dados e da divulgação permitirá uma caracterização mais detalhada dos SPC, contribuindo para recomendações baseadas em evidência que promovam a saúde animal, a segurança alimentar e a mitigação de riscos zoonóticos, alinhando-se, assim, com a abordagem *One Health* (11-13,19,20).

Referências bibliográficas:

- (1) Despacho n.º 7198/2016, de 1 de junho. Autorização de abate para autoconsumo. Revoga o despacho n.º 14535-A/2013, publicado no Diário da República de 11 de novembro de 2013. DR n.º 105/2016, Série II de 2016-06-01, pp. 17188-89. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/despacho/7198-2016-74587642>
- (2) Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. Procedimento para o Registo de Detenção Caseira [online][consult. 5/5/2025]. <https://www.dgav.pt/animais/conteudo/animais-de-producao/bovinos/identificacao-registo-e-movimentacao-de-bovinos/condicoes-de-alojamento-e-detencao/procedimento-para-o-registo-de-detencao-caseira/>
- (3) Decreto-Lei n.º 81/2013. Novo regime de exercício da atividade pecuária. DR n.º 113/2013, Série I de 2013-06-14. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/decreto-lei/81-2013-496729>
- (4) Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. Abate para autoconsumo [online] [consult. 5/5/2025]. <https://www.dgav.pt/alimentos/conteudo/generos-alimenticios/regras-especificas-por-tipo-de-alimentos/carne-e-produtos-carneos/carne-e-produtos-carneos-obrigacoes-do-operador-produtor/j-abate-para-autoconsumo/>
- (5) Dione MM, Amia WC, Ejobi F, et al. Supply Chain and Delivery of Antimicrobial Drugs in Smallholder Livestock Production Systems in Uganda. *Front Vet Sci*. 2021 Sep 8;8:611076. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.611076>
- (6) Ibekwe AM, Bhattacharjee AS, Phan D, et al. Potential reservoirs of antimicrobial resistance in livestock waste and treated wastewater that can be disseminated to agricultural land. *Sci Total Environ*. 2023 May 10;872:162194. Epub 2023 Feb 11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162194>
- (7) Sukhum KV, Vargas RC, Boolchandani M, et al. Manure Microbial Communities and Resistance Profiles Reconfigure after Transition to Manure Pits and Differ from Those in Fertilized Field Soil. *mBio*. 2021 May 11;12(3):e00798-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00798-21>
- (8) Dhaka P, Chantziaras I, Vijay D, et al. Can Improved Farm Biosecurity Reduce the Need for Antimicrobials in Food Animals? A Scoping Review. *Antibiotics (Basel)*. 2023 May 11;12(5):893. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050893>
- (9) Adel A, El-Sayed HS, Samir A, et al. A cross-sectional survey for the assessment of biosecurity measures in small-scale duck farms in Qalyoubia, Egypt: Comprehensive evaluation and procedural recommendations. *Vet World*. 2023 Mar;16(3):607-17. Epub 2023 Mar 26. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.607-617>
- (10) Jaleta M, Junker V, Kolte B, et al. Improvements of weaned pigs barn hygiene to reduce the spread of antimicrobial resistance. *Front Microbiol*. 2024 May 14;15:1393923. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1393923>
- (11) Baumberg C, Di Pillo F, Galdames P, et al. Swine Backyard Production Systems in Central Chile: Characterizing Farm Structure, Animal Management, and Production Value Chain. *Animals (Basel)*. 2023 Jun 15;13(12):2000. <https://doi.org/10.3390/ani13122000>
- (12) Gentile N, Carrasquer F, Marco-Fuertes A, et al. Backyard poultry: exploring non-intensive production systems. *Poult Sci*. 2024 Feb;103(2):103284. Epub 2023 Nov 17. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103284>
- (13) Lee S, Fan P, Liu T, et al. Transmission of antibiotic resistance at the wildlife-livestock interface. *Commun Biol*. 2022 Jun 15;5(1):585. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03520-8>
- (14) Correia-Gomes C, Sparks N. Exploring the attitudes of backyard poultry keepers to health and biosecurity. *Prev Vet Med*. 2020 Jan;174:104812. Epub 2019 Nov 4. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104812>
- (15) Nicholson CW, Campagnolo ER, Boktor SW, et al. Zoonotic disease awareness survey of backyard poultry and swine owners in southcentral Pennsylvania. *Zoonoses Public Health*. 2020 May;67(3):280-290. Epub 2020 Feb 4. <https://doi.org/10.1111/zph.12686>
- (16) Özdemir D. The Structural Characteristics, Management, and Challenges of Backyard Poultry Farming in Residential Areas of Turkey. *Animals (Basel)*. 2020 Dec 9;10(12):2336. <https://doi.org/10.3390/ani10122336>
- (17) Paphitis K, Metcalf D, Weese JS. Backyard chickens - A cross-sectional survey of current and prospective backyard chicken owners in Ontario (2019-2021). *Can Vet J*. 2023 Jan;64(1):54-62. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9754136/>
- (18) Pohjola L, Rossow L, Huovilainen A, et al. Questionnaire study and postmortem findings in backyard chicken flocks in Finland. *Acta Vet Scand*. 2015 Jan 22;57(1):3. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0095-1>
- (19) Souvestre M, Delpont M, Guinat C, et al. Backyard poultry flocks in France: A diversity of owners and biosecurity practices. *Prev Vet Med*. 2021 Dec;197:105511. Epub 2021 Oct 19. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105511>
- (20) Pires AFA, Peterson A, Baron JN, et al. Small-scale and backyard livestock owners needs assessment in the western United States. *PLoS One*. 2019 Feb 14;14(2):e0212372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212372>
- (21) Patel H, Joseph, J. Questionnaire Designing Process: A Review. *Clin Trials* 2016 6:2, 1-7. <https://doi.org/10.4172/2167-0870.1000255>
- (22) Brancato G, Macchia S, Murgia M, et al. Handbook of recommended practices for questionnaire development and testing in the European Statistical System. [European Commission:Brussels, Belgium], 2006. http://www.istat.it/en/files/2013/12/Handbook_questionnaire_development_2006.pdf
- (23) R Core Team. The R Project for Statistical Computing [online]. [consult. 5/5/2025]. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Acrilamida em cereais e derivados: validação do método analítico e resultados preliminares

Acrylamide in cereals and cereal products: analytical method validation and preliminary results

Sandra Copeto, Susana Jesus, Inês Delgado, Inês Coelho

ines.coelho@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

A reação de Maillard, responsável pela cor, sabor e aroma dos alimentos, também produz substâncias nocivas, como a acrilamida (AA). Esta amida insaturada forma-se quando alimentos ricos em hidratos de carbono, como pão, batatas e café, são cozinhados a temperaturas elevadas e humidade baixa. A União Europeia classificou a AA como carcinogénica (Categoria 1B), mutagénica (Categoria 1B) e tóxica para a reprodução (Categoria 2). O presente estudo visa validar um método para determinar AA em cereais e derivados e investigar a sua presença em diferentes variedades desses produtos.

Utilizou-se a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um detetor de massa (UPLC-MS/MS) com ionização por electrospray positiva (ESI⁺) para detetar e quantificar a AA. O desempenho do método foi validado utilizando testes de avaliação externa da qualidade internacionais como testes de proficiência (FAPAS) e material de referência certificado (ERM-BD272). Avaliaram-se parâmetros como linearidade, limite de deteção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, exatidão e incerteza. Os LD e LQ foram de 0,40 µg/L e 1,22 µg/L, respetivamente, em conformidade com o Regulamento (UE) 2017/2158. A curva de calibração mostrou linearidade ($R^2 > 0,995$).

O método apresentou boas taxas de recuperação (92%-105%) e de precisão (desvio padrão relativo (RSD) $\leq 13\%$), participação satisfatória em ensaios de comparação interlaboratorial (ECI) (Z-score: 0,69 para *Crispbread* e -0,93 para *Biscuit*), assim como bons resultados para o ERM-BD272, demonstrando que o método é adequado para a determinação de AA em cereais e derivados. O método foi aplicado a cereais e derivados existentes no mercado, incluindo bolacha Maria, pão de trigo, flocos de milho e bolachas para bebé, todos recolhidos em Lisboa, Portugal.

Os resultados de AA das amostras avaliadas, expressos em µg/kg, encontram-se abaixo dos valores legislados pelo Regulamento (EU) 2017/2158. Embora os níveis de acrilamida encontrados cumpram os limites estabelecidos pela União Europeia, é necessária uma monitorização contínua da sua ocorrência, considerando as incertezas ainda presentes sobre os efeitos a longo prazo deste contaminante.

_Abstract

The Maillard reaction, responsible for food color, flavor, and aroma, also produces harmful substances such as acrylamide (AA). This unsaturated amide is formed when carbohydrate-rich foods such as bread, potatoes, and coffee are cooked at high temperatures and low humidity. The European Union has classified AA as carcinogenic (Category 1B), mutagenic (Category 1B), and toxic for reproduction (Category 2). The present study aims to validate a method to determine AA in cereals and cereal-based

products and investigate its presence in different food items.

Ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS/MS) with positive electrospray ionization (ESI⁺) was used to detect and quantify AA. The method performance was validated using international external quality control tests such as proficiency tests (FAPAS) and a certified reference material (ERM-BD272). Parameters such as linearity, limit of detection (LD), limit of quantification (LQ), precision, accuracy and uncertainty were evaluated. The LD and LQ were 0.40 µg/L and 1.22 µg/L, respectively, in compliance with Regulation (EU) 2017/2158. The calibration curve showed linearity with an R^2 greater than 0.995.

The method showed suitable recovery rates (92%-105%) and precision (RSD $\leq 13\%$), satisfactory participation in interlaboratory comparison (ECI) assays (Z-score: 0.69 for *Crispbread* and -0.93 for *Biscuit*) and good results for the ERM-BD272, demonstrating that the method is suitable for the determination of AA in cereals and cereal-based products. The method was applied to commercially available products, including Maria biscuits, wheat bread, corn flakes, and baby biscuits collected in Lisbon, Portugal.

The AA results of the evaluated samples, expressed in µg/kg, are below the values legislated by the Commission Regulation (EU) 2017/2158. Although the acrylamide levels found comply with the limits established by the European Union, continuous monitoring of its occurrence is necessary, considering the remaining uncertainties about the long-term effects of this contaminant.

_Introdução

A acrilamida (AA) é um composto químico que se forma em alimentos ricos em hidratos de carbono quando estes são cozinhados a elevadas temperaturas e baixa humidade, levantando sérias preocupações de saúde pública ⁽¹⁾. Este composto é classificado como carcinogénico do Grupo 2A pela *International Agency for Research on Cancer* ⁽²⁾. A alimentação é a principal fonte de exposição e os produtos à base de cereais são uma das principais fontes de exposição à AA, sendo fundamental controlar a sua ocorrência nos alimentos para reduzir a exposição alimentar e o risco para a saúde humana ⁽³⁾.



Atualmente, em Portugal, existe apenas um estudo de exposição realizado, que utiliza dados de ocorrência fornecidos pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) (4). Assim, é essencial avaliar a ocorrência de AA nos produtos alimentares comercializados em Portugal, utilizando métodos analíticos devidamente validados por forma a garantir a fiabilidade dos dados.

Embora os efeitos da AA na saúde humana ainda não sejam totalmente compreendidos, diversos estudos sugerem riscos potenciais. A exposição dietética à AA pode afetar negativamente o crescimento e o desenvolvimento dos recém-nascidos, tendo também sido relatado que este contaminante causa efeitos neurotóxicos, podendo levar à neuropatia (5-7). Evidências indicam uma correlação entre a exposição à AA e o aumento do risco de certos tipos de cancro, incluindo cancro do pulmão (8), linfático (9), do ovário e endométrio (10). No entanto, alguns trabalhos apresentam opiniões divergentes, sublinhando a necessidade de mais estudos para compreender plenamente os efeitos da AA na saúde humana (11,12).

A metodologia de Estudos de Dieta Total (*Total Diet Study* - TDS) é amplamente utilizada para avaliar a exposição da população a substâncias químicas nos alimentos, sejam elas benéficas ou prejudiciais à saúde. Reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), esta metodologia, preconiza a avaliação das amostras tal como consumidas, servindo como uma ferramenta de saúde pública essencial para monitorizar a segurança de alimentos e proteger a saúde da população.

_Objetivos

Este trabalho teve como objetivos: i) desenvolver e validar um método para a determinação de acrilamida (AA) em cereais e derivados utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a um detetor de massas (UPLC-MS/MS), ii) avaliar os níveis de AA em diferentes produtos disponíveis no mercado português utilizando o método desenvolvido.

_Materiais e métodos

O teor de AA foi determinado por UPLC-MS/MS com modo de ionização, ESI⁺. O método de extração incluiu o desengorduramento com n-hexano, a adição de AA-D3 como padrão interno, extração com água, e limpeza com coluna de extração em fase sólida. O desempenho do método e as figuras de mérito, foram avaliados recorrendo a ferramentas metrológicas como um material de referência certificado (MRC) (ERM-BD272 - Crispbread) e ensaios de comparação interlaboratorial (ECIs) (FAPAS) e pela avaliação de parâmetros como: limite de deteção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, repetibilidade, precisão intermédia, exatidão e incerteza.

O processo de seleção e preparação das amostras para o estudo preliminar de monitorização dos teores de AA foi realizado de acordo com a metodologia TDS, mas com um número inferior de amostras por *pool* de grupo de alimentos. O plano de amostragem abrangeu a recolha de produtos de cereais e derivados no mercado, nomeadamente bolacha Maria (n=6), pão de trigo (n=6), flocos de milho (n=6) e biscoitos infantis (n=6), adquiridos no comércio local, em 2023, em Lisboa, Portugal. Após a recolha foram preparadas *pools* com as 6 amostras recolhidas de cada natureza, levando a um total de 4 *pools*. Estas foram analisadas em triplicado, em condições de garantia da qualidade suportadas pelos requisitos descritos na norma ISO/IEC 17025:2018 (13). A concentração de AA encontra-se expressa, pela média de três réplicas \pm desvio padrão (DP), em $\mu\text{g}/\text{kg}$.

_Resultados e discussão

Neste trabalho apresentam-se os resultados obtidos nos estudos de validação do método desenvolvido para determinação do teor de AA em cereais e derivados, e que possibilitaram a sua acreditação de acordo com a norma ISO 17025:2018, assim como os resultados decorrentes da aplicação do método a quatro categorias de produtos (bolacha Maria, bolachas infantis, pão de trigo e flocos de milho).

A **tabela 1** apresenta as figuras de mérito dos diversos parâmetros da validação do método.

artigos breves_ n. 4

A curva de calibração foi estabelecida com base no sinal/ruído (S/N) das transições quantificadora (m/z 72 > 55) e qualificadora (m/z 72 > 72 ou m/z 72 > 44 ou m/z 72 > 27) e dos rácios entre as transições qualificadora/quantificadora. Foram validadas duas gamas de trabalho, ambas apresentam linearidade das respetivas curvas de calibração e um quadrado do coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,995. O LD e LQ do método foram calculados pela curva de calibração sendo de 0,40 $\mu\text{g/L}$ e 1,22 $\mu\text{g/L}$, respetivamente. A exatidão do método foi analisada com recurso a um MRC de pão estaladiço (ERM-BD272 - *Crispbread*), com um valor de referência de $980 \pm 90 \mu\text{g/kg}$, e a ensaios de recuperação. O laboratório obteve um valor médio ($n=17$) de $954 \pm 34 \mu\text{g/kg}$, o qual está dentro do intervalo do MRC. Foram também analisados vários alimentos de cereais e derivados ($n=7$) fortificados com uma solução padrão de AA para determinar as taxas de recuperação, que se situaram, entre 92 e 105%. Os estudos de repetibilidade e precisão intermédia do método

obtiveram resultados satisfatórios, 3,4% e $\leq 13\%$, respetivamente. O laboratório participou ainda em ECIs, obtendo z-scores dentro dos critérios de aceitação (FAPAS *Crispbread*: z-score = 0,69; FAPAS *Biscuit*: z-score = -0,93). A incerteza expandida do método, considerando um fator de expansão de 2, foi de 24%, tendo sido calculada com base em dados analíticos de controlo de qualidade interno.

Os resultados obtidos na validação do método cumprem os requisitos do Regulamento (UE) 2017/2158 da Comissão Europeia (14) e da norma ISO 17025:2018, encontrando-se o ensaio acreditado desde 2023.

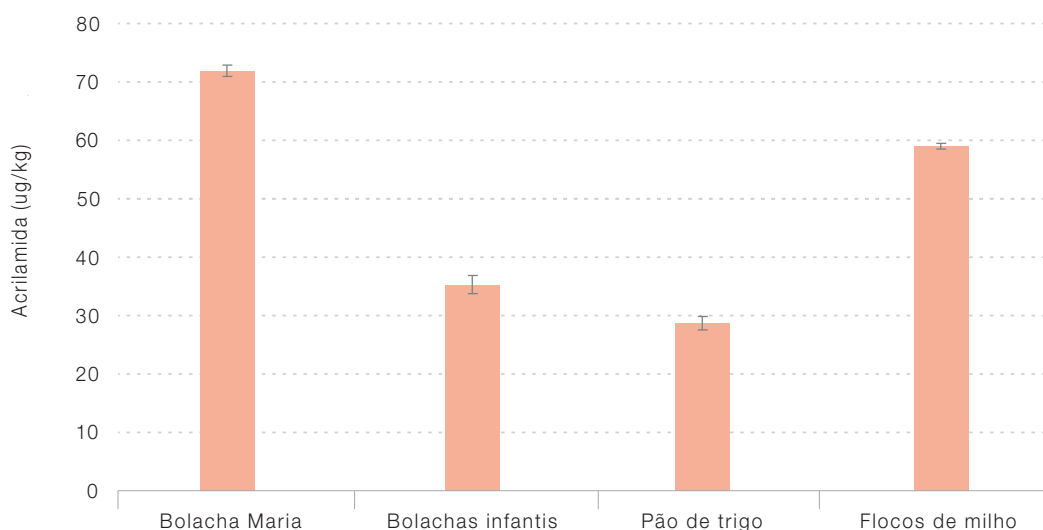
Após a otimização e validação do método, foram analisadas amostras de bolacha Maria, bolachas infantis, pão de trigo e flocos de milho, as quais foram preparadas na forma de *pools*. No gráfico 1 estão apresentados os resultados obtidos para estas amostras.

Tabela 1: Figuras de mérito da validação do método para determinação do teor de acrilamida.

	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)	Gama de trabalho ($\mu\text{g/L}$)	Recuperação (%)	Repetibilidade (%)	Precisão intermédia (%)	Incerteza expandida (%)
Acrilamida	0,40	1,22	1,25 - 12,5 10 - 100	92 - 105	3,4	≤ 13	21

LD-Limite de deteção; LQ-Limite de quantificação

Gráfico 1: Teor de acrilamida ($\mu\text{g/kg}$) nas matrizes alimentares em estudo.





artigos breves_ n. 4

A *pool* de bolacha Maria apresentou um teor médio de AA de $72 \pm 1 \mu\text{g}/\text{kg}$. No caso da bolacha Maria, os valores obtidos de AA estão abaixo dos níveis de referência da União Europeia (UE) ($350 \mu\text{g}/\text{kg}$) (14). A média da EFSA ($201 \mu\text{g}/\text{kg}$) para este tipo de produto é superior ao valor encontrado mas está dentro dos limites indicativos da UE, sugerindo que os níveis de AA são aceitáveis e seguros para o consumo (3).

No pão de trigo observou-se uma concentração média de AA de $29 \pm 1 \mu\text{g}/\text{kg}$. Os valores de AA encontrados estão abaixo dos níveis de referência estabelecidos pelo regulamento da UE, sendo também inferiores aos valores reportados pela EFSA ($42 \mu\text{g}/\text{kg}$) (3,14). Os dados do presente estudo, indicam que o pão de trigo apresenta níveis de AA seguros para o consumo humano.

Para os flocos de milho, o teor médio de AA foi de $59,0 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{kg}$. Os resultados mostram que os níveis de AA encontrados estão abaixo dos valores de referência da UE ($150 \mu\text{g}/\text{kg}$) (14). A média reportada pela EFSA para cereais de pequeno-almoço ($117 \mu\text{g}/\text{kg}$) mantém-se dentro dos níveis de referência da UE (3).

As bolachas infantis apresentaram uma concentração média de AA de $35 \pm 2 \mu\text{g}/\text{kg}$. Os níveis de AA encontrados estão abaixo dos limites indicativos da UE ($150 \mu\text{g}/\text{kg}$) e EFSA ($111 \mu\text{g}/\text{kg}$) para alimentos processados à base de cereais para bebés, indicando que estes produtos são seguros para o consumo infantil face à legislação atual (3,14).

Avaliando os valores de AA obtidos nas amostras de cereais e derivados analisadas, verificou-se que todos os teores estão abaixo do nível de referência estabelecido pela legislação da UE 2017/2158 (14).

Embora existam algumas diferenças entre as médias reportadas pela EFSA e os valores encontrados no presente estudo, ambos estão abaixo dos níveis de referência da UE, sendo um bom indicativo de segurança alimentar.

_Conclusão

O método analítico proposto foi validado com sucesso para determinar o teor de AA em cereais e derivados, cumprindo os requisitos estabelecidos tanto no Regulamento (UE) 2017/2158 como na norma ISO 17025:2018, estando acreditado pelo Instituto Português de Acreditação.

Avaliando os valores de AA obtidos nas amostras de cereais e derivados, verificou-se que todos os teores estão abaixo do nível de referência estabelecido pela legislação da UE, regulamento 2017/2158. Como tal, os produtos analisados ao abrigo da atual legislação, são seguros para o consumo da população portuguesa. No entanto, considerando a constante evolução da ciência, a alteração dos produtos disponíveis no mercado e a alteração nos padrões de consumo, é importante uma monitorização periódica. Torna-se fundamental expandir a monitorização dos teores de AA a outros grupos de alimentos, permitindo no futuro a realização de estudos rigorosos e fidedignos sobre a exposição a este composto químico, e possibilitando uma correlação mais precisa com dados epidemiológicos.

Referências bibliográficas:

- (1) Pandiselvam R, Süfer Ö, Özasan ZT, et al. Acrylamide in food products: Formation, technological strategies for mitigation, and future outlook. *Food Front*. 2024;5(3):1063-95. <https://doi.org/10.1002/fft2.368>
- (2) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Acrylamide. In: WHO-International Agency for Research on Cancer. *Some Industrial Chemicals*. Lyon: IARC, 1994, pp. 389-433. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 60) https://publications.iarc.fr/_publications/-media/download/2017/91e1d37ff33b7285b94ec62e51e19cdd5107a549.pdf
- (3) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA J*. 2015;13(6):4104. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4104>
- (4) Costa SA, Correia D, Carvalho C, et al. Risk characterization of dietary acrylamide exposure and associated factors in the Portuguese population. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2022 May;39(5):888-900. Epub 2022 Mar 14. <https://doi.org/10.1080/19440049.2022.2047540>.
- (5) Guan T, Zhang S, Jiang Y, et al. Relationship between gestational acrylamide exposure and offspring's growth: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Public Health Nutr*. 2020 Jul;23(10):1791-99. <https://doi.org/10.1017/S1368980019005123>. Epub 2020 Apr 30
- (6) Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, et al. Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat Res Genet Toxicol*. 1988;195(1):45-77. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(88\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0165-1110(88)90015-2).



artigos breves_ n. 4

- (7) Hogervorst J, Virgolino A, Halldorsson TI, et al. Maternal acrylamide exposure during pregnancy and fetal growth: A systematic review and dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Environ Res.* 2022;213:113705. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113705>
- (8) Hirvonen T, Kontto J, Jestoi M, et al. Dietary acrylamide intake and the risk of cancer among Finnish male smokers. *Cancer Causes Control.* 2010;21(12):2223-99. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9642-2>
- (9) Bongers ML, Hogervorst JG, Schouten LJ, et al. Dietary acrylamide intake and the risk of lymphatic malignancies: the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. *PLoS One.* 2012;7(6):e38016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038016>
- (10) Adani G, Filippini T, Wise LA, et al. Dietary intake of acrylamide and risk of breast, endometrial, and ovarian cancers: a systematic review and dose response meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2020;29(6):1095-1106. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-1628>
- (11) Benisi-Kohansal S, Salari-Moghaddam A, Seyed Rohani, et al. Dietary acrylamide intake and risk of women's cancers: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Br J Nutr.* 2021;126(9):1355-63. <https://doi.org/10.1017/S0007114520005255>
- (12) Filippini T, Halldorsson TI, Capitão C, et al. Dietary Acrylamide Exposure and Risk of Site-Specific Cancer: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Front Nutr.* 2022 Apr 25;9:875607. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.875607>
- (13) Instituto Português de Acreditação. Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025:2018. http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/requisitos/OGC001_GuiaAplicacao17025_v20181231.pdf
- (14) União Europeia. Regulamento (UE) 2017/2158 da Comissão, de 20 de novembro de 2017, que estabelece medidas de mitigação e níveis de referência para a redução da presença de acrilamida em géneros alimentícios. JO L 304 de 21.11.2017:24-44. <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/2158/oj>

Qualidade microbiológica de “comida de rua” pronta para consumo comercializada na área metropolitana de Lisboa, Portugal

Microbiological quality of ready-to-eat street foods marketed in the Lisbon metropolitan área, Portugal

Maria João Barreira, Sílvia Marcos, Cristina Varela Flores, Teresa Teixeira Lopes, Isabel Bastos Moura, Cristina Belo Correia, Margarida Saraiva, Rita Batista

rita.batista@insa.min-saude.pt

Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa/Porto, Portugal

_Resumo

A “comida de rua”/ *street food* é uma importante componente do sistema de distribuição de alimentos em muitas cidades. No entanto, alimentos expostos para venda na rua estão geralmente associados a condições ambientais e estruturais que favorecem a sua potencial contaminação microbiológica.

Neste estudo, foi avaliada a qualidade microbiológica de 118 alimentos prontos para consumo, vendidos na rua, em instalações móveis e/ou amovíveis localizadas na área metropolitana de Lisboa.

Foram usados como indicadores de higiene e/ou alteração, os ensaios Microrganismos a 30 °C, Bolores, Leveduras, *Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli*. Como indicadores de segurança/higiene alimentar foram utilizados os ensaios *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e patótipos de *E. coli* implicados em doenças gastrointestinais.

De acordo com os Valores-guia INSA, 2019 a declaração de conformidade da qualidade microbiológica foi de Satisfatório em 35 amostras (29,7%), Questionável em 29 (24,6%) e Não satisfatório em 51 (43,2%). Três amostras (2,6%) obtiveram declaração de conformidade da qualidade microbiológica de Não satisfatório/potencialmente perigoso, devido à presença de *L. monocytogenes* > 100 unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g) e/ou *B. cereus* > 10⁵ ufc/g e/ou SCP > 10⁴ ufc/g. Foram detetados genes de *B. cereus* que codificam toxinas diarreicas e eméticas nas estirpes isoladas de duas amostras que continham *B. cereus* > 10⁵ ufc/g. Não foi detetada a presença de *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* e de genes característicos de patótipos de *E. coli* habitualmente implicados em doenças gastrointestinais, em qualquer das amostras analisadas. Verificou-se a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em 26,3% das amostras analisadas.

Foi observada uma relação significativa entre a qualidade microbiológica declarada e o Grupo em que os alimentos se incluíam, com o aumento de classificações Questionáveis e Não satisfatórias no caso dos Grupos de alimentos que incluíam componentes hortofrutícolas crus (Fisher-Freeman-Halton = 29,01; $p < 0,001$). Os dados obtidos alertam para a necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre o cumprimento das Boas Práticas de Higiene, sobre o estabelecimento de pontos críticos de controlo e sobre o grau de conhecimento destes princípios pelos vendedores ambulantes de alimentos.

_Abstract

Street food sector is an important component of the food distribution system in many cities. However, foods exposed for sale on the roadside are generally associated with conditions that favor its potential microbiological contamination.

In this study, the microbiological quality of 118 ready-to-eat street foods sold in the metropolitan area of Lisbon, Portugal was evaluated.

Colony count at 30 °C, yeasts, moulds, Enterobacteriaceae and Escherichia coli were used as spoilage/hygiene indicators. Listeria monocytogenes, Salmonella spp., coagulase-positive staphylococci (CPS), Clostridium perfringens, Bacillus cereus and E. coli pathotypes implicated in gastrointestinal disease were used as food safety/hygiene indicators.

According to INSA Microbiological guidelines (Valores-guia INSA, 2019), 35 (29.7%) of the samples were classified as satisfactory, 29 (24.6%) as questionable and 51 (43.2%) as unsatisfactory. Three samples (2.6%) were unsatisfactory/ potentially dangerous, due to the presence of L. monocytogenes > 100 cfu/g (colony-forming units per gram) and/or B. cereus > 10⁵ cfu/g and/or CPS > 10⁴ cfu/g. B. cereus genes encoding diarrheal and emetic toxins were detected in the strains isolated from two samples containing > 10⁵ cfu/g. Salmonella spp., Clostridium perfringens and pathogenic E. coli were not detected in any of the examined samples. CPS was detected in 26.3% of the samples.

A significant relationship between microbiological quality and food category groups, with the increase of questionable and unsatisfactory classifications for those samples including raw components, like fruits and vegetables, was observed (Fisher-Freeman-Halton = 29.01; $p < 0.001$). The data obtained highlight the need to deepen knowledge about compliance with Good Hygiene Practices, the establishment of critical control points and the level of knowledge of these principles by the street food vendors.

_Introdução

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) “comida de rua”/ *street food* são “alimentos e bebidas preparados e/ou vendidos em ruas, e outros locais públicos, para consumo imediato, ou consumo posterior sem processamento ou preparação adicional” (1,2).

A *street food* está ligada aos estilos de vida urbanos e, por isso, é normalmente comercializada em áreas de passagem constante ou intermitente de pessoas, como perto de locais de trabalho, escolas, paragens de transportes públicos e em eventos festivos esporádicos de curta duração, como jogos de futebol, concertos, feiras e festivais de verão ou de Natal (3). Embora os consumidores estejam cientes das limitações associadas às condições estruturais e de higiene das instalações em que a “comida de rua” é preparada (4-6), por vezes, escolhem estes alimentos devido ao seu fácil acesso, preço mais baixo, sabor característico, variedade e serviço rápido, entre outros (4-6).

Na União Europeia (UE) os estabelecimentos de *street food* devem cumprir os requisitos estipulados pelo Regulamento (CE) N.º 852/2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. Neste regulamento, há uma disposição especial (Anexo II, Cap. III) que estabelece os requisitos aplicáveis, entre outras, às instalações amovíveis e/ou temporárias (7). Neste contexto, os vendedores ambulantes de alimentos devem seguir regras de higiene rigorosas para evitar contaminações e a deterioração dos alimentos por microrganismos, de forma a garantir a segurança dos produtos comercializados. De realçar que, na Europa, de acordo com os dados reportados à Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) (8), entre 2019 e 2023, foram associados a locais de exposição como “restaurantes, *pubs*, vendedores ambulantes, *take-away*, etc.”, 721 surtos com forte evidência da sua origem alimentar, que originaram 10871 casos de doença. *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens* foram alguns dos agentes causais mais comuns detetados em surtos associados a estes locais de exposição (8).

Até ao momento, a maior parte dos estudos sobre a qualidade microbiológica de “comida de rua” foi realizada fora da Europa, principalmente em países em desenvolvimento (9-14). No entanto, com o crescente interesse nos países europeus por este tipo de alimentos, e de forma a melhor compreender os sistemas de segurança alimentar implementados, será crucial estabelecer programas de vigilância que monitorizem a qualidade microbiológica da *street food* disponibilizada em Portugal.

_Objetivo

Monitorizar a qualidade microbiológica de “comida de rua”/ *street food*, pronta para consumo, comercializada na área metropolitana de Lisboa, Portugal.

_Material e métodos

Amostragem

Foram colhidas cento e dezoito (118) amostras únicas de alimentos *street food*, prontos para consumo, por amostragem de conveniência, em 39 pontos de venda de sete áreas do distrito de Lisboa, entre março de 2019 e dezembro de 2022.

Classificação das amostras

As amostras foram classificadas em Grupos, de acordo com os Valores-guia INSA, 2019 (15), com base no tipo de preparação: com/sem tratamento térmico, manipulação após tratamento térmico, presença de componentes crus ou de componentes com flora própria (tabela 1).

Tabela 1: ↓ Classificação das amostras (n=118) em Grupos de alimentos prontos para consumo.

Grupo	Nº de amostras (Total=118)	Tipo de alimentos	Exemplos
1	52	Alimentos que sofreram tratamento térmico	Salgadinhos ou aperitivos que geralmente são servidos frios (ex.: pastéis de bacalhau, rissóis, chamuças), produtos de pastelaria (ex.: <i>croissants</i> , <i>donuts</i>) e sanduíches (ex.: cachorros-quentes e hambúrgueres)
2	51	Alimentos compostos por alimentos totalmente cozinhados/pasteurizados, adicionados de componentes crus	Sanduíches contendo vegetais frescos (ex.: cachorros-quentes ou hambúrgueres contendo alface, tomate e cenoura crua) e saladas mistas consistindo na combinação de alimentos cozinhados e produtos hortícolas crus
		Alimentos prontos a consumir contendo peixe cru	<i>Sushi</i>
3	15	Frutos e produtos hortícolas crus, podendo incluir pequenos apontamentos de alimentos totalmente cozinhados	Frutas, saladas de hortofrutícolas, sumos de fruta e de vegetais

Análises microbiológicas

Em todas as amostras foram efetuados os seguintes ensaios de quantificação: Microrganismos a 30°C, Bolores, Leveduras, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium perfringens*. As amostras foram ainda ensaiadas para a presença de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em 25 gramas de alimento. Sempre que se obteve uma contagem de *E. coli*, em 25 gramas, foi efetuada a pesquisa de marcadores de virulência de *E. coli* patogénica intestinal. Foram utilizados os métodos automatizados TEMPO® (bioMérieux), para as contagens e VIDAS® (bioMérieux) para as pesquisas, como método de *screening* de *Listeria monocytogenes* e de *Salmonella* spp., com confirmação de resultados positivos pelos métodos de referência ISO 11290-1 e ISO 6579-1, respetivamente. A tipagem e identificação de genes específicos associados à virulência das estirpes patogénicas isoladas foi efetuada por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e/ou por sequenciação total do genoma (WGS). A contagem de *L. monocytogenes*, *C. perfringens* e fungos (bolores e leveduras) foi efetuada, respetivamente, pela ISO 11290-2, ISO 7937 e ISO 21527.

Interpretação dos resultados microbiológicos e análise estatística

A interpretação dos resultados microbiológicos foi efetuada de acordo com os Valores-guia INSA, 2019 (15).

Para determinar se havia uma relação significativa entre a qualidade microbiológica e o Grupo dos alimentos analisados foi realizado o teste exato de Fisher-Freeman-Halton, (99,9% de confiança). Para tal foi utilizado o *software* IBM SPSS Statistics 27.0.1.

_Resultados

Os resultados foram analisados tendo por base os Valores-guia INSA, 2019 de forma a estabelecer a declaração de conformidade da qualidade microbiológica das amostras ensaiadas, estando os dados obtidos apresentados na **tabela 2**. Das 118 amostras, a declaração de conformidade da qualidade microbiológica foi de Satisfatório em 35 (29,7%), Questionável em 29 (24,6%), Não satisfatório em 51 (43,2%) e Não satisfatório/potencialmente perigoso em 3 (2,6%).



Tabela 2: ↓ Nível da qualidade microbiológica, por parâmetro, por Grupo e global, de acordo com os Valores-guia INSA, 2019 (15)

Parâmetros microbiológicos	Nível da qualidade microbiológica	Grupo 1 Total=52	Grupo 2 Total=51	Grupo 3 Total=15	Total (n=118) (%)
Microrganismos a 30 °C	Satisfatório	34	21	8	63 (53,4)
	Questionável	5	12	6	23 (17,8)
	Não satisfatório	13	18	1	32 (27,1)
Enterobacteriaceae	Satisfatório	40	15	5	60 (50,9)
	Questionável	4	13	4	21 (17,8)
	Não satisfatório	8	23	6	37 (31,4)
Escherichia coli	Satisfatório	48	40	13	101 (85,6)
	Questionável	--	8	1	9 (7,6)
	Não satisfatório	4	3	1	8 (6,8)
Bolores	Satisfatório	52	45	7	104 (88,1)
	Questionável	0	1	3	4 (3,4)
	Não satisfatório	0	5	5	10 (8,5)
Leveduras	Satisfatório	45	40	11	96 (81,4)
	Questionável	6	5	4	15 (12,7)
	Não satisfatório	1	6	0	7 (5,9)
Clostridium perfringens	Satisfatório	52	51	15	118 (100)
	Não satisfatório	0	0	0	0 (0)
	Não satisf./ pot. perigoso	0	0	0	0 (0)
Bacillus cereus	Satisfatório	48	47	15	110 (93,2)
	Não satisfatório	2	4	0	6 (5,1)
	Não satisf./ pot. perigoso	2	0	0	2 (1,7)
Staphylococcus coagulase positiva	Satisfatório	40	40	7	87 (73,7)
	Questionável	7	11	7	25 (21,2)
	Não satisfatório	4	0	1	5 (4,3)
	Não satisf./ pot. perigoso	1	0	0	1 (0,8)
L. monocytogenes	Satisfatório	50	51	15	116 (98,4)
	Não satisfatório	1	0	0	1 (0,8)
	Não satisf./ pot. perigoso	1	0	0	1 (0,8)
Salmonella spp.	Satisfatório	52	51	15	118 (100)
	Não satisf./ pot. perigoso	0	0	0	0 (0)
Total	Satisfatório	28	7	0	35 (29,7)
	Questionável	10	13	6	29 (24,6)
	Não satisfatório	11	31	9	51 (43,2)
	Não satisf./ pot. perigoso	3	0	0	3 (2,6)



artigos breves_ n. 5

A declaração de conformidade da qualidade microbiológica Não satisfatório/potencialmente perigoso atribuída a três amostras (todas do Grupo 1) foi devida à presença de *L. monocytogenes* superior a 100 ufc/g - uma amostra; *B. cereus* (> 10⁵ ufc/g) e *Staphylococcus* coagulase positiva (> 10⁴ ufc/g) – uma amostra; e *B. cereus* superior a 10⁵ ufc/g – uma amostra. Foi também detetada em uma amostra do Grupo 1 a presença de *L. monocytogenes* num nível < 100 ufc/g. As estirpes de *L. monocytogenes* isoladas pertenciam aos *sequence types* ST87 e ST121. Não se detetou a presença de *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* e *E. coli* patogénicas em qualquer das amostras analisadas. Foram detetados genes codificadores de toxinas diarreicas e eméticas nas estirpes de *B. cereus* isoladas das duas amostras com declaração de conformidade da qualidade microbiológica Não satisfatório/potencialmente perigoso (> 10⁵ ufc/g).

A declaração de conformidade da qualidade microbiológica de Não satisfatório para 51 amostras ocorreu devido a resultados superiores ao Valor Máximo Admissível (VMA) em vários parâmetros microbiológicos, sendo o mais frequente as *Enterobacteriaceae* (37/51; 72,5%). Níveis acima do VMA para *E. coli* também foram encontrados em 8 amostras.

Ao analisar os resultados obtidos, considerando também a classificação das amostras em Grupos, foi possível encontrar uma associação significativa entre a qualidade microbiológica e o Grupo do alimento pronto para consumo (Fisher-Freeman-Halton = 29,01; $p < 0,001$). Observa-se uma clara diminuição na proporção de amostras satisfatórias e um consequente aumento na proporção de amostras questionáveis e não satisfatórias, à medida que passamos das amostras do Grupo 1 para as do Grupo 3.

_Discussão

Apesar de na Europa existirem poucos estudos que avaliem as condições e práticas de higiene, bem como a qualidade microbiológica da “comida de rua” disponível para venda em estabelecimentos amovíveis e/ou temporários (16), a informação publicada evidencia a existência de algumas lacunas na implementação das Boas Práticas de Higiene (BPH) (17-20).

Analogamente os resultados obtidos no presente estudo apontam para um incumprimento de algumas das BPH neste tipo de estabelecimentos. A deteção de *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva (indicadores de segurança/higiene) acima do Valor Máximo de Referência (VMR) em 14,4% (17/118) e 26,2% (31/118) das amostras, respetivamente, reflete a importância de incentivar os operadores destas empresas a rever e/ou a implementar BPH, estabelecer pontos críticos de controlo, revalidar a formação dos manipuladores de alimentos e promover o autocontrolo nos seus estabelecimentos.

A associação significativa entre o nível da qualidade microbiológica e o Grupo de alimentos prontos para consumo, com uma diminuição na proporção de amostras satisfatórias à medida que passamos do Grupo 1 para o 3, pode estar relacionada com o tipo de componentes incluídos. Uma lavagem inadequada de componentes hortofrutícolas servidos crus, a utilização de tempos/temperaturas de armazenamento inadequados e um ineficiente controlo do tempo de utilização destes produtos podem explicar estes resultados. Contrariando a tendência revelada pelo teste exato de Fisher-Freeman-Halton, neste estudo, a declaração de conformidade da qualidade microbiológica Não satisfatório/potencialmente perigoso foi atribuída apenas a amostras do Grupo 1. No entanto, é importante notar que essas 3 amostras eram todas do mesmo tipo de alimento - Coxinhas de frango que, embora totalmente cozinhado, é um alimento pronto para consumo que requer muita manipulação durante a preparação. Além disso, apesar de ser frito antes de servir, por ser uma preparação em panado, com alguma espessura, deve ter-se em atenção que no seu interior deverá ser atingida uma temperatura suficiente para a eliminação de microrganismos que possam estar presentes. O tempo e a temperatura de conservação antes e após fritura, bem como a proteção contra contaminantes ambientais, antes de ser dispensado ao consumidor, são também fatores importantes para garantir a segurança deste tipo de preparações.

As *sequence types* identificadas para as estirpes de *L. monocytogenes* encontradas já foram relatadas, na Europa, em isolados clínicos humanos (21). A integração de ambos os isolados de *L. monocytogenes* na coleção do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge permitiu verificar que o isolado ST121 integrou um grande grupo de estirpes isoladas de alimentos (com estirpes desde 2009), confirmando o elevado grau de disseminação e persistência desta bactéria.

_Conclusão

Apesar da existência de regulamentação europeia que estabelece os requisitos aplicáveis às instalações amovíveis e/ou temporárias (7), a declaração de conformidade da qualidade microbiológica nas amostras, únicas, de conveniência, analisadas neste estudo, evidencia a necessidade de os operadores de empresas alimentares de *street food* melhorarem os sistemas de segurança alimentar implementados.

Devem ser incentivados programas de vigilância que visem motivar e consciencializar este grupo específico de operadores sobre a importância do cumprimento das Boas Práticas de Higiene e de Fabrico, do estabelecimento de pontos críticos de controlo, da revalidação frequente da formação dos manipuladores e da implementação de programas de autocontrolo, como determinantes para a segurança e qualidade dos alimentos prontos para consumo disponibilizados por este setor alimentar.

Este artigo corresponde a uma versão reduzida, em português, do artigo original: Barreira MJ, Marcos S, Flores CV, Lopes TT, Moura IB, Correia CB, Saraiva M, Batista R. *Microbiological quality of ready-to-eat street foods in Lisbon, Portugal*. *Discov Food*. 2024;4(45): 1-13. <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00105-8>

Referências bibliográficas:

- (1) Street foods. Report of an FAO Expert Consultation, Jogjakarta, Indonesia, 5-9 December 1988. *FAO Food Nutr Pap*. 1989;46:1-96.
- (2) World Health Organization. Food Safety Team. Essential safety requirements for street-vended foods, Revised ed. Geneva: WHO, 1996. (WHO/FNU/FOS/96.7 Rev1). <https://iris.who.int/handle/10665/63265>
- (3) Bouafou KGM, Beugré GFC, Amani YC. Street Food around the World: A Review of the Literature. *J Service Sci Manag*. 2021;14(6):557-73. <https://doi.org/10.4236/jssm.2021.146035>
- (4) Sanlier N, Sezgin AC, Sahin G, et al. A study about the young consumers' consumption behaviors of street foods. *Cien Saude Colet*. 2018 May;23(5):1647-56. <https://doi.org/10.1590/1413-81232018235.17392016>
- (5) Durán-Agüero S, Arboleda LM, Vargas JEV, et al. Characterization of street food consumption according to age, multicentric study. *Rev Esp Nutr Hum Diet*. 2018;22(3):243-50. <https://dx.doi.org/10.14306/renhyd.22.3.554>
- (6) Wiatrowski M, Czarniecka-Skubina E, Trafialek J. Consumer Eating Behavior and Opinions about the Food Safety of Street Food in Poland. *Nutrients*. 2021 Feb 11;13(2):594. <https://doi.org/10.3390/nu13020594>
- (7) União Europeia. Regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. *JO L 139*, 30.4.2004:1-54. <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/852/oj>
- (8) European Food Safety Authority. Dashboard on Foodborne outbreaks, 2024 [online] [consult. 3/3/2025]. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/microstrategy/FBO-dashboard>
- (9) Ferrari AM, Oliveira JSC, São Jose JFB. Street food in Espírito Santo, Brazil: a study about good handling practices and food microbial quality. *Food Sci Technol*. 2021;41(suppl 2):549-56. <https://doi.org/10.1590/fst.31620>
- (10) Raza J, Asmat TM, Mustafa MZ, et al. Contamination of ready-to-eat street food in Pakistan with *Salmonella* spp.: Implications for consumers and food safety. *Int J Infect Dis*. 2021 May;106:123-27. Epub 2021 Mar 23. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.03.062>
- (11) Budiarso TY, Amarantini C, Prihatno G, et al. Detection of Coliforms and Enteric Pathogens in Favorite Snack Food Sold in Yogyakarta City. In: *Proceedings of the 7th International Conference on Research, Implementation, and Education of Mathematics and Sciences (ICRIEMS 2020)*, 2020 Jul 12-13; Yogyakarta, Indonesia: Atlantis Press, 2021. pp. 40-8. <https://doi.org/10.2991/assehr.k.210305.007>
- (12) Birgen BJ, Njue LG, Kaindi DM, et al. Determinants of Microbial Contamination of Street-Vended Chicken Products Sold in Nairobi County, Kenya. *Int J Food Sci*. 2020 Feb 14;2020:2746492. <https://doi.org/10.1155/2020/2746492>
- (13) Abubakari A, Amoah ID, Essiaw-Quayson G, et al. Presence of pathogenic *E. coli* in ready-to-be-eaten saladfood from vendors in the Kumasi Metropolis Ghana. *Afr J Microbiol Res*. 2015;9(21):1440-5. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.7349>
- (14) Salamandane A, Silva AC, Brito L, et al. Microbiological assessment of street foods at the point of sale in Maputo (Mozambique). *Food Qual Saf*. 2021 Feb 9;5:1-9. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyaa030>
- (15) Saraiva M, Correia CB, Cunha IC, et al. Interpretação de resultados de ensaios microbiológicos em alimentos prontos para consumo e em superfícies do ambiente de preparação e distribuição alimentar: valores-guia. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2019. <http://hdl.handle.net/10400.18/5610>
- (16) Abrahale K, Sousa S, Albuquerque G, et al. Street food research worldwide: a scoping review. *J Hum Nutr Diet*. 2019 Apr;32(2):152-74. Epub 2018 Oct 11. <https://doi.org/10.1111/jhn.12604>
- (17) Campos J, Gil J, Mourão J, et al. Ready-to-eat street-vended food as a potential vehicle of bacterial pathogens and antimicrobial resistance: An exploratory study in Porto region, Portugal. *Int J Food Microbiol*. 2015 Aug 3;206:1-6. Epub 2015 Apr 13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.016>
- (18) Giammanco GM, Pepe A, Aleo A, et al. Microbiological quality of Pecorino Siciliano "primosale" cheese on retail sale in the street markets of Palermo, Italy. *New Microbiol*. 2011 Apr;34(2):179-85. Epub 2011 Apr 30. www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2011/2/179.pdf



artigos breves_ n. 5

- (19) Lozano-León A, Torres J, Osorio CR, et al. Identification of tdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 Sep 26;226(2):281-4. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00604-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00604-9)
- (20) Czarniecka-Skubina E, Trafialek J, Wiatrowski M, et al. An Evaluation of the Hygiene Practices of European Street Food Vendors and a Preliminary Estimation of Food Safety for Consumers, Conducted in Paris. *J Food Prot.* 2018 Oct;81(10):1614-21. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-165>
- (21) Painset A, Björkman JT, Kiil K, et al. LiSEQ - whole-genome sequencing of a cross-sectional survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and human clinical cases in Europe. *Microb Genom.* 2019 Feb;5(2):e000257. Epub 2019 Feb 18. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000257>

Avaliação da exposição ao mercúrio no primeiro estudo da dieta total harmonizado em Portugal

Assessment of mercury exposure in the first harmonized total diet study in Portugal

Elsa Vasco, Maria Graça Dias, Luísa Oliveira

elsa.vasco@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

O objetivo deste estudo foi estimar a exposição da população portuguesa ao metilmercúrio e mercúrio inorgânico, usando uma metodologia harmonizada de Estudos de Dieta Total (TDS), e avaliar o risco de exceder a Dose Semanal Admissível (DSA) (1,3 e 4 µg/kg de peso corporal/ semana, respetivamente). Amostras de alimentos representativas do padrão alimentar da população foram preparadas de acordo com os hábitos de consumo e analisadas para determinar o teor de mercúrio total. O metilmercúrio e o mercúrio inorgânico foram estimados a partir do mercúrio total, utilizando a abordagem conservadora da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e a exposição aos mesmos foi estimada usando o Monte Carlo Risk Assessment (MCRA).

A exposição dos adultos e idosos dos 18 aos 74 anos, expressa em µg/kg peso corporal/semana, ao metilmercúrio foi de 1,25 (média), 0,01 (mediana) e 5,45 (P95), enquanto ao mercúrio inorgânico foi de 0,37 (média), 0,15 (mediana) e 1,27 (P95). Dos indivíduos, 27,6% excederam a DSA, para o metilmercúrio, e 3,5% para o mercúrio inorgânico. Entre as mulheres em idade fértil (18-45 anos), a exposição média ao metilmercúrio foi de 1,13 µg/kg peso corporal/semana, com 25% excedendo a DSA. O bacalhau seco e a pescada foram os principais contribuintes para a ingestão de mercúrio.

_Abstract

The aim of this study was to estimate the exposure of the Portuguese population to methylmercury and inorganic mercury using a harmonized Total Diet Study (TDS) methodology and to assess the risk of exceeding the Tolerable Weekly Intake (TWI) (1.3 and 4 µg/kg body weight/week, respectively). Food samples representative of the population's diet were prepared as consumed and analysed for total mercury. The European Food Safety Authority's (EFSA) conservative approach to estimating methylmercury and inorganic mercury was applied, and exposure was assessed using the Monte Carlo Risk Assessment (MCRA) software.

The mean, median, and P95 exposure of adults and elderly from 18 to 74 years old to methylmercury was 1.25, 0.01, and 5.45 µg/kg body weight/week, respectively, while exposure to inorganic mercury was 0.37, 0.15, and 1.27 µg/kg body weight/week. TWI was exceeded by 27.6% of the individuals for methylmercury and by 3.5% for inorganic mercury. Women of childbearing age (18–45 years) showed a mean exposure to methylmercury of 1.13 µg/kg body weight/week, with 25% exceeding the TWI. Cod and hake were the main contributors to mercury intake.

_Introdução

O mercúrio, um metal naturalmente presente na crosta terrestre, ocorre em diversas formas químicas, sendo o metilmercúrio a mais preocupante devido à sua bioacumulação nos organismos aquáticos e na cadeia alimentar (1,2). A exposição humana ao mercúrio ocorre por diversas vias, incluindo a inalação, ingestão de alimentos e contato dérmico, sendo o consumo de peixe e marisco uma das principais fontes. A exposição crónica ao metilmercúrio pode causar efeitos adversos na saúde, especialmente défice no neurodesenvolvimento em crianças e problemas neurológicos, cardiovasculares e renais em adultos (3).

Para proteger a saúde humana da exposição a substâncias químicas, entidades internacionais como o Comité conjunto da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura e da Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS) de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) e a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) estabeleceram valores de referência para a saúde, como a Dose Semanal Admissível (DSA) para o metilmercúrio e mercúrio inorgânico (3,4).

O consumo de pescado pela população portuguesa é elevado (59,41 kg *per capita* em 2021 (5)), resultando potencialmente numa exposição excessiva ao mercúrio cujo risco é importante avaliar. Os estudos de dieta total (TDS) são uma ferramenta de saúde pública, pois permitem estimar, de modo robusto, a exposição da população a contaminantes e nutrientes, uma vez que representam a alimentação da população de uma forma global e analisam os alimentos tal como são consumidos, refletindo as práticas de preparação culinária habituais. São, portanto, instrumentos essenciais



artigos breves_ n. 6

para desenvolver estratégias eficazes de gestão e redução da exposição. A utilização de metodologias harmonizadas para a avaliação da exposição alimentar, permite a análise de tendências temporais, facilita a comparabilidade entre países e fornece evidência científica para a adoção de medidas eficazes de gestão do risco (6,7).

_Objetivos

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a exposição crónica da população portuguesa ao metilmercúrio e mercúrio inorgânico, utilizando uma metodologia harmonizada de Estudos de Dieta Total (TDS), e estimar o risco de ultrapassar os valores de referência admissíveis estabelecidos para proteção da saúde.

_Material e métodos

O planeamento, a aquisição e a preparação das amostras de alimentos utilizadas no presente estudo, foram realizados pelo Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, tal como descrito detalhadamente por Vasco (8), de acordo com a metodologia harmonizada desenvolvida no projeto TDS-Exposure (7,9).

Dados de consumo alimentar e amostragem de alimentos

Com base no inquérito de consumo alimentar “Alimentação e estilos de vida da população portuguesa” (10), foi elaborada uma lista de 1072 alimentos representativos da dieta da população portuguesa (18-93 anos, n=3529), classificando-os em 20 grupos segundo o sistema de classificação e descrição de alimentos FoodEx2 (11). Para os adultos e idosos dos 18 aos 74 anos (n=3272), foi criada uma lista TDS com 528 alimentos, cobrindo 95% da dieta. A seleção dos alimentos baseou-se em dois critérios: i) todos os que contribuíam para 90% do consumo alimentar, ii) e aqueles que, não estando cobertos pelo critério anterior, eram relevantes como possíveis fontes de exposição a substâncias de interesse (8). Os alimentos foram agrupados, resultando em 164 amostras TDS, cada uma composta por 12 subamostras. Para considerar variações sazonais e regionais, foram analisadas 227

amostras TDS (2724 subamostras). A recolha dos alimentos decorreu entre abril de 2014 e março de 2016, em diferentes estabelecimentos comerciais da Grande Lisboa. Os alimentos foram preparados como consumidos pela população, seguindo os hábitos culinários mais comuns. As partes edíveis foram homogeneizadas, agrupadas nas respetivas amostras TDS, alíquotadas e armazenadas a -20°C até à análise (8).

Determinação analítica de mercúrio

A determinação da ocorrência de mercúrio total nas amostras TDS foi realizada por um método acreditado ISO/IEC 17025, utilizando um analisador direto de mercúrio DMA-80 (Milestone Inc., EUA), baseado na decomposição térmica, amálgama e deteção espectrométrica atómica (254 nm). Os resultados foram expressos em µg/kg. Os limites de deteção (LOD) e quantificação (LOQ) do método variaram entre 0,07-4,6 µg/kg e 0,2-13,8 µg/kg, respetivamente. A precisão da medição, expressa em coeficiente de variação de repetibilidade e de precisão intermédia, foi igual ou inferior a 0,70% e 1,16%, respetivamente. A avaliação do desempenho laboratorial incluiu a participação em testes de proficiência (Fapas®, Reino Unido) e a análise de material de referência certificado (NIST 1566b, tecido de ostra), apresentando z-scores entre -2,9 e 1,2. A incerteza relativa dos resultados foi de 5%.

Ocorrência, avaliação da exposição e caracterização do risco

Para os resultados da ocorrência os valores obtidos na determinação analítica abaixo do limite de deteção (LOD) e/ou limite de quantificação (LOQ) foram tratados pelo método de substituição *Upper Bound* (UB) e *Lower Bound* (LB) (12,13). No UB, aos valores não detetados foi atribuído o valor do LOD e aos valores entre LOD e LOQ o valor de LOQ. No LB, valores não detetados foram considerados zero e aos valores entre LOD e LOQ foi atribuído o valor de LOD.

Para estimar os níveis de metilmercúrio a partir dos valores de mercúrio total, seguiu-se a abordagem conservadora da EFSA, assumindo 100% de metilmercúrio no peixe e 80% nos mariscos. O mercúrio inorgânico foi estimado como 20% do mercúrio total no peixe e 50% nos mariscos. Nos restantes alimentos, o mercúrio total foi considerado 100% inorgânico (3).

A avaliação da exposição ao metilmercúrio e mercúrio inorgânico foi realizada por uma abordagem semiprobabilística, combinando os dados de ocorrência (UB e LB) com os consumos alimentares de cada indivíduo, registados no inquérito alimentar. A combinação dos dados de ocorrência com os de consumo foi realizada por meio da codificação utilizando o sistema FoodEx2, e a exposição foi calculada com o *software Monte Carlo Risk Assessment (MCRA)*, utilizando o modelo "Observed Individual Mean" (OIM) (14). A exposição foi estimada para os alimentos "como medidos" (amostras TDS) e "como consumidos" (subamostras TDS), sendo expressa em média, mediana (P50) e percentil 95 (P95), representando a população com exposição média e muito alta. A exposição foi calculada, para os adultos e idosos dos 18 aos 74 anos (n=3272) e segmentada por sexo. A exposição para mulheres em idade fértil (18-45 anos, n=905) foi também avaliada.

Para a caracterização do risco, os valores estimados de exposição ao metilmercúrio e mercúrio inorgânico foram comparados com os valores da DSA de 1,3 e 4 µg/kg de peso corporal (pc), respetivamente, estabelecidos pela EFSA (3). Foi também estimada a percentagem de indivíduos que excederam a DSA, assim como, a contribuição de cada alimento para a exposição total, destacando-se os principais contribuintes.

_Resultados e discussão

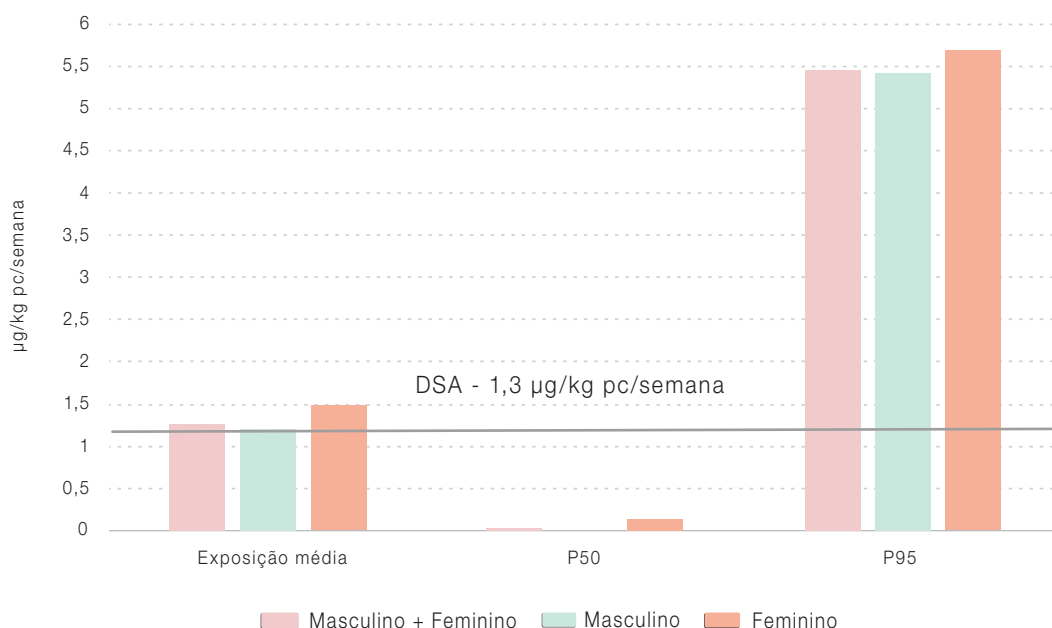
Mercúrio

Os níveis de ocorrência de mercúrio total abaixo do LOD e LOQ representaram 77% das amostras analisadas, no entanto, todas as amostras TDS compostas por peixe e/ou marisco apresentaram valores de ocorrência acima do LOQ. O grupo alimentar "peixe, marisco, anfíbios, répteis e invertebrados" teve o maior valor médio de ocorrência de mercúrio total (0,136 mg/kg), incluindo a amostra com o maior valor (0,574 mg/kg, peixe-espada). Outros grupos alimentares apresentaram valores médios iguais ou abaixo de 0,0195 mg/kg.

Metilmercúrio

Somente as estimativas UB do metilmercúrio são apresentadas, pois não houve diferenças significativas entre os valores de UB e LB. O gráfico 1 apresenta a estimativa de exposição ao metilmercúrio dos adultos e idosos dos 18 aos 74 anos. A média semanal de exposição foi de 1,25 µg/kg pc/semana, com a mediana (P50) próxima de zero (0,01 µg/kg pc/semana) e o P95 estimado em 5,45 µg/kg pc/semana. A exposição média ao metilmercúrio atingiu 96% da DSA, e o percentil 95 o valor de 419%. A proporção de indivíduos que excederam a DSA foi de 27,6%. Os grupos alimentares "peixe, mariscos,

Gráfico 1: ⚓ Exposição estimada dos adultos e idosos dos 18 aos 74 anos ao metilmercúrio.



anfíbios, répteis e invertebrados" e "pratos compostos" foram os únicos responsáveis pela exposição ao metilmercúrio. Os principais alimentos contribuintes para a exposição ao metilmercúrio foram o bacalhau seco (18,3%) e pescada (14,3%).

Quando considerados apenas os consumidores (1659 indivíduos), a exposição ao metilmercúrio foi estimada em 2,46 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana (média) e 1,57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana (P50), correspondendo a 189% e 121% do DSA, respetivamente.

O metilmercúrio está associado a efeitos adversos no desenvolvimento neurológico em fetos e crianças, por isso a exposição foi estimada para 905 mulheres portuguesas em idade fértil (18 a 45 anos). A exposição semanal média estimada foi de 1,13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana, correspondendo a 86,9% do DSA (1,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana), enquanto a mediana (P50) foi 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana. No percentil 95, a exposição foi de 5,56 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana, aproximadamente quatro vezes a DSA, com 25% das mulheres excedendo esse limite. Para as consumidoras de peixe e marisco (409 indivíduos), a exposição média foi de 2,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana (192% a DSA), o dobro do valor estimado para todas as mulheres em idade fértil. Os principais contribuintes para a exposição foram a pescada (20,2%), o bacalhau seco (14,5%) e o atum em conserva (12,8%).

Mercúrio inorgânico

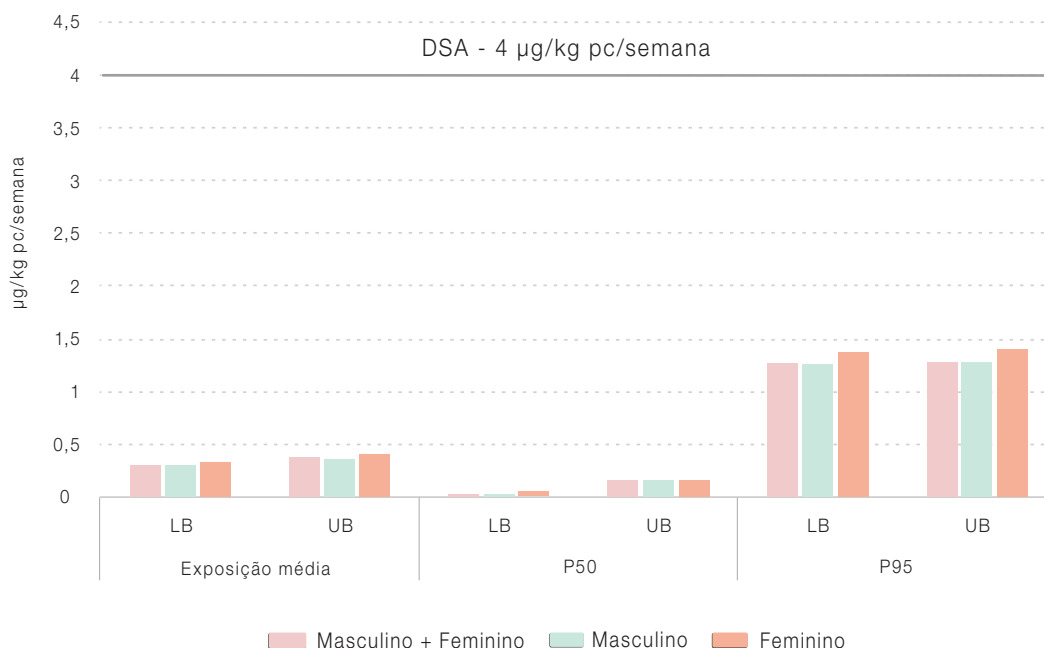
O **gráfico 2** apresenta a estimativa de exposição ao mercúrio inorgânico para os adultos e idosos dos 18 aos 74 anos em Portugal.

A exposição média foi de 0,30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana (LB) e 0,37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana (UB), com a mediana de 0,03 e 0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana, LB e UB, respetivamente. No percentil 95, a exposição semanal foi de 1,26 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana (LB) e 1,27 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pc/semana (UB). Apenas 3,4% (LB) e 3,5% (UB) dos indivíduos excederam a DSA.

Os grupos alimentares 'peixes, mariscos, anfíbios, répteis e invertebrados' e 'pratos compostos' foram responsáveis por 79% a 85% da exposição ao mercúrio inorgânico.

Os principais alimentos que contribuíram para a exposição foram o bacalhau seco (11,6% a 16,8%) e a pescada (9,3% a 9,9%).

Gráfico 2:  Exposição estimada dos adultos e idosos dos 18 aos 74 anos ao mercúrio inorgânico.



_Conclusões

A exposição média estimada dos adultos e idosos dos 18 aos 74 anos ao metilmercúrio e mercúrio inorgânico não excedeu a Dose Semanal Admissível (DSA). No entanto, 27,6% dos indivíduos ultrapassaram a DSA para metilmercúrio e 3,5% para mercúrio inorgânico, indicando risco potencial de efeitos adversos.

A distribuição da exposição ao metilmercúrio é assimétrica, afetando apenas cerca de metade dos indivíduos correspondendo aos consumidores de peixe e marisco para os quais a exposição média excede em 189% a DSA e em 192% a DSA, no caso particular das consumidoras em idade fértil. Este último resultado é particularmente preocupante, pois a exposição ao metilmercúrio pode prejudicar o desenvolvimento neurológico fetal. Por outro lado, para as não consumidoras de pescado há preocupação com a baixa ingestão de ácidos gordos ómega-3 que têm o pescado como principal fonte e que são essenciais para a saúde cardiovascular e para o neurodesenvolvimento infantil, sendo de privilegiar o consumo de diferentes espécies, com elevados teores de ómega-3 e com menores teores de mercúrio.

Estudos futuros devem avaliar a exposição ao metilmercúrio em grupos vulneráveis (grávidas, lactantes e crianças até 10 anos), considerando as recomendações portuguesas para o consumo de peixe e marisco (15).

Este artigo corresponde a uma versão reduzida, em português, do artigo original: Vasco E, Dias MG, Oliveira L. *Mercury Exposure Assessment from the First Harmonised Total Diet Study in Portugal*. Expo Health. 2025;17:119–152. Epub 2024 Aug 15. <https://doi.org/10.1007/s12403-024-00649-1>

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations & Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting (72nd : 2010 : Rome, Italy). Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second [72nd] report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: WHO, 2011. <https://iris.who.int/handle/10665/44514>
- (2) Clarkson TW. The three modern faces of mercury. Environ Health Perspect. 2002 Feb;110 Suppl 1(Suppl 1):11-23. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s111>
- (3) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. EFSA Journal. 2012; 10(12):2985. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2985>
- (4) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2003 : Rome, Italy), World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. Evaluation of certain food additives and contaminants : sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: World Health Organization, 2004. <https://iris.who.int/handle/10665/42849>
- (5) Our World in Data. Fish and seafood consumption per capita, 2021 [online] [consult. 8/5/2024]. <https://ourworldindata.org/grapher/fish-and-seafood-consumption-per-capita?tab=chart&time=2021>
- (6) European Food Safety Authority, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Towards a harmonised Total Diet Study approach: a guidance document. EFSA Journal. 2011;9(11):2450. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2450>
- (7) Pité M, Pinchen H, Castanheira I, et al. Quality Management Framework for Total Diet Study centres in Europe. Food Chem. 2018 Feb 1;240:405-14. Epub 2017 Jul 21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.101>
- (8) Vasco E, Dias MG, Oliveira L. The first harmonised total diet study in Portugal: Planning, sample collection and sample preparation. Food Chem. 2021 Nov 30;363:130258. Epub 2021 Jun 1. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130258>
- (9) Dofkova M, Nurmi T, Berg K, et al. Development of harmonised food and sample lists for total diet studies in five European countries. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2016 Jun;33(6):933-44. Epub 2016 Jun 1. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1189770>
- (10) Poínhos R, Franchini B, Afonso C, et al. Estudo Alimentação e Estilos de Vida da População Portuguesa: Metodologia e resultados preliminares. Aliment Humana. 2009;15(3):43-60. http://www.spcna.pt/download.php?path=publicacoes&filename=SPCNA_20101209222339_SPCNA_n3_2009_1.pdf
- (11) European Food Safety Authority. The food classification and description system FoodEx 2 (draft-revision 1). EFSA Support Publ. 2011;8(12):215E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2011.EN-215>
- (12) European Food Safety Authority. Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. EFSA J. 2010;8(3):1557. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1557>
- (13) GEMS/Food-EURO. Reliable evaluation of low-level contamination of food: Workshop report, Kulmbach, Germany, 26–27 May 1995. Copenhagen: World Health Organization, Regional Office for Europe, 1995. <https://toolbox.foodcomp.info/References/LOD/GEMS-Food-EURO%20-%20-%20Reliable%20Evaluation%20of%20Low-Level%20Contamination%20of%20Food.pdf>
- (14) Boon PE, de Boer WJ, Kruisselbrink J, et al. Monte Carlo Risk Assessment (MCRA) computational model: maintenance and management 2017. Bilthoven: National Institute for Public Health and the Environment, 2018. <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2018-0001.pdf>
- (15) Direção-Geral da Alimentação e Veterinária, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Economic and Food Safety Authority, et al. Recomendações para o consumo de pescado. 2023. <https://nutrimento.pt/wp-content/uploads/2023/05/Consumo-Pescado.pdf>



Hipercolesterolemia familiar homozigótica em Portugal: caracterização de casos diagnosticados geneticamente no âmbito do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar, 1999-2023

Familial hypercholesterolemia in Portugal: characterization of genetic diagnosed cases in the Portuguese Study of Familial Hypercholesterolemia, 1999-2023

Ana Margarida Medeiros^{1,2}, Ana Catarina Alves^{1,2}, Beatriz Miranda^{1,2}, Joana Rita Chora^{1,2}, Patrício Aguiar³, Mário Amaro⁴, Margarida Bruges⁵, Sofia Ferreira⁶, António Furtado⁷, Ana Gaspar⁸, Filipa Sousa Gonçalves³, Goreti Lobarinhas⁹, Guilherme Lourenço¹⁰, Paula Martins¹¹, Sofia Moura Antunes¹², Isabel Palma¹³, Quitéria Rato¹⁴, Diogo Torres¹⁵, Miguel Toscano Rico¹⁶, André Travessa¹⁷, Mafalda Bourbon^{1,2}

mafalda.bourbon@insa.min-saude.pt

(1) Grupo de Investigação Cardiovascular. Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal; (2) Biosystems & Integrative Sciences Institute. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal; (3) Centro de Referência das Doenças Hereditárias do Metabolismo, Serviço de Medicina Interna, Unidade Local de Saúde de Santa Maria, Lisboa, Portugal; (4) Serviço de Medicina Interna, Unidade de Saúde Local de Almada/Seixal, Seixal, Portugal; (5) Serviço de Nefrologia, Unidade Local de Saúde Lisboa Ocidental, Lisboa, Portugal; (6) Serviço de Pediatria, Unidade Local de Saúde da Cova da Beira, Covilhã, Portugal; (7) Serviço de Medicina Interna, Unidade Local de Saúde Matosinhos. Matosinhos, Portugal; (8) Serviço de Pediatria, Unidade Local de Saúde de Santa Maria, Lisboa, Portugal; (9) Serviço de Pediatria, Unidade Local de Saúde de Barcelos/Esposende, Barcelos, Portugal; (10) Serviço de Cardiologia Pediátrica, Unidade Local de Saúde de São José, Lisboa, Portugal; (11) Serviço de Cardiologia Pediátrica, Unidade Local de Saúde de Coimbra, Coimbra, Portugal; (12) Serviço de Pediatria, Hospital de Cascais, Cascais, Portugal; (13) Serviço de Endocrinologia, Unidade Local de Saúde de Santo António, Porto, Portugal; (14) Serviço de Cardiologia, Unidade Local de Saúde da Arrábida, Setúbal, Portugal; (15) Serviço de Cardiologia, Hospital Lusitadas Amadora, Amadora, Portugal; (16) Serviço de Medicina Interna, Unidade Local de Saúde de São José, Lisboa, Portugal; (17) Serviço de Genética Médica, Unidade Local de Saúde de Santa Maria, Lisboa, Portugal.

_Resumo

A Hipercolesterolemia Familiar (FH) é uma condição autossómica semidominante causada por variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. A FH pode apresentar-se na forma monoalélica (FH heterozigótica) ou bialélica (FH homozigótica). A forma homozigótica é mais rara e com fenótipo mais grave. Indivíduos com FH homozigótica geralmente apresentam hipercolesterolemia severa ($LDL > 400 \text{ mg/dL}$), xantomas e doença cardiovascular aterosclerótica (DCVA) prematura em idade jovem.

Até 2023, foram referenciados ao Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar 1291 casos-index. Neste estudo foram analisados os casos com FH homozigótica.

Foram identificados 15 casos com FH homozigótica: 5 com a mesma variante bialélica no *LDLR*, 7 com variantes bialélicas diferentes no *LDLR*, 1 com variantes bialélicas diferentes no *PCSK9*, e 2 com variantes nos genes *LDLR* e *APOB*. A maioria dos indivíduos eram adultos (73%) e do sexo feminino (87%), 13% apresentando xantomas tendinosos e 36% com DCVA. Variantes de alelo nulo estão associadas a um fenótipo mais grave e a uma menor resposta ao tratamento, sendo necessária terapêutica independente da atividade do receptor de LDL.

O diagnóstico genético permite identificar com precisão as variantes e os tipos de alelos, e implementar uma abordagem terapêutica mais personalizada nestes indivíduos.

_Abstract

Familial Hypercholesterolemia (FH) is an autosomal semidominant condition caused by pathogenic or likely pathogenic variants in the *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9* genes. FH can manifest in a monoallelic form (heterozygous FH) or a biallelic form (homozygous FH). The homozygous form, which is

rarer and has a more severe phenotype, with severe hypercholesterolemia ($LDL > 400 \text{ mg/dL}$), xanthomas, and premature atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) at a young age.

This study aims to analyse cases of homozygous FH. Until 2023, 1291 index cases were referred to the Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study. Among these, 15 cases were identified with homozygous FH: 5 with the same biallelic variant in *LDLR*, 7 with different biallelic variants in *LDLR*, 1 with different biallelic variants in *PCSK9*, and 2 with variants in both *LDLR* and *APOB*. Most individuals are adults (73%) and females (87%), with 13% presenting tendon xanthomas and 36% with ASCVD. Null allele variants were associated with a more severe phenotype and less responsive to treatments, requiring therapies with a mechanism of action independent of LDL receptor activity.

Genetic diagnosis enables precise identification of variants and allele types, allowing personalized therapeutic approaches for these individuals.

_Introdução

A Hipercolesterolemia Familiar (FH) é uma condição genética do metabolismo lipídico, caracterizada clinicamente por níveis elevados de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (C-LDL), levando a um risco aumentado de doença cardiovascular aterosclerótica (DCVA), e a uma maior morbilidade e mortalidade (1,2).

A FH é uma condição autossómica semidominante que se manifesta de forma monoalélica, designada por FH heterozigótica, ou bialélica, denominada FH homozigótica, consoante a presença de um ou dois alelos com variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas (3-6). As variantes ocorrem em três genes primários, estando presentes em maior frequência no gene *LDLR* (>90%), e em menor frequência nos genes *APOB* (5-10%) e *PCSK9* (<1%) (1,7,8).

O padrão de hereditariedade da FH é considerado semidominante, uma vez que ambos os alelos afetados contribuem para o fenótipo, aumentando de forma aditiva o nível de C-LDL. O fenótipo observado em indivíduos homozigóticos é manifestamente mais grave do que nos indivíduos heterozigóticos, incluindo valores extremamente elevados de C-LDL (> 400 mg/dL não tratados), xantomas tendinosos ou cutâneos e presença de DCVA prematura em idade jovem (3,9).

As variantes identificadas nos indivíduos com FH podem ser classificadas em dois tipos, com base na atividade do recetor de LDL: alelo nulo ou alelo defeituoso. As variantes de alelo nulo correspondem a uma perda total de função (<10% de atividade), enquanto as variantes de alelo defeituoso implicam uma perda parcial de função (10-70% de atividade) (3,10). A determinação da atividade do recetor é realizada através de ensaios funcionais específicos que avaliam o ciclo do recetor das LDL, na forma da sua expressão, e ligação e internalização das partículas de LDL (5,11).

A FH homozigótica pode apresentar-se em três combinações possíveis de alelos: defeituoso/defeituoso, defeituoso/nulo ou nulo/nulo. Os tipos de variantes estão associados a diferentes graus de hipercolesterolemia, com as variantes de alelo nulo a resultarem em fenótipos mais graves, enquanto as variantes de alelo defeituoso estão geralmente associadas a um fenótipo mais moderado, sendo por esta razão essencial a identificação dos alelos nos indivíduos com FH homozigótica (6,12).

Ao contrário da forma heterozigótica, que é muito comum (1 em 300), a forma homozigótica é mais rara (1 em 400.000) (13,14). A identificação destes indivíduos nos primeiros anos de vida é muito importante, pois permite a implementação de medidas terapêuticas desde cedo, de modo a travar a

progressão da aterosclerose e reduzindo, assim, o risco de doença cardiovascular aterosclerótica (3,6,15,16). A esperança e qualidade de vida de pessoas com FH homozigótica melhorou significativamente nos últimos 30 anos (9), devido ao desenvolvimento de diversos fármacos que atuam na via do recetor das LDL (estatinas, inibidores de absorção intestinal e inibidores de PCSK9 (iPCSK9)) que, em conjunto, permitem uma redução de C-LDL de cerca de 60% (3,17). Mais recentemente, foram aprovados novos fármacos específicos para a FH homozigótica, sendo que, em Portugal, está aprovado apenas o inibidor de ANGPTL3 (iANGPTL3), que reduz o LDL por uma via independente do recetor de LDL. Este fármaco é particularmente importante para os homozigotos de alelo nulo/nulo, uma vez que estes não respondem a fármacos dependentes da via do recetor das LDL. A LDL aférese é um tratamento fundamental nos indivíduos com FH homozigótica, utilizado em combinação com outras terapêuticas. Existem, no entanto, limitações relativamente ao seu uso, como a acessibilidade, a invasibilidade e duração do procedimento, que impactam a qualidade de vida das pessoas.

_Objetivo

Neste trabalho, pretende-se analisar os casos identificados geneticamente com FH homozigótica, referenciados ao Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar entre 1999 e 2023.

_Material e métodos

O Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar é um projeto de investigação, coordenado pelo INSA desde 1999, gratuito para os seus participantes e instituições de saúde colaboradoras (18). No momento da referenciação, foi realizado um perfil bioquímico com determinação de colesterol total (CT), C-LDL direto, colesterol HDL (C-HDL) e triglicéridos (TG), por métodos enzimáticos colorimétricos e imunoturbidimétricos.

Desde 2017, o estudo molecular é realizado através de um painel de NGS que inclui 8 genes (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *APOE*, *LIPA*, *ABCG5* e *ABCG8*). Para os casos recebidos entre 1999 e 2016, o estudo molecular incluiu a

análise dos genes *LDLR*, *APOB* (apenas fragmentos de 2 exões) e *PCSK9*, utilizando as metodologias de sequenciação de *Sanger* e de *MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)*, para a identificação de grandes rearranjos no gene *LDLR* (19). Todas as variantes encontradas por NGS foram validadas por sequenciação de *Sanger*, e o estudo foi alargado aos familiares, sempre que possível, para identificação de familiares em risco. A classificação das variantes foi realizada segundo as *guidelines* do *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*, utilizando as recomendações do painel de peritos do *Clinical Genome Resource (ClinGen) Familial Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel (FH VCEP)* para o gene *LDLR* (5) e as *guidelines* gerais do ACMG com as respetivas adaptações para os restantes genes (20,21). A atividade da proteína foi determinada através de ensaios funcionais, realizados no nosso grupo de investigação ou por outros laboratórios (11,22-24), permitindo classificar as variantes, com base na atividade do recetor de LDL, em variantes de alelo nulo e variantes de alelo defeituoso.

Em 2024, foram recolhidos dados de seguimento (*follow-up*) para 6 dos indivíduos com FH homozigótica.

_Resultados

Até ao final de 2023, foram referenciados 1291 indivíduos com critérios clínicos de FH (casos-índice), e confirmados geneticamente com FH homozigótica 15 indivíduos. Dois dos casos com FH homozigótica foram identificados através do estudo de familiares (método *cascade screening*).

Na **tabela 1** encontram-se as características demográficas, clínicas e perfil lipídico dos indivíduos com FH homozigótica, assim como as variantes identificadas nos genes primários da FH, o tipo de alelo e as respetivas atividades determinadas através de estudos funcionais.

No total de indivíduos com FH homozigótica, foram identificados 5 casos com a mesma variante bialélica no gene *LDLR* (**tabela 1A**), 7 casos com diferentes variantes bialélicas no gene *LDLR* (**tabela 1B**), 1 caso com diferentes variantes bialélicas no gene *PCSK9* (**tabela 1B**), e 2 casos com variantes bialélicas em genes diferentes (*LDLR* e *APOB*) (**tabela 1C**).

Tabela 1: Características demográficas, clínicas e genéticas dos indivíduos com FH homozigótica do Estudo Português de FH.

Dados demográficos					Dados clínicos		Perfil lipídico (mg/dL)					Variantes identificadas				
Sexo	Idade (ano de referência)	Idade presente (vivo ou morto)	DCVA (idade)	Xantomas tendinosos		CT	C-LDL	C-HDL	TG	Tratamento	Gene	cDNA	Proteína	Classificação da variante	Atividade da proteína*	
F	55 (2000)	78 (?)	Não	Não	Pré	-	-	-	-	-	<i>LDLR</i>	c.[1285G>C]; [1285G>C]	p.[(Val429Leu)]; [(Val429Leu)]	Patogénica	15-30% de atividade	
					Em	299	232	47	99	Estatina						
F**	25 (2006)	42 (vivo)	Não	Não	Pré	596	512	65	96	-	<i>LDLR</i>	c.[1291G>A]; [1291G>A]	p.[(Ala431Thr)]; [(Ala431Thr)]	Patogénica	~20% de atividade	
					Em	370	299	54	84	Estatina + ezetimiba						
F	21 (2009)	35 (?)	Não	Não	Pré	345	210	51	-	-	<i>LDLR</i>	c.[1216C>T]; [c.1216C>T]	p.[(Arg406Trp)]; [(Arg406Trp)]	Patogénica	60-65% de atividade	
					Em	258	186	50	79	Estatina						
F	33 (2022)	35 (vivo)	Angina (15)	?	Pré	544	460	49	175	-	<i>LDLR</i>	c.[1027G>A]; [1027G>A]	p.[(Gly343Ser)]; [(Gly343Ser)]	Patogénica	65-70% de atividade	
					Em	391	326	47	105	Estatina + ezetimiba						
M**	35 (2023)	35 (vivo)	Estenose aórtica (35)	Sim	Pré	-	-	-	-	-	<i>LDLR</i>	c.[661G>T]; [661G>T]	p.[(p.Asp221Tyr)]; [(p.Asp221Tyr)]	Patogénica	<10% de atividade	
					Em	767	702	35	161	Rosuvastatina + ezetimiba + iPCSK9 + LDL aférese						

Idade expressa em anos; F, feminino, M, masculino; ?, desconhecido; DCVA, doença cardiovascular aterosclerótica; EAM, enfarte do miocárdio; CT, colesterol total; C-LDL, colesterol LDL; C-HDL, colesterol HDL; TG, triglicéridos; pré, valores pré-tratamento; em, valores em tratamento; iPCSK9, inibidor de PCSK9; *atividade da proteína LDLR com a variante em comparação com uma proteína de atividade normal (*wild type*); **Casos que correspondem a indivíduos com informação de seguimento (*follow-up*) disponível.

artigos breves_ n. 7

B – Casos com diferentes variantes bialélicas

Dados demográficos			Dados clínicos		Perfil lipídico (mg/dL)					Variantes identificadas					
Sexo	Idade (ano de referência)	Idade presente (vivo ou morto)	DCVA (idade)	Xantomas tendinosos		CT	C-LDL	C-HDL	TG	Tratamento	Gene	cDNA	Proteína	Classificação da variante	Atividade da proteína*
F**	36 (2001)	58 (vivo)	Não	Não	Pré	49	435	42	64	-	LDLR	c.[313+6T>C];	p.[Leu64_Pro105 delinsSer];	VUS	?
					Em	355	280	51	119	Rosuvastatina + ezetimiba		[1291G>A]	[[Ala431Thr]]	Patogénica	~20% de atividade
M	29 (2006)	46 (morto)	EAM (23)	Não	Pré	561	515	-	-	-	LDLR	c.[631C>G];	p.[(His211Asp)];	Patogénica	100% expressão, ~50% ligação e internalização
					Em	346	298	29	84	Estatina + ezetimiba + LDL aferése		[1178delA]	[[Lys393Argfs*20]]	Patogénica	<10% de atividade
F	46 (2011)	58 (?)	Não	Não	Pré	600	-	-	-	-	LDLR	c.[1633G>T];	p.[(Gly545Trp)];	Patogénica	10% de atividade
					Em	185	108	63	36	Estatina + ezetimiba		[1775G>A]	[[Gly592Glu]]	Patogénica	51% expressão, ~40% ligação e internalização
F	61 (2012)	72 (vivo)	Angina (50)	Não	Pré	587	401	69	67	-	LDLR	c.[1061-?_1845+?del];	p.[?];	Patogénica	<10% de atividade
					Em	389	293	65	122	Estatina + ezetimiba + LDL aferése		[1216C>T]	[[Arg406Trp]]	Patogénica	60-65% de atividade
F**	10 (2016)	18 (vivo)	Não	Não	Pré	656	594	45	70	-	LDLR	c.[670G>A];	p.[(Asp224Asn)];	Patogénica	<10% de atividade
					Em	470	397	38	70	Estatina		[1291G>A]	[[Ala431Thr]]	Patogénica	~20% de atividade
F**	15 (2018)	20 (vivo)	Não	Não	Pré	423	317	41	323	-	LDLR	c.[1060+1G>A];	p.[(Gly293_Glu332del)];	Patogénica	?
					Em	470	397	38	70	Atorvastatina		[1585G>C]	[[Ala431Thr]]	VUS	~70% de atividade
F	39 (2021)	42 (?)	EAM (34)	Sim	Pré	-	-	-	-	-	LDLR	c.[1187-34_2140+43del];	p.[(?)];	Provavelmente patogénica	<10% de atividade
					Em	175	122	42	46	Estatina + ezetimiba + iPCSK9		[241C>T]	[[Arg81Cys]]	Provavelmente patogénica	~70% de atividade
F	11 (2011)	23 (vivo)	Não	Não	Pré	316	234	50	58	-	PCSK9	c.[185C>A];	p.[(Ala62Asp)];	Provavelmente patogénica	46% expressão ~35% internalização
					Em	139	88	42	55	Estatina		[1399C>G]	[[Pro467Ala]]	VUS	56% expressão ~35% internalização

F, feminino, M, masculino; ?, desconhecido; DCVA, doença cardiovascular aterosclerótica; EAM, enfarte do miocárdio; CT, colesterol total; C-LDL, colesterol LDL; C-HDL, colesterol HDL; TG, triglicéridos; pré, valores pré-tratamento; em, valores em tratamento; iPCSK9, inibidor de PCSK9; *atividade da proteína LDLR com a variante (expressão, ligação e/ou internalização das partículas de LDL em comparação com uma proteína de atividade normal (*wild type*), nos ensaios que envolvem variantes no gene PCSK9 é quantificada a expressão do LDLR e a internalização das partículas de LDL. **Casos que correspondem a indivíduos com informação de seguimento (*follow-up*) disponível; VUS, variante de significado incerto.

C – Casos com diferentes variantes bialélicas em genes diferentes (digénico)

Dados demográficos			Dados clínicos		Perfil lipídico (mg/dL)					Variantes identificadas					
Sexo	Idade (ano de referência)	Idade presente (vivo ou morto)	DCVA (idade)	Xantomas tendinosos		CT	C-LDL	C-HDL	TG	Tratamento	Gene	cDNA	Proteína	Classificação da variante	Atividade da proteína*
F**	21 (2022)	22 (vivo)	Não	Não	Pré	465	356	78	149	-	LDLR	c.1291G>A	p.(Ala431Thr)	Patogénica	~20% de atividade
					Em	237	152	59	99	Atorvastatina + ezetimiba	APOB	c.10580G>A	p.(Arg3527Gln)	Patogénica	~40% LDL ligação e internalização
F	12 (2022)	13 (vivo)	Não	Não	Pré	273	195	66	62	-	LDLR	c.1118G>A	p.(Ala431Thr)	Patogénica	64-69% ligação e internalização
					Em	180	119	53	66	Atorvastatina	APOB	c.13480_13482del	p.(Gln4494del)	Patogénica	50-60% ligação e internalização

F, feminino, M, masculino; DCVA, doença cardiovascular aterosclerótica; EAM, enfarte do miocárdio; CT, colesterol total; C-LDL, colesterol LDL; C-HDL, colesterol HDL; TG, triglicéridos; pré, valores pré-tratamento; em, valores em tratamento; iPCSK9, inibidor de PCSK9; *atividade da proteína LDLR com a variante (expressão, ligação e/ou internalização das partículas de LDL em comparação com uma proteína de atividade normal (*wild type*), nos ensaios que envolvem variantes no gene APOB é quantificada a ligação e internalização das partículas de LDL. **Casos que correspondem a indivíduos com informação de seguimento (*follow-up*) disponível.



_Discussão

Neste trabalho, foram identificados 15 indivíduos com FH homozigótica, a maioria com variantes bialélicas patogénicas ou provavelmente patogénicas nos três genes da FH (*LDLR*, *APOB* ou *PCSK9*), sendo mais frequente a presença de variantes no gene *LDLR*. Três das variantes identificadas (*LDLR*: c.1585G>C/p.(Gly529Arg); *PCSK9*: c.1399C>G/p.(Pro467Ala); *LDLR*: c.313+6T>C) foram classificadas como variantes de significado incerto (VUS), no entanto, os estudos funcionais realizados revelaram um defeito na função do recetor das LDL (**tabela 1B**). Os estudos funcionais realizados em células heterólogas, para a variante *LDLR*: c.1585G>C/p.(Gly529Arg), resultaram numa diminuição da expressão do recetor e também da ligação e internalização das partículas de LDL, afetando assim a atividade do recetor (11). Para a variante *PCSK9*: c.1399C>G/p.(Pro467Ala), foi observada uma redução na expressão do recetor e na internalização das partículas de LDL em células heterólogas, bem como, em linfócitos dos indivíduos portadores desta variante (24). No caso da variante *LDLR*: c.313+6T>C, embora a atividade do recetor não tenha sido diretamente avaliada, os estudos de RNA realizados com o cDNA do indivíduo portador desta variante demonstraram a eliminação do exão 3 no transcrito final (p.Leu64_Pro105delinsSer). Esta alteração sugere que a variante resulta na introdução de um codão stop prematuro, levando à produção de uma proteína truncada não funcional (25).

Dois dos indivíduos com FH homozigótica descritos neste trabalho foram identificados através do estudo de familiares. Estes indivíduos apresentavam um fenótipo mais severo, não justificado pela presença de apenas uma variante, o que levou à realização de um estudo aprofundado dos 3 genes da FH, permitindo assim identificar uma variante adicional e confirmando o genótipo de FH homozigótica.

A idade média de referenciação foi de 29,9±15,3 anos, sendo que a maioria dos casos identificados são adultos (73%) e do sexo feminino (87%). Cerca de 13% apresentavam xantomas tendinosos, e 36% dos adultos apresenta-

vam, no momento da referenciação, doença cardiovascular aterosclerótica. No momento da referenciação, todos os casos estavam em terapêutica com estatina, 50% utilizavam uma associação de estatina com ezetimiba, 13% estavam em terapêutica em combinação com iPCSK9 e 13% realizavam LDL aférese. Tal como observado noutros países, estes indivíduos estão a ser diagnosticados tardiamente (adultos: 36,5±12,5 anos; crianças/adolescentes: 12,0±1,9 anos) e, apesar do tratamento implementado, não atingem os valores alvo de C-LDL recomendados (<70 mg/dL nos adultos, ou <55 mg/dL na presença de outros fatores de risco cardiovascular, e <115 mg/dL nas crianças e adolescentes) (3,9), o que contribui para a ocorrência de aterosclerose prematura (**tabela 1**).

Relativamente ao tipo de alelo, verificou-se que 5 indivíduos possuíam uma variante de alelo nulo, que resultam em recetores com uma atividade <10%, e 9 indivíduos apresentavam variantes de alelo defeituoso. Um caso foi identificado com duas variantes de alelo nulo (**tabela 1A**), sendo este o indivíduo com fenótipo mais severo, apresentando C-LDL=702 mg/dL, apesar do tratamento com rosuvastatina, ezetimiba, LDL aférese e iPCSK9. A presença de variantes de alelo nulo tem sido amplamente associada a um fenótipo mais severo e a uma menor resposta ao tratamento, uma vez que os tratamentos de primeira e segunda linha (estatina e iPCSK9) dependem da presença de atividade residual dos recetores de LDL (10,11,26-29). Para estes casos, está indicado uma terapêutica com mecanismo de ação independente do recetor de LDL (3,30).

Em 2024, foram recolhidos dados de seguimento de 6 indivíduos com FH homozigótica (identificados com ** na tabela): 4 indivíduos com duas variantes de alelo defeituoso estão atualmente em terapêutica combinada com iPCSK9; e 2 indivíduos, com pelo menos uma variante de alelo nulo, encontram-se em terapêutica combinada com iANGPTL3, incluindo o indivíduo com o fenótipo mais severo, cujo valor atual de LDL-C é de 74 mg/dL sob tratamento com rosuvastatina, ezetimiba, iANGPTL3 e LDL aferése.

_Conclusões

A FH homozigótica encontra-se subdiagnosticada tanto a nível mundial como em Portugal, uma vez que, face à prevalência estimada, muitos dos indivíduos afetados permanecem por identificar ou são diagnosticados tardiamente. Em Portugal, estima-se que existam cerca de 25 indivíduos com FH homozigótica, mas apenas 15 foram identificados ao longo dos 25 anos do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar.

O diagnóstico genético em indivíduos com suspeita clínica de FH homozigótica permite identificar com precisão as variantes e os tipos de alelos presentes, viabilizando uma abordagem clínica/terapêutica mais personalizada. Além disso, contribui para a estratificação do risco cardiovascular destes indivíduos e para o rastreio dos seus familiares.

Assim, é essencial que indivíduos com suspeita clínica de FH sejam identificados em idade jovem e estudados molecularmente para que seja possível implementar o tratamento adequado, visando melhorar o prognóstico da sua condição.

Agradecimentos:

A todos os participantes e investigadores do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar. Às unidades ULR/DPS e UTI/DGH, pela colaboração na determinação do perfil lipídico e nas corridas de sequenciação, respetivamente.

Referências bibliográficas:

- (1) Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS. Familial Hypercholesterolemia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. (eds). The metabolic and molecular bases of inherited disease. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1995. pp. 1981-2030.
- (2) Ray KK, Pillas D, Hadjiphilippou S, et al. Premature morbidity and mortality associated with potentially undiagnosed familial hypercholesterolemia in the general population. *Am J Prev Cardiol.* 2023 Sep 6;15:100580. <https://doi.org/10.1016/j.ajpc.2023.100580>
- (3) Cuchel M, Raal FJ, Hegele RA et al. 2023 Update on European Atherosclerosis Society Consensus Statement on Homozygous Familial Hypercholesterolaemia: new treatments and clinical guidance. *Eur Heart J.* 2023 Jul 1;44(25):2277-91. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehad197>
- (4) Berberich AJ, Hegele RA. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. *Nat Rev Cardiol.* 2019 Jan;16(1):9-20. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0052-6>
- (5) Chora JR, Iacocca MA, Tichý L, et al. The Clinical Genome Resource (ClinGen) Familial Hypercholesterolemia Variant Curation Expert Panel consensus guidelines for LDLR variant classification. *Genet Med.* 2022 Feb 1;24(2):293-306. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2021.09.012>
- (6) Sturm AC, Knowles JW, Gidding SS, et al. Clinical Genetic Testing for Familial Hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 2018 Aug 7;72(6):662-80. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.044>
- (7) Abifadel M, Varret M, Rabes JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet.* 2003;34:154-6. <https://doi.org/10.1038/ng1161>
- (8) Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Oct;84(19):6919-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.19.6919>
- (9) Tromp TR, Hartgers ML, Hovingh GK, et al. Worldwide experience of homozygous familial hypercholesterolaemia: retrospective cohort study. *Lancet.* 2022 Feb 19;399(10326):719-28. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02001-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02001-8)
- (10) Bourbon M, Alves AC, Alonso R, et al. Mutational analysis and genotype-phenotype relation in familial hypercholesterolemia: The SAFEHEART registry. *Atherosclerosis.* 2017 Jul 1;262:8-13. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.04.002>
- (11) Graça R, Alves AC, Zimon M, et al. Functional profiling of LDLR variants: Important evidence for variant classification: Functional profiling of LDLR variants. *J Clin Lipidol.* 2022 Jul 1;16(4):516-24. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2022.04.005>
- (12) Reijman MD, Defesche JC, Wiegman A. Genotype-phenotype correlation in a large cohort of pediatric patients with heterozygous and homozygous familial hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol.* 2023 Dec 1;34(6):287-95. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000863>
- (13) Hu P, Dharmayat KI, Stevens CAT, et al. Prevalence of Familial Hypercholesterolemia Among the General Population and Patients With Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation.* 2020 Jun 2;141(22):1742-59. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044795>
- (14) Beheshti SO, Madsen CM, Varbo A, et al. Worldwide Prevalence of Familial Hypercholesterolemia: Meta-Analyses of 11 Million Subjects. *J Am Coll Cardiol.* 2020 May 26;75(20):2553-66. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.03.057>
- (15) Groselj U, Wiegman A, Gidding SS. Screening in children for familial hypercholesterolaemia: start now. *Eur Heart J.* 2022 Sep 7;43(34):3209-12. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac224>
- (16) Wiegman A, Gidding SS, Watts GF, et al. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *Eur Heart J.* 2015 Sep 21;36(36):2425-37. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv157>
- (17) Mach F, Baigent C, Catapano AL, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J.* 2020 Jan 1;41(1):111-88. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz455>.



artigos breves_ n. 7

- (18) Bourbon M, Rato Q; Investigadores do Estudo Português de Hipercolesterolemia Familiar. Portuguese Familial Hypercholesterolemia Study: presentation of the study and preliminary results. *Rev Port Cardiol.* 2006 Nov;25(11):999-1013.
- (19) Medeiros AM, Alves AC, Miranda B, et al. Unraveling the genetic background of individuals with a clinical familial hypercholesterolemia phenotype. *J Lipid Res.* 2024 Feb;65(2):100490. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2023.100490>
- (20) Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- (21) Chora JR, Medeiros AM, Alves AC, et al. Analysis of publicly available LDLR, APOB, and PCSK9 variants associated with familial hypercholesterolemia: application of ACMG guidelines and implications for familial hypercholesterolemia diagnosis. *Genet Med.* 2018 Jun 26;20(6):591-8. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.151>
- (22) Graça R, Zimon M, Alves AC, et al. High-Throughput Microscopy Characterization of Rare LDLR Variants. *JACC Basic Transl Sci.* 2023 Jun 28;8(8):1010-21. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2023.03.013>
- (23) Alves AC, Benito-Vicente A, Medeiros AM, et al. Further evidence of novel APOB mutations as a cause of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis.* 2018 Oct;277:448-56. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.819>
- (24) Alves AC, Etxebarria A, Medeiros AM, et al. Characterization of the first PCSK9 gain of function homozygote. *J Am Coll Cardiol.* 2015 Nov 10;66(19):2152-54. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.08.871>
- (25) Bourbon M, Duarte MA, Alves AC, et al. Genetic diagnosis of familial hypercholesterolaemia: the importance of functional analysis of potential splice-site mutations. *J Med Genet.* 2009 May;46(5):352-7. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.057000>
- (26) Santos PCJL, Morgan AC, Jannes CE, et al. Presence and type of low density lipoprotein receptor (LDLR) mutation influences the lipid profile and response to lipid-lowering therapy in Brazilian patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2014 Mar;233(1):206-10. Epub 2014 Jan 4. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.028>
- (27) Perez De Isla L, Alonso R, Watts GF, et al. Attainment of LDL-Cholesterol Treatment Goals in Patients With Familial Hypercholesterolemia: 5-Year SAFEHEART Registry Follow-Up. *J Am Coll Cardiol.* 2016 Mar 22;67(11):1278-85. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.01.008>
- (28) Alonso R, Mata N, Castillo S, et al. Cardiovascular disease in familial hypercholesterolaemia: influence of low-density lipoprotein receptor mutation type and classic risk factors. *Atherosclerosis.* 2008 Oct;200(2):315-21. Epub 2008 Feb 20. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.024>
- (29) Etxebarria A, Benito-Vicente A, Palacios L, et al. Functional characterization and classification of frequent low-density lipoprotein receptor variants. *Hum Mutat.* 2015 Jan;36(1):129-41. Epub 2014 Nov. 27. <https://doi.org/10.1002/humu.22721>
- (30) Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. Monoclonal Antibodies in the Management of Familial Hypercholesterolemia: Focus on PCSK9 and ANGPTL3 Inhibitors. *Curr Atheroscler Rep.* 2021 Oct 26;23(12):79. <https://doi.org/10.1007/s11883-021-00972-x>

Deficiência da descarboxilase dos L-aminoácidos aromáticos: possibilidade de inclusão no Programa Nacional de Rastreio Neonatal

Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: possibility for inclusion in Portuguese Newborn Screening Program

Raquel Santos^{1,2}, Filipa Ferreira², Laura Vilarinho², Hugo Rocha^{1,2}

hugo.rocha@insa.min-saude.pt

(1) Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto, Porto, Portugal

(2) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

_Resumo

A deficiência da descarboxilase dos L-aminoácidos aromáticos (AADC) é uma doença genética rara que afeta a síntese de neurotransmissores, resultando em sintomas neurológicos e de desenvolvimento graves. A quantificação da 3-O-metildopa (3-OMD), em amostras de sangue seco, tem-se mostrado um método fiável, sensível e específico para a deteção desta patologia no período neonatal. Este facto, associado ao desenvolvimento de novas terapias com vantagens de início precoce, tem feito equacionar o rastreio neonatal desta patologia.

Este estudo teve como objetivo avaliar a possibilidade de integrar a quantificação de 3-OMD no protocolo existente, de espectrometria de massa, no Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN), assim como implementar uma prova de segundo nível para melhorar a sensibilidade e especificidade da deteção da patologia.

A quantificação da 3-OMD foi incorporada no procedimento existente, sem comprometimento do mesmo, sendo eficaz na quantificação de valores de concentração clinicamente relevantes. Como prova de segundo nível foi desenvolvida uma abordagem por LC-MS/MS que se revelou eficaz na deteção de eventuais interferentes.

A possibilidade de inclusão da quantificação da 3-OMD, incluída na abordagem multiplex de MS/MS já utilizada, sem custos diretos relevantes associados, permite que se equacione a eventual inclusão desta patologia no PNRN.

_Abstract

Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency is a rare genetic disorder that affects neurotransmitter synthesis, resulting in severe neurological and developmental symptoms.

Quantification of 3-O-methyl-dopa (3-OMD), a metabolite accumulated in this condition, in dried blood spot's (DBS) has proven to be a sensitive and specific method for newborn screening. This fact, combined with the development of new therapies offering advantages when started earlier, has led to discussions about considering the neonatal screening for this condition.

This study aimed to assess the possibility of integrating the quantification of 3-OMD into the existing mass spectrometry protocol of the Portuguese Neonatal Screening Program (PNRN), as well as to implement a second-tier test to improve the sensitivity and specificity of the detection. The quantification of 3-OMD was incorporated into the existing procedure without compromising it, being effective in quantifying clinically relevant concentration values. A second-tier test was developed using an LC-MS/MS approach, which proved effective in discriminating potential interferences.

The possibility of including 3-OMD quantification, as part of the already used multiplex MS/MS approach, with no significant associated direct costs, allows for the consideration of including this condition in the PNRN.

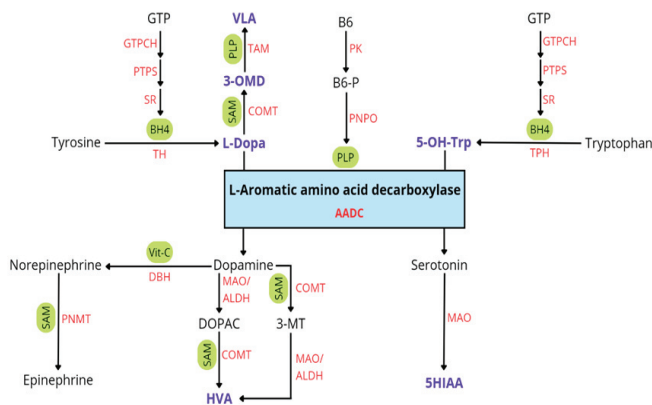
_Introdução

A deficiência da descarboxilase dos L-aminoácidos aromáticos (AADC) é uma doença genética rara, de transmissão autossómica recessiva, causada por variantes patogénicas no gene DDC (1). A enzima AADC desempenha um papel crucial na biossíntese dos neurotransmissores dopamina e serotonina (figura 1), e a sua deficiência resulta em manifestações neurológicas, neuromusculares e comportamentais (2). Esta patologia foi descrita pela primeira vez em 1990 por Hyland, *et al.* (3) e, atualmente, estão documentados cerca de 350 casos na literatura (4). A prevalência global permanece desconhecida, variando entre 1:32.000 no Taiwan e 1:190.000 nos Estados Unidos da América (4).

Os sintomas geralmente surgem nos primeiros seis meses de vida, sendo os mais frequentes a hipotonia, distúrbios do movimento (como crises oculogíricas e distonia), atraso de desenvolvimento e disfunções autonómicas (por exemplo, ptose e sudorese excessiva). Adicionalmente, incluem-se problemas comportamentais (irritabilidade e choro excessivo), perturbações do sono (insónia e hipersonia) e sintomas gastrointestinais (diarreia, obstipação, entre outros) (6).

Segundo o mais recente consenso (6), o diagnóstico da deficiência da AADC requer resultados positivos em pelo menos duas das três principais abordagens diagnósticas: (1) análise dos neurotransmissores no líquido cefalorraquidiano (LCR), que revela um padrão característico, com um redução significativa do ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) e do ácido homovanílico (HVA), aumento de precursores como L-DOPA, 5-hidroxitriptofano (5-OH-Trp) e 3-OMD, com níveis normais de pterinas; (2) avaliação da atividade enzimática no plasma, que se encontra reduzida; e (3) diagnóstico molecular, com identificação de variantes patogénicas no gene DDC (6).

Figura 1: Via metabólica da síntese de dopamina e serotonina, adaptada de Himmelreich N., *et al* (5).



Estudos internacionais demonstraram que esta pode ser incluída nos métodos multiplex de MS/MS, já utilizado pelos laboratórios para o rastreio neonatal de doenças metabólicas, apresentando elevada sensibilidade e especificidade, associada a uma baixa taxa de falsos positivos (14-18).

_Objetivos

O objetivo deste estudo é avaliar a possibilidade técnica de integrar a quantificação de 3-OMD no método de MS/MS utilizado no Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) e desenvolver e implementar uma prova de segundo nível para eliminar possíveis interferentes na quantificação da 3-OMD no rastreio inicial, permitindo aumentar a sensibilidade e especificidade do teste.

_Material e métodos

O método de MS/MS utilizado no PNRN é um protocolo desenvolvido e validado internamente, baseado na técnica descrita por Rashed, *et al.* (19). Este procedimento permite a análise de aminoácidos e acilcarnitinas através de Injeção de Fluxo acoplada a Espectrometria de Massa em Tandem (FIA-MS/MS) (Sciex Qtrap4500 e 4000Qtrap). Para a quantificação de 3-OMD, foi adicionado o padrão interno 3-OMD-D₃, numa concentração final de 0,1 µM, à solução de extração. As transições 268,1 m/z → 166,1 m/z (3-OMD) e 271,1 m/z → 169,1 m/z (3-OMD-D₃) foram otimizadas e integradas no método de aquisição MS/MS.

Foram analisadas amostras residuais de sangue seco em papel de filtro (DBS) anonimizadas, provenientes do PNRN, bem como amostras DBS anonimizadas de adultos em terapia com DOPA, fornecidas por um laboratório parceiro. Amostras com concentrações de 3-OMD acima do cut-off estabelecido foram sujeitas a uma prova de segundo nível, utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), com condições de extração idênticas às do método FIA-MS/MS. Para a análise por LC-MS/MS, foi utilizada uma coluna *Penomex Gemini 3u C6-phenyl* 110A, com uma fase móvel composta por acetetonitrilo/água, utilizando um sistema HPLC Agilent série 1100 acoplado a um MS/MS 4000Qtrap da Sciex (gráfico 1).

Os tratamentos de primeira linha incluem agonistas da dopamina (que ativam diretamente os recetores de dopamina), inibidores da monoamina oxidase (que impedem a degradação da dopamina e da serotonina) e piridoxal fosfato (PLP), um cofator essencial da enzima AADC (6). Contudo, a eficácia destas terapias é limitada na maioria dos casos (2,7).

O desenvolvimento de terapias génicas tem surgido como uma estratégia promissora no tratamento de doenças raras (8). Para a deficiência de AADC, a terapia génica envolve a administração intraputamina de uma cópia funcional do gene *DDC*, utilizando vetores virais adeno-associados. Estudos clínicos demonstraram melhorias significativas nos sintomas e na função motora após o tratamento, com benefícios mais evidentes em pacientes mais jovens (9-12). Em 2022, a Agência Europeia de Medicamentos aprovou a terapia génica *Eladocagene exuparvovec* (Upstaza®) para doentes com deficiência de AADC confirmada, fenótipo grave e idade mínima de 18 meses (13).

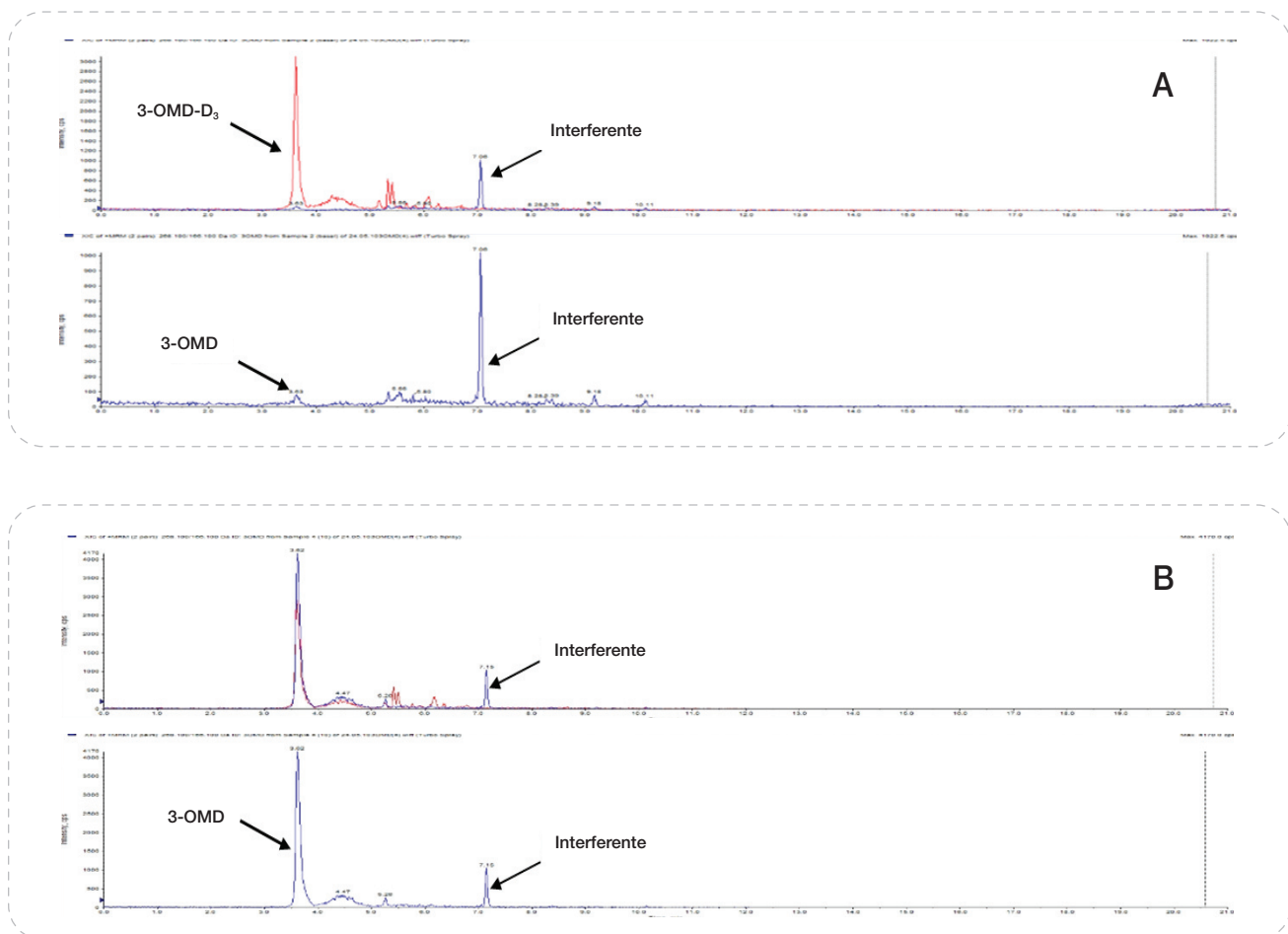
A existência de uma abordagem terapêutica que apresenta maior eficácia quando iniciada em fases pré-sintomáticas suscitou o interesse pela inclusão desta patologia nos programas de rastreio neonatal. Estes baseiam-se na quantificação de 3-OMD, um metabolito acumulado nesta condição, em amostras de sangue seco em papel de filtro (DBS), utilizando espectrometria de massa em tandem (MS/MS).

_Resultados e discussão

A integração do 3-OMD no método FIA-MS/MS foi realizada com sucesso, sem interferir na quantificação dos restantes biomarcadores do painel de rastreio. O método de quantificação implementado revelou um limite de deteção de 0,95 μM , o limite de quantificação de 2,87 μM , a exatidão de 1,3% e a precisão de 5,7%. A análise de 2066 amostras de sangue

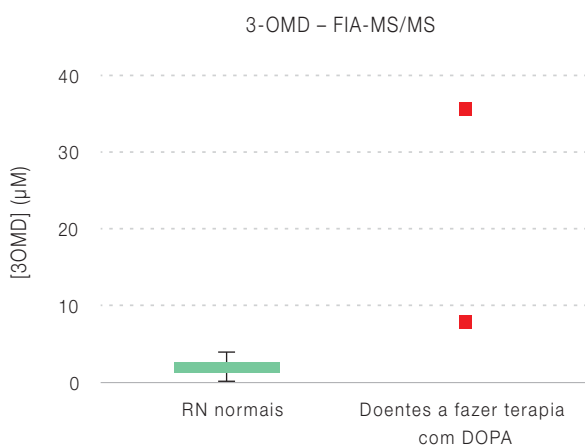
seco (DBS) anonimizadas de recém-nascidos saudáveis revelou uma concentração média de 3-OMD de 1,9 μM , com um desvio padrão de 0,4, enquanto os percentis 2,5 e 99,5 foram 1,2 μM e 3,3 μM , respetivamente. Estes dados estabeleceram uma *baseline* abrangente dos valores de 3-OMD na população neonatal.

Gráfico 1: ⬇️ Separação cromatográfica de 3-OMD endógeno (azul) e 3-OMD-D₃ (vermelho) numa amostra de um indivíduo normal (A) e numa amostra enriquecida a 10 μM (B), utilizando LC-MS/MS. O pico azul aos 7,05 minutos foi identificado como um interferente.



As amostras dos dois doentes sob terapia com DOPA revelaram concentrações de 3-OMD significativamente mais elevadas em comparação com os recém-nascidos normais (8,0 μM e 35,6 μM). Estes resultados demonstram a capacidade do método em detetar concentrações de 3-OMD a níveis clinicamente relevantes (gráfico 2). As amostras de rastreio neonatal de doentes com AADC, reportadas na literatura, apresentam valores de 3-OMD entre 5,05 μM e 35,95 μM , o que suporta a validade do método implementado na identificação desta patologia.

Gráfico 2: Distribuição da concentração de 3-OMD em recém-nascidos (RN) normais (gráfico de *box-and-whiskers*, verde) e em indivíduos sob terapia com DOPA (pontos individuais, vermelho).



Com base numa análise detalhada dos dados obtidos e nos valores de 3-OMD reportados em doentes com deficiência de AADC confirmada, o percentil 99,5 (3,3 μM) foi estabelecido como o *cut-off* para o encaminhamento das amostras para prova de segundo nível. Todas as amostras que apresentaram concentrações iniciais elevadas de 3-OMD mostraram valores normais após reanálise por LC-MS/MS. Estes resultados evidenciam que a separação cromatográfica utilizada na prova de segundo nível permite discriminar de forma eficaz os níveis verdadeiramente elevados de 3-OMD de potenciais interferentes, reduzindo a ocorrência de falsos positivos e garantindo a precisão diagnóstica.

Para avaliar a viabilidade de padrões internos alternativos, foi realizada uma comparação entre FIA-MS/MS utilizando 3-OMD- D_3 e FIA-MS/MS com $^{13}\text{C}_6$ -Phe e $^{13}\text{C}_6$ -Tyr, previamente demonstrados como eficazes em fluxos de trabalho de rastreio neonatal (16,17). A análise de 24.441 amostras de recém-nascidos revelou um desempenho semelhante entre os dois métodos. Embora $^{13}\text{C}_6$ -Phe e $^{13}\text{C}_6$ -Tyr apresentem menor precisão e exatidão em comparação com o 3-OMD- D_3 , os resultados sugerem que podem ser adequados para fins de rastreio, representando uma alternativa viável com potencial para reduzir custos e simplificar o processo.

_Conclusão

Neste estudo o método FIA-MS/MS para quantificação de 3-OMD em amostras DBS foi adicionado com sucesso ao atual método multiplex de MS/MS já utilizado pelo Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) para o rastreio neonatal de doenças metabólicas.

Quando conjugado com a prova de segundo nível desenvolvida, permite criar uma abordagem ao rastreio neonatal da deficiência em AADC com elevados níveis de sensibilidade e especificidade.

Este facto, associado à já existência na Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, das técnicas para a confirmação das suspeitas de diagnóstico, nomeadamente a análise de neurotransmissores em LCR e estudos moleculares do gene DDC, possibilita ao PNRN equacionar a realização de um eventual estudo-piloto para o rastreio neonatal da deficiência em AADC.



Referências bibliográficas:

- (1) Hyland K, Surtees RA, Rodeck C, et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, diagnosis, and treatment of a new inborn error of neurotransmitter amine synthesis. *Neurology*. 1992 Oct;42(10):1980-8. <https://doi.org/10.1212/WNL.42.10.1980>
- (2) Brun L, Ngu LH, Keng WT, et al. Clinical and biochemical features of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Neurology*. 2010 Jul 6;75(1):64-71. Epub 2010 May 26. Erratum in: *Neurology*. 2010 Aug 10;75(6):576. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181e620ae>
- (3) Hyland K, Clayton PT. Aromatic amino acid decarboxylase deficiency in twins. *J Inher Metab Dis*. 1990;13(3):301-4. <https://doi.org/10.1007/BF01799380>
- (4) Himmelreich N, Bertoldi M, Alfadhel M, et al. Prevalence of DDC genotypes in patients with aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency and in silico prediction of structural protein changes. *Mol Genet Metab*. 2023 Jul;139(3):107624. Epub 2023 Jun 2. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2023.107624>. Erratum in: *Mol Genet Metab*. 2023 Aug;139(4):107647. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2023.107647>
- (5) Himmelreich N, Montioli R, Bertoldi M, et al. Aromatic amino acid decarboxylase deficiency: Molecular and metabolic basis and therapeutic outlook. *Mol Genet Metab*. 2019 May;127(1):12-22. Epub 2019 Mar 27. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.03.009>. Erratum in: *Mol Genet Metab*. 2021 Sep-Oct;134(1-2):216. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.06.010>
- (6) Wassenberg T, Molero-Luis M, Jeltsch K, et al. Consensus guideline for the diagnosis and treatment of aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency. *Orphanet J Rare Dis*. 2017 Jan 18;12(1):12. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0522-z>
- (7) Manegold C, Hoffmann GF, Degen I, et al. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, drug therapy and follow-up. *J Inher Metab Dis*. 2009 Jun;32(3):371-80. Epub 2009 Jan 28. <https://doi.org/10.1007/s10545-009-1076-1>
- (8) Yilmaz BS, Gurung S, Perocheau D, et al. Gene therapy for inherited metabolic diseases. *J Mother Child*. 2020 Nov 10;24(2):53-64. <https://doi.org/10.34763/jmotherandchild.20202402si.2004.000009>
- (9) Chien YH, Lee NC, Tseng SH, et al. Efficacy and safety of AAV2 gene therapy in children with aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: an open-label, phase 1/2 trial. *Lancet Child Adolesc Health*. 2017 Dec;1(4):265-73. Epub 2017 Oct 23. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(17\)30125-6](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(17)30125-6)
- (10) Kojima K, Nakajima T, Taga N, et al. Gene therapy improves motor and mental function of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Brain*. 2019 Feb 1;142(2):322-33. <https://doi.org/10.1093/brain/awy331>
- (11) Pearson TS, Gupta N, San Sebastian W, et al. Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency by MR-guided direct delivery of AAV2-AADC to midbrain dopaminergic neurons. *Nat Commun*. 2021 Jul 12;12(1):4251. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24524-8>
- (12) François-Heude MC, Poulen G, Flamand Roze E, et al. Intraputamenal Gene Delivery in Two Patients with Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Deficiency. *Mov Disord Clin Pract*. 2023 Feb 24;10(5):811-18. <https://doi.org/10.1002/mdc3.13685>
- (13) Keam SJ. Eladocagene Exuparvovec: First Approval. *Drugs*. 2022 Sep;82(13):1427-32. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01775-3>
- (14) Chien YH, Chen PW, Lee NC, et al. 3-O-methyl-dopa levels in newborns: Result of newborn screening for aromatic L-amino-acid decarboxylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2016 Aug;118(4):259-63. Epub 2016 May 16. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.05.011>
- (15) Brennenstuhl H, Kohlmüller D, Gramer G, et al. High throughput newborn screening for aromatic L-amino-acid decarboxylase deficiency by analysis of concentrations of 3-O-methyl-dopa from dried blood spots. *J Inher Metab Dis*. 2020 May;43(3):602-10. Epub 2020 Jan 6. <https://doi.org/10.1002/jimd.12208>
- (16) Burlina A, Giuliani A, Polo G, et al. Detection of 3-O-methyl-dopa in dried blood spots for neonatal diagnosis of aromatic L-amino-acid decarboxylase deficiency: The northeastern Italian experience. *Mol Genet Metab*. 2021 May;133(1):56-62. Epub 2021 Mar 13. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.03.009>
- (17) Chen PW, Hwu WL, Lee NC, et al. Streamlined determination of 3-O-methyl-dopa in dried blood spots: Prospective screening for aromatic L-amino-acid decarboxylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2023 Sep-Oct;140(1-2):107687. Epub 2023 Aug 15. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2023.107687>
- (18) Reischl-Hajjibadi AT, Okun JG, Kohlmüller D, et al. Newborn screening for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency - Strategies, results, and implication for prevalence calculations. *Mol Genet Metab*. 2024 Mar;141(3):108148. Epub 2024 Jan 31. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2024.108148>
- (19) Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, et al. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatr Res*. 1995 Sep;38(3):324-31. <https://doi.org/10.1203/00006450-199509000-00009>

Provas de segundo nível para o rastreio neonatal da hiperplasia congénita das suprarrenais

Second tier tests for neonatal screening of congenital adrenal hyperplasia

Ana Leal^{1,2}, Hugo Rocha^{1,2}, Marlene Mota², Laura Vilarinho¹

a.catarina.leal@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

(2) Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto, Porto, Portugal

_Resumo

O rastreio neonatal tem um papel essencial na deteção precoce da Hiperplasia Congénita das Suprarrenais, numa fase pré-sintomática, permitindo uma institucionalização atempada de tratamento com melhoras no curso clínico do recém-nascido. O marcador utilizado para efeitos de rastreio neonatal, é a 17- α -hidroxiprogesterona (17-OHP), quantificada em cartão de Guthrie por fluoroimunoensaio. No entanto, este marcador origina classicamente um elevado número de falsos positivos, sobretudo em recém-nascidos de baixo peso e/ou prematuros. De forma a contornar esta limitação, a estratégia preconizada passa pelo ajuste dos valores de referência da 17-OHP, em função do peso e/ou idade gestacional e a utilização de provas de segundo nível, através da análise de perfis de esteroides, em sangue em papel.

Neste trabalho foi levada a cabo a definição de valores de referência para a 17-OHP (estratificados por peso e idade gestacional) adaptados à população portuguesa de recém-nascidos e foram implementadas as provas de segundo nível. Da conjugação destas duas estratégias, resulta uma abordagem que se traduzirá numa considerável melhoria de sensibilidade e especificidade, caso se considere no futuro a introdução do rastreio desta patologia no Programa Nacional de Rastreio Neonatal.

_Abstract

Neonatal screening has an essential role in the early detection of Congenital Adrenal Hyperplasia in a pre-symptomatic phase, allowing an early institutionalization of treatment with improvements in the clinical course of the newborn. The marker used for neonatal screening purposes is 17- α -hydroxyprogesterone (17-OHP), quantified in Guthrie cards by fluoroimmunoassay. However, this marker classically leads to a high number of false positives, especially in low birth weight and/or premature newborns. To overcome this limitation, various screening programs resort to the adjustment of the reference values of 17-OHP, according to weight and/or gestational age and the use of second-tier tests, through the analysis of steroid profiles, in dried blood spots.

In this work, the definition of reference values for 17-OHP (stratified by weight and gestational age) adapted to the Portuguese population of newborns was carried out and the second-tier tests were implemented. The combination of stratified reference values and the use of these second-tier tests results in an approach that will translate into a considerable improvement in sensitivity and specificity, if the introduction of screening for this pathology in the National Neonatal Screening Program is considered in the future.

_Introdução

A Hiperplasia Congénita das Suprarrenais (HCSR) compreende um grupo de doenças genéticas com um modo de transmissão autossómica recessiva, que pode ter origem em defeitos em uma de cinco enzimas, envolvidas na biossíntese do cortisol, pelas glândulas suprarrenais (21-hidroxilase, 11- β -hidroxilase, 3- β -hidroxiesteróide desidrogenase, 17- α -hidroxilase e a StAR - *steroidogenic acute regulatory protein*) (1). A HCSR por défice de 21-hidroxilase, que se deve a mutações no gene *CYP21A2* (1-3), representa cerca de 90 a 95% dos casos desta patologia e por isso é reiteradamente considerado sinónimo de HCSR (4,5). Esta apresenta uma ampla variabilidade clínica que se traduz num vasto espectro de sintomas. Nas formas clássicas, as manifestações clínicas podem surgir já durante o período pré-natal, por norma mais severas, sendo subdivididas entre formas com perda de sal e virilizantes simples. Já, as formas não clássicas, podem apresentar manifestações clínicas em idade mais tardia, sendo que alguns pacientes podem ser assintomáticos (6). A HCSR clássica apresenta uma incidência global de 1 em cada 15.000 nados-vivos, sendo esta semelhante em ambos os sexos. Por sua vez, a forma não clássica, apesar de sub-diagnosticada, é mais comum, estimando-se que tenha uma incidência de 1 em cada 1000 nados-vivos (7-9).

O diagnóstico da deficiência de 21-hidroxilase deve ser ponderado em recém-nascidos com ambiguidade sexual e perda de sal, hipotensão ou hipoglicemia. Analiticamente, a hiponatremia e hipercalemia com aumento da atividade plasmática da renina são encontradas na forma com perda de sal. A alteração bioquímica mais característica da HCSR



artigos breves_ n. 9

por deficiência de 21-hidroxilase é o aumento da 17 α -OHP, mas que não é específico, podendo também pode ser observado na deficiência em 11- β -hidroxilase (10-12).

Entre 1986 e 1987, foi efetuado em Portugal um estudo-piloto para o Rastreio Neonatal da HCSR em 100.000 recém-nascidos, tendo sido detetados sete casos positivos (prevalência ao nascimento de 1/14.300), mas onde apenas se conseguiu antecipar o diagnóstico clínico em dois casos, devido ao facto de à data a média de início de tratamento ser 19 dias de vida. Por esta razão a avaliação do estudo-piloto não foi positiva e atualmente, o Programa Nacional de Rastreio Neonatal (PNRN) não inclui a HCSR no seu painel de doenças rastreadas (13). A nível mundial, já são vários os países que incluem a Hiperplasia Congénita das Suprarrenais no rastreio neonatal, tendo em vista, essencialmente, a identificação da forma clássica com perda de sal e a virilizante simples, o que se traduz numa significativa diminuição da morbilidade e mortalidade associadas (1,14). Além de permitir a rápida administração do tratamento adequado (uso de mineralocorticoides ou glicocorticoides), prevenindo crises de perda de sal e morbimortalidade associada, a deteção precoce possibilita a correta classificação do género em recém-nascidos do sexo feminino com virilização dos órgãos genitais externos e o diagnóstico precoce da forma virilizante simples, evitando a hiperandrogenização durante a infância (15,16).

Todavia, a utilização da 17-OHP como marcador primário do rastreio desta doença resulta num elevado número de falsos positivos, devido a reações cruzadas com metabolitos precursores deste esteroide, verificadas principalmente nas primeiras 48h após o nascimento e em recém-nascidos pré-termo e/ou de baixo peso ou até mesmo devido a patologias associadas, stress e variação biológica (17,18). No sentido de mitigar este problema foi reportada a utilização de provas de segundo nível recorrendo a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS). Desta forma, o doseamento da 17-OHP de forma mais específica por LC-MS/MS, conjuntamente com a quantificação de outros metabolitos como a androstenediona (A4), 11-desoxicortisol (11-D), 21-desoxicortisol (21-D), cortisol (F) e particularmente, o uso da razão (17-OHP+A4) /F, fornecem informações adicionais importantes,

melhorando significativamente a especificidade do protocolo e por consequência o seu valor preditivo positivo (6,19).

O desenvolvimento das provas de segundo nível associadas ao facto de o PNRN ter aos dias de hoje uma média de início de tratamento de 9,3 dias, faz com que se volte a equacionar o rastreio desta patologia em Portugal, como aliás já se encontra vertido no Despacho n.º 7276/2019, de 16 de agosto que aprova o Programa Nacional de Rastreio Neonatal (20).

_Objetivo

Estabelecer valores de referência para o doseamento da 17- α -OH-progesterona em sangue seco em papel de filtro, numa população de recém-nascidos portugueses, tendo por base a idade gestacional e/ou peso e a implementação das provas de segundo nível por LC-MS/MS.

_Materiais e métodos

O doseamento da 17-OHP foi efetuado por fluoroimunoensaio de resolução temporal de fase sólida, em amostras anonimizadas residuais de sangue seco em papel de filtro de 1724 recém-nascidos, rececionadas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge para efeitos de rastreio neonatal entre 2020 e 2023.

Assim, para este doseamento, o protocolo baseou-se no kit DELFIA® 17 α -OH-progesterona da Perkin Elmer. Este método utiliza uma reação competitiva entre a 17-OHP marcada com Európio (Eu) e a 17-OHP da amostra, que competem para locais limitados de ligação a anticorpos policlonais específicos para a 17-OHP de coelho. O danazol é usado para libertar a 17-OHP das proteínas ligadas. Um segundo anticorpo, contra IgG de coelho, separa os anticorpos ligados dos antigénios livres. A solução intensificadora dissocia os iões de Európio, formando quelatos fluorescentes, cuja intensidade é inversamente proporcional à quantidade de 17-OHP na amostra (10).

Tendo em vista a otimização dos valores de referência, foi calculado o percentil 99,5 da população saudável em estudo e tendo em conta os subgrupos previamente definidos pelo método de *Lahti*, em função da idade gestacional e do peso.

De seguida, para desenvolvimento e implementação das provas de segundo nível foi selecionada a técnica de LC-MS/MS. Esta trata-se de uma técnica que permite identificar e quantificar os esteroides em estudo (17-OHP, androstenediona, 11-desoxicortisol, 21-desoxicortisol e cortisol) com base nas suas razões massa/carga e padrões de fragmentação, oferecendo alta sensibilidade e especificidade. A implementação do procedimento experimental incluiu três fases principais: extração, separação cromatográfica e deteção por espectrometria de massa (19,21). Neste contexto, foram analisadas amostras de controlo externo de qualidade (CDC – *Center for Disease Control and Prevention* – Atlanta), amostras de recém-nascidos normais e duas amostras de doentes com HCSR (diagnosticados após apresentação de sintomas).

Resultados

Para definir os grupos para os valores de referência de 17-OHP (em função da idade gestacional e peso) adequados, é primordial que o nível deste metabolito seja homogéneo. Para isso, foram seguidas as recomendações do Comité Nacional de Normas Laboratoriais Clínicas dos Estados Unidos da América (NCCLS). De forma a otimizar o ajuste dos valores de referência para a 17-OHP, utilizou-se o percentil 99,5, da população saudável em estudo e tendo em conta

os subgrupos previamente definidos pelo método de *Lahti*, em função da idade gestacional e do peso. Os resultados encontram-se apresentados na [tabela 1](#).

Com o intuito de obter resultados quantitativos, foram construídas curvas de calibração para cada um dos metabolitos em estudo, utilizando-se amostras certificadas do programa de controlo de qualidade do CDC. Obteve-se um coeficiente de correlação superior a 0,99 para todos os metabolitos a quantificar, com baixos limites de deteção e quantificação. A análise de amostras de indivíduos com HCSR revelou, como esperado, um aumento não apenas da 17-OHP, mas também da androstenediona e da razão (17-OHP+ androstenediona)/cortisol.

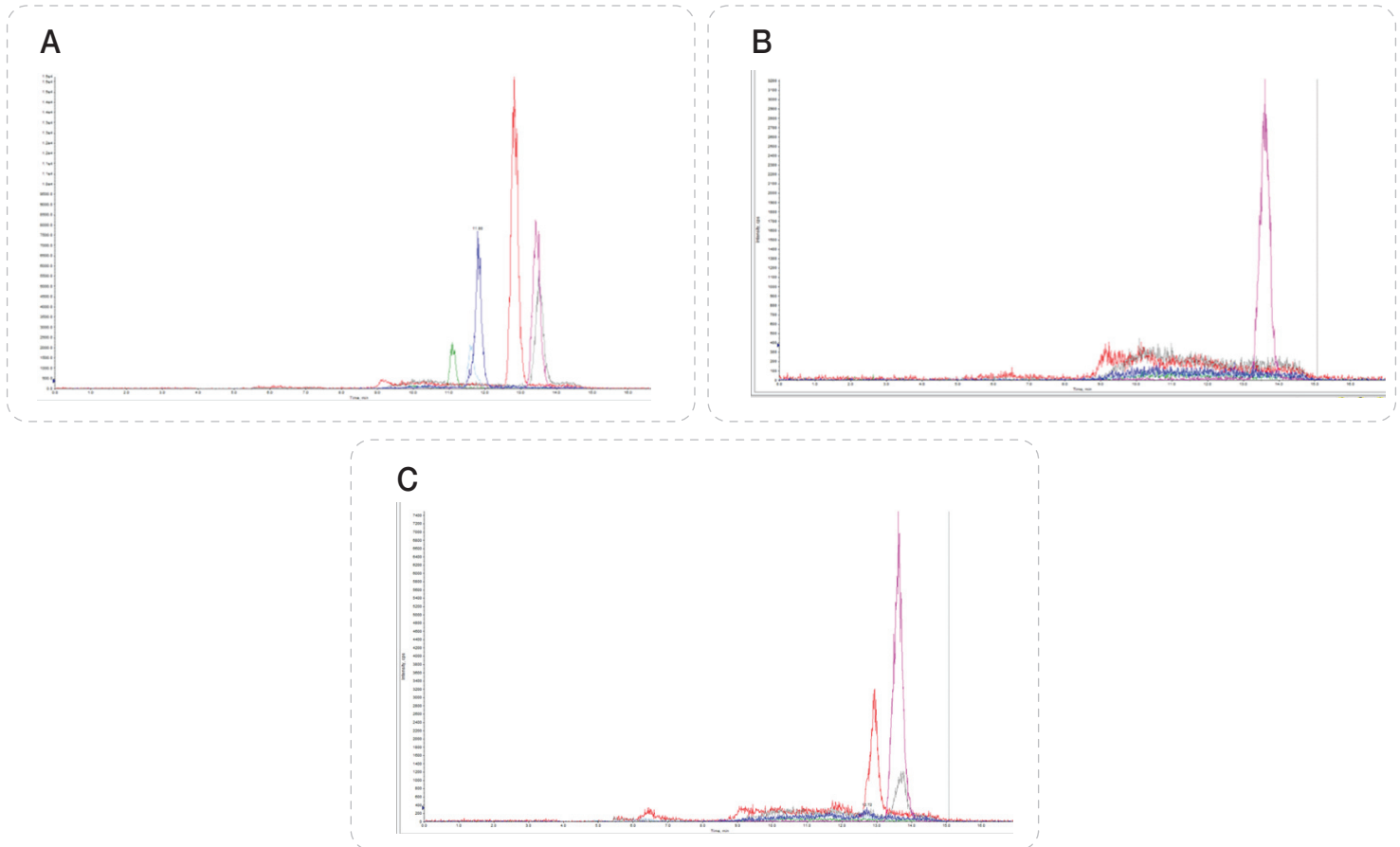
A implementação das provas de segundo nível, por espectrometria de massa em *tandem*, permitiu quantificar vários esteroides em sangue em papel, com altos níveis de sensibilidade e especificidade ([gráfico 1](#)):

Tabela 1: Percentil 99,5 de 17-OHP (nmol/L), em função do peso e idade gestacional.

Grupos	Peso (gramas)	Percentil 99,5 (nmol/L)
A	<1750	212,80
B	1750-2500	51,08
C	2500-3000	32,67
D	>3000	12,97

Grupos	Idade gestacional (semanas)	Percentil 99,5 (nmol/L)
I	<31	252,70
II	31-33	107,49
III	33-35	61,16
IV	35-36	38,03
V	36-37	28,43
VI	37-38	20,30
VII	38-39	14,94
VIII	>39	13,28

Gráfico 1: Perfil cromatográfico de esteroides obtido de uma amostra fornecida pelo controlo de qualidade externo (CDC) (A), um controlo normal (B) e um positivo para HCSR (C).



d₅-17OHP - rosa, 17-OHP - cinza, androstenediona (A4) - vermelho, 11-desoxicortisol (11-D) - azul, 21-desoxicortisol (21-D) - azul-claro, cortisol (F) - verde.

Discussão e conclusão

Este estudo comprovou a necessidade de efetuar uma estratificação dos valores de 17-OHP, no que diz respeito à idade gestacional e/ou peso, tendo sido definidos os intervalos e peso e idade gestacional que devem ser considerados e a variação da 17-OHP em cada um deles, servindo de suporte a uma futura definição dos valores de referência para a população portuguesa.

No entanto, a especificidade limitada do doseamento da 17-OHP por fluoroimunoensaio e as alterações decorrentes da prematuridade, resultam numa alta taxa de falsos positivos (FP) quando esta é utilizada como única abordagem ao rastreio (21-23). A alta taxa de FP ao rastreio, acarreta gastos económicos superiores a 10 vezes o gasto de uma amostra

considerada normal, acrescentando ainda a avaliação clínica, muitas vezes desnecessária, assim como ansiedade gerada nas famílias (24). Uma das estratégias para diminuição dos FP é a utilização das provas de segundo nível que são efetuadas sobre a amostra inicial do rastreio neonatal, quando o marcador primário do rastreio se encontra aumentado (17-OHP doseada por fluoroimunoensaio).

No caso do rastreio da HCSR a prova de segundo nível baseia-se numa cromatografia de esteroides, por LC-MS/MS, doseando para além da 17-OHP (de forma mais específica) outros marcadores secundários, nomeadamente, androstenediona (A4), cortisol (F), 21-desoxicortisol (21-D) e 11-desoxicortisol (11-D) e da aplicação da razão (17-OHP + androstenediona)/ cortisol (6).

Tendo em consideração a importância das provas de segundo nível para a eficácia da abordagem laboratorial ao rastreio da HCSR e tendo em vista uma eventual inclusão no painel de doenças rastreadas no PNRN, foi levado a cabo a sua implementação na Unidade de Rastreio de Neonatal, Metabolismo e Genética, o braço laboratorial do Programa Nacional de Rastreio Neonatal. Os resultados obtidos revelam uma especificidade e sensibilidade adequadas e uma eficiente quantificação dos metabolitos numa gama de concentrações clinicamente relevantes.

Sendo a cromatografia de esteroides uma prova extremamente específica, a sua adoção e inclusão no fluxograma de rastreio da HCSR permitirá não só os óbvios ganhos em especificidade (com a redução de falsos positivos), mas também de sensibilidade, pois permitirá definir os valores de referência do marcador primários em valores inferiores ao $P_{99,5}$, melhorando desta forma a sensibilidade, sem comprometer a especificidade.

O cálculo dos valores de referência da 17-OHP estratificados por idade gestacional e peso ajustados à população portuguesa e a implementação da cromatografia de esteroides como prova de segundo nível, cria bases para se equacionar o início de um novo estudo-piloto para o rastreio de HCSR em Portugal.

Referências bibliográficas:

- (1) Witchel SF. Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2017 Oct;30(5):520-534. Epub 2017 Apr 24. <https://doi.org/10.1016/j.jpaga.2017.04.001>
- (2) Turcu AF, Auchus RJ. Adrenal Steroidogenesis and Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015 Jun;44(2):275-96. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2015.02.002>
- (3) White PC, Grossberger D, Onufer BJ, et al. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Feb;82(4):1089-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.4.1089>
- (4) Azevedo T, Martins T, Lemos M, et al. Hiperplasia congénita da suprarrenal não clássica: aspetos relevantes para a prática clínica. *Rev Port End Diab Metab*. 2014;9(1):59-64. <https://doi.org/10.1016/j.rpedm.2013.12.001>
- (5) White PC, Bachega TA. Congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency: from birth to adulthood. *Semin Reprod Med*. 2012 Oct;30(5):400-9. Epub 2012 Oct 8. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1324724>
- (6) de Hora MR, Heather NL, Webster D, et al. Birth Weight- or Gestational Age-adjusted Second-tier LCMSMS Cutoffs Improve Newborn Screening for CAH in New Zealand. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021 Aug 18;106(9):e3390-99. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab383>
- (7) Nimkarn S, Gangishetti PK, Yau M, et al. 21-Hydroxylase-Deficient Congenital Adrenal Hyperplasia. 2002 Feb 26 [updated 2016 Feb 4]. IN: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al.(eds). *GeneReviews*® [online]. Seattle (WA): University of Washington, 1993-2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1171/>
- (8) Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*. 2005 Jun 18-24;365(9477):2125-36. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66736-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66736-0)
- (9) Nimkarn S, Lin-Su K, New MI. Steroid 21 hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Clin North Am*. 2011 Oct;58(5):1281-300. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2011.07.012>
- (10) Wallac Oy. DELFIA® Neonatal 17α-OH-progesterone kit: instrução de utilização. Turku, Finland, 2019.
- (11) Berry J, Betts P, Wood PJ. The interpretation of bloodspot 17 alpha-hydroxyprogesterone levels in term and pre-term neonates. *Ann Clin Biochem*. 1986 Sep;23 (Pt 5):546-51. <https://doi.org/10.1177/000456328602300510>
- (12) Honour JW. 17-Hydroxyprogesterone in children, adolescents and adults. *Ann Clin Biochem*. 2014 Jul;51(Pt 4):424-40. Epub 2014 Apr 7. <https://doi.org/10.1177/0004563214529748>
- (13) Osório RV, Vilarinho L, Soares JP. Rastreio nacional da fenilcetonúria, hipotirodismo congénito e hiperplasia congénita das suprarrenais. *Acta Med Port*. 1992 Mar;5(3):131-4. www.actamedicportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/3215
- (14) Sharma L, Momodu II, Singh G. Congenital Adrenal Hyperplasia. 2023 [Updated 2025 Jan 27]. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025 Jan-. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448098/>
- (15) Dulin Iñiguez E, Ezquieta Zubicaray B. Cribado neonatal de hiperplasia suprarrenal congénita. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)*. 2018 Jan;65(1):1-4. Epub 2017 Dec 11. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2017.11.001>
- (16) Rhéaume E, Lachance Y, Zhao HF, et al. Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol*. 1991 Aug;5(8):1147-57. <https://doi.org/10.1210/mend-5-8-1147>
- (17) Gidlöf S, Wedell A, Guthenberg C, et al. Nationwide neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia in sweden: a 26-year longitudinal prospective population-based study. *JAMA Pediatr*. 2014 Jun;168(6):567-74. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.5321>
- (18) Heather NL, Seneviratne SN, Webster D, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in New Zealand, 1994-2013. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Mar;100(3):1002-8. Epub 2014 Dec 12. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-3168>
- (19) Janzen N, Peter M, Sander S, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jul;92(7):2581-9. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2890>
- (20) Despacho n.º 7276/2019, de 16 de agosto. DR n.º 156/2019, Série II 2019-08-16: 141-47. Aprova o Programa Nacional do Rastreio Neonatal (PNRN) e determina a sua implementação pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/despacho/7276-2019-124006819_c
- (21) Vogeser M, Parhofer KG. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) -Technique and applications in endocrinology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007 Oct;115(9):559-70. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981458>
- (22) Clayton PE, Miller WL, Oberfield SE, et al.; ESPE/ LWPES CAH Working Group. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the European Society for Paediatric Endocrinology and the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. *Horm Res*. 2002;58(4):188-95. <https://doi.org/10.1159/000065490>
- (23) Berry J, Betts P, Wood PJ. The interpretation of bloodspot 17 alpha-hydroxyprogesterone levels in term and pre-term neonates. *Ann Clin Biochem*. 1986 Sep;23 (Pt 5):546-51. <https://doi.org/10.1177/000456328602300510>
- (24) Ng PC, Wong GW, Lam CW, et al. Pituitary-adrenal response in preterm very low birth weight infants after treatment with antenatal corticosteroids. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Nov;82(11):3548-52. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.11.4392>
- (25) Olgemöller B, Roscher AA, Liebl B, et al. Screening for congenital adrenal hyperplasia: adjustment of 17-hydroxyprogesterone cut-off values to both age and birth weight markedly improves the predictive value. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Dec;88(12):5790-4. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021732>



O ensaio do micronúcleo em células da mucosa bucal: aplicabilidade em biomonitorização humana

The buccal micronucleus cytome assay: applicability in human biomonitoring

Rita Lopes Rosário^{1,2}, Ana Maria Tavares^{2,3}, Henriqueta Louro^{2,3}, Maria João Silva^{2,3}

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

(1) Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

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

(3) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana, NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

As exposições ambientais e ocupacionais a alguns agentes químicos ou físicos representam sérios riscos para a saúde humana. A biomonitorização humana (BMH) permite quantificar a exposição a substâncias químicas e seus efeitos precoces através da caracterização de biomarcadores de exposição e de biomarcadores de efeito. O ensaio do micronúcleo em células bucais (MNBMCyt) é um biomarcador precoce de genotoxicidade que permite identificar instabilidade cromossômica em células da mucosa oral, tendo vindo a encontrar uma aplicação crescente em estudos de BMH.

Nesta revisão pretendeu-se dar uma perspetiva da aplicação do MNBMCyt em estudos epidemiológicos realizados em contexto ambiental e ocupacional, com base em exemplos de estudos de BMH recolhidos através de pesquisa bibliográfica.

Globalmente, a facilidade da colheita e processamento da amostra, aliada à já existente harmonização de procedimentos de análise e à sensibilidade para deteção precoce de efeitos genotóxicos decorrentes da exposição a variados agentes químicos (p.ex., compostos orgânicos voláteis, metais, entre outros) e físicos (radiação ionizante) têm levado a propor a sua mais frequente inclusão em futuros estudos de BMH. Contudo, ainda permanecem algumas limitações analíticas (análise microscópica morosa) e necessidade de mais dados que permitam fortalecer a relevância e grau de confiança neste biomarcador, para reforçar a sua futura utilização para apoiar intervenções que visem prevenir o desenvolvimento de doenças relacionadas com a exposição a substâncias genotóxicas.

_Abstract

Environmental and occupational exposures to some chemical or physical agents pose serious risks to human health. Human biomonitoring (HBM) allows the quantification of exposure to chemical substances and their early effects through the characterization of exposure and effect biomarkers. The micronucleus (MN) assay in buccal cells (MNBMCyt) is a biomarker of early effect that allows the identification of chromosomal instability in oral mucosa cells, and has been increasingly used in HBM studies.

This review aimed to provide an overview of the application of MNBMCyt in epidemiological studies carried out in environmental and occupational settings, based on examples of HBM studies collected through literature search.

Overall, the simplicity of sample collection and processing, combined with the already existing harmonization of analysis procedures and the sensitivity for early detection of genotoxic effects from exposure to various chemical agents (e.g., volatile organic compounds, metals, among others) and physical agents (ionizing radiation) have led to the

proposal for its more frequent inclusion in future HBM studies. However, some analytical limitations (time-consuming microscopic analysis) and a need for more data to strengthen the relevance and degree of confidence in this biomarker have been also identified, in order to reinforce its future use to support interventions aimed at preventing the development of diseases related to exposure to genotoxic substances.

_Introdução

A biomonitorização humana (BMH) é uma ferramenta essencial na avaliação da exposição a substâncias químicas e dos seus impactos na saúde. Permite quantificar de forma fidedigna a exposição a produtos químicos através da análise das substâncias químicas, dos seus metabolitos ou dos produtos de reação em amostras biológicas (1). Enquanto a monitorização ambiental avalia a exposição externa, a BMH foca-se na dose interna atingida no organismo, tornando-se muito relevante para a identificação de grupos mais expostos ou mais vulneráveis, com vista a uma melhor orientação das ações de mitigação, quando necessárias (2). No domínio da saúde ocupacional, a BMH possibilita a análise tanto de exposições individuais como coletivas, a identificação de atividades ou processos associados a uma maior exposição, bem como a caracterização de efeitos precoces (pré-clínicos) e a avaliação da eficácia das medidas de proteção implementadas (3).

Os biomarcadores de efeito são cruciais para avaliar precocemente alterações biológicas ou bioquímicas no organismo associadas à exposição a produtos químicos, antes do aparecimento de doença, ajudando a entender a relação entre exposição e os seus efeitos. Alguns desses compostos são genotóxicos, isto é, possuem a capacidade de alterar, direta ou indiretamente, a função ou estrutura do DNA, interferindo,

por exemplo, na sua replicação (2). Os biomarcadores de genotoxicidade, como os que refletem alterações ao nível dos cromossomas, são essenciais na interpretação da associação entre a exposição, as lesões no DNA e o desenvolvimento de doenças a longo termo, como o cancro, entre muitas outras condições de saúde (4).

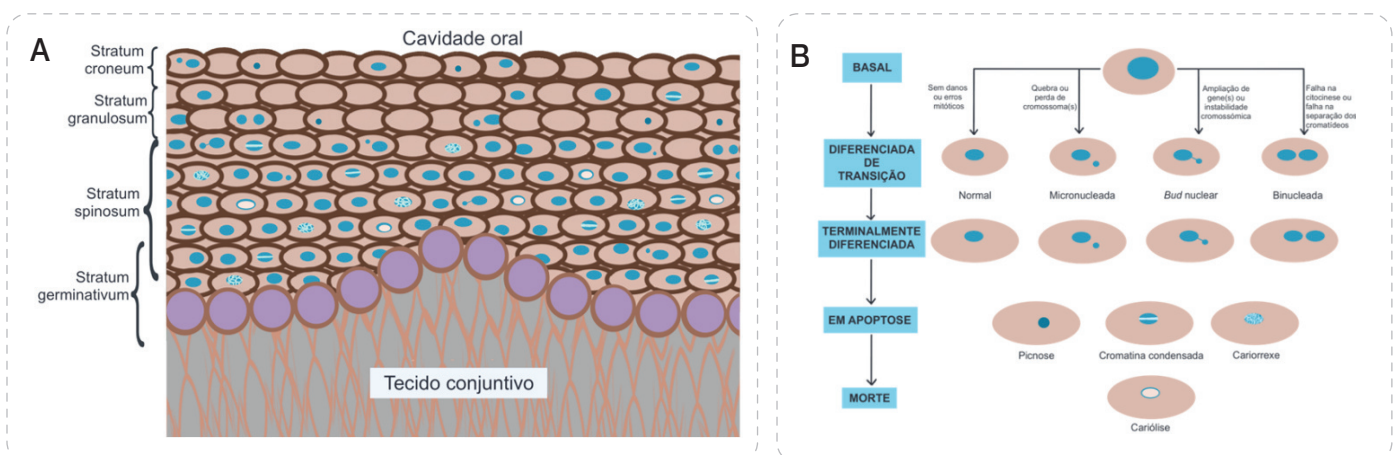
Os micronúcleos (MN), pequenos núcleos adicionais e independentes do núcleo principal da célula, surgem no citoplasma como resultado da perda/ganho de cromossomas inteiros que se segregam erroneamente durante a divisão celular, ou de quebras nos cromossomas. A frequência de MN é, por isso, um biomarcador fidedigno para avaliar a instabilidade cromossómica, indicando um efeito genotóxico (5,6). A análise de MN em linfócitos do sangue periférico é amplamente reconhecida como biomarcador de efeito em estudos de BMH. A análise de MN em células da mucosa bucal (MNBM) tem sido também utilizada na monitorização da exposição a agentes genotóxicos, particularmente por via oral ou inalatória, como por exemplo, em fumadores ativos ou passivos (7), consumidores de tabaco de mascar e trabalhadores de indústrias metalúrgicas e de reciclagem (8).

A mucosa bucal constitui uma barreira primária contra substâncias inaladas ou ingeridas, e as suas células epiteliais possuem ainda alguma capacidade de metabolizar substâncias

químicas, incluindo agentes carcinogénicos. As células da mucosa bucal têm ainda a particularidade de migrarem do estrato basal (*stratum germinativum*) até ao superficial (*stratum corneum*) num curto período de apenas 7 a 21 dias, durante o qual podem apresentar alterações nucleares resultantes de lesões no DNA causadas pelos compostos que contactaram com a mucosa bucal (8,9) (figura 1A e figura 1B).

Uma vez que as amostras de células bucais são colhidas de forma fácil e não invasiva, comparativamente a outras amostras biológicas (ex.: sangue), a sua utilização é vantajosa em estudos de BMH para investigar o impacto da exposição a agentes potencialmente genotóxicos na mucosa oral e, também, para analisar, a influência da nutrição, fatores de estilo de vida, etc. (8,10). Esta metodologia não requer cultura celular nem indução de divisão nuclear *ex vivo*, ao contrário da análise de MN em linfócitos. O MNBM evoluiu para o Ensaio do Citoma de Micronúcleos Buciais (MNBM Cyt) que oferece uma quantificação abrangente das alterações cromossómicas, falhas na citocinese e morte celular, além de outras anomalias nucleares, uma vez que as mesmas podem ser retidas ao longo da maturação e diferenciação celular bucal. Assim, é considerado um biomarcador muito útil e fidedigno para identificar efeitos genotóxicos, citostáticos e citotóxicos (5,6).

Figura 1: Representações esquemáticas da secção transversal da mucosa bucal, destacando os diferentes estratos celulares (a), e diferentes tipos celulares e possíveis alterações genéticas (b) [adaptado de Thomas, *et al.* (2009) e Bolognesi, *et al.* (2013), respetivamente].



A colheita de células bucais é realizada através de uma raspagem suave do revestimento interno da bochecha com uma espátula ou pequena escova. Após os procedimentos de fixação e coloração das células, a análise microscópica consiste na contagem do número de células bucais diferenciadas com MN e com vesículas nucleares (NBUDs), e são ainda contabilizadas células em diferentes estádios de diferenciação (**figura 1B**). É recomendada a análise de 1.000-3.000 células bucais para garantir robustez estatística na deteção de danos genéticos, dada a baixa frequência espontânea de MN (8-10). A recolha, através de um questionário, de dados demográficos e fatores de saúde e estilo de vida dos participantes permite depois contextualizar os resultados citogenéticos obtidos na análise microscópica e estatística.

_Objetivo

Este estudo teve como objetivo reunir alguns exemplos da vasta literatura existente sobre a aplicação do ensaio de MN em células bucais na BMH, para a deteção de potenciais efeitos genotóxicos e citotóxicos associados a diversas exposições ambientais e ocupacionais. Pretendeu-se contribuir para uma análise crítica dos resultados obtidos com o MNBM Cyt, bem como para a discussão do seu papel futuro como um biomarcador de efeito, tendo em conta a ligação entre exposição e efeitos na saúde humana.

_Aplicação do ensaio MNBM Cyt em estudos de exposição ambiental

Na **tabela 1** apresenta-se um resumo dos principais resultados dos estudos analisados no âmbito da exposição ambiental ou associada a estilos de vida.

Dois estudos relataram aumentos significativos na frequência de MN e NBUDs bucais em populações expostas ao arsénio através do consumo de água (11), e ao arsénio em combinação com o fumo do tabaco (12), o que está em linha com o potencial carcinogénico desses agentes químicos (11,12). Inclusivamente, foram observados efeitos sinérgicos decorrentes da co-exposição ao arsénio e tabaco (12). Naderi e colaboradores (2012), mostraram que indivíduos fumadores apresentam uma maior frequência de MN bucais em compa-

ração com não fumadores, reforçando assim as evidências de que o tabagismo pode causar alterações cromossómicas na mucosa oral. Contudo, não foi encontrada uma correlação significativa entre o número de pacotes de tabaco por ano e a frequência de MN bucais (13). Este estudo é particularmente relevante para destacar que o estilo de vida, particularmente o tabagismo (mesmo a níveis moderados), pode induzir alterações genéticas detetáveis.

Num estudo realizado em populações residentes perto de uma exploração mineira, observaram-se frequências mais elevadas de todos os parâmetros medidos pelo MNBM Cyt em populações expostas a resíduos de minas de carvão, comparativamente às populações não expostas, embora não se tenha observado uma correlação significativa entre os níveis de exposição e as frequências de MN em células bucais. Os resultados indicaram, contudo, correlações significativas entre as frequências de MN bucais e dados de outros biomarcadores de genotoxicidade, nomeadamente o Comet Assay e o ensaio de MN em linfócitos. Este estudo reforça a necessidade de monitorizar os danos genéticos em populações expostas a este tipo de poluentes ambientais (14), e que o MNBM Cyt pode complementar ou substituir outros biomarcadores de efeito.

Relativamente à exposição a poluentes do ar, um estudo realizado em estudantes universitários saudáveis, mostrou uma relação direta entre a exposição ao ozono (O₃), um potente indutor de stress oxidativo, e o aumento da frequência de MN bucais, tendo-se observado um aumento de 39% na população mais exposta durante a estação do ano com maior concentração de O₃ (15). Assim, este estudo sublinha a importância de fatores sazonais na avaliação de biomarcadores de genotoxicidade. Efeitos semelhantes foram também observados por Demircigil e colaboradores (2013) quando investigaram os efeitos da exposição a poluentes resultantes do tráfego urbano. Nesse estudo, amostras de células bucais colhidas em crianças de duas escolas em áreas de tráfego urbano e tráfego suburbano foram comparadas em estações do ano distintas tendo-se observado uma frequência mais elevada de MN bucais nas crianças da escola na área urbana durante o verão (quando os níveis de O₃ são mais elevados)

e uma relação inversa com os testes de função pulmonar. Estes resultados indicam que a exposição à poluição do ar e a sazonalidade podem ter um impacto considerável na saúde e no desenvolvimento das crianças (16). Ceretti e colaboradores (2014) descreveram também elevados valores de MN bucais em crianças residentes numa cidade com elevados níveis de tráfego urbano (17). Outros autores compararam valores de MN bucais em crianças residentes perto e longe de indústrias de produção de óleo de palma (18). Estes dois estudos revelaram a existência de uma associação fraca, mas estatisticamente significativa, entre a frequência de MN (e outros biomarcadores) e a concentração de partículas PM₁₀, PM_{2.5} (17,18) e de NO₂ (17). Assim, a exposição precoce das crianças a estas emissões poluentes pode aumentar o risco de sintomas respiratórios e de desenvolvimento de doenças crónicas, como o cancro, a longo prazo (17,18), evidenciando a necessidade de reduzir essa exposição para prevenir problemas de saúde no futuro.

Aplicação do ensaio MNBM Cyt em estudos de exposição ocupacional

Na **tabela 2** apresenta-se um resumo dos principais resultados dos estudos analisados no âmbito da exposição ocupacional a agentes potencialmente genotóxicos.

Em trabalhadores expostos a compostos orgânicos voláteis (VOCs), como n-hexano, tolueno, metilacetona e formaldeído (FA), em indústrias de calçado e em laboratórios de anatomia patológica, observou-se uma frequência significativamente mais elevada de MN bucais, em comparação ao grupo de controlo (19,20). A amostragem do ar nas zonas de ar respirável das trabalhadoras em questão suportou a associação entre exposição ocupacional ao FA, amplamente usado neste tipo de laboratórios, e os danos genéticos observados. Para além disso, o aumento da frequência de MN bucais foi muito superior ao aumento de MN em linfócitos no grupo exposto comparativamente ao controlo, evidenciando a sensibilidade do ensaio MNBM Cyt (20). Observou-se também uma relação significativa entre a duração da exposição e a frequência deste biomarcador, o que sugere um efeito cumulativo (21). A exposição a VOCs noutros seto-

res industriais, como pintura, causou também um aumento significativo na frequência de MN e em células bucais relativamente a um grupo de controlo. Ao estratificar os trabalhadores por tipo de atividade foi ainda possível observar que os efeitos da exposição ocupacional variam de acordo com a tarefa desempenhada, com os pintores de rolo a apresentarem frequências significativamente mais elevadas de MN e NBUDs bucais em relação aos pintores de *spray* (22). Outro estudo analisou trabalhadores com atividades associadas à exposição a VOCs presentes em poeiras de tintas. Por exemplo, a exposição a este tipo de compostos por trabalhadores de flexografia (FWs) refletiu-se em frequências elevadas de MN bucais. Neste estudo, a influência do hábito tabágico também foi analisado e observou-se que os FWs expostos apresentaram um aumento significativo de MN bucais (23). Contudo, essa influência não parece ser geral e poderá ser aparente apenas em “grandes fumadores” ou em associação com a exposição a outros compostos químicos. Efetivamente, no estudo de Vital e colaboradores (2020), a exposição a fumo passivo (FP) em trabalhadores de restaurantes e bares não causou diferenças significativas na frequência de MN e NBUDs bucais entre os grupos expostos e não expostos ao FP. Contudo, foi observada uma correlação positiva entre a frequência de MN bucais e a de MN em linfócitos no grupo exposto a FP (24).

Relativamente à exposição a metais, em fundições de cobre observou-se uma associação entre a exposição ao arsénio e o aumento da frequência de MN bucais e de MN em linfócitos (25). Este estudo enfatiza a relevância do uso complementar de diferentes biomarcadores de efeito, como o MNBM Cyt e os MN em linfócitos de sangue periférico e a associação existente entre ambos. A exposição a resíduos de equipamentos eletrónicos (*e-waste*), incluindo metais e compostos orgânicos, foi também associada com um aumento significativo da frequência de MN bucais e outros parâmetros, como células binucleadas e células cariolíticas (indicadoras de morte celular), em trabalhadores de indústrias de reciclagem (informal) de *e-waste*. O aumento da frequência de MN bucais apresentou também uma correlação direta com o período de exposição ao *e-waste* (26).



Existem ainda dados do ensaio MNBM_{Cyt} em trabalhadores expostos a radiação, por exemplo em estações de energia nuclear (27) e na área da medicina nuclear (28), evidenciando frequências de MN bucais mais elevadas do que os controlos. Os dados sugerem que este biomarcador é capaz de detetar também efeitos precoces decorrentes da exposição ocupacional a baixas doses de radiação ionizante.

Em suma, todos estes estudos mostram a sensibilidade do ensaio MNBM_{Cyt} para deteção de efeitos genotóxicos precoces associados à exposição ocupacional a agentes físicos e químicos, incluindo VOCs, metais e suas misturas, havendo, nalguns estudos, indícios de um efeito cumulativo na indução de MN. Para além disso, poderá ser utilizado para identificação de grupos mais suscetíveis ou de atividades industriais que representem maior risco para a saúde do trabalhador.

Muitos outros estudos da literatura demonstram o potencial e a aplicabilidade do ensaio MNBM_{Cyt} como biomarcador de efeito em contexto ocupacional, tendo uma revisão sistemática recente identificado 121 estudos em trabalhadores, num total de 561 estudos descrevendo a aplicação deste ensaio (29). Apesar disso, também são apontados alguns desafios metodológicos (30). A diversidade de variáveis relacionadas com colheita, coloração e critérios de análise, entre outras, pode comprometer a exatidão dos dados (8). Assim, existe uma necessidade de uniformização contínua dos protocolos deste ensaio, para garantir resultados confiáveis, comparáveis e reprodutíveis (8,9). Para reduzir essa variabilidade, têm sido desenvolvidos protocolos padronizados que garantam consistência na identificação de células e biomarcadores entre laboratórios, como o projeto HUMNXL, em que foram definidos protocolos e critérios de avaliação para o MNBM_{Cyt} (6,9,10). Para além disso, estudos de comparação interlaboratorial como o de Rohr e colaboradores (2020) têm visado harmonizar o protocolo de MNBM_{Cyt} e identificar possíveis fontes de variabilidade em estudos de BMH. Os seus resultados salientaram a necessidade de uma maior padronização nos critérios de análise, principalmente nos parâmetros de morte celular, e foi demonstrada também a importância deste tipo de exercícios comparativos para garantir a consistência e fiabilidade dos resultados (31).

Tabela 1: Principais dados e resultados do ensaio MNBMcyt identificados em artigos referentes a exposições ambientais e associadas a estilos de vida (tabagismo).

Exposição	Tamanho da População amostrada	Localização	Sexo	Idade Média/ Intervalo (anos)	Frequência de biomarcadores	Significância estatística	Observações adicionais	REF.
Arsénio inorgânico na água potável	n=65	Santa Ana Nazareno, México	F, M	20-60	(MN/1000 células) 2,21 ± 0,47 (grupo exposto) 0,56 ± 0,13 (controlo)	Sim ($p < 0,05$)	Correlação entre MN e lesões cutâneas; tabagismo não associado a indução de MN.	(11)
Tabaco e arsénio	n=138	Sul de Assam, Índia	F, M	22-42	3,46 ± 0,27 (Tab + Ars) 1,96 ± 0,15 (Ars) 2,06 ± 0,17 (Tab) 0,2 ± 0,08 (controlo)	Sim ($p < 0,001$) (Ars) Sim ($p < 0,001$) (Tab)	Sinergismo entre exposição a arsénio e ao fumo do tabaco na indução de MN e NBUDs em células bucais: Sim ($p < 0,001$)	(12)
Tabaco	n=63	Universidade Shahed, Irão	F, M	I: 34,78 ± 11,73 II: 40,26 ± 12,43 C: 37,75 ± 17,25	(MN/2000 células) MN= 1,89 ± 0,62 (Grupo I) MN= 2,01 ± 0,93 (Grupo II) MN= 0,94 ± 0,94 (Controlo)	Sim ($p < 0,002$) não fumadores Vs, fumadores Não ($p < 0,6$) fumadores < 10 Vs, > 10 anos	[Grupo I= Fumadores < 10 anos Grupo II= Fumadores > 10 anos Controlo= Não fumadores] Nº pacotes/ano não afeta MN	(13)
Poliuição do ar (resíduos de carvão)	n=139	Nordeste Colômbia	F, M	Expostos: 18-62 Controlo: 18-57	(MN/2000 células) 4,79 ± 5,30 (grupo exposto) 1,38 ± 1,54 (controlo)	Sim ($p < 0,001$)	-	(14)
Poliuição do ar (tráfego urbano)	n=126	Universidade de California, Berkeley, Los Angeles, São Francisco	F, M	-	(MN/1000 células) LA outono= 1,17 LA primavera= 0,70 SF outono= 0,87 SF primavera= 0,76	Sim ($p < 0,001$) ≠ SF/LA na mesma estação Sim ($p < 0,05$) ≠ outono/primavera no mesmo local	Forte efeito da estação em MN ($p < 0,01$)	(15)
Matéria particulada	n=194	Eskişehir, Turquia	F, M	9-13	(MN/2000 células) Escola A Verão= 2,78 ± 2,00 Escola A Inverno= 2,11 ± 1,70 Escola B Verão= 2,68 ± 1,99 Escola B Inverno= 1,64 ± 1,59	Sim ($p < 0,05$) verão Vs, inverno escola B Não ($p > 0,05$) ≠ estações escola A Não ($p > 0,05$) escola A Vs, escola B	Frequências CMN ↑ significativamente com ↓ níveis de função pulmonar	(16)
Matéria particulada	n=167	Semenyih, Selangor	F, M	9-11	(MN/2000 células) 4,00 ± 3,00 0,50 ± 1,00 (controlo)	Sim ($p = 0,001$)	Sim, positiva moderada: PM10 - frequência de MN ($r = 0,562$; $p = 0,001$).	(18)

r = coeficiente de correlação de Pearson (quanto mais próximo o valor de r estiver de 1 ou -1, mais forte a relação linear); p = p-value, Ars – grupo de indivíduos exposto a arsénio; LA – Los Angeles; SF – Baía de São Francisco; Tab – grupo de indivíduos exposto a tabaco; Tab+Ars – grupo de indivíduos exposto a arsénio e a tabaco; Escola A – suburbana; Escola B – urbana; * derivado do resultado de uma análise conjunta de 321 crianças com até 9 anos de idade⁽³⁹⁾.

Tabela 2: Principais dados e resultados do ensaio MNBMcyt identificados em artigos referentes a exposições ocupacionais.

Exposição	Tamanho da População amostrada	Localização	Sexo	Atividade	Idade (Média/Intervalo)	Frequência de biomarcadores	Significância estatística	Observações adicionais	REF.
Pesticidas	n=108	Hyderabad, Índia	F,M	Trabalhadores indústria de pesticidas	35,1 ± 5,2 33,4 ± 5,5 (controlo)	(MN/2000 células) 1,24 ± 0,72 0,32 ± 0,26 (controlo)	Sim (p<0,05)	Exposição = 10 e > 10 anos = ↑ frequência de MN (p<0,05)	(19)
n-hexano, tolueno, metilacetona e Formaldeído	n=68	Universidade de Ancara e Gazi, Turquia (controlo)	F,M	Trabalhadores indústria de calçado	29,5 ± 8,34 (grupo I) 29,68 ± 5,37 (grupo II) 31,10 ± 8,77 (controlo)	(MN/3000 células) 0,62 ± 0,45% (grupo I) 0,71 ± 0,56% (grupo II) 0,33 ± 0,30% (controlo)	Sim (p<0,05) grupo I Vs. controlo Sim (p<0,05) grupo II Vs. controlo	[Grupo I- trabalhadores de calçado Grupo II- trabalhadores de laboratórios de anatomia e patologia Controlo- trabalhadores universidade]	(20)
FA	n=64	Portugal	F	Técnicos de laboratório de anatomia e patologia	20-61	(MN/1000 células) 0,71 ± 0,12 0,12 ± 0,06 (controlo)	Sim (p<0,05)	Sim: MN linfócitos grupo exposto (3,51 ± 0,35) vs. controlo (1,71 ± 0,25); p<0,05	(21)
Compostos voláteis e solventes orgânicos em poeiras de tintas	n=200	Cidades de Teerão e Rasht, Irão	F,M	FWs	35,65 ± 3,22 33,12 ± 4,51 (controlo)	(MN/500 células) 18,33 ± 12,36 10,55 ± 6,22 (controlo)	Sim (p=0,003)	Sim: duração exposição - frequência média de MN e nº total de MN em CMN (p=0,03)	(22)
Poeiras	n=50	-	M	FWs	20-40	(MN/1000 células) 1,86 ± 1,77 (FWs F) 1,02 ± 1,08 (FWs NF) 1,26 ± 1,33 (controlo F) 0,62 ± 0,92 (controlo NF)	Sim (p=0,002) FWs F Vs. FWs NF Sim (p=0,029) FWs F Vs. controlo F Sim (p<0,001) FWs F Vs. controlo NF Não (p= 0,381) FWs F Vs. controlo F	-	(24)
Arsênio	n=83	L'Aquila, Itália	M	Trabalhadores construção civil	≥40	(GMN/1000 células) 19,79 ± 3,54 4,95 ± 7,11 (controlo) (Céls. binucleadas/1000) 13,93 ± 2,10 8,96 ± 1,29 (controlo) (Céls. cariolíticas/1000) 2,09 ± 1,71 1,18 ± 0,38 (controlo)	Sim (p<0,001)	Tabaco: variável significativa	(5)
Compostos orgânicos voláteis	n=35	Polónia	M	Trabalhadores fundições de cobre	19-62	(MN/2000 células) 0,88 ± 0,76 0,50 ± 0,52 (controlo)	Sim (p≤0,05)	Sim: MN linfócitos grupo exposto (7,96 ± 4,28) Vs. controlo (3,47 ± 1,70); p<0,05	(25)
Fumo de Tabaco Passivo	n=81	Region Marche, Itália	M	Pintores	39,05 ± 8,16	(MN/2000 células) 0,89 ± 0,90 0,05 ± 0,15 (controlo)	Sim (p≤0,05)	Não: pintores spray - MN Sim: pintores de rolo (p<0,001)	(23)
Produtos radioativos	n=45	Lisboa, Portugal	F,M	Empregados de restaurantes e bares	37,2 ± 10,8 (E) 39,1 ± 11,1 (F) 45,2 ± 12,2 (controlo)	(MN/1000 células) 0,69 ± 0,90 (E) 0,48 ± 0,59 (F) 0,49 ± 0,80 (controlo)	Não (p=0,306) E Vs. C	Sim: MNC bucais Vs. MNBC em PBL (p=0,003)	(7)
Radiação ionizante	n=81	Hospital do Divino Espírito Santo, Açores, Portugal	F,M	Trabalhadores estações energia nuclear	25-67	(MN/1000 células) 0,20 ± 41 (controlo) 2,93 ± 1,43 (grupo II) 7,73 ± 2,71 (grupo III)	Sim (p<0,05) Grupo III Vs. outros Sim (p<0,05) Grupo II Vs. Grupo I	[Controlo = não expostos Grupo II= trabalhadores NPS Grupo III= pacientes c/leucemia]	(27)
E-waste	n=92	Payatas, Filipinas	F,M	Profissionais de saúde Trabalhadores reciclagem e-waste	44,8 ± 1,4 44,5 ± 1,8 (controlo)	(MN/2000 células) 5,3 ± 0,6 1,3 ± 0,21 (controlo)	Sim (p<0,001)	Baixas doses IR = ↑ 80% frequência de CMN	(28)
					34,25 ± 12,34 34,5 ± 9,24 (controlo)	(MN/%) 84% 16% (controlo)	Sim (p=0,00)	-	(26)

r = coeficiente de correlação de Pearson (quanto mais próximo o valor de r estiver de 1 ou -1, mais forte a relação linear); p = p-value, CMN – Células micronucleadas; E – grupo de trabalhadores exposto a fumo passivo; F – Fumadores; FWs – trabalhadores de flexografia; MN – células binucleadas micronucleadas; MNC – células micronucleadas; NF – Não fumadores; NPS – estações de energia nuclear.

Conclusões

Este artigo visou dar uma perspetiva da aplicabilidade da análise de MN em células da mucosa bucal, ou ensaio MNBM Cyt, em estudos de BHM envolvendo indivíduos expostos a uma variedade de agentes químicos e físicos, em contextos ambientais e ocupacionais. Este ensaio tem vindo a afirmar-se como um biomarcador de efeito vantajoso, pela facilidade da colheita e transporte de amostras, aliada à sua sensibilidade para deteção de efeitos genotóxicos e de outras alterações nucleares e celulares. Trata-se, assim, de uma análise acessível, não invasiva e altamente aplicável na deteção precoce de potenciais efeitos com repercussão na saúde a longo prazo, já com algum grau de padronização de protocolos, o que é crucial para assegurar a consistência dos dados. Apesar disso, é também um ensaio moroso por requerer uma análise microscópica minuciosa, reconhecendo-se a enorme vantagem de se desenvolverem métodos automatizados para a sua análise. Existem ainda lacunas de conhecimento que devem ser abordadas em estudos futuros, como a necessidade de compreender melhor a biologia e os efeitos da cinética celular bucal, nomeadamente ao nível da taxa mitótica e da sua influência sobre a frequência de MN e a influência de fatores de confundimento como idade, género, estilo de vida, estação do ano, entre outros.

Assim, apesar da sua grande potencialidade, reconhece-se também a necessidade da realização de estudos adicionais que forneçam mais evidências que permitam ultrapassar as limitações apontadas. Para além disso, a realização de estudos que explorem a relação entre MN em células bucais e outros biomarcadores de genotoxicidade, por exemplo, MN em linfócitos, serão fundamentais para validar o uso do ensaio MNBM Cyt em estudos de BMH. Complementarmente, a realização de mais estudos prospetivos que permitam estabelecer uma associação entre uma frequência elevada de MN em células bucais e um maior risco de desenvolvimento de doença, permitirá fortalecer a relevância e grau de confiança neste biomarcador, reforçando a sua futura utilização para apoiar intervenções que visem prevenir o desenvolvimento de doenças relacionadas com a exposição a substâncias genotóxicas.

Referências bibliográficas:

- (1) Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health*. 2007 May;210(3-4):201-28. Epub 2007 Mar 21. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.01.024>
- (2) Bergamaschi E, Canu IG, Prina-Mello A, et al. Chapter 6 - Biomonitoring. In: Fadeel B, Pietrousti A, Shvedova AA (eds). *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*. 2nd ed. Academic Press, 2017, pp. 125-58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809199-9.00006-9>
- (3) Manno M, Viau C, Cocker J, Colosio C, Lowry L, et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicol Lett*. 2010 Jan 15;192(1):3-16. Epub 2009 May 13. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.001>
- (4) Ladeira C, Smajdova L. The use of genotoxicity biomarkers in molecular epidemiology: applications in environmental, occupational and dietary studies. *AIMS Genet*. 2017 Aug 11;4(3):166-91. <https://doi.org/10.3934/genet.2017.3.166>
- (5) Leonardi S, Poma AM, Colafarina S, et al. Early genotoxic damage through micronucleus test in exfoliated buccal cells and occupational dust exposure in construction workers: a cross-sectional study in L'Aquila, Italy. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020 Oct 15;203:110989. Epub 2020 Jul 18. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110989>
- (6) Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 24;21(4):1534. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
- (7) Vital N, Antunes S, Louro H, et al. Environmental Tobacco Smoke in Occupational Settings: Effect and Susceptibility Biomarkers in Workers From Lisbon Restaurants and Bars. *Front Public Health*. 2021 Jun 4;9:674142. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.674142>
- (8) Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*. 2008 Jul-Aug;659(1-2):93-108. Epub 2008 Apr 11. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.007>
- (9) Bolognesi C, Knasmueller S, Nersesyan A, et al. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - an update and expanded photogallery. *Mutat Res*. 2013 Oct-Dec;753(2):100-13. Epub 2013 Aug 11. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.07.002>
- (10) Thomas P, Holland N, Bolognesi C, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2009;4(6):825-37. Epub 2009 May 7. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.53>
- (11) Gonshebbat ME, Vega L, Salazar AM, et al. Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutat Res*. 1997 Jun;386(3):219-28. [https://doi.org/10.1016/s1383-5742\(97\)00009-4](https://doi.org/10.1016/s1383-5742(97)00009-4)
- (12) Roy P, Mukherjee A, Giri S. Evaluation of genetic damage in tobacco and arsenic exposed population of Southern Assam, India using buccal cytome assay and comet assay. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2016 Feb;124:169-76. Epub 2015 Oct 27. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.10.019>
- (13) Naderi NJ, Farhadi S, Sarshar S. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. *Indian J Pathol Microbiol*. 2012 Oct-Dec;55(4):433-8. <https://doi.org/10.4103/0377-4929.107774>
- (14) Espitia-Pérez L, da Silva J, Brango H, et al. Genetic damage in environmentally exposed populations to open-pit coal mining residues: Analysis of buccal micronucleus cytome (BMN-cyt) assay and alkaline, Endo III and FPG high-throughput comet assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2018 Dec;836(Pt B):24-35. Epub 2018 Jun 4. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.06.002>
- (15) Chen C, Arjomandi M, Qin H, et al. Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone. *Mutagenesis*. 2006 Mar;21(2):131-7. Epub 2006 Mar 2. <https://doi.org/10.1093/mutage/gel007>
- (16) Demircigil GÇ, Erdem O, Gaga EO, et al. Cytogenetic biomonitoring of primary school children exposed to air pollutants: micronuclei analysis of buccal epithelial cells. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014 Jan;21(2):1197-207. Epub 2013 Jul 25. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2001-6>
- (17) Ceretti E, Feretti D, Viola GC, et al. DNA damage in buccal mucosa cells of pre-school children exposed to high levels of urban air pollutants. *PLoS One*. 2014 May 2;9(5):e96524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096524>



artigos breves_ n. 10

- (18) Othman SF, Jalaludin J, Hisamuddin NH, et al. Association of Exposure to PM2.5 and PM10 with DNA Damage in Exfoliated Buccal Mucosa Cells among Primary School Children Living Nearby Palm Oil Activity at Semenyih, Selangor. *Malaysian J Med Health Sci* 2019;15(4):130-35. <https://core.ac.uk/download/pdf/286784251.pdf>
- (19) Sailaja N, Chandrasekhar M, Rekhadevi PV, et al. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutat Res.* 2006 Oct 10;609(1):74-80. Epub 2006 Aug 2. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.06.022>
- (20) Burgaz S, Erdem O, Cakmak G, et al. Cytogenetic analysis of buccal cells from shoe-workers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to n-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde. *Biomarkers.* 2002 Mar-Apr;7(2):151-61. (Erratum in: *Biomarkers.* 2006 Jul-Aug;11(4):383). <https://doi.org/10.1080/13547500110113242>
- (21) Costa S, Brandão F, Coelho M, et al. Micronucleus frequencies in lymphocytes and buccal cells in formaldehyde exposed workers. IN: *Environmental Health Risk VII. WIT Transactions on Biomedicine and Health.* 2013 Apr 16;16:83-92 <https://doi.org/10.2495/EHR130081>
- (22) Akhlaghi G, Shahsavari F, Ghorbanpour M. Formalin Induced Micronucleus Formation in the Buccal Mucosa of Pathology Laboratory Workers. *Iran J Pathol.* 2023;18(4):425-32. Epub 2023 Oct 15. <https://www.doi.org/10.30699/IJP.2023.1989457.3062>
- (23) Cavallo D, Ursini CL, Fresegna AM, et al. Occupational Exposure in Industrial Painters: Sensitive and Noninvasive Biomarkers to Evaluate Early Cytotoxicity, Genotoxicity and Oxidative Stress. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Apr 27;18(9):4645. <https://www.doi.org/10.3390/ijerph18094645>
- (24) Kumar PN, Reginald BA, Reddy BS, et al. Assessment of Cytogenetic Damage in Flexographic Workers: Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Epithelial Cells. *Indian J Occup Environ Med.* 2023 Jan-Mar;27(1):17-20. Epub 2023 Mar 31. https://www.doi.org/10.4103/ijoem.ijoem_106_22
- (25) Lewińska D, Palus J, Stepnik M, et al. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *Int Arch Occup Environ Health.* 2007 Apr;80(5):371-80. Epub 2007 Feb 3. <https://www.doi.org/10.1007/s00420-006-0130-7>
- (26) Berame JS, Lapada AA, Miguel FF, et al. Micronucleus Evaluation in Exfoliated Human Buccal Epithelium Cells among E-Waste Workers in Payatas, the Philippines. *J Health Pollut.* 2020 Dec 7;10(28):201213. <https://www.doi.org/10.5696/2156-9614-10.28.201213>
- (27) Sagari SG, Babannavar R, Lohra A, et al. Micronuclei frequencies and nuclear abnormalities in oral exfoliated cells of nuclear power plant workers. *J Clin Diagn Res.* 2014 Dec;8(12):ZC15-7. Epub 2014 Dec 5. <https://www.doi.org/10.7860/JCDR/2014/9059.5240>
- (28) Aguiar Torres L, Dos Santos Rodrigues A, Linhares D, et al. Buccal epithelial cell micronuclei: Sensitive, non-invasive biomarkers of occupational exposure to low doses of ionizing radiation. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2019 Feb;838:54-58. Epub 2018 Dec 19. <https://www.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.12.009>
- (29) Hopf NB, Bolognesi C, Danuser B, et al. Biological monitoring of workers exposed to carcinogens using the buccal micronucleus approach: A systematic review and meta-analysis. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2019 Jul-Sep;781:11-29. Epub 2019 Mar 8. <https://www.doi.org/10.1016/j.mrrev.2019.02.006>
- (30) Fenech M, Knasmueller S, Nersesyan A, et al. The buccal micronucleus cytome assay: New horizons for its implementation in human studies. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2024 Feb-Mar;894:503724. Epub 2024 Jan 6. <https://www.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2023.503724>
- (31) Rohr P, da Silva GF, Vicentini VEP, et al. Buccal micronucleus cytome assay: Inter-laboratory scoring exercise and micronucleus and nuclear abnormalities frequencies in different populations from Brazil. *Toxicol Lett.* 2020 Oct 15;333:242-50. Epub 2020 Aug 22. <https://www.doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.08.011>
- (32) Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, et al. The HUman MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res.* 2011 Nov-Dec;728(3):88-97. Epub 2011 Jul 8. <https://www.doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.06.005>

Monitorização da mortalidade em Portugal: evolução da mortalidade por todas as causas em 2024

Monitoring mortality in Portugal: evolution of all-cause mortality during 2024

Susana Pereira da Silva, Ana Paula Rodrigues

susana.pereira@insa.min-saude.pt

Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A monitorização da mortalidade por *todas as causas* é uma ferramenta útil na identificação de fenómenos de saúde, ou desastres de elevada magnitude ou gravidade e que podem, por isso, ter impacto na mortalidade.

Este trabalho teve como objetivo descrever a evolução da mortalidade por *todas as causas* durante o ano de 2024 [semana 01/2024 à semana 52/2024 (01 janeiro de 2024 a 29 dezembro de 2024)], bem como, identificar e analisar os períodos de excesso de mortalidade.

Foram analisados dados semanais de mortalidade, estratificados por sexo e grupo etário. A mortalidade esperada foi estimada através de modelos de regressão linear ajustados para tendências temporais e sazonalidade, excluindo-se os períodos associados a eventos com potencial impacto na mortalidade. A identificação dos períodos de excesso de mortalidade baseou-se na aplicação de regras de *Westgard*, e os excessos foram quantificados em termos absolutos e relativos.

No período em estudo, foram registados 118.360 óbitos em Portugal, tendo sido identificados dois períodos de excesso de mortalidade a nível nacional [3.072 óbitos em excesso (IC 95%: 2.534-3.610)]. Foram estimados excessos de mortalidade nos grupos etários acima dos 45 anos, observando-se um gradiente crescente com a idade.

Pela coincidência temporal podemos concluir que os períodos de excesso de mortalidade terão estado potencialmente associados à epidemia de gripe, ao período de maior circulação de COVID-19, e ao período de calor extremo ocorrido em 2024.

_Abstract

All-cause mortality monitoring is a useful tool for identifying health events or disasters of high severity or high incidence in the population, which have impact on mortality.

The aim of this work was to describe the evolution of all-cause mortality during 2024 [week 01/2024 to week 52/2024 (01 January 2024 to 29 December 2024)], as well as to identify and analyse the periods of excess mortality. Weekly mortality data was analysed, stratified by sex and age group. Expected mortality was estimated using linear regression models adjusted for time trends and seasonality, excluding periods associated with events with a potential impact on mortality. The identification of periods of excess mortality was based on the application of *Westgard* rules, absolute and relative excess mortality were estimated.

During the study period, 118,360 deaths were registered in Portugal, and two periods of excess mortality were identified at national level [3,072 excess deaths (95% CI: 2,534-3,610)]. Excess mortality was observed in age groups over 45 years, with an increasing gradient with age.

Due to the coincidence in time, we might conclude the periods of excess mortality were potentially associated with the flu epidemic, the period of highest circulation of COVID-19, and the period of extreme heat occurred in 2024.

_Introdução

A monitorização da mortalidade por *todas as causas* é uma ferramenta essencial em saúde pública para a deteção precoce de alterações nos padrões de mortalidade associadas a eventos com possíveis impactos, como epidemias sazonais de gripe, pandemias, períodos de temperaturas extremas ou outras emergências de saúde pública. A sua principal vantagem reside no facto de permitir a vigilância em tempo quase real de tendências de mortalidade, independentemente da causa específica de óbito, proporcionando uma visão abrangente e não enviesada, por exemplo por diferentes práticas de diagnóstico, do impacto global de fenómenos agudos na saúde da população.

Em Portugal, o sistema de vigilância da mortalidade por *todas as causas* foi implementado de forma sistemática em 2007, assegurando uma monitorização contínua e permitindo a identificação de padrões sazonais, tendências de longo prazo e episódios de excesso de mortalidade (1). Esta monitorização tem-se revelado crucial na resposta a diversos eventos de saúde pública, incluindo a pandemia da COVID-19, epidemias de gripe sazonal e períodos de temperaturas extremas.

O excesso de mortalidade — definido como a diferença entre o número de óbitos observado e o número de óbitos esperado com base em padrões históricos — constitui um dos principais indicadores utilizados nesta monitorização. Para a sua quantificação, recorrem-se frequentemente a modelos estatísticos baseados em séries temporais, que ajustam para tendências seculares, variações sazonais e outros fatores relevantes.

Além da deteção de sinais anómalos na evolução da mortalidade, esta abordagem é também útil na avaliação do impacto de políticas de saúde pública, na orientação de intervenções

emergentes e na comunicação de risco junto da população e dos decisores políticos.

_Objetivos

Este trabalho teve como objetivo descrever a evolução da mortalidade por *todas as causas* em 2024 [entre a semana 01/2024 (01 a 07 de janeiro 2024) e a semana 52/2024 (23 a 29 de dezembro de 2024)], bem como identificar e analisar os períodos de excesso de mortalidade por *todas as causas* ocorridos.

_Material e métodos

Foram usados dados de mortalidade provenientes do Sistema de Informação dos Certificados de Óbito (SICO) (disponíveis a 14-01-2025) que foram agregados por semana e estratificados por grupo etário (0-14; 15-24; 25-44; 45-64; 65-74; 75-84; ≥ 85 anos), e por sexo.

A mortalidade esperada (linha de base) foi estimada para cada estrato utilizando modelos de regressão linear ajustados para a mortalidade semanal, excluindo períodos potencialmente associados a excessos de mortalidade (epidemias de gripe e COVID-19, e períodos de frio ou calor extremo) em função de uma componente polinomial para explicar as tendências temporais e uma componente sinusoidal para captar a sazonalidade. Para ajuste das linhas de base foram usados dados entre a semana 40/2007 e a semana 40/2024.

O número semanal de óbitos em excesso foi estimado a partir da diferença entre o número de óbitos observado e o número de óbitos esperado durante os períodos de excesso de mortalidade identificados. Os períodos com excesso de mortalidade são identificados de acordo com duas regras de *Westgard* (2,3) descritas como:

- Duas semanas com mortalidade acima do limite superior do intervalo de confiança a 95% da linha de base;
- Uma semana com mortalidade acima do limite superior do intervalo de confiança a 99% da linha de base.

Em ambos os casos o período com excesso de mortalidade termina quando a mortalidade se encontrar abaixo do limite superior do intervalo de confiança a 95% (IC 95%) por duas semanas consecutivas.

Para estes períodos, além do excesso de mortalidade absoluto, estimou-se ainda o excesso de mortalidade relativo à linha de base, bem como o excesso da mortalidade por 100.000 habitantes, considerando as estimativas oficiais de população publicadas pelo Instituto Nacional de Estatística (4).

_Resultados

Entre a semana 01/2024 (01 a 07 de janeiro 2024) e a semana 52/2024 (23 a 29 de dezembro de 2024) foram registados 118.360 óbitos em Portugal (119.117, considerando o ano civil de 2024). Destes, 53.664 no grupo etário com 85 e mais anos de idade e 59.298 no sexo masculino. A mortalidade variou entre um valor mínimo de 1.884 óbitos na semana 36/2024 (02 a 08 de setembro) e um valor máximo de 3.561 óbitos na semana 01/2024 (01 a 07 de janeiro) (gráfico 1).

No decorrer do ano de 2024, foram identificados dois períodos com excesso de mortalidade a nível nacional (gráfico 1 e tabela 1).

No primeiro período de excesso de mortalidade, com duração de 3 semanas, estimámos um excesso relativo ao esperado de 32%. Neste período foram estimados excessos de mortalidade em ambos os sexos - apresentando o sexo feminino valores superiores ao masculino - e nos grupos etários acima dos 45 anos de idade, com um gradiente crescente com a idade (entre os 45 e 65 anos observou-se um excesso relativo de 26% e no grupo etário ≥ 85 anos de 36%) (tabela 1). Este período foi temporalmente coincidente com a epidemia de gripe da época 2023/2024, que decorreu entre a semana 47/2023 e a semana 4/2024.

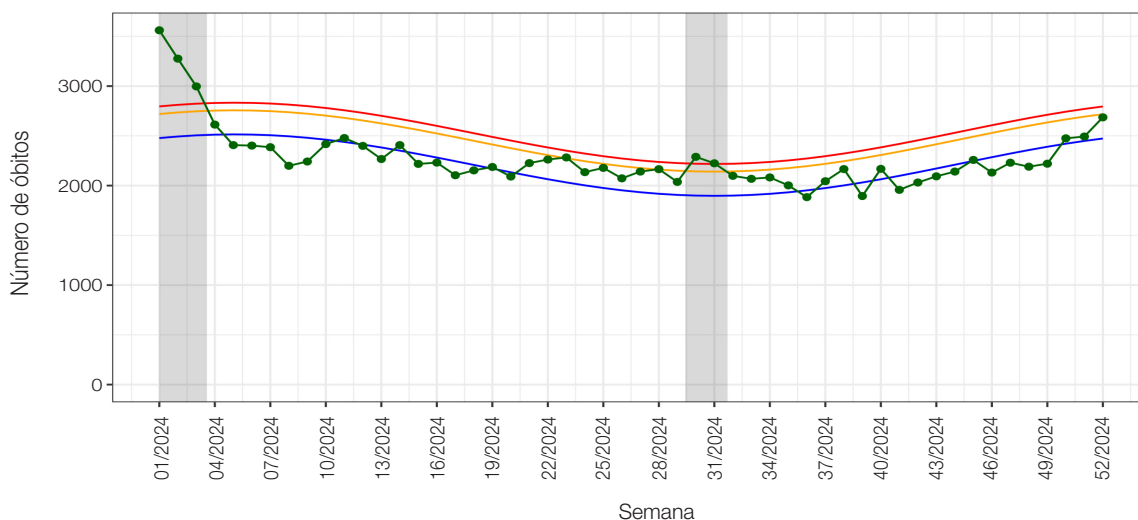
O segundo período de excesso de mortalidade teve um menor impacto (excesso relativo de 19%), uma duração de 2 semanas e apenas foi detetado no sexo feminino e nos grupos etários dos 65 aos 74 anos e dos 85 e mais anos de idade (tabela 1). Este período foi temporalmente coincidente com o aumento do número de casos e de óbitos por COVID-19 ocorrido no verão de 2024 e com alguns dias de calor extremo identificados pelo Sistema ÍCARO como períodos de calor extremo com provável impacto na mortalidade.

artigos breves_ n. 11

Para o sexo feminino, observou-se ainda um terceiro período de excesso de mortalidade, na última semana de 2024 que se prolongou para 2025 (excesso absoluto na semana 52/2024 de 137 (IC 95%: 4-270) óbitos correspondendo a um excesso relativo de 11%).

Em total, em 2024 foram identificados 3.072 óbitos em excesso (IC 95%: 2.534-3.610), durante dois períodos de excesso de mortalidade.

Gráfico 1: Evolução da mortalidade entre as semanas 1 e 52 de 2024.



A azul a linha de base, a laranja e vermelho os limites superiores do intervalo de confiança superiores a 95% e 99% respetivamente, e a verde os óbitos registados.
As áreas a sombreado cinzento apresentam os períodos de excesso de mortalidade identificados.

Tabela 1: Resumo dos dois períodos de excesso de mortalidade identificados (excesso absoluto, excesso relativo, e óbitos em excesso por 100.000 habitantes).

Estrato	Período 1 (01/2024 a 03/2024)			Período 2 (30/2024 a 31/2024)		
	Excesso absoluto n (IC 95%)	Excesso relativo (%)	Óbitos em excesso (/100 000 habitantes)	Excesso absoluto n (IC95%)	Excesso relativo (%)	Óbitos em excesso (/100 000 habitantes)
Portugal	2.357 (1.940-2.774)	32	22	715 (375-1.055)	19	6
Sexo						
Feminino	1.335 (1.103-1.565)	36	24	471 (283-659)	25	8
Masculino	1.021 (806-1.236)	27	20	—	—	—
Grupo etário						
45 aos 64 anos	206 (140-272)	25	6	—	—	—
65 aos 74 anos	239 (164-314)	22	18	125 (64-186)	21	9
75 aos 84 anos	500 (374-626)	37	56	—	—	—
85 e mais anos	1.299 (1.090-1.508)	39	342	363 (192-534)	22	95

_Discussão

Entre 1 de janeiro e 29 de dezembro de 2024, registaram-se em Portugal 118.360 óbitos. Neste período, foram identificados dois períodos de excesso de mortalidade por *todas as causas* a nível nacional, correspondendo a um total de 3.072 óbitos em excesso (IC 95%: 2.534-3.610).

O primeiro episódio ocorreu entre 1 e 21 de janeiro de 2024, coincidindo temporalmente com o final do período epidémico da gripe. A epidemia de gripe de 2023/2024, cujo período epidémico se estendeu da semana 47/2023 à semana 4/2024, foi associada a um excesso estimado de 3.624 óbitos (IC 95%: 3.086-4.162), concentrados entre o início de dezembro de 2023 e o final de janeiro de 2024 (5). Com a atualização de dados estima-se que, no intervalo de 1 a 21 de janeiro, tenham ocorrido 2.357 óbitos em excesso (IC 95%: 1.940-2.774). Este excesso foi observado nos grupos etários acima dos 45 anos de idade, aumentando progressivamente com a idade e em ambos os sexos. Importa salientar que, em períodos epidémicos anteriores com dominância do subtipo A(H1N1)pdm09 (5) — o vírus predominante na época gripal de 2023/2024 —, os excessos de mortalidade foram, tendencialmente, de menor magnitude e menos impactantes nos grupos etários mais velhos (6). O padrão de mortalidade observado poderá estar relacionado com a redução da imunidade populacional devido à limitada circulação deste subtipo desde a época gripal de 2019/2020, com a emergência de novos grupos genéticos virais ou com uma possível maior gravidade clínica das infeções (6).

O segundo episódio de excesso de mortalidade foi identificado entre 22 de julho e 4 de agosto de 2024, coincidindo com um período de temperaturas extremas identificado pelo sistema de vigilância ÍCARO (7). Este excesso ocorreu aproximadamente duas semanas após o pico de atividade da COVID-19 durante o verão de 2024 (8). Durante este período, a média diária de óbitos por COVID-19 superou a registada nas estações de inverno, primavera e outono. Estes dados sugerem que a conjugação de temperaturas elevadas e da atividade epidémica da COVID-19 constituíram fatores determinantes

para o excesso de mortalidade observado. Foram estimados excessos nos grupos etários entre 65-74 anos e ≥ 85 anos e no sexo feminino, o que pode estar relacionado com o maior número de mulheres nos grupos etários mais velhos.

_Conclusões

Dada a coincidência temporal, concluímos que os períodos de excessos de mortalidade identificados terão estado potencialmente associados a fenómenos amplamente conhecidos por poderem ter impactos na mortalidade, particularmente, as epidemias de gripe e COVID-19 e períodos de calor extremo. O estudo confirma a existência de padrões sazonais e variações etárias na mortalidade em Portugal, reforçando a necessidade de políticas públicas, focadas nas populações mais vulneráveis e a existência de planos de contingência para mitigar os excessos de mortalidade sazonais.

A monitorização e investigação mantêm-se necessárias para melhor compreensão dos determinantes da mortalidade, sua evolução futura e avaliação das medidas implementadas.

Referências bibliográficas:

- (1) Nogueira PJ, Machado A, Rodrigues E, et al. The new automated daily mortality surveillance system in Portugal. *EuroSurveill*. 2010;15(13):pii=19529. <https://doi.org/10.2807/ese.15.13.19529-en>
- (2) Westgard Rules | Multirules by James Westgard - Westgard QC [Internet]. Disponível em: <https://westgard.com/westgard-rules.html>
- (3) Chaves TRS. Automated Daily Mortality Surveillance Systems: Integration of Data Collection, Data Analysis and Reporting System Components. Dissertação de mestrado, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, 2015.
- (4) Instituto Nacional de Estatística. População residente (N.º) por Local de residência (NUTS - 2013), Sexo e Grupo etário; Anual [online]. [consult. 7/4/2025]. Disponível em: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0008273&xlang=pt
- (5) Guiomar R, Verdasca N, Gomes L, et al. Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2023/2024. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2024. <http://hdl.handle.net/10400.18/9227>
- (6) Silva S, Soares AC, Guiomar R, et al. Excesso de mortalidade durante as epidemias de gripe por A(H1N1)pdm09 em Portugal após a pandemia de gripe de 2009. *Bol Epidemiol Observações*. 2024;12(Supl 16):38-41. https://www.insa.min-saude.pt/wp-content/uploads/2024/12/BEO-NE-16-2024_Artigo6-1.pdf
- (7) Silva S, Matias Dias C, Rodrigues AP. Avaliação da época de vigilância ÍCARO - Mortalidade 2024. Lisboa: INSA, 2025.
- (8) Direção-Geral da Saúde. Relatório de Resposta Sazonal em Saúde - Vigilância e Monitorização: Relatório n.º 89 | semana 33/2024 (12.08.2024 a 18.08.2024). Lisboa: DGS, 2024. https://covid19.min-saude.pt/wp-content/uploads/2024/09/2024_0822_Relatorio-89_Verdao_37_Semana-33_24-Resposta_Sazonal_em_Saude_Vigilancia_e_Monitorizacao_DGS.pdf



ficha técnica_

_Título: Boletim Epidemiológico Observações

_Periodicidade: Quadrimestral

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

_Numeração: 2ª série

Volume 14, número 37
janeiro - abril 2025

_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

Cristina **Furtado**, Departamento de Doenças Infecciosas

Manuela **Cano**, Departamento de Saúde Ambiental

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

Paulo **Dario**, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis

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

Luísa **Romão**, Conselho Científico do INSA

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

_Composição e paginação Rodrigo **Jorge**

(segundo layout inicial de Nuno Almodovar Design, Lda.)

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2025.

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