



Observações

— Boletim Epidemiológico

sumário_

_Editorial

Os institutos de saúde pública e o combate às alterações climáticas p 03

Public health institutes and the fight against climate change

Alexandra Bento, Coordenadora do Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA

_Artigos breves

_Alimentação e nutrição

1_ Ocorrência de contaminantes e aditivos alimentares na cadeia alimentar portuguesa: recolha e transmissão de dados de amostras do controlo oficial para a EFSA, 2017-2023 p 05

Occurrence of contaminants and food additives in the Portuguese food chain: data collection and transmission of official control samples to EFSA, 2017-2023

Roberto Brazão, Francisco Ravasco, Sidney Tomé, Maria da Graça Dias

2_ Bolachas de arroz e/ou milho: uma opção saudável no lanche escolar? p 10

Puffed rice and/or corn crackers: a healthy option for school snacks?

Tânia Gonçalves Albuquerque, Mafalda Alexandra Silva, Alexandra Bento, Helena S Costa

3_ Exposição a metilmercúrio e consumo de pescado: emissão de recomendações nacionais, 2023 p 17

Exposure to methylmercury and fish consumption: issuing national recommendations, 2023

Paulo Fernandes, Cláudia Afonso, Paula Bico, Narcisa Bandarra, Marta Borges, Paulo Carmona, Catarina Carvalho, Daniela Correia, Susana Gonçalves, Carla Lopes, Helena Lourenço, Sarogini Monteiro, Pedro Nabais, Luísa Oliveira, Susana Santiago, Milton Severo, Duarte Torres, Maria Graça Dias

4_ Toxinas da *Alternaria* em géneros alimentícios: uma preocupação ao nível da saúde pública p 21

Alternaria toxins in foodstuffs: a public health concern

Beatriz Guerreiro, Célia Ventura, Henriqueta Louro, Maria João Silva

_Doenças infecciosas

5_ Sistema de vigilância de infeções respiratórias agudas graves (SARI): uma abordagem para deteção de mudanças nos padrões de doenças respiratórias graves p 26

Severe acute respiratory infections (SARI) surveillance system: an approach for detecting changes in severe respiratory disease patterns

João Almeida Santos, Verónica Gomez, Débora Pereira, Sónia Leal, João Nuak, Ana Catarina Pereira, Susana Silva, Diana Lucas, Ana Paula Rodrigues, Ausenda Machado

6_ Toxocaríase: confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção por *Toxocara* spp. entre 2018 e 2022 p 30

*Toxocaríasis: laboratory confirmation of clinical cases suspected of infection by *Toxocara* spp. between 2018 and 2022*

Tânia Reis, Anabela Vilares, Susana Martins, Idalina Ferreira, Maria João Gargaté

7_ Infeções por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*: resultados do diagnóstico laboratorial realizado no INSA, 2017-2022 p 36

*Infections by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: results of laboratory diagnosis at INSA, 2017-2022*

Inês João, Dora Cordeiro, Cristina Correia, Teresa Carreira, Maria José Borrego

8_ Rede de Vigilância de Vetores - Flebótomos: a importância da vigilância de um vetor menos conhecido p 43

Vector Surveillance Network - sandflies: the importance of the surveillance of a lesser-known vector

Fátima Amaro, Hugo Osório, Manuel Silva, Inês Campos Freitas, Patrícia Soares, Anabela Vilares, Susana Martins, Tânia Reis, Maria João Gargaté, Maria João Alves; Equipa REVIVE





Observações

Boletim Epidemiológico

Doenças genéticas e condições de base genética

9_ Doenças mitocondriais na era da sequenciação de nova geração: estudo de 450 doentes p 52

Mitochondrial diseases in the next generation sequencing era: study of 450 patients

Célia Nogueira, Cristina Pereira, Lisbeth Silva, Mateus Laranjeira, Altina Lopes, Raquel Neiva, Esmeralda Rodrigues, Teresa Campos, Esmeralda Martins, Anabela Bandeira, Margarida Coelho, Marina Magalhães, Joana Damásio, Ana Gaspar, Patrícia Janeiro, Levy Gomes, Ana Cristina Ferreira, Sandra Jacinto, José Pedro Vieira, Luísa Diogo, Helena Santos, Carla Mendonça, Laura Vilarinho

10_ Rastreio neonatal da deficiência em 3-metilcrotonil-CoA carboxilase em Portugal, 2004-2024 p 60

Neonatal Screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in Portugal, 2004-2024

Helena Fonseca, Ana Marcão, Carmen Sousa, Hugo Rocha, Laura Vilarinho

11_ Análise de uma rede de similaridade genética entre a perturbação do espectro do autismo e comorbilidades do foro neurológico e neuropsiquiátrico p 68

Disease similarity network analysis of autism spectrum disorder and comorbid neurological and neuropsychiatric disorders

Joana Vilela, Hugo Martiniano, Ana Rita Marques, João Xavier Santos, Célia Rasga, Guiomar Oliveira, Astrid Moura Vicente

12_ Classificação de variantes de hipercolesterolemia familiar pelo painel de peritos do *Clinical Genome Resource* p 73

Familial hypercholesterolemia variant classification by the Clinical Genome Resource expert panel

Joana Rita Chora, Mafalda Bourbon; em nome do FH Variant Curation Expert Panel

Saúde ambiental

13_ Monitorização de formaldeído (HCHO) em amostras de água: avaliação de eventuais riscos para a saúde pública decorrentes da exposição a este composto p 80

Monitoring of formaldehyde (HCHO) in water samples: assessment of possible risks to public health from exposure to this compound

Sílvia S José, José Grossinho, Helena Rebelo

14_ Programa nacional de avaliação externa da qualidade de microbiologia do ar (2010-2022) p 85

Portuguese external quality assessment programme of air microbiology (2010-2022)

Manuela Cano, Ana Paula Faria, Helena Correia, Cristina Almeida, Nuno Rosa, Cláudia Júlio

Lesões e acidentes

15_ Quedas em pessoas idosas em Portugal: uma abordagem epidemiológica a partir dos dados de 2023 do sistema EVITA p 91

Falls in elderly people in Portugal: epidemiological approach based on 2023 data from the EVITA system

Tatiana Alves, Susana Silva, Paula Braz, Carlos Aniceto, Ricardo Mexia, Carlos Matias Dias

Os institutos de saúde pública e o combate às alterações climáticas

Public health institutes and the fight against climate change

A investigação constitui uma das principais atividades do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) sendo desenvolvida de forma intensa, em domínios muito diversos, de que são exemplos os artigos publicados nesta edição do *Boletim Epidemiológico Observações*.

Um dos contributos emergentes para a saúde pública em Portugal é, sem dúvida, a investigação para o combate às alterações climáticas. O tema esteve em discussão na recente [reunião da International Association of National Public Health Institute \(IANPHI\)](#) (1), onde o INSA, enquanto um dos 115 membros dos 98 países representados, participou de forma destacada.

Os Institutos Nacionais de Saúde Pública (INSP) são essenciais na conceção de políticas de adaptação baseadas em evidências (preparação e prevenção de emergências, entre outras) e no apoio a políticas de mitigação (por exemplo, promoção de intervenções sobre determinantes-chave da saúde, como dietas e estilos de vida) (2). Deste domínio a IANPHI desenvolveu um interessante [roteiro para reforçar o papel dos INSP nas políticas de mitigação e adaptação às alterações climáticas](#) (3).

No que toca à área da alimentação e nutrição, a investigação demonstra que as alterações climáticas comprometem a estabilidade dos sistemas alimentares globais (4). Este é um desafio para todos nós e é uma área de investigação prioritária, emergente e obrigatória, indo de encontro aos [objetivos de desenvolvimento sustentável \(ODS\)](#) (5), que preveem a adoção de medidas urgentes para combater as alterações climáticas e os seus impactos (ODS 13).

A produção de alimentos, a composição em nutrientes e antinutrientes, bem como a biodisponibilidade de nutrientes e os riscos para a segurança alimentar são os principais constrangimentos associados ao impacto das alterações climáticas nos sistemas alimentares. Esses aspetos terão impacto direto na disponibilidade de macro e micronutrientes, o que afetará a qualidade da dieta dos indivíduos (6).

Nos últimos anos, o DAN tem desenvolvido investigação no intuito de mitigar o impacto das alterações climáticas, designadamente nas áreas da sustentabilidade alimentar e fontes alimentares alternativas, com o desenvolvimento de projetos como Alternativa (Fontes alternativas de proteínas nas dietas europeias: integrando risco-benefício para a saúde e sustentabilidade) (7), Entosafe (Insectos comestíveis: uma solução sustentável de produção de alimento e os riscos químicos associados) (8), SafeGrain (Contaminação de cereais e derivados armazenados por pragas de insectos e fungos) (9) e Food4DIAB (Valorização de subprodutos de frutos como ingredientes multifuncionais e alimentos funcionais para diabéticos) (10).

É também realizada investigação sobre biomonitorização humana e avaliação de riscos, pois sabemos que o aumento da temperatura e humidade potenciam a produção de contaminantes tóxicos que podem ocorrer com maior frequência nos alimentos, produzindo efeitos graves para a saúde (HBM4EU – *European Human Biomonitoring Initiative* (11), PARC – *Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals* (12)).

Na área do risco de exposição é também desenvolvida investigação de que é exemplo o projeto ILIFOOD (Lítio na alimentação: o impacto das explorações mineiras de lítio) (13).

editorial_

Ao mesmo tempo participamos em diversas infraestruturas de investigação, nomeadamente o AQUASERV (Serviços de infraestruturas de investigação para uma aquacultura, pescas e economia azul sustentáveis) (14) e o METROFOOD-RI (Infraestrutura de investigação destinada à Promoção da Metrologia em Alimentação e Nutrição) (15), que podem contribuir para a mitigação das alterações climáticas.

Estamos profundamente comprometidos com a ambição de ajudar os portugueses a terem uma alimentação melhor, uma saúde maior e um planeta mais sustentável.

Alexandra Bento

Coordenadora do Departamento de Alimentação e Nutrição
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

Referência bibliográfica:

- (1) IANPHI Europe Regional Network Meeting 2024 "Change – Public Health Approaches to the New Realities", 18-19 abril, Montenegro. <https://ianphi.org/news/2024/2024-europe-meeting-announcement.html>
Participação INSA: <https://www.insa.min-saude.pt/instituto-ricardo-jorge-participa-no-encontro-europeu-dos-institutos-nacionais-de-saude-publica-da-europa/>
- (2) Pascal M, Phalkey R, Rigal L, et al. Public health institutes and the fight against climate change. *Lancet Public Health*. 2022 Mar;7(3):e209. [https://doi.org/10.1016/s2468-2667\(22\)00032-9](https://doi.org/10.1016/s2468-2667(22)00032-9)
- (3) IANPHI Roadmap for Action on Health and Climate Change Engaging and Supporting National Public Health Institutes as Key Climate Actors, Nov 2021. https://ianphi.org/_includes/documents/sections/tools-resources/climate-change/roadmap-climate-english.pdf
- (4) Owino V, Kumwenda C, Ekesa B, et al. The impact of climate change on food systems, diet quality, nutrition, and health outcomes: A narrative review. *Front Clim*. 2022 Aug 16;4: 941842. <https://doi.org/10.3389/fclim.2022.941842>
- (5) United Nations. Department of Economic and Social Affairs. Sustainable Development. <https://sdgs.un.org/goals>
- (6) Springmann M, Mason-D'Croz D, Robinson S, et al. Global and regional health effects of future food production under climate change: a modelling study. *Lancet*. 2016 May 7;387(10031):1937-46. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01156-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01156-3)
- (7) Seródio A, Biasini B, Boué G, et al. Escolhas alimentares sustentáveis: o contributo do projeto ALTERNATIVA enquanto ferramenta para a escolha de fontes alternativas de proteína. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2023;12(33):78-84. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/8632>
- (8) Cardoso D, Mostafaie A, Silva AR, et al. ENTOSAFE - Edible insects: From a sustainable food production to a food safety concern. 2022. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/8704>
- (9) Duarte S, Magro A, Oliveira C, et al. Assessment of multiple mycotoxins in maize flour samples from Portugal under SafeGrains project, 2023. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/8824>
- (10) Silva MA, Albuquerque TG, Alves RC, et al. Melon peel flour: utilization as a functional ingredient in bakery products. *Food Funct*. 2024 Feb 19;15(4):1899-1908. <https://doi.org/10.1039/d3fo05268k>
- (11) HBM4EU – European Human Biomonitoring Initiative. <https://www.hbm4eu.eu/>
- (12) PARC – Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals. <https://www.eu-parc.eu/>
- (13) Jesus S, Ventura M, Miranda D, et al. Impacto da mineração de lítio na saúde: resultados preliminares do projeto ILiFOOD. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2023;12(33):54-59. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/8636>
- (14) AQUASERV – Research Infrastructure Services for Sustainable Aquaculture, Fisheries and Blue Economy. <https://cordis.europa.eu/project/id/101131121>
- (15) Coelho I, Motta C, Ribeiro M, et al. A infraestrutura METROFOOD-RI como instrumento para a prevenção do ambiente obesogénico. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2021;10(Supl 13):60-64. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7814>

Ocorrência de contaminantes e aditivos alimentares na cadeia alimentar portuguesa: recolha e transmissão de dados de amostras do controlo oficial para a EFSA, 2017-2023

Occurrence of contaminants and food additives in the Portuguese food chain: data collection and transmission of official control samples to EFSA, 2017-2023

Roberto Brazão, Francisco Ravasco, Sidney Tomé, Maria da Graça Dias

roberto.brazao@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

A recolha de dados precisos, fiáveis e comparáveis sobre géneros alimentícios e alimentos para animais é essencial para monitorizar a sua segurança e para apoiar avaliações e gestão informadas da exposição alimentar e dos riscos associados ao seu consumo, contribuindo para uma maior segurança e saúde dos consumidores. Na Europa, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) tem disponibilizado vários sistemas, ferramentas e procedimentos técnicos, nomeadamente o *Standard Sample Description for Food and Feed (SSD2)*, o *FoodEx2* e as *Excel Reporting Tools*, para garantir que, na medida do possível, os dados que recebe são atualizados, normalizados e comparáveis em todos os Estados-membros. O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) é a entidade nacional responsável por recolher, harmonizar e submeter eletronicamente à EFSA, de acordo com os seus requisitos de reporte, a informação sobre contaminantes de géneros alimentícios e de alimentos para animais e sobre aditivos alimentares, provenientes dos planos de controlo oficiais portugueses e de estudos realizados em laboratórios do INSA.

Neste âmbito, pretende-se apresentar o processo de recolha e de transmissão de dados à EFSA e os principais resultados durante o período 2017-2023 (amostras colhidas entre 2016 e 2022).

Entre 2017 e 2023, foram recolhidos, harmonizados de acordo com o formato SSD2 e transmitidos à EFSA 64076 resultados analíticos, quase inteiramente de contaminantes (62167). Estes resultados correspondem a 12438 amostras de géneros alimentícios e de alimentos para animais recolhidas. De todos os resultados reportados avaliados (60134), apenas 0,2% (131) estavam não conformes (cerca de 6,3% (3942) foram classificados como "não avaliados" porque correspondiam a resultados de estudos do INSA). Neste período, foram reportados dados de contaminantes químicos em alimentos para animais somente em 2023.

A utilização do modelo e sistema de dados SSD2 e FoodEx2 e de todas as outras ferramentas disponibilizadas pela EFSA garantem a harmonização, padronização, qualidade, consistência e fiabilidade geral dos dados reportados. Durante o período em análise, registou-se um elevado nível de conformidade (99,8%) nos resultados das amostras colhidas no âmbito dos planos de controlo oficiais portugueses.

_Abstract

The collection of accurate, reliable and comparable data on food and feed is essential to monitor their safety and to support informed dietary exposure and risk assessments and management, contributing to higher consumer safety and health. In Europe, the European Food Safety Authority (EFSA) has made available several systems, tools and technical procedures, namely the Standard Sample Description for Food and Feed (SSD2), the FoodEx2 and the Excel Reporting Tools, to ensure that, as far as possible, the data it receives is up-to-date, standardized and comparable across all Member States. The National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge (INSA) is the national entity responsible for gathering, harmonising and electronically submitting to EFSA, according to their reporting requirements, the information on food and feed contaminants and food additives from the official control plans in Portugal and from studies performed in INSA laboratories.

In this context, we aim to present the process of data collection and transmission to EFSA and the main results during the period 2017-2023 (samples collected between 2016 and 2022).

Between 2017 and 2023, 64076 analytical results were gathered, harmonized accordingly to SSD2 and transmitted to EFSA, almost entirely on contaminants (62167). These results correspond to 12438 food and feed samples collected. Of all the reported results evaluated (60134), only 0.2% (131) were non-compliant (around 6.3% (3942) were classified as "not evaluated" because they corresponded to INSA studies results). In this period, animal feed contaminants data were reported just in 2023.

The use of the SSD2 and FoodEx2 data model and system, and all other tools made available by EFSA, ensure data harmonisation, standardisation, and overall quality, consistency, and reliability in the information reported. During the period under review, there was a high level of compliance (99.8%) in the results of samples collected under the Portuguese official control plans.

_Introdução

Procurando garantir a qualidade e segurança dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, Portugal e os restantes Estados-membros da União Europeia executam, anualmente, vários planos de controlo oficiais, que envolvem a recolha de dados das colheitas e analíticos em diversos domínios, nomeadamente: contaminantes químicos, aditivos alimentares, resíduos de pesticidas, monitorização biológica e resíduos de medicamentos veterinários. Os dados obtidos neste âmbito devem obrigatoriamente ser reportados por todos os Estados-membros à Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) ⁽¹⁾ (figura 1), que os compila e analisa, de modo a promover a avaliação da exposição alimentar e dos riscos associados ao consumo dos géneros alimentícios e alimentos para animais bem como a suportar atividades que visem a sua minimização, contribuindo para a proteção da saúde pública e reforço da confiança dos consumidores no sistema alimentar europeu.

Ao longo do tempo a EFSA tem disponibilizado vários sistemas, ferramentas e procedimentos técnicos, para garantir que, na medida do possível, os dados que recebe estão atualizados e normalizados e são comparáveis em todos os Estados-membros. Deste modo, esta entidade apenas aceita dados que estejam de acordo com o modelo *Standard*

Sample Description versão 2 (SSD2) ⁽³⁾ e solicita que toda a informação seja reportada eletronicamente, no formato XML, através da plataforma *Data Collection Framework* (DCF) e validada no *Scientific Data Warehouse* (sDWH), da EFSA.

O Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) é a instituição nacional responsável por recolher, harmonizar e submeter eletronicamente para a EFSA, de acordo com os referidos requisitos de reporte, a informação sobre contaminantes e aditivos alimentares provenientes dos planos de controlo oficiais portugueses, conjuntamente com alguns dados de estudos realizados em laboratórios do próprio INSA.

Neste contexto, pretende-se apresentar o processo de recolha, harmonização e de transmissão de dados à EFSA e os principais resultados registados entre 2017 e 2023.

_Objetivo

Apresentar o processo de recolha, harmonização e de transmissão para a EFSA dos dados de contaminantes químicos em géneros alimentícios e alimentos para animais e de aditivos alimentares e os principais resultados obtidos durante o período 2017-2023 (amostras colhidas entre 2016 e 2022).

Figura 1: ↓ Fornecedores de dados para a EFSA ⁽²⁾.



_Métodos

O INSA recolheu, anualmente, informação sobre os contaminantes químicos em géneros alimentícios e sobre os aditivos alimentares, resultante dos planos de controlo oficiais concretizados pelas autoridades portuguesas responsáveis - ASAE e DGAV; e de estudos em géneros alimentícios realizados em laboratórios do próprio INSA. Foi, ainda, recolhida informação referente a contaminantes químicos em alimentos para animais, que foi disponibilizada ao INSA somente em 2023.

Toda a informação foi tratada de acordo com o modelo de dados SSD2 (figura 2, i), complementado pelo FoodEx2 (figura 2, ii), para garantir a harmonização, padronização, consistência e qualidade geral dos dados. Foram utilizadas as ferramentas EFSA *Excel tool FLAT for SSD2 data collection* e *EFSA Catalogue Browser* para facilitar o processo de tratamento dos dados, nomeadamente de aplicação das linguagens controladas SSD2, preenchimento dos campos SSD2 obrigatórios, dependentes de obrigatórios e relevan-

tes, classificação/descrição dos géneros alimentícios e alimentos para animais de acordo com o sistema de classificação FoodEx2, validação da informação e geração dos ficheiros XML.

O tratamento de dados, de acordo com o modelo SSD2, foi realizado pelo INSA, para a totalidade dos dados, até 2020, sendo que, após essa data, a DGAV passou a assumir esta tarefa para a informação produzida nos seus controlos oficiais, ficando o INSA encarregue pelos dados da ASAE e do próprio INSA. No entanto, após a compilação da informação, o INSA foi responsável pela verificação e correção, em estreita colaboração com as entidades responsáveis, de eventuais erros e/ou falhas de preenchimento dos campos para todos os ficheiros recebidos, sua validação, geração dos ficheiros XML e reporte para a EFSA.

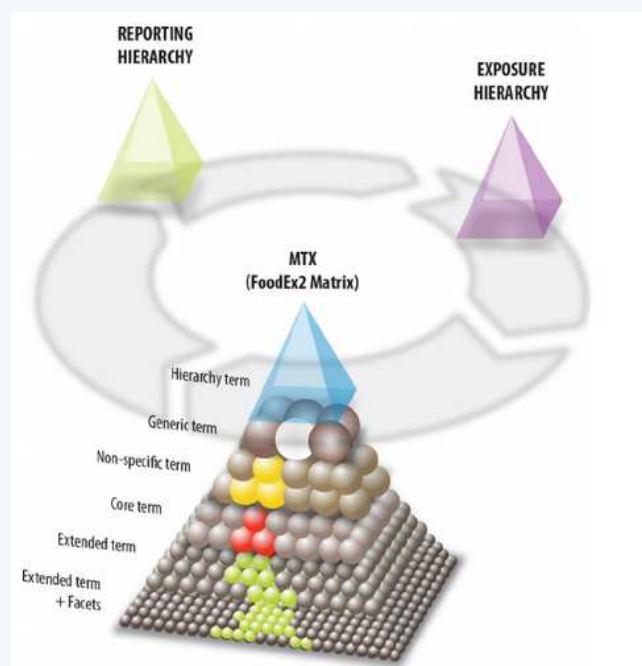
Todos os dados foram transmitidos eletronicamente para a EFSA, no formato XML, através da *Data Collection Framework* (DCF), e, posteriormente, validados no *Scientific Data Warehouse* (sDWH), da EFSA.

Figura 2: Breve descrição do modelo de dados SSD2 e do sistema de classificação FoodEx2.

i) O modelo de dados *Standard Sample Description* (SSD2) é um formato para descrever amostras de géneros alimentícios e alimentos para animais e resultados analíticos que tem de ser utilizado pelos fornecedores de dados da EFSA. Especifica os elementos, estrutura, linguagens controladas e regras de validação, obrigatórios para contaminantes e resíduos químicos, aditivos alimentares bem como para contaminantes microbiológicos, agentes zoonóticos e dados de resistência antimicrobiana em géneros alimentícios, alimentos para animais, animais, amostras ambientais e materiais em contato com alimentos.

ii) O FoodEx2 é um sistema normalizado para classificar e descrever géneros alimentícios e alimentos para animais. O FoodEx2 consiste em descrições de um grande número de alimentos/ ingredientes individuais, que se encontram agregados em grupos de alimentos e em categorias alimentares mais amplas, numa hierarquia pai-filhos (figura 3).

Figura 3: Estrutura do sistema de classificação FoodEx2 (4).



_Resultados

A utilização, pelo INSA, da *EFSA Excel tool FLAT* e do *EFSA Catalogue Browser* permitiram um tratamento/harmonização dos dados, de acordo com o SSD2, muito mais eficiente. Todo o trabalho de preenchimento dos campos e de utilização das linguagens controladas SSD2, de classificação/descrição das amostras com recurso ao FoodEx2, de verificação das lacunas de informação e de possíveis erros de preenchimento e/ou codificação, de validação dos dados e de geração dos ficheiros XML é muito mais rápido e facilitado, contribuindo para a melhoria da qualidade, integridade e consistência final da informação.

Entre 2017 e 2023, foram recolhidos e transmitidos para a EFSA, de acordo com o SSD2, 64076 resultados analíticos sobre géneros alimentícios (62963) e alimentos para animais (1113) (**gráfico 1**). Estes resultados, quase inteiramente relativos a contaminantes (62167), correspondem a 12438 amostras de géneros alimentícios e alimentos para animais recolhidas. Foi no ano de 2019 que se reportaram mais dados, com um total de 14900 resultados transmitidos para a EFSA (**gráfico 2**). Conforme já referido, neste período, somente em 2023 foi possível recolher e reportar dados de contaminantes químicos referentes aos alimentos para animais, por Portugal.

Gráfico 1: Número total de resultados analíticos de géneros alimentícios e alimentos para animais reportados à EFSA, entre 2017-2023, em conformidade com o SSD2.

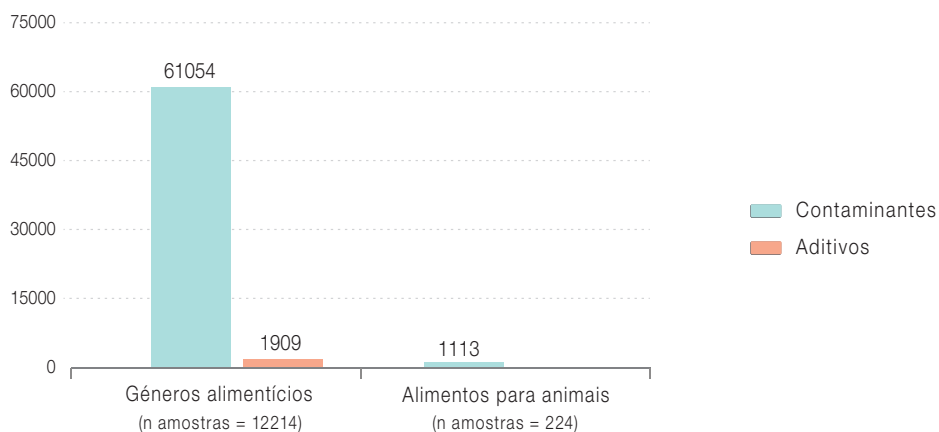
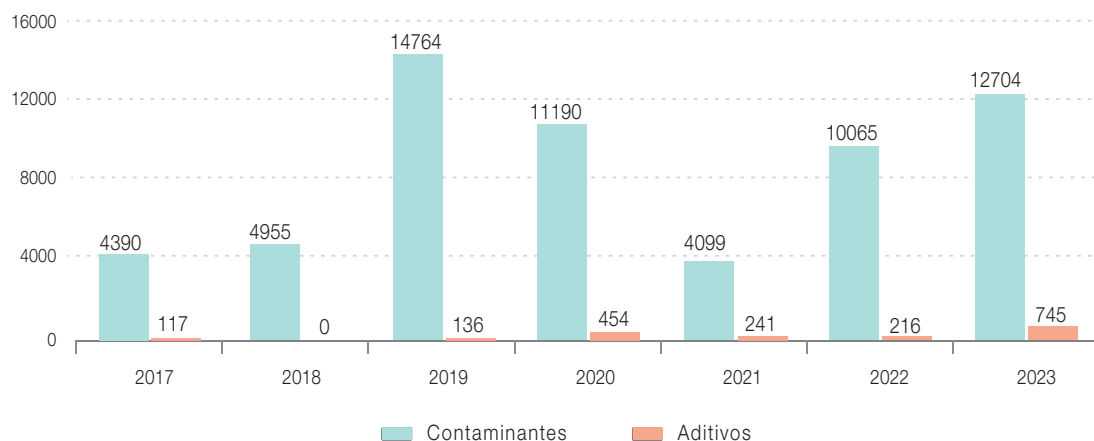


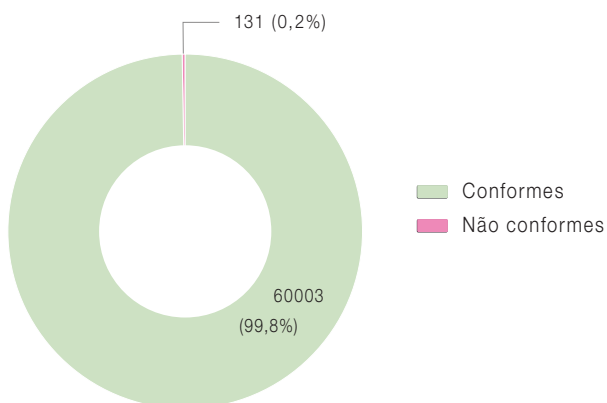
Gráfico 2: Número total de resultados analíticos de géneros alimentícios e alimentos para animais reportados à EFSA, entre 2017-2023, em conformidade com o SSD2, por ano.



artigos breves_ n. 1

Durante o período em análise (2017-2023), de todos os resultados avaliados reportados à EFSA (60134), apenas 0,2% (131) eram não conformes (gráfico 3). Existiam 3942 resultados classificados como “não avaliados”, porque correspondiam aos dados de estudos realizados nos laboratórios do INSA, ou seja, não resultaram dos planos de controlo oficiais.

Gráfico 3: Número e percentagem de resultados avaliados, conformes e não conformes, reportados à EFSA, entre 2017-2023.



Conclusão

O uso do modelo e sistema de dados SSD2 e do FoodEx2 bem como de todas as outras ferramentas disponibilizadas pela EFSA garante a harmonização, padronização, consistência, fiabilidade, confiabilidade e a qualidade geral dos dados reportados à EFSA. Durante o período em análise, verificou-se um elevado nível de conformidade (99,8%) nos resultados das amostras colhidas ao abrigo dos planos de controlo oficiais.

Estes dados, combinados com informações sobre consumos alimentares, torna possível a avaliação da exposição dos consumidores a certos perigos, tanto na União Europeia como ao nível dos Estados-membros. Portanto, informações atualizadas, confiáveis e comparáveis entre os vários Estados-membros são cruciais para os peritos

que desenvolvem avaliação de risco bem como para os decisores políticos, na tomada de decisões informadas, garantindo uma maior segurança dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais, visando proteger e promover a saúde dos consumidores europeus.

Referências bibliográficas:

- (1) Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. JO L 31 de 01/02/2002:1-24. <http://data.europa.eu/eli/reg/2002/178/oj>
- (2) European Food Safety Authority. Data Reports [online]. [consult. 23/1/2024]. <https://www.efsa.europa.eu/pt/data/data-reports>
- (3) European Food Safety Authority. Standard Sample Description ver. 2.0. EFSA Journal. 2013;11(10):3424. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3424>
- (4) Ioannidou S, Cascio C, Gilseman MB. European Food Safety Authority open access tools to estimate dietary exposure to food chemicals. Environ Int. 2021 Apr;149:106357. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106357>

Bolachas de arroz e/ou milho: uma opção saudável no lanche escolar?

Puffed rice and/or corn crackers: a healthy option for school snacks?

Tânia Gonçalves Albuquerque^{1,2}, Mafalda Alexandra Silva^{1,2}, Alexandra Bento¹, Helena S. Costa^{1,2}

tania.albuquerque@insa.min-saude.pt

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

(2) REQUIMTE-LAQV/Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal

_Resumo

A infância é crucial para desenvolver hábitos alimentares saudáveis e o ambiente escolar desempenha um papel vital na formação desses hábitos. Os lanches escolares muitas vezes caracterizam-se por qualidade nutricional pobre, sendo ricos em sal, açúcar e gordura saturada. Bolachas de arroz e/ou milho são frequentemente associadas a uma opção mais saudável. Ferramentas como a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS), o Guia para Lanches Escolares Saudáveis, os sistemas de rotulagem *front-of-pack*, como o decodificador de rótulos (*traffic-light*) e o Nutri-Score, e os modelos de perfil nutricional, permitem-nos avaliar a qualidade nutricional destes produtos e podem auxiliar na elaboração de outras recomendações.

Pretende-se avaliar a informação nutricional de bolachas de arroz e/ou milho disponíveis no mercado português e, através da aplicação de ferramentas de avaliação da qualidade nutricional, orientações para uma alimentação saudável, e instrumentos de educação alimentar, estimar o potencial impacto na saúde pública.

Foram analisados 175 tipos de bolachas, identificando-se desafios na quantidade de sal, uma vez que apenas 42% atingem a meta (inferior a 0,3 g/100 g) da EIPAS. Apesar de alguns produtos satisfazerem os limites de açúcares, há necessidade de reformulação, especialmente nas bolachas de arroz ou milho com cobertura. O decodificador de rótulos e o Nutri-Score permitem identificar diferenças marcantes entre bolachas simples e com cobertura, podendo ser profícuos no auxílio ao consumidor a realizar a sua escolha informada e consciente. A análise utilizando os modelos de perfil nutricional da Direção-Geral da Saúde e Organização Mundial da Saúde ressaltou a importância de limitar a publicidade dirigida a crianças.

Em conclusão, este trabalho enfatiza a necessidade de ações multidisciplinares, estratégias de reformulação e de educação alimentar. Espera-se que tais medidas promovam escolhas alimentares mais seguras e saudáveis, contribuindo para ambientes salutogénicos e para a saúde pública.

_Abstract

Childhood is crucial for developing healthy eating habits, and the school environment plays a vital role in shaping these habits. School snacks are often characterised by poor nutritional quality, high in salt, sugar and saturated fat. Puffed rice or corn crackers are usually associated with a healthier option. Tools such as the Integrated Strategy for the Promotion of Healthy Eating (EIPAS), the Guide to Healthy School Snacks, front-of-pack nutrition labelling, like traffic-light labels and Nutri-Score, and the nutritional profile models allow us to assess the nutritional quality of these products and can help in the development of further recommendations.

This study aims to evaluate the nutritional information of puffed rice and/or corn crackers available in the Portuguese market and, through the application of tools for the nutritional quality assessment, guidelines for healthy eating, and food education materials, estimate the potential impact on public health.

175 types of puffed crackers were analysed, and challenges were identified regarding the amount of salt, as only 42% met the EIPAS target (less than 0.3 g/100 g). Although some products meet the sugar limits, reformulation is needed, especially in puffed rice or corn crackers with toppings. The traffic-light system and Nutri-Score make it possible to identify marked differences between plain and coated puffed crackers and they can be useful in helping consumers to make informed and conscious choices. The analysis using the Directorate-General of Health and World Health Organization nutritional profile models highlighted the importance of restricting the marketing of these foods to children.

In conclusion, this work emphasises the need for multidisciplinary actions, reformulation strategies and food education. Such measures are hoped to promote safer and healthier food choices, contributing to salutogenic environments and public health promotion.

_Introdução

A infância é uma fase crucial para o desenvolvimento saudável e para a formação de hábitos que perduram ao longo da vida. Neste contexto, a promoção de hábitos alimentares saudáveis, desde as idades mais precoces, emerge como uma estratégia fundamental para o bem-estar geral e para a prevenção de doenças crónicas relacionadas com os hábitos alimentares inadequados (1). O ambiente escolar desempenha um papel essencial na vida das crianças, e apresenta-se como um espaço primordial para a promoção da educação alimentar. Além de fornecerem conhecimentos académicos, as escolas desempenham um papel vital na formação de atitudes e comportamentos em relação à alimentação (2,3). Ao criar um ambiente propício para escolhas alimentares saudáveis, seguras e sustentáveis, estaremos a influenciar positivamente os hábitos alimentares das gerações futuras, e consequentemente a promover a saúde pública (4).

Os lanches consumidos em meio escolar são maioritariamente provenientes de casa ou complementados com alimentos distribuídos gratuitamente pela escola no âmbito do Regime Escolar, sendo estes a fruta e o leite escolar (5). Os lanches escolares por vezes apresentam uma qualidade nutricional pobre, sendo constituídos por alimentos de elevada densidade energética e baixa densidade nutricional, ricos em sal, açúcar e gordura saturada (6). De acordo com o *Guia para Lanches Escolares Saudáveis* da Direção-Geral da Saúde (DGS), um lanche saudável deve incluir: leite e derivados; fruta; e cereais e derivados (7). Neste documento é disponibilizada uma lista de alimentos a privilegiar, a consumir de vez em quando e a evitar. Entre os alimentos a privilegiar, incluem-se as bolachas de arroz e/ou milho sem cobertura.

As bolachas de milho ou arroz caracterizam-se pela sua textura crocante, por um sabor suave, pela versatilidade de utilização (com ou sem complementos, como por exemplo queijo ou doce), e também porque muitas vezes são produtos isentos de alergénios comuns (como por exemplo o trigo), o que as torna uma opção inclusiva para crianças que apresentam sensibilidades ou alergias alimentares. Este tipo de produtos é muitas vezes percecionado como uma opção mais saudável em comparação com outros tipos de bolachas, podendo desta forma influenciar a preferência para a inclusão desta opção na alimentação.

Existem atualmente um conjunto de diretrizes e princípios que pretendem contribuir para orientar a população para a prática de padrões alimentares mais saudáveis, proporcionando ferramentas que promovem escolhas alimentares mais conscientes e informadas, e prevenindo doenças relacionadas com hábitos alimentares inadequados.

Destacam-se, por exemplo:

i) *Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS)* - reflete uma abordagem multissetorial que inclui um conjunto de medidas para a prevenção da doença, e em particular para a promoção da alimentação saudável, que pretende influenciar o comportamento alimentar da po-

pulação, melhorar a qualidade nutricional dos alimentos disponíveis e criar ambientes que favoreçam escolhas mais saudáveis (8).

ii) *Guia para Lanches Escolares Saudáveis* - inclui recomendações sobre a elaboração dos lanches escolares e quais os alimentos que devem ser incluídos e/ou evitados, destinado essencialmente a encarregados de educação, mas também a professores, educadores e todos aqueles que possam condicionar o comportamento alimentar das crianças (7).

iii) Sistemas de rotulagem *front-of-pack*, como o Descodificador de Rótulos (*traffic-light*) e o Nutri-Score - tratam-se de ferramentas de rotulagem simplificada que têm como objetivo apresentar a informação nutricional de forma mais compreensível e acessível ao consumidor (através de cores e/ou letras), permitindo que este faça escolhas alimentares mais informadas e conscientes (9-11).

iv) Modelos de perfil nutricional - definem o perfil nutricional dos alimentos que devem ser tidos em conta para limitar a publicidade alimentar dirigida a crianças, porque podem comprometer uma alimentação saudável e porque são caracterizados por apresentarem um elevado teor de sal, açúcar, ácidos gordos saturados e ácidos gordos *trans* (12,13).

_Objetivo

Avaliar a informação nutricional de bolachas de arroz e/ou milho disponíveis no mercado português e, através da aplicação de ferramentas de avaliação da qualidade nutricional, orientações para uma alimentação saudável, e instrumentos de educação alimentar, estimar o potencial impacto na saúde pública.

_Materiais e métodos

Entre novembro e dezembro de 2023, foi desenvolvida uma base de dados com informação recolhida em websites de grandes superfícies comerciais e/ou de produtores de bolachas de arroz ou milho, que disponibilizam este tipo de produtos no mercado português. Nesta base de dados foi incluída, por exemplo, informação relativa aos ingredientes, alergénios, declaração nutricional, entre outras. O tratamento dos dados e a análise estatística foram efetuados com recurso ao Microsoft Excel®. Posteriormente, realizou-se uma análise detalhada da informação recolhida, considerando as orientações existentes (7-13), como a EIPAS, o *Guia para Lanches Escolares Saudáveis* da DGS, o Descodificador de Rótulos e o Nutri-Score, e aplicaram-se também os modelos de perfil nutricional da DGS e da Organização Mundial da Saúde (OMS) (figura 1).

Neste trabalho foram incluídos 175 tipos de bolachas de arroz e/ou milho (127 simples, BS, e 48 com cobertura, BC). As bolachas foram ainda agrupadas em: bolachas de arroz (BA, n=75), bolachas de milho (BM, n=66), bolachas de arroz e milho (BAM, n=27) e bolachas de pseudocereais (n=7).

_Resultados e discussão

De acordo com a EIPAS, deve ser promovida a adequação dos perfis nutricionais para determinadas categorias de alimentos, nomeadamente em relação à quantidade de sal, açúcar e ácidos gordos *trans*. Como os ácidos gordos *trans* não estão incluídos na declaração nutricional obrigatória

de acordo com o Regulamento (UE) n.º 1169/2011, neste trabalho apenas foram aplicadas as metas da EIPAS para os teores de sal e de açúcar (8,14). Mesmo sendo estes de declaração obrigatória, 2 dos produtos incluídos não apresentavam informação para a quantidade de sal. Verificou-se que dos 175 produtos, 66,9% cumprem a meta para a quantidade de açúcar (< 5 g/100 g), 42,3% cumprem a meta para a quantidade de sal (< 0,3 g/100 g) e 20% cumprem cumulativamente as metas definidas para açúcar e sal (gráfico 1 a-d). A maioria das BS (n=115) cumpre a meta para o açúcar, mas apenas 35% satisfazem a meta para o sal. Das BM analisadas, 74% cumprem a meta para açúcar, mas 62% não satisfazem a meta para sal. No caso das BA, a maioria atinge a meta de açúcar (60%) e de sal (52%).

Da aplicação dos limites estabelecidos no *Guia para Lanches Escolares Saudáveis* da DGS (figura 1), se considerarmos o limite para sal, em ambos os grupos (BC e BS) a maioria dos produtos seriam considerados adequados. Este facto indica que o limite para o sal pode não ser o melhor indicador para identificar as bolachas de arroz e/ou milho a privilegiar (gráfico 2 a-d) (7). No entanto, ressalva-se que, a aplicação dos limites para açúcar, gordura e ácidos gordos saturados permite uma diferenciação entre os dois grupos, uma vez que no grupo das BC nenhum produto cumpre os limites para a gordura e ácidos gordos saturados e apenas dois cumprem os limites para o açúcar, justificando que não sejam produtos a privilegiar.

Figura 1: Metas e valores-limite (por 100 g) de acordo com várias orientações e recomendações de entidades nacionais e internacionais (7-13).

Metas e valores-limite (por 100 g de alimento)				
EIPAS	<i>Guia para Lanches Escolares Saudáveis</i> (DGS)	Descodificador de rótulos (DGS)	Perfil nutricional DGS (2019)	Perfil nutricional OMS (2023)
Açúcar ≤ 5 g Sal ≤ 0,3 g	Gordura ≤ 8 g AGS ≤ 3 g Açúcar ≤ 7 g Sal ≤ 1 g Fibra > 3 g	Gordura ≤ 3 g AGS ≤ 1,5 g Açúcar ≤ 5 g Sal ≤ 0,3 g	AGS ≤ 1,5 g Açúcar ≤ 5 g Sal ≤ 0,3 g	Sal ≤ 0,25 g

AGS, ácidos gordos saturados; DGS, Direção-Geral da Saúde; EIPAS, Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável; OMS, Organização Mundial da Saúde.

Gráfico 1 (a-d): ↓ Valores de açúcar e de sal (g/100 g) para as amostras seleccionadas, de acordo com a informação disponibilizada na declaração nutricional e aplicação dos limites definidos pela Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (açúcar <5 g/100 g; sal <0,3 g/100 g).

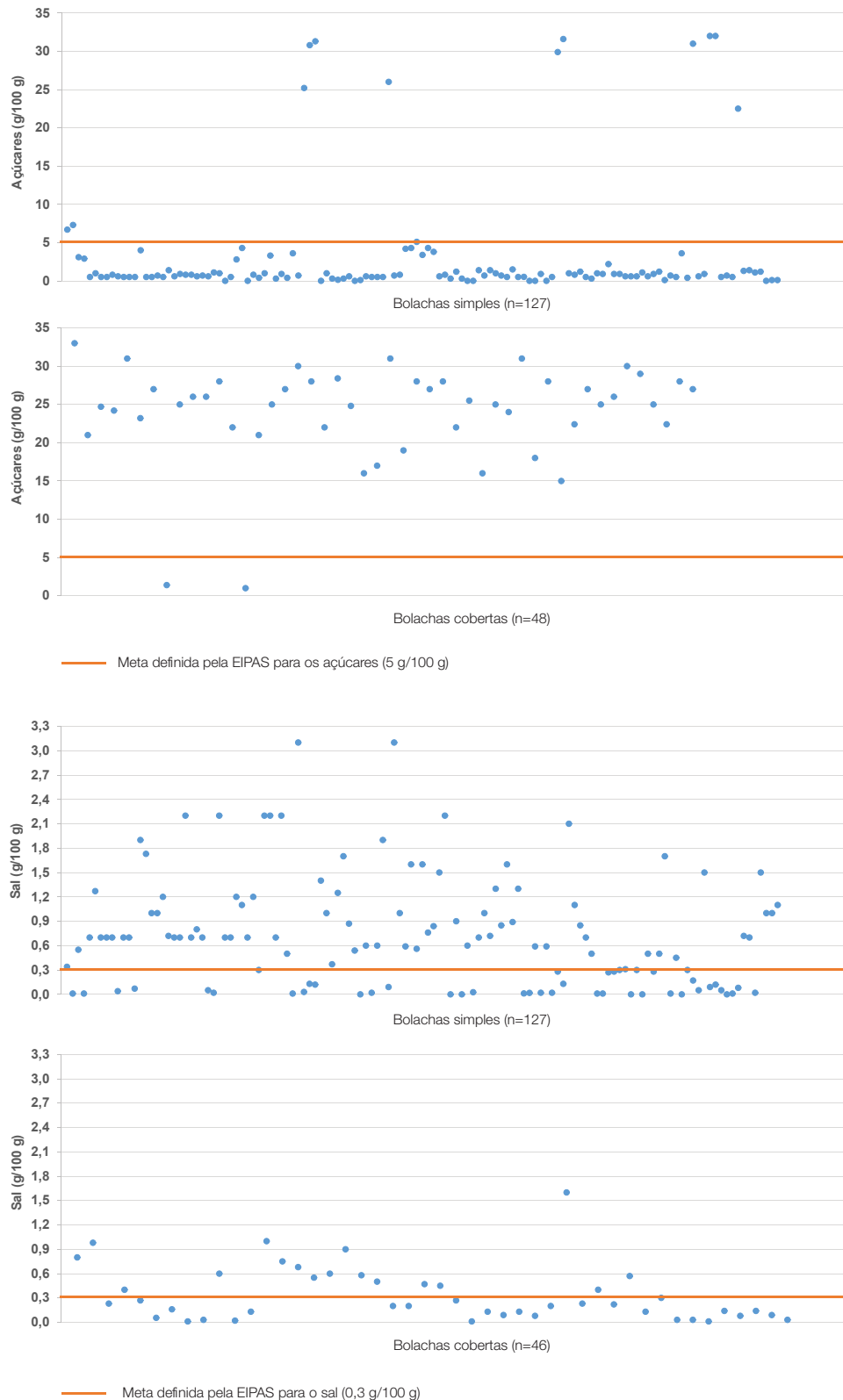
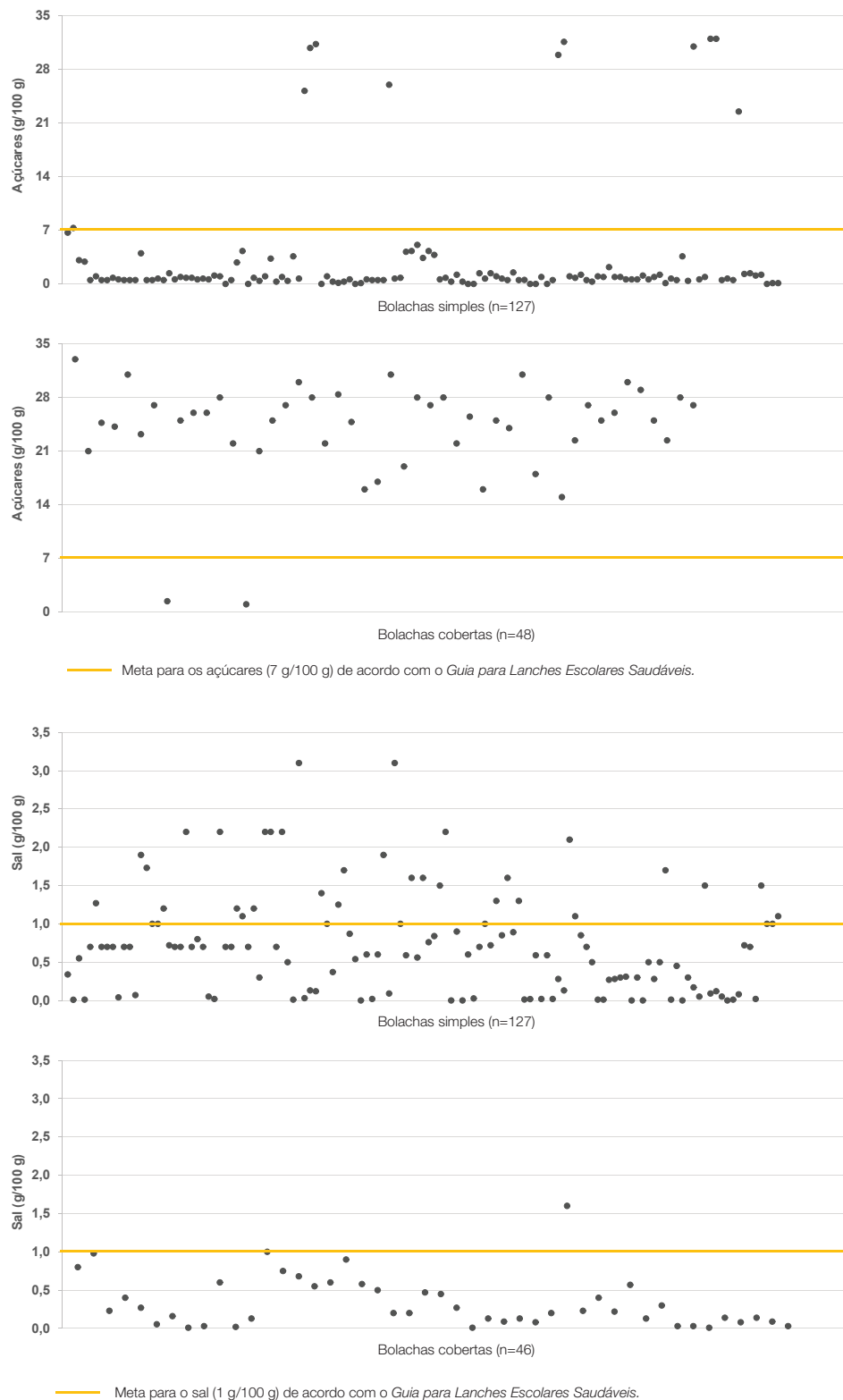


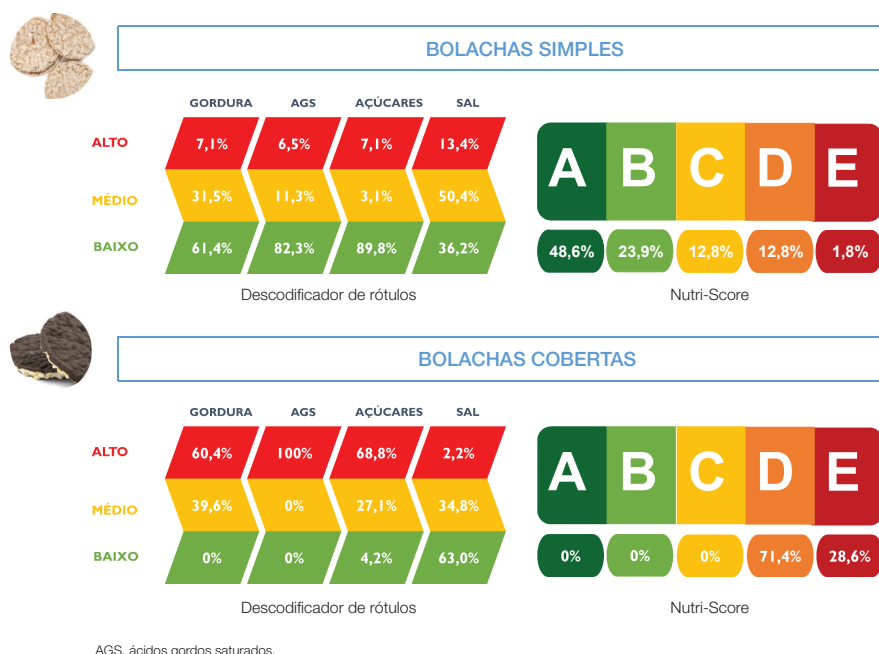
Gráfico 2 (a-d): ↓ Valores de açúcar e de sal (g/100 g) para as amostras selecionadas, de acordo com a informação disponibilizada na declaração nutricional e aplicação dos limites definidos pelo *Guia para Lanches Escolares Saudáveis* (açúcar ≤ 7 g/100 g; sal ≤ 1 g/100 g).



Após a aplicação do decodificador de rótulos aos produtos estudados, verifica-se que 22%; 33%; 24% e 11%, são classificados com a cor vermelha que corresponde a um teor alto de gordura, ácidos gordos saturados, açúcares e sal, respetivamente (9). Comparativamente ao Nutri-Score, as categorias D e E indicam que são produtos com qualidade nutricional pobre. Neste trabalho, observou-se que 35% e 11% das bolachas estudadas ficam classificadas nas categorias D e E, respetivamente. Da análise comparativa entre BS e BC, após aplicação das duas ferramentas, evidencia-se uma distinção clara entre os dois grupos (figura 2). No grupo das BS, de acordo com o decodificador de rótulos, para gordura, ácidos gordos saturados e açúcares, a maioria dos produtos é classificado com um teor baixo que corresponde à cor verde. Por sua vez, aplicando o Nutri-Score a este grupo, observou-se que 73% dos produtos encontram-se nas categorias A e B, sendo considerados alimentos com uma composição nutricional mais equilibrada (10). No grupo das BC, para gordura, ácidos gordos saturados e açúcares, a maioria das bolachas estudadas encontra-se na cor vermelha que indica um alto teor. O mesmo se verifica com a classificação do Nutri-Score, dado que todas as BC são classificadas nas categorias D e E, indicando que estes produtos terão uma composição nutricional mais pobre.

Neste trabalho foram ainda aplicados os modelos de perfil nutricional da DGS e da OMS (12,13). Para ambos os documentos, os limites são apresentados para diferentes categorias de alimentos. Usaram-se os limites aplicados à categoria 3 (Aperitivos e *snacks* (DGS) e *Savoury snacks* (OMS)), onde se incluem os *snacks* à base de arroz, milho ou batata e outros cereais (figura 1). Observou-se que para o sal, apenas 42% e 36% cumprem o limite definido nos modelos de perfil nutricional da DGS e da OMS, respetivamente. Este facto, indica-nos que de acordo com o propósito destes referenciais, para a maioria das bolachas estudadas deve ser limitada a publicidade alimentar dirigida a crianças. Na análise comparativa entre os grupos BS e BC, verifica-se que mais de 80% das BS cumprem os critérios da DGS para açúcares e ácidos gordos saturados. No entanto, no que diz respeito ao sal, a aplicação dos critérios de ambos os modelos de perfil nutricional indica que é no grupo das BC que encontramos mais produtos que satisfazem o critério.

Figura 2: Classificação dos produtos analisados de acordo com o decodificador de rótulos e o Nutri-Score.



_Conclusão

Em suma, a análise de 175 tipos de bolachas de arroz e/ou milho identifica que existem desafios significativos em relação à quantidade de sal, com apenas 42,3% a satisfazerem a meta da EIPAS. Apesar de alguns destes produtos cumprirem os limites para os açúcares, observa-se que ainda existe necessidade de reforçar a implementação de estratégias de reformulação que contribuam para melhorias dos aspetos nutricionais, especialmente nas bolachas de arroz e/ou milho com cobertura.

A classificação pelo Descodificador de Rótulos e o Nutri-Score evidenciou diferenças marcantes entre as bolachas simples e com cobertura, reforçando a necessidade de melhorias na composição nutricional das últimas. A análise dos modelos de perfil nutricional da DGS e OMS robustece a importância de limitar a publicidade dirigida a crianças, uma vez que a maioria das bolachas estudadas não satisfaz os critérios estabelecidos para a categoria de aperitivos e *snacks*, onde são incluídos estes produtos.

Os resultados evidenciados destacam a necessidade de ações de reflexão multidisciplinar, desenvolvimento de estratégias de reformulação, e implementação de ações de educação alimentar. Com a implementação das necessidades identificadas, espera-se que as escolhas alimentares realizadas se tornem mais seguras e saudáveis, contribuindo para a criação de ambientes salutogénicos e para a promoção da saúde pública.

Financiamento:

Este trabalho foi financiado pelo INSA, no âmbito do projeto "NutriData - Monitorização e vigilância da qualidade nutricional de alimentos ultraprocessados" (2024DAN2268).

Referências bibliográficas:

- (1) Monteiro M, Magalhães T. Modelo de política nutricional e alimentar escolar. *Acta Por t Nutri*. 2023;33:28-33. https://actaportuguesadenutricao.pt/wp-content/uploads/2023/12/06_AR.pdf
- (2) World Health Organization, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. Making every school a health-promoting school: global standards and indicators. Geneva, 2021. <https://iris.who.int/handle/10665/341907>
- (3) World Health Organization. (2021). Implementing school food and nutrition policies: a review of contextual factors. Geneva: WHO, 2021. <https://iris.who.int/handle/10665/345130>
- (4) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Nutrition guidelines and standards for school meals: a report from 33 low and middle-income countries. Rome: FAO, 2019. <https://www.fao.org/3/ca2773en/CA2773EN.pdf>
- (5) Regulamento (UE) 2016/791 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 11 de maio de 2016, que altera os Regulamentos (UE) n.º 1308/2013 e (UE) n.º 1306/2013 no que respeita ao regime de ajuda à distribuição de fruta e produtos hortícolas, bananas e leite nos estabelecimentos de ensino. JO L 135 de 24.5.2016: 1-10. <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/791/oj>
- (6) Monjardino M. Avaliação dos lanches escolares de crianças do 1º ano do ensino básico de escolas de Matosinhos. Porto, 2008. (trabalho académico). <https://hdl.handle.net/10216/54787>
- (7) Gregório MJ, Lima R, Sousa S, et al. Guia para lanches escolares saudáveis. Lisboa: DGE, 2021. https://www.dge.mec.pt/sites/default/files/Noticias_documentos/guia_lanch_escolares.pdf
- (8) Despacho n.º 11418/2017, de 29 de dezembro. DR n.º 249, Série II de 2017-12-29: 29595-98. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/despacho/11418-2017-114424591>
- (9) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável. Descodificador de Rótulos [online]. [consul. 2024.1.23]. <https://alimentacaosaudavel.dgs.pt/descodificador-de-rotulos/>
- (10) Santé Publique France. Nutri-Score [online]. [consul. 2024.1.23]. <https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/nutrition-et-activite-physique/articles/nutri-score>
- (11) UK Department of Health, Food Standards Agency. Guide to creating a front of pack (FoP) nutrition label for pre-packed products sold through retail outlets. 2016. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/566251/FoP_Nutrition_labelling_UK_guidance.pdf
- (12) Direção-Geral da Saúde. Perfil Nutricional – Restrições à publicidade alimentar dirigida a crianças. Lisboa: DGS, 2019. <https://nutrimento.pt/activeapp/wp-content/uploads/2019/08/Manual-de-perfil-nutricional-restric%CC%A7o%CC%83es-a-publicidade-alimentar.pdf>
- (13) World Health Organization. Regional Office for Europe. WHO Regional Office for Europe nutrient profile model, second edition. Copenhagen: WHO-EURO, 2023. <https://iris.who.int/handle/10665/366328>
- (14) Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de outubro de 2011, relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios. JO L 304 de 22.11.2011:18-63. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj>

Exposição a metilmercúrio e consumo de pescado: emissão de recomendações nacionais, 2023

Exposure to methylmercury and fish consumption: issuing national recommendations, 2023

Paulo Fernandes¹, Cláudia Afonso³, Paula Bico², Narcisa Bandarra³, Marta Borges², Paulo Carmona⁵, Catarina Carvalho⁴, Daniela Correia⁴, Susana Gonçalves³, Carla Lopes⁴, Helena Lourenço³, Sarogini Monteiro⁵, Pedro Nabais⁵, Luísa Oliveira¹, Susana Santiago¹, Milton Severo⁴, Duarte Torres⁶, Maria Graça Dias¹

paulo.fernandes@insa.min-saude.pt

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

(2) Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária, Lisboa, Portugal

(3) Instituto Português do Mar e da Atmosfera, Lisboa, Portugal

(4) Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto, Porto, Portugal

(5) Autoridade de Segurança Alimentar e Económica, Lisboa, Portugal

(6) Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Porto, Portugal

_Resumo

Considerando que o consumo de pescado é uma fonte importante de exposição ao metilmercúrio, a Comissão Europeia recomendou aos Estados-membros que estabelecessem recomendações para o seu consumo. Assim, tendo sido criado um grupo de trabalho, é objetivo deste artigo apresentar o trabalho desenvolvido para a elaboração das recomendações de consumo de pescado adaptadas à população portuguesa, tendo em conta o padrão nacional de consumo de peixe e as espécies consumidas.

A definição das recomendações assentou na realização de um estudo de avaliação de risco-benefício associado ao consumo de pescado. Esta metodologia permitiu identificar dois grupos populacionais sujeitos a recomendações distintas: para a população em geral recomenda-se uma frequência de consumo de 4 a 7 vezes por semana e, para a população vulnerável, uma frequência de 3 a 4 vezes por semana das espécies com médio e baixo teor de mercúrio, devendo ser evitado o consumo das espécies com elevado teor de mercúrio.

Estas recomendações foram divulgadas num evento público e deverão ser alvo de esforços adicionais para chegarem à população vulnerável, constituída por mulheres grávidas, mulheres a amamentar e crianças até aos 10 anos.

_Abstract

Considering that fish consumption is an important source of exposure to methylmercury, the European Commission recommended Member States to establish recommendations for its consumption. Therefore, having created a working group, the objective of this article is to present the work developed to prepare fish consumption recommendations adapted to the Portuguese population.

The definition of the recommendations was based on carrying out a risk-benefit assessment study associated with fish consumption. This methodology made it possible to identify two population groups subjected to different recommendations: for the general population, a frequency of consumption of 4 to 7 times per week is recommended and for the vulnerable population, a frequency of 3 to 4 times per week for

species with medium and low mercury content and the avoidance of the consumption of species with high mercury content is advised.

These recommendations were released at a public event and should be the target of additional efforts to reach the vulnerable population, consisting of pregnant women, breastfeeding women and children up to 10 years of age.

_Introdução

A preocupação com a exposição a metilmercúrio pelos grupos vulneráveis da população, decorrente do consumo de pescado é transversal a vários países, sendo alvo de atenção por parte da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) que emitiu, em 2012, um Parecer sobre o risco associado à ingestão de metilmercúrio (1) e, em 2015, uma Declaração sobre os benefícios do consumo de pescado face aos riscos da ingestão de metilmercúrio (2). Também a Comissão Europeia, através da Recomendação UE 2022/1342 (3), propôs aos Estados-membros a elaboração de recomendações de consumo nacionais específicas relativas ao consumo de pescado, com vista à obtenção dos plenos benefícios do respetivo consumo, limitando simultaneamente os riscos de toxicidade do mercúrio.

A Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), enquanto ponto de contacto nacional da Comissão Europeia, criou um grupo de trabalho para que, com base numa avaliação de risco-benefício (4), fossem elaboradas recomendações para Portugal, tendo em conta as espécies de pescado

habitualmente consumidas pela população nacional e a ocorrência de metilmercúrio no pescado disponível no mercado.

_Objetivo

Apresentar o trabalho desenvolvido para a definição de recomendações para a população portuguesa para o consumo de pescado, tendo por base o seu teor em metilmercúrio, para uma maior proteção da saúde pública.

_Métodos

Com base na Recomendação EU 2022/1342 da Comissão Europeia, a Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) criou e integrou, em 2018, um grupo de trabalho constituído também pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP (INSA), pelo Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), pelo Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto (ISPUP), pela Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE), e pela Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto (FCNAUP).

Dado o elevado consumo de pescado em Portugal, adotou-se a estratégia de realizar uma avaliação de risco-benefício associado ao consumo de pescado pela população portuguesa, considerando os riscos associados à ingestão de metilmercúrio e os benefícios da ingestão dos ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa ómega 3, EPA e DHA, provenientes do consumo de pescado.

O trabalho iniciou-se pela recolha de dados analíticos produzidos em Portugal sobre os teores de metilmercúrio, e de EPA e DHA nas espécies de pescado consumidas em Portugal. Estes dados foram combinados com os dados de consumo obtidos através do Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física (IAN-AF, 2016) e procedeu-se a uma avaliação de risco-benefício.

_Resultados e discussão

De acordo com a avaliação efetuada os benefícios excederam os riscos associados ao consumo diário de pescado, pela generalidade da população. No entanto, o mesmo não se verificou para as mulheres grávidas e crianças.

Com base nestes resultados, o grupo de trabalho iniciou a elaboração das recomendações à população considerando os grupos populacionais “população em geral” e “mulheres grávidas, mulheres a amamentar e crianças até aos 10 anos”, de que resultou o infográfico *Recomendações para o consumo de pescado* (figura 1).

Neste infográfico, para além de outras recomendações gerais sobre o consumo de pescado e diversificação alimentar, as principais recomendações apresentam-se na **tabela 1**. O seu *design* foi pensado com especial enfoque na sua versatilidade: um documento para ser consultado *online*, descarregado para um dispositivo digital do utilizador ou disponibilizado em suporte de papel, tendo sido publicado por todas as entidades participantes no grupo de trabalho, nos respetivos *websites*, no dia 16 de maio de 2023, bem como publicado no *Knowledge junction* da EFSA. (<https://zenodo.org/records/10406057>)

Tabela 1: Principais recomendações para a população portuguesa sobre o consumo de pescado, considerando a sua contaminação por metilmercúrio.

População-alvo	Espécies de pescado	Frequência de consumo
População em geral	Todas as espécies	4 a 7 vezes por semana
Grupos Vulneráveis - mulheres grávidas - mulheres a amamentar - crianças até aos 10 anos	Espécies com médio e baixo teor de mercúrio	3 a 4 vezes por semana
	Espécies com elevado teor de mercúrio	Evitar o consumo

Figura 1: Infográfico *Recomendações para o consumo de pescado, 2023* (5).



Diversifique!

Inclua na sua alimentação diferentes espécies de pescado provenientes de pescarias sustentáveis.

Parceiros:



artigos breves_ n. 3

As espécies com médio e baixo teor de mercúrio foram: abrótea, atum em conserva, bacalhau, cantarilho, carapau, cavala, chicharro, choco, corvina, dourada, faneca, garoupa, linguado, lula, perca, pescada, polvo, pota, pregado, raia, "redfish", robalo, rodovalho, salmão, salmonete, sarda, sardinha, sargo, solha, tamboril e truta. As espécies com elevado teor de mercúrio foram: atum fresco, cação, espadarte, maruca, pata roxa, peixe espada e tintureira.

No mesmo dia, para ampliar a disseminação da informação veiculada no infográfico, foi realizado, no auditório do INSA um evento de apresentação pública das recomendações, com a presença das entidades parceiras e de saúde e transmissão online via Zoom e no Youtube do INSA. O evento ficou disponível nesta última plataforma para ulterior consulta, tendo, em abril de 2024, mais de 1200 visualizações. Este lançamento foi acompanhado por um comunicado de imprensa, contendo a ligação para o artigo de avaliação de risco/benefício previamente elaborado, bem como a ligação para consulta do infográfico apresentado no evento.

Neste evento foram feitas apresentações, sobre os trabalhos desenvolvidos, por elementos da DGAV, INSA, IPMA, ISPUP, ASAE, abordando todas as etapas percorridas, desde a emissão da Recomendação da Comissão Europeia, à publicação do infográfico contendo as recomendações para a população portuguesa.

_Conclusões

O trabalho da disseminação das recomendações sobre o consumo de pescado é um processo contínuo que pressupõe ações adicionais, com vista à chegada da informação aos agentes que poderão influenciar o consumo alimentar da população de risco, grávidas e crianças até aos 10 anos, nomeadamente aos profissionais de saúde, e aos fornecedores de refeições escolares.

A articulação com os Ministérios da Saúde e da Educação, nomeadamente com os Organismos que contactam diretamente com as populações de risco poderá também ser relevante para que o tema seja apresentado nos âmbitos das unidades locais de saúde e escolares, como parte integrante da literacia para a saúde.

Referências bibliográficas:

- (1) EFSA (2012) Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. EFSA Journal. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2012.2985>
- (2) EFSA (2015) Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. EFSA Journal. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.3982>
- (3) Recomendação (UE) 2022/1342 da Comissão de 28 de julho de 2022, relativa à monitorização do mercúrio em peixes, crustáceos e moluscos. JO L 201, 1.8.2022:71-73.
- (4) Carvalho C, Correia D, Severo M, et al. Quantitative risk-benefit assessment of Portuguese fish and other seafood species consumption scenarios. Br J Nutr. 2022 Nov 28;128(10):1997-2010. <https://doi.org/10.1017/s0007114521004773>. Epub 2021 Dec 7.
- (5) Grupo de trabalho-Direção Geral da Alimentação e Veterinária. Recomendações para o consumo de pescado. 2023. <https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2023/05/Consumo-Pescado.pdf>

Toxinas da *Alternaria* em géneros alimentícios: uma preocupação ao nível da saúde pública

Alternaria toxins in foodstuffs: a public health concern

Beatriz Guerreiro^{1,2}, Célia Ventura^{1,3}, Henriqueta Louro^{1,3}, Maria João Silva^{1,3}

beatriz.guerreiro@insa.min-saude.pt

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

(2) Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal

(3) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

As toxinas da *Alternaria* são metabolitos secundários produzidos por fungos do género *Alternaria*, que são agentes patogénicos e saprófitas comuns das plantas, com a capacidade de crescer numa ampla gama de temperaturas e níveis de humidade. Deste modo, estão amplamente distribuídos no ambiente e são contaminantes prevalentes em produtos agrícolas a nível mundial, causando danos pré e pós-colheita em frutas, vegetais, cereais e grãos. Apesar de causarem perdas económicas relevantes e representarem um risco para a saúde humana e animal, até ao momento não há uma caracterização adequada dos perigos associados a estas micotoxinas emergentes. Neste artigo apresenta-se um resumo da literatura referente aos efeitos tóxicos destas micotoxinas ao nível do fígado, com ênfase nos estudos de citotoxicidade e genotoxicidade. Estes estudos toxicológicos sugerem que micotoxinas da *Alternaria* podem induzir a perda da viabilidade celular e danos do DNA nas células hepáticas humanas.

_Abstract

Alternaria mycotoxins are secondary metabolites produced by black moulds of the genus *Alternaria*, which are common plant pathogens and saprophytes that can grow in a wide range of temperatures and moisture levels. Thus, they are widely distributed in the environment, and are prevalent contaminants of food and feed worldwide, causing pre- and post-harvest damage to agricultural products, such as fruits, vegetables, cereals and grains. Despite causing relevant economic losses and posing a risk to the health of humans and animals, there is a lack of proper hazard characterization for these emergent mycotoxins. This article aims to summarize data on these mycotoxins, focusing on hepatic cytotoxicity and genotoxicity. These toxicological studies suggest that *Alternaria* mycotoxins may induce loss of cell viability and DNA damage in human hepatocytes.

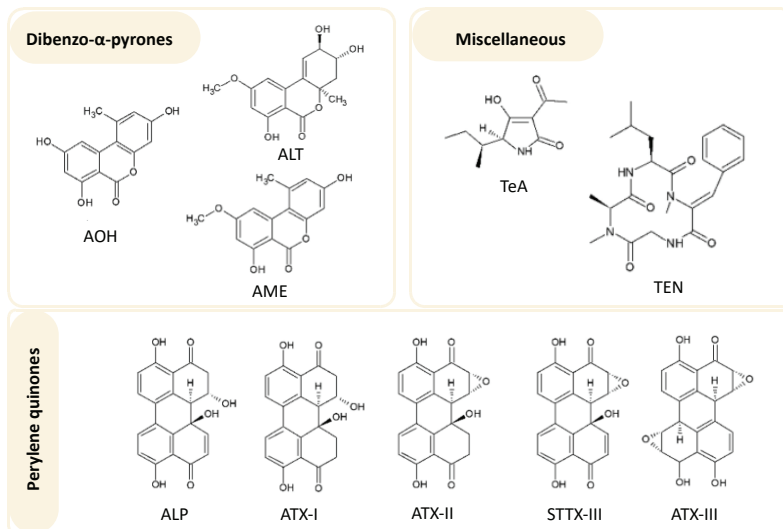
_Exposição humana a micotoxinas da *Alternaria*

Os fungos do género *Alternaria* vivem como saprófitas, parasitas ou em simbiose com plantas e animais, sendo a maioria das espécies patogénicas para plantas, podendo infetar mais de 4000 plantas hospedeiras (1). Graças à sua capacidade de sobrevivência numa ampla gama de temperaturas e níveis

de humidade, estes fungos crescem em praticamente todas as condições ambientais e estão amplamente distribuídos na natureza. Algumas espécies são comumente encontradas no solo, ar ou em ambientes interiores. Assim, os seus esporos podem ser isolados de vários habitats diferentes. Além disso, os fungos *Alternaria* têm a capacidade de produzir mais de 70 metabolitos secundários, que são formados em condições específicas no campo, durante o armazenamento, transporte ou processamento de produtos alimentares, designadamente, cereais, grãos, frutas e vegetais (2). Deste modo, são responsáveis pela contaminação pré e pós-colheita de produtos alimentares. Alguns destes metabolitos estão quimicamente caracterizados e apresentam estruturas muito diversas. Estas refletem propriedades biológicas distintas e podem pôr em risco a saúde humana e animal, sendo por isso considerados micotoxinas. As micotoxinas da *Alternaria* mais documentadas na literatura são o alternariol (AOH), éter monometílico de alternariol (AME), o altenueno (ALT), alterperilenol (ALP), altertoxinas I, II, e III (ATX-I, -II e -III), a stemfilitoxina III (STTX-III), o ácido tenuazóico (TeA), e por fim a tentoxina (TEN) (1). Estas toxinas são geralmente agrupadas de acordo com a sua estrutura química (figura 1).

Na década de 90, foi observado que em regiões da China com alto índice de cancro do esófago, se verificava uma maior contaminação por *Alternaria alternata* em grãos, sugerindo que as micotoxinas produzidas podem ser um fator contribuinte para o desenvolvimento do cancro nessas áreas (3). Tendo em conta que a exposição a estas micotoxinas ocorre, sobretudo, através da ingestão de alimentos contaminados, torna-se crucial estabelecer limites máximos para a sua ocor-

Figura 1: Estruturas e grupos químicos das toxinas da *Alternaria* mais relevantes.



Alternariol (AOH), éter monometílico de alternariol (AME), altenueno (ALT), alterperilenol (ALP), altertoxinas I, II e III (ATX-I, -II e -III), stemfilitoxina III (STTX-III), ácido tenuazóico (TeA), tentoxina (TEN).

rência em produtos alimentares. Em 2011, a EFSA publicou um parecer científico sobre os riscos para a saúde pública relacionados com a presença de toxinas da *Alternaria* em alimentos e rações, tendo sido definida uma dose de preocupação toxicológica (*threshold of toxicological concern*, TTC) de 2,5 ng/kg peso corporal/dia para a AOH e AME, e de 1500 ng/kg peso corporal/dia para a TeA. Adicionalmente, foi estimada a exposição alimentar crónica em adultos, tendo-se concluído que a população vegetariana está mais sujeita à exposição por micotoxinas da *Alternaria*, uma vez que a sua alimentação é baseada em produtos de origem vegetal (4).

A avaliação de risco das micotoxinas é essencial para a proteção da saúde humana e compreende diversas componentes, sendo uma delas a identificação e caracterização do perigo. No entanto, apesar de as toxinas da *Alternaria* causarem perdas económicas relevantes e representarem um risco para a saúde humana e animal, os perigos associados à sua exposição ainda não se encontram devidamente caracterizados. Uma revisão recente descreve os potenciais impactos para a saúde associados a estas toxinas e identifica lacunas no conhecimento (5).

A absorção de micotoxinas através do consumo de alimentos contaminados resulta, frequentemente, em danos ao nível do fígado que levam à hepatotoxicidade. Adicionalmente, o fígado é o principal órgão de destoxificação, sendo responsável pela biotransformação dos xenobióticos. Por este motivo, constitui um dos principais órgãos de interesse aquando da avaliação dos potenciais riscos associados micotoxinas (6).

_Objetivo

Com o presente artigo pretende-se resumir o estado da arte da literatura relativa à hepatotoxicidade das micotoxinas da *Alternaria*, com foco principal em estudos de citotoxicidade e genotoxicidade, para fornecer uma visão geral dos dados existentes. Adicionalmente, pretende-se alertar a comunidade para o potencial impacto da exposição a estas micotoxinas na saúde humana.

_Toxicidade *in vitro* e *in vivo*

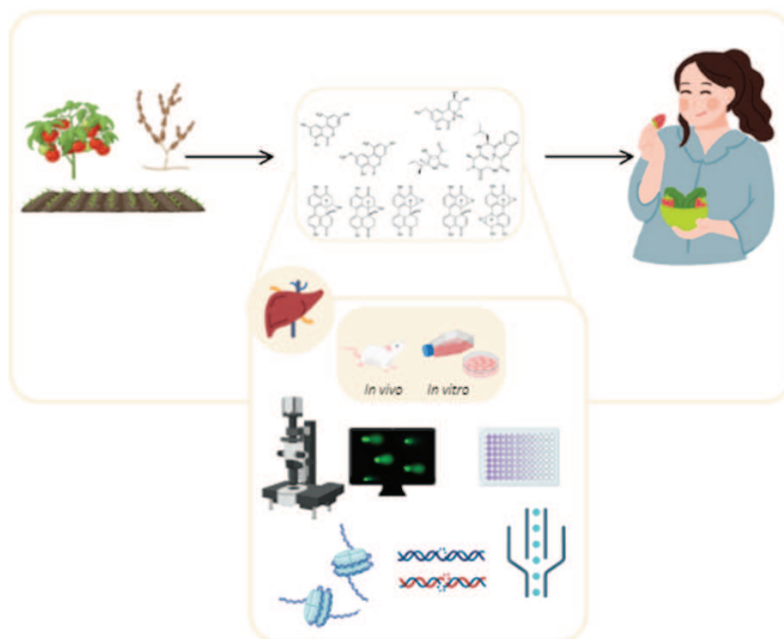
Embora não haja uma caracterização adequada dos perigos associados a estas micotoxinas emergentes, os estudos toxicológicos realizados nos últimos anos permitem uma primeira abordagem aos potenciais riscos relativos a hepatotoxicidade (figura 2).

Até à data, existem apenas estudos *in vivo* relativos ao AOH, AME e ATX-I. Por exemplo, num estudo em ratos NMRI expostos oralmente ao AOH, não foram identificadas lesões no DNA extraído de tecido hepático (7). Em estudos mais recentes em ratos Sprague Dawley, a administração oral de AOH não causou quebras no DNA nas células do fígado, tendo-se colocado a hipótese de tal se dever à baixa biodisponibilidade sistémica do AOH. No entanto, a análise de secções histopatológicas revelou danos citotóxicos ao nível do fígado, designadamente sinais de inflamação, inchaço e retenção de gordura nos hepatócitos (8). Por outro lado, o AME e ATX-I induziram quebras no DNA do fígado destes ratos, revelando o potencial genotóxico destas toxinas (9-10).

Os estudos *in vitro* recorrem a modelos celulares hepáticos e são essenciais para uma primeira compreensão dos efeitos exercidos por micotoxinas (11). Os modelos mais frequentemente utilizados são a linha celular hepática proliferativa, HepG2, e a linha celular hepática diferenciada, HepaRG.

Diversos estudos demonstraram o potencial citotóxico das toxinas da *Alternaria* na linha celular HepG2, nomeadamente o AOH, AME, ALP e TeA (12-14). Adicionalmente, a sensibilidade das células hepáticas aparenta ser superior à de outros tipos celulares, suportando a possibilidade de o fígado ser um órgão-alvo destas micotoxinas (15-17). Por outro lado, o estado de proliferação e diferenciação das células hepáticas pode ser um fator de suscetibilidade, bem como a sua capacidade celular de metabolização de xenobióticos (12).

Figura 2: ⚡ Exposição humana às micotoxinas da *Alternaria* via géneros alimentícios e estudos toxicológicos ao nível do fígado, realizados até à data.



Ensaios de genotoxicidade que incluem o ensaio do cometa e a fosforilação da histona γ -H2AX; Ensaios de citotoxicidade baseados em citometria de fluxo e ensaios colorimétricos.

Relativamente ao potencial genotóxico destas micotoxinas, alguns estudos revelaram que o AOH, o AME, ATX-II e STTX-III induzem quebras nas cadeias de DNA em células HepG2 (12,18). Observou-se também uma diferença na reparação das quebras no DNA provocadas pelo AOH e as pirelenoquinonas, sendo que os danos provocados pela ATX-II e STTX-III foram mais persistentes (19). O pré-tratamento das células com um sistema de ativação metabólica resultou na destoxificação destas toxinas, o que novamente sugere que a capacidade metabólica das células seja um fator de influência nos efeitos tóxicos provocados por estas toxinas. Para as toxinas TeA e TEN não foram observados efeitos genotóxicos, com e sem metabolização exógena (12).

No âmbito da Parceria Europeia para a Avaliação de Riscos dos Químicos (PARC; <https://www.eu-parc.eu/>) estas toxinas foram consideradas como substâncias prioritárias, pelo que serão conduzidos diversos estudos com o objetivo de preencher as lacunas no conhecimento e contribuir para a identificação e caracterização dos perigos associados a estes contaminantes alimentares emergentes, apoiando a sua avaliação de risco e regulamentação.

Conclusões

As micotoxinas da *Alternaria* têm despertado cada vez mais interesse ao nível da saúde pública, em parte porque são contaminantes prevalentes numa grande variedade de produtos alimentares, mas também pelo facto de não haver uma caracterização adequada dos perigos associados a estas micotoxinas emergentes, principalmente ao nível de um dos seus principais órgãos-alvo, o fígado.

Os estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo* têm vindo a revelar o potencial citotóxico e genotóxico destas toxinas, e reforçam a necessidade de estudos adicionais que permitam não só melhorar a avaliação do risco associado à exposição, mas também às agências regulatórias competentes estabelecer valores limite para a ocorrência destas toxinas em alimentos.

Financiamento:

Trabalho parcialmente financiado pelo *Centre for Toxicogenomics and Human Health* – ToxOmics (UIDB/00009/2020; UIDP/ 00009/2020).

Referências bibliográficas:

- (1) Pinto VE, Patriarca A. *Alternaria* Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods Mol Biol.* 2017;1542:13-32. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_2
- (2) Ostry V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin J.* 2008;1(2):175-188. <https://doi.org/10.3920/wmj2008.x013>
- (3) Liu GT, Qian YZ, Zhang P, et al. Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. In: O'Neill IK, Chen J, Bartsch H. (eds). *Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins.* Lyon, France: IARC, 1991, pp. 258-262.
- (4) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal.* 2011;9(10):1-97. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407>
- (5) Louro H, Vettorazzi A, López de Cerain A, et al. Hazard characterization of *Alternaria* toxins to identify data gaps and improve risk assessment for human health. *Arch Toxicol.* 2024 Feb;98(2):425-469. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03636-8>
- (6) Gu X, Manautou JE. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert Rev Mol Med.* 2012 Feb 3;14:e4. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002110>
- (7) Schuchardt S, Ziemann C, Hansen T. Combined toxicokinetic and *in vivo* genotoxicity study on *Alternaria* toxins. *EFSA Supporting Publications.* 2014;11(11). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2014.en-679>
- (8) Miao Y, Wang D, Chen Y, et al. General toxicity and genotoxicity of alternariol: a novel 28-day multi-endpoint assessment in male Sprague-Dawley rats. *Mycotoxin Res.* 2022 Nov;38(4):231-241. <https://doi.org/10.1007/s12550-022-00466-y>
- (9) Tang X, Chen Y, Zhu X, et al. Alternariol monomethyl ether toxicity and genotoxicity in male Sprague-Dawley rats: 28-Day *in vivo* multi-endpoint assessment. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2022 Jan;873:503435. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503435>
- (10) Zhu X, Chen Y, Tang X, et al. General toxicity and genotoxicity of altertoxin I: A novel 28-day multiendpoint assessment in male Sprague-Dawley rats. *J Appl Toxicol.* 2022 Aug;42(8):1310-22. <https://doi.org/10.1002/jat.4297>
- (11) Ruan H, Lu Q, Wu J, et al. Hepatotoxicity of food-borne mycotoxins: molecular mechanism, anti-hepatotoxic medicines and target prediction. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022;62(9):2281-2308. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1960794>
- (12) Hessel-Pras S, Kieshauer J, Roenn G, et al. *In vitro* characterization of hepatic toxicity of *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Res.* 2019 May;35(2):157-168. <https://doi.org/10.1007/s12550-018-0339-9>
- (13) Juan-García A, Juan C, König S, et al. Cytotoxic effects and degradation products of three mycotoxins: alternariol, 3-acetyl-deoxynivalenol and 15-acetyl-deoxynivalenol in liver hepatocellular carcinoma cells. *Toxicol Lett.* 2015 May 19;235(1):8-16. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.03.003>
- (14) Wang Y, Liu HX, Chen YC, et al. Two New Metabolites from the Endophytic Fungus *Alternaria* sp. A744 Derived from *Morinda officinalis*. *Molecules.* 2017 May 8;22(5):765. <https://doi.org/10.3390/molecules22050765>
- (15) den Hollander D, Holvoet C, Demeyere K, et al. Cytotoxic Effects of Alternariol, Alternariol Monomethyl-Ether, and Tenuazonic Acid and Their Relevant Combined Mixtures on Human Enterocytes and Hepatocytes. *Front Microbiol.* 2022 Apr 22;13:849243. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.849243>

Referências bibliográficas:

- (16) Vejdovsky K, Sack M, Jarolim K, et al. In vitro combinatory effects of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and altertoxin II and potentially involved miRNAs. *Toxicol Lett.* 2017 Feb 5;267:45-52. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.011>
- (17) Mahmoud MM, Abdel-Razek AS, Soliman HSM, et al. Diverse polyketides from the marine endophytic *Alternaria* sp. LV52: Structure determination and cytotoxic activities. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2021 May 24;33:e00628. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00628>
- (18) Pfeiffer E, Eschbach S, Metzler M. *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells in vitro. *Mycotoxin Res.* 2007 Sep;23(3):152-7. <https://doi.org/10.1007/BF02951512>
- (19) Fleck SC, Sauter F, Pfeiffer E, et al. DNA damage and repair kinetics of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, altertoxin II and stemphytoxin III in cultured cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2016 Mar;798-799:27-34. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.02.001>

Sistema de vigilância de infeções respiratórias agudas graves (SARI): uma abordagem para deteção de mudanças nos padrões de doenças respiratórias graves

Severe acute respiratory infections (SARI) surveillance system: an approach for detecting changes in severe respiratory disease patterns

João Almeida Santos¹, Verónica Gomez¹, Débora Pereira², Sónia Leal³, João Nuak², Ana Catarina Pereira³, Susana Silva², Diana Lucas¹, Ana Paula Rodrigues¹, Ausenda Machado¹

joao.santos@insa.min-saude.pt

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

(2) Centro Hospitalar e Universitário de São João, Unidade Local de Saúde São João, Porto, Portugal

(3) Centro Hospitalar e Universitário de Lisboa Central, Unidade Local de Saúde São José, Lisboa, Portugal

Resumo

Em 2021, em Portugal, foi implementado um sistema de vigilância sentinela de infeções respiratórias agudas graves (SARI) baseado em registos de saúde eletrónicos hospitalares. O presente artigo tem como objetivo apresentar este sistema de vigilância assim como os dados recolhidos, nas duas unidades hospitalares envolvidas, a partir de outubro de 2023.

São incluídos na vigilância os indivíduos internados (≥ 24 horas) aos quais seja atribuído pelo menos um código CID-10 (*Classificação Internacional de Doenças*, 10ª revisão) associado a SARI. Os indicadores de vigilância incluem a incidência de SARI, a proporção de SARI entre o total de hospitalizações e a fração etiológica atribuível ao SARS-CoV-2, gripe e vírus sincicial respiratório. Estes indicadores são analisados para o total de população em observação e estratificados por grupo etário.

Entre a semana 40/2023 e 15/2024, foram reportados 2261 casos de SARI, com a semana 53/2023 a apresentar a incidência mais elevada (19,7/100 000 habitantes). Relativamente à idade, a incidência mais elevada tem sido observada em indivíduos com mais de 65 anos. A pesquisa de agentes infecciosos respiratórios permitiu constatar que os vírus da gripe foram os mais frequentemente detetados (45,2%), seguidos de vírus sincicial respiratório (32,2%) e SARS-CoV-2 (22,6%).

Este sistema de vigilância sentinela pretende assim contribuir para uma visão compreensiva das infeções respiratórias em Portugal.

Abstract

In 2021, in Portugal, a sentinel surveillance system for severe acute respiratory infections (SARI) was implemented based on hospital electronic health records. This article aims to present this surveillance system as well as the data collected, in the two hospital units involved, from October 2023. Hospitalized individuals (≥ 24 hours) who are assigned at least one of ICD-10 (*International Classification of Diseases*, 10th revision) codes associated with SARI are included in the surveillance. Surveillance indicators include the incidence of SARI, the proportion of SARI among total hospitalizations, and the etiological fraction attributable to SARS-CoV-2, influenza and respiratory syncytial virus. These indicators are analyzed for the total population under observation and stratified by age group. Between week 40/2023 and 15/2024, 2261 cases of SARI were reported, with week 53/2023 showing the highest incidence (19,7/100 000

inhabitants). Regarding age, the highest incidence has been observed in individuals over 65 years of age. Research into respiratory infectious agents revealed that influenza viruses were the most frequently detected (45,2%), followed by respiratory syncytial virus (32,2%) and SARS-CoV-2 (22,6%). This sentinel surveillance system thus aims to contribute to a comprehensive view of respiratory infections in Portugal.

Introdução

Em resposta à pandemia da COVID-19, houve uma mudança no foco nas atividades de vigilância de infeções respiratórias, transitando de uma vigilância centrada na gripe para uma vigilância mais alargada, abrangendo outros agentes respiratórios, nomeadamente o SARS-CoV-2. Segundo recomendação conjunta da WHO (*World Health Organization*) e ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) esta vigilância não deve continuar centrada maioritariamente na identificação e notificação de casos confirmados de doença, mas deverá incluir sistemas de vigilância síndromica. (1)

A vigilância síndromica de infeções respiratórias agudas graves (SARI, *severe acute respiratory infections*) baseada em registos de internamentos hospitalares, é uma abordagem eficiente para detetar alterações nos padrões da doença e criar alertas precoces sobre o seu potencial impacto, sem encargos adicionais de recolha de dados (2). Pretende-se que estes sistemas de vigilância sejam uma ferramenta útil e rápida para a monitorização da atividade de diferentes agentes patogénicos respiratórios, entre os quais a gripe, SARS-CoV-2 e vírus sincicial respiratório (RSV), de forma a minimizar o impacto destas doenças.

Permite ainda fornecer informações úteis para orientar as autoridades de saúde pública, a fim de planear medidas adequadas de controlo e intervenção, alocar recursos de saúde e fazer recomendações para a gestão de casos.

Em Portugal, nas fases iniciais da pandemia, um estudo-piloto de vigilância sindrómica para infeções respiratórias, com base em registos de saúde eletrónicos hospitalares de internamentos, constatou que os internamentos por pneumonia viral detetaram variações na frequência da incidência de COVID-19 cerca de uma semana antes, sugerindo que este indicador poderia detetar precocemente surtos de COVID-19 (3).

Desta forma, o desenvolvimento e implementação de um sistema de vigilância que possibilite a monitorização dos internamentos por SARI, resulta da necessidade em reunir dados epidemiológicos que permitam acompanhar a propagação e a intensidade de infeções respiratórias, de forma a auxiliar na implementação de medidas de controlo e mitigar o seu impacto em termos de morbilidade e mortalidade na população.

O sistema de vigilância SARI pretende monitorizar a (co-)circulação de agentes patogénicos respiratórios, avaliar a sua gravidade, *burden* e impacto em saúde pública, assim como o efeito da implementação de intervenções farmacológicas (como vacinas) e não farmacológicas, na incidência de SARI.

Em 2021, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) iniciou uma colaboração com duas unidades hospitalares, de forma a desenvolver e implementar um sistema sentinela de vigilância de SARI. Esta colaboração, numa primeira fase, permitiu avaliar a viabilidade de implementação deste sistema de vigilância em tempo real e semiautomatizado baseado em registos eletrónicos de saúde (4).

Este sistema de vigilância tem por base a codificação, segundo a *Classificação Internacional de Doenças*, 10ª revisão (CID-10) (5), realizada na altura da admissão hospitalar. São considerados como pacientes com SARI aqueles aos quais seja atribuída codificação relacionada com gripe e outras infeções respiratórias, eventos cardiovasculares agudos comumente associados a infeções respiratórias e exacerbação de doenças respiratórias crónicas (4).

A análise dos dados obtidos pelo sistema de vigilância SARI, passou a integrar, desde a semana 05/2024, o Boletim de Vigilância Epidemiológica da Gripe e outros Vírus Respiratórios elaborado pelo INSA em colaboração com a Direção-Geral da Saúde e Instituto Português do Mar e da Atmosfera (6).

_Objetivos

Este artigo tem como objetivo apresentar o sistema de vigilância sentinela de SARI, assim como os dados recolhidos a partir de outubro de 2023.

_Material e métodos

O sistema de vigilância conta com a participação de duas unidades hospitalares sentinela: Centro Hospitalar e Universitário de São João (Unidade Local de Saúde São João) e Centro Hospitalar e Universitário de Lisboa Central (ULS São José).

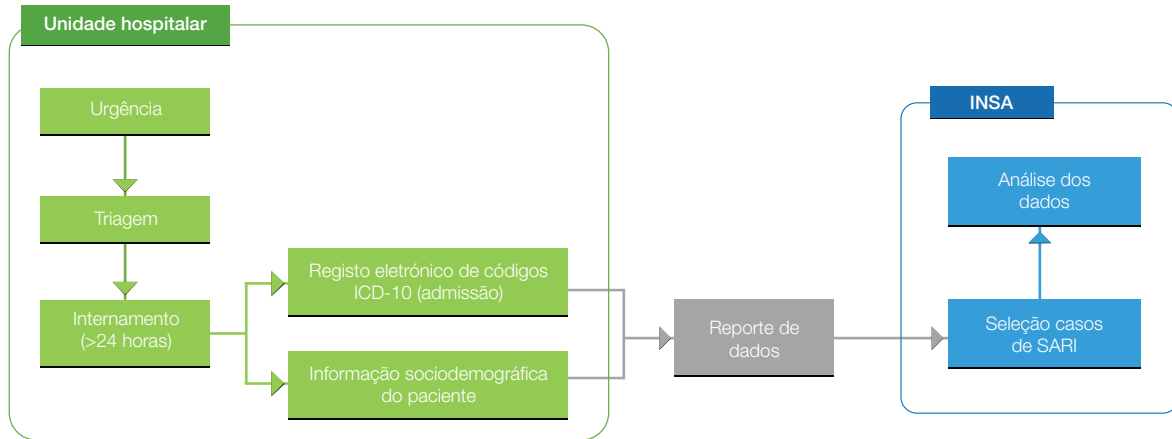
A população em estudo são todos os indivíduos com SARI, identificados de entre aqueles que estiveram internados, durante pelo menos um período de 24h, em cada uma das unidades hospitalares participantes.

A identificação dos casos SARI tem por base o diagnóstico realizado na admissão ao serviço de urgência, diagnóstico este codificado segundo CID-10 (figura 1). Os casos de SARI foram definidos como indivíduos aos quais foi atribuído um código CID-10 para doenças semelhantes a gripe, diagnóstico cardiovascular, diagnóstico respiratório e infeção respiratória no seu diagnóstico principal na admissão. Os códigos utilizados associados a SARI podem ser encontrados em Torres *et al.* (4).

Semanalmente, as unidades hospitalares enviam para o INSA os dados anonimizados dos indivíduos internados, indicando diagnóstico primário de admissão e respetivo código CID-10 (figura 1).

Os procedimentos de compilação e envio de dados são automatizados, programados rotineiramente e de acordo com os requisitos legais e éticos.

Figura 1: Fluxograma do sistema de vigilância sentinela de SARI. INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

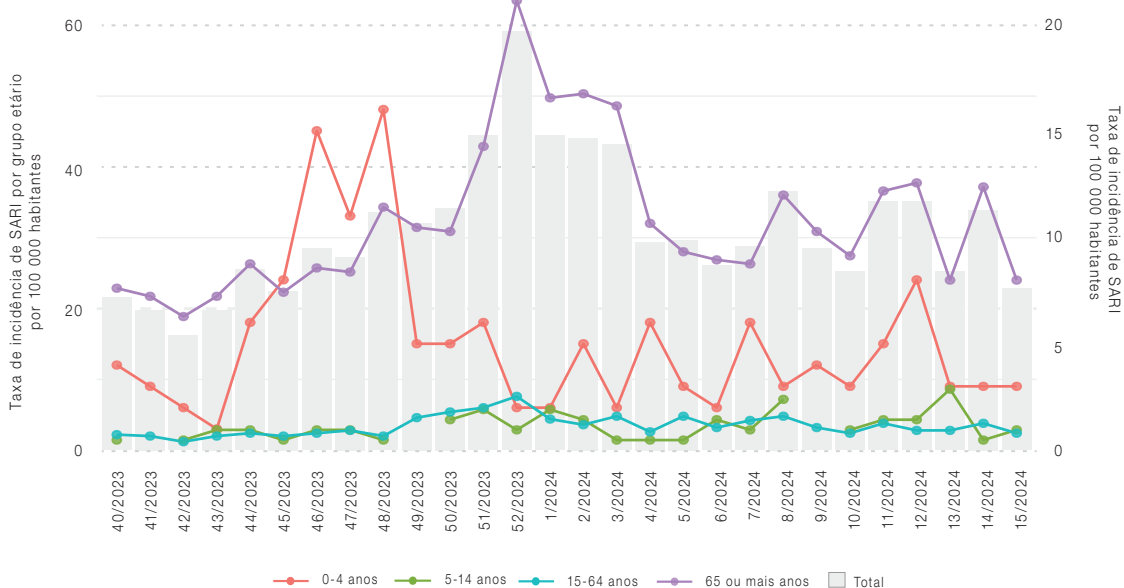


_Resultados

Ao longo do período de estudo, a taxa de incidência de SARI máxima foi observada na semana 52/2023 (19,7 por 100 000 habitantes), verificando-se, desde então, uma tendência decrescente. Até à data, indivíduos com ≥ 65 anos de idade apresentaram a incidência mais elevada de diagnóstico de SARI na admissão, seguidos de indivíduos com idade ≤ 4 anos (gráfico 1).

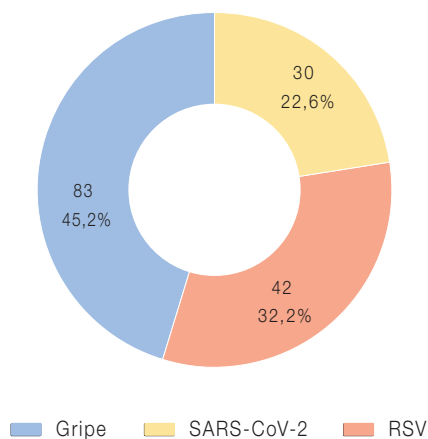
Analisando a semana mais recente (15/2024), de entre as 849 admissões nas unidades hospitalares que participam na vigilância, identificaram-se 59 indivíduos com SARI, o que corresponde a uma proporção de casos SARI reportados nessa semana de 6,9% e uma taxa de incidência de SARI de 7,6 por 100 000 habitantes (gráfico 1).

Gráfico 1: Taxa de incidência de infeções respiratórias agudas graves (SARI) por grupo etário e total, entre a semana 40/2023 e semana 15/2024.



A partir dos dados disponibilizados, os resultados da pesquisa de agentes infecciosos respiratórios realizadas na admissão, permitiu constatar que, até à data, os vírus da gripe foram os mais frequentemente detetados (45,2 %), seguidos de RSV (32,2%) e SARS-CoV-2 (22,6%) (gráfico 2).

Gráfico 2: Número e percentagem de casos de infeções respiratórias agudas graves (SARI) positivas para vírus da gripe (influenza), SARS-CoV-2 e vírus sincicial respiratório (RSV) detetados, na ULS São João, a partir da semana 2023/40.



Discussão e conclusões

A implementação, desenvolvimento e manutenção de um sistema de vigilância que permita responder aos objetivos de saúde pública é um desafio que requer uma colaboração multidisciplinar e recursos consideráveis para manter o seu correto funcionamento. Contudo, os benefícios para a saúde da população são substanciais. Com a (co-)circulação de agentes patogénicos respiratórios, o surgimento do SARS-CoV-2 e as possibilidades de novos agentes patogénicos respiratórios no futuro, é cada vez mais importante monitorizar as infeções respiratórias agudas graves para preparação e resposta de emergência a ameaças de saúde pública nacionais e internacionais.

Uma vez estabelecido o sistema de vigilância da SARI em duas unidades hospitalares, pretende-se alargar para outras unidades sentinela de forma a tornar os dados recolhidos o mais representativos da população portuguesa. A deteção

precoce permitirá que as autoridades de saúde planeiem estratégias adequadas de controlo e intervenção de forma atempada.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization, European Centre for Disease, Prevention and Control. Operational considerations for respiratory virus surveillance in Europe, 18 July 2022. Copenhagen: WHO/EURO, ECDC, 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Operational-considerations-respiratory-virus-surveillance-euro-2022.pdf>
- (2) Hughes HE, Edeghere O, O'Brien SJ, et al. Emergency department syndromic surveillance systems: a systematic review. BMC Public Health. 2020 Dec 9;20(1):1891. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09949-y>
- (3) Torres AR, Silva S, Kislaya I, et al. Deteção precoce de COVID-19 em Portugal: uso de registos clínicos. Acta Med Port. 2021 Mar 1;34(3):176-84. Portuguese. <https://doi.org/10.20344/amp.14593>
- (4) Torres AR, Gómez V, Kislaya I, et al. Monitoring COVID-19 and Influenza: The Added Value of a Severe Acute Respiratory Infection Surveillance System in Portugal. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2023 Feb 16;2023:6590011. <https://doi.org/10.1155/2023/6590011>
- (5) World Health Organization. ICD-10 Version: 2019: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision [online]. <https://icd.who.int/browse10/2019/en>
- (6) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Boletim de Vigilância Epidemiológica da Gripe e outros Vírus Respiratórios: Época 2023/2024 (Semana 15 | 8 a 14 abril). Lisboa: INSA, 2024. https://www.insa.min-saude.pt/wp-content/uploads/2024/04/S15_2024.pdf

Toxocaríase: confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção por *Toxocara* spp. entre 2018 e 2022

*Toxocariasis: laboratory confirmation of clinical cases suspected of infection by *Toxocara* spp. between 2018-2022*

Tânia Reis, Anabela Vilares, Susana Martins, Idalina Ferreira, Maria João Gargaté

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

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

_Resumo

A toxocaríase é uma infeção parasitária zoonótica com distribuição mundial, considerada pelo *Centre for Disease Control and Prevention* (CDC) uma das doenças parasitárias mais negligenciadas e que apresenta uma taxa de prevalência subestimada, sendo raros os estudos sobre a seroprevalência para *Toxocara* spp. em Portugal. A infeção no Homem pode ocorrer de várias formas, sendo predominante a infeção através da ingestão de ovos infetados existentes no meio ambiente.

O objetivo deste estudo foi efetuar uma análise dos resultados laboratoriais de todos os casos com suspeita clínica de toxocaríase estudados no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre 2018 e 2022, tal como descrever as características demográficas dos casos confirmados.

As metodologias laboratoriais usadas foram métodos serológicos: determinação qualitativa de anticorpos IgG para *Toxocara canis* – ELISA (TECAN) e Imunoblot comercial (Ldbio Iberlab) para confirmação dos casos positivos. Durante o período de estudo de 5 anos foram analisadas amostras de soro de 542 casos suspeitos de infeção por *Toxocara* spp., dos quais 160 (29,5%) apresentaram serologia positiva, tendo 19% (30/160) ocorrido em crianças entre os 5 e os 14 anos de idade, sendo este o grupo etário com maior número de infeções causadas por este agente etiológico.

Estes resultados mostram uma seroprevalência muito superior aos 10,5% encontrados na Região europeia sendo associada principalmente a fatores socioeconómicos e ambientais, destacando-se a necessidade de uma compreensão mais aprofundada da biologia molecular, bioquímica, genética, epidemiologia e ecologia de *Toxocara* spp. que possam levar a novas e melhores estratégias para o tratamento, diagnóstico e controlo desta parasitose, tais como o desenvolvimento de uma vacina e/ou de um agente ovicida eficaz, com vista a um melhor controlo deste problema de saúde pública.

_Abstract

*Toxocariasis is a zoonotic parasitic infection with worldwide distribution, considered by the Center for Disease Control and Prevention to be one of the most neglected parasitic diseases and which has an underestimated prevalence rate, with studies on seroprevalence for *Toxocara* spp being rare in Portugal. It is a disease caused by the larval forms of *Toxocara* spp., nematodes belonging to the order Ascaridiodea, family Toxocaridae, with the species *Toxocara canis*, whose definitive hosts are canids, responsible for the majority of infections in humans. Infection in humans can occur in several ways, with the predominant mode of infection being through the ingestion of infected larval eggs*

existing in the environment, and presenting four main clinical forms.

The aim of the study was to perform an analysis of the laboratory results of all cases with clinical suspicion of toxocariasis studied at the National Reference Laboratory for Parasitic and Fungal Infections of the National Institute of Health Dr Ricardo Jorge (Portugal) between 2018 and 2022, as describe the demographic characteristics in confirmed cases.

*The laboratory methodologies used were serological methods: qualitative determination of IgG antibodies to *Toxocara canis* – ELISA (TECAN) and commercial Immunoblot (Ldbio Iberlab) to confirm positive cases. During the 5-year study period, serum samples from 542 suspected cases of *Toxocara* spp. infection were analyzed, of which 160 (29.5%) presented positive serology, 19% (30/160) of which occurred in children aged 5 and 14 years of age, this being the age group with the highest number of infections caused by this etiological agent.*

*These results show a seroprevalence much higher than the 10.5% found in the European region, being associated mainly with socioeconomic and environmental factors, highlighting the need for a more in-depth understanding of the molecular biology, biochemistry, genetics, epidemiology and ecology of *Toxocara* spp. that could lead to new and better strategies for treatment, diagnosis and control of this parasitic disease, such as the development of a vaccine and/or an effective ovicidal agent to control this helminthozoonosis and promote a higher public health standard.*

_Introdução

A toxocaríase é uma infeção parasitária zoonótica com distribuição mundial de maior incidência em países tropicais e subtropicais, sendo também frequente em climas temperados como a bacia do Mediterrâneo (1-3). A infeção em humanos é causada pelas formas larvares de *Toxocara* spp., nemátodes pertencentes à ordem *Ascaridiodea*, família *Toxocaridae*, sendo a espécie *Toxocara canis*, que tem como hospedeiro definitivo os canídeos (cães, raposas, lobos, coiotes), responsável pela maioria das infeções em humanos.

As espécies *Toxocara cati* e *Toxocara malaysiensis* têm como hospedeiro definitivo os felídeos, contudo raramente ou nunca infetam o Homem (4,5). Estudos veterinários mostraram que ambas as espécies de *Toxocara canis* e *T. cati* estão amplamente distribuídas em animais carnívoros domésticos e selvagens em Portugal, variando entre 5% em cães domésticos e 29% em cães vadios do norte de Portugal, 11-38% em gatos vadios de Lisboa e cães domésticos de Évora. É também prevalente em lobos ibéricos (9%) e raposas vermelhas (21-37%) do centro de Portugal (4).

O Homem pode infetar-se através da ingestão acidental de ovos embrionados de *Toxocara* spp, a partir de água ou vegetais ou através da ingestão de larvas hipobióticas em hospedeiros intermediários (4). No entanto, o modo predominante de infeção é através da ingestão de ovos infetados existentes no meio ambiente, comportamento comum nas crianças. Estes parasitas só completam o seu ciclo de vida no tubo digestivo do cão ou gato, local onde as larvas atingem formas adultas com capacidade de reprodução (1-3). Uma larva fêmea pode produzir até 200 000 ovos por dia, que são excretados nas fezes do animal infetado (6). Os ovos apenas adquirem capacidade infetante após aproximadamente uma semana no solo, em condições favoráveis, período em que se tornam embrionados podendo depois manter-se infetantes no solo vários anos (6).

A doença humana pode apresentar quatro formas clínicas principais: Larva migrans visceral (LMV), Larva migrans Ocular (LMO), Neurotoxocaríase (NT) e a forma assintomática ou subclínica, denominada de toxocaríase comum (TC). A LMV é mais prevalente em crianças de 1-7 anos de idade e pode resultar em hepatite e pneumonite, com hepatomegalia, eosinofilia, linfadenopatia, tosse, febre, perda de peso, diarreia e vômitos (4). A LMO ocorre mais frequentemente em crianças mais velhas (5-10 anos de idade) e adolescentes, podendo resultar em endoftalmite crónica, retinite, granuloma posterior/periférico e cegueira (7). As larvas podem migrar para o sistema nervoso central pode desenvolver neurotoxocaríase e causar meningoencefalite, meningite,

mielite, epilepsia, vasculite cerebral e doença neurodegenerativa em indivíduos de meia idade, resultando em manifestações clínicas inespecíficas como dores de cabeça e febre. O quadro clínico da toxocaríase comum (TC) é similar à LMV mas com manifestações mais ligeiras, apresentando eosinofilia e concentração aumentada da imunoglobulina E (7).

O tratamento em humanos varia, em função do quadro clínico e da localização das larvas. São usados anti-helmínticos como o albendazol (primeira linha) ou mebendazol, juntamente com corticosteroides para minimizar as reações alérgicas ligadas aos antígenos de *Toxocara* spp. (4).

Esta doença parasitária é considerada pelo *Centre for Disease Control and Prevention* (CDC) uma das mais importantes infeções parasitárias negligenciadas (4). Tratando-se de uma parasitose disseminada por muitos países, a sua prevalência é elevada mesmo nos países desenvolvidos. Apesar da sua importância clínica para a saúde pública, a prevalência da toxocaríase está subestimada, não só devido à sua sintomatologia inespecífica, mas também pelo facto de não ser uma doença de notificação obrigatória e conseqüentemente não estar incluída nos programas de vigilância epidemiológica existentes. São muito escassos os estudos sobre a seroprevalência para *Toxocara* spp. em Portugal, existindo apenas dois estudos, um que mostrou que em 457 amostras humanas foram detetados 21,9% de casos positivos (8) e outro estudo posterior, que revelou uma taxa de seropositividade de 18,8% de um total de 846 soros de indivíduos suspeitos de infeção por *Toxocara* spp (4).

_Objetivo

Este estudo tem como objetivo descrever as características demográficas de indivíduos com quadro clínico suspeito de infeção por *Toxocara* spp. recebidos no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 2018 e dezembro de 2022.

_Material e métodos

Foi efetuada uma análise retrospectiva dos resultados laboratoriais de todos os casos com suspeita clínica de toxocaríase estudados no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 2018 e dezembro de 2022. Para a análise descritiva dos dados demográficos dos casos confirmados, recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas.

O diagnóstico laboratorial da infeção por *Toxocara* spp. foi realizado por métodos serológicos, determinação qualitativa de anticorpos IgG para *Toxocara canis* – ELISA (TECAN) e Immunoblot comercial (Ldbio Iberlab) para confirmação dos casos suspeitos de infeção.

_Resultados

Entre 2018 e 2022, foram analisadas amostras de soro de 542 casos suspeitos de infeção por *Toxocara* spp., dos quais 160 (29,5%) apresentaram serologia positiva.

Na **tabela 1** apresenta-se a distribuição dos casos com quadro clínico suspeito de infeção por *Toxocara* spp. estudados no INSA entre 2018 e 2022 e o número de casos com diagnóstico laboratorial confirmado, por ano de diagnóstico.

O quadro clínico para a maioria dos casos de infeção por *Toxocara* spp. confirmados é desconhecido. A eosinofilia foi conhecida em 40 dos 160 (25%) casos de infeção por *Toxocara* spp., seguida de esplenomegalia, diarreia crónica, doença renal e febre. Em 9% dos casos descreveu-se um quadro de lesões oculares (uveíte unilateral, bilateral, retinite e coriorretinite) maioritariamente em crianças e jovens adultos.

Dos 160 casos positivos para *Toxocara* spp., apenas dois referiram ter tido contacto próximo com gatos ou cães.

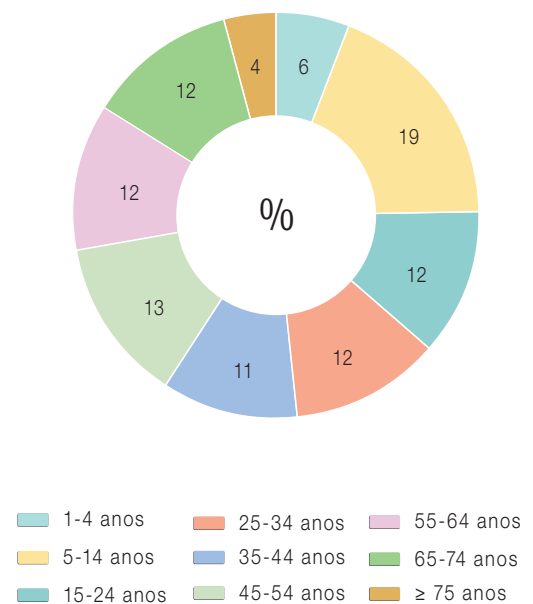
Distribuição de casos de infeção por *Toxocara* spp. por sexo e grupo etário

Dos 160 doentes com infeção por *Toxocara* spp. confirmada, 86 (53,8%) pertenciam ao sexo masculino e 74 casos (46,2%) ao sexo feminino. No decorrer dos 5 anos em estudo, observou-se que 19% (30/160) dos casos ocorreram em crianças entre os 5 e os 14 anos de idade, sendo este o grupo etário com maior número de infeções por *Toxocara* spp. (**gráfico 1**).

Gráfico 1: Distribuição dos casos de infeção por *Toxocara* spp. por grupo etário, 2018-2022.

Tabela 1: Distribuição anual dos casos de infeção por *Toxocara* spp., 2018-2022

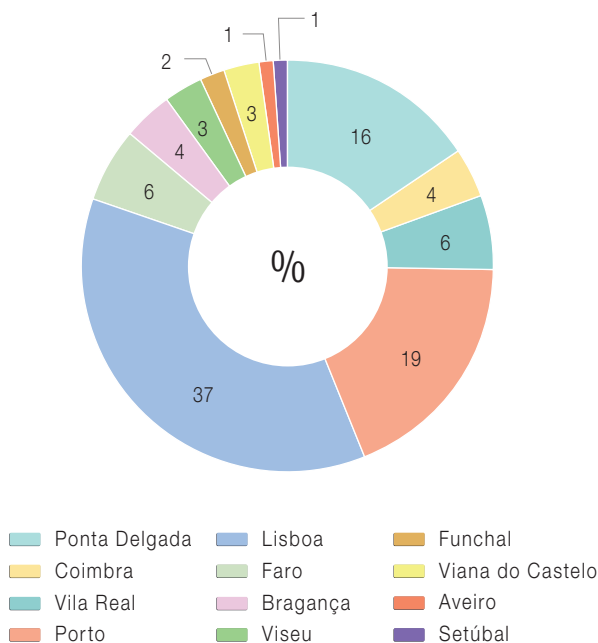
Ano	Número total de casos suspeitos estudados	Nº (%) de casos confirmados de infeção por <i>Toxocara</i> spp.
2018	134	44 (32,8)
2019	133	41 (30,8)
2020	86	18 (20,9)
2021	72	20 (27,8)
2022	117	37 (31,6)
Total	542	160 (29,5)



Distribuição de casos de infeção por *Toxocara spp.* por distrito de residência

A maioria dos casos de toxocaríase confirmados no INSA entre 2018 e 2022, eram residentes na área metropolitana de Lisboa (37%; 59/160), seguido da área metropolitana do Porto (19%; 30/160) e de Ponta Delgada (16%; 26/160) (gráfico 2).

Gráfico 2: Distribuição dos casos de infeção por *Toxocara spp.* por distrito de residência, 2018-2022.



Todas as áreas geográficas de Portugal registaram casos positivos para *Toxocara spp.*, à exceção do Alentejo. Lisboa e Vale do Tejo registou a maior positividade (37,5%), seguido do Norte (31,9%) e Centro (6,9%) (tabela 2).

Tabela 2: Distribuição do número de casos positivos para *Toxocara spp.*, por área geográfica, 2018-2022.

Área geográfica	Número de casos positivos	Porcentagem de casos positivos
Norte	51	31,9
Centro	11	6,9
Lisboa e Vale do Tejo	60	37,5
Alentejo	0	0,0
Algarve	9	5,6
Madeira	3	1,9
Açores	26	16,3
Total	160	100

_Discussão e conclusão

Globalmente, nos 542 casos suspeitos de infeção por *Toxocara spp.* estudados no INSA entre 2018 e 2022, foi encontrada uma seroprevalência de 29,5%. Este valor é superior, aos 21,9% reportados também pelo INSA num estudo efetuado no sul de Portugal entre 1995 e 2005 em 457 amostras suspeitas de toxocaríase (8), tal como num estudo posterior no qual um total de 846 soros de indivíduos suspeitos da referida infeção, colhidos entre 2010 e 2020 em Portugal, revelaram uma seroprevalência de 18,8% (4).

Dados de outros países europeus mostram taxas de seroprevalência de 8,0% em residentes da Catânia, Itália e 16,0% em residentes de Attica, Grécia (4). Uma revisão sistemática com meta-análise publicada em 2019 revelou uma seroprevalência global de 19,0% de toxocaríase em humanos, variando de 8,2% no Mediterrâneo Oriental a 37,7% em África, com uma seroprevalência de 10,5% (8,5-12,8%) em toda a Região europeia (9). Observaram-se seroprevalências mais elevadas em países tropicais menos industrializados, incluindo África: 30% na Nigéria,

45% na Suazilândia e 93% na Reunião (África), 81% no Nepal, 63,2% na Indonésia e 58% na Malásia (Ásia) e 36% no Brasil e 37% no Peru (América do Sul) (10).

Apesar de se tratarem de estudos com desenhos e amostras populacionais diferentes, o presente e os referidos estudos referentes a Portugal, mostram uma seroprevalência muito superior aos 10,5% encontrados na região europeia (9). Com a agravante que obtivemos um menor número de amostras suspeitas e casos diagnosticados de toxocaríase em 2020 e 2021 muito provavelmente devido ao adiar de cuidados médicos e realização de técnicas complementares de diagnóstico devido à pandemia da COVID-19.

Conforme descrito por Rostami *et al.* em 2019, as elevadas seroprevalências da infeção por *Toxocara* spp. foram associadas principalmente a fatores socioeconómicos e ambientais, como sejam o menor nível de instrução, menor índice de desenvolvimento humano, menor latitude, maior humidade, maior temperatura e maior precipitação (9). Considerando se outros potenciais fatores de risco relacionados com a aquisição da infeção por *Toxocara* spp., por exemplo o sexo masculino, idade jovem, habitação em meio rural, contacto próximo com cães, gatos ou solo, consumo de carne crua e consumo de água não tratada (9).

No presente estudo, o maior número de casos de infeção por *Toxocara* spp. ocorreu nos homens (53,8%), o que está de acordo com a literatura que relata o sexo masculino como um potencial fator de risco associado à seropositividade para esta parasitose (9). No que respeita à idade, também este estudo mostrou a idade jovem como um fator de risco acrescido, sendo o grupo etário entre os 5 e os 14 anos de idade o que revelou um maior número de infeções por *Toxocara* spp. (19%). Neste estudo foram identificados casos de infeção em todo o território de Portugal continental e Regiões Autónomas, pelo que habitar em áreas rurais não foi revelado como um fator de risco, sendo as zonas com maior número de casos positivos os maiores centros urbanos, as áreas metropolitanas de Lisboa e Porto. Por outro lado, o facto de neste estudo não terem sido diagnos-

ticados casos de toxocaríase em residentes na Região do Alentejo pode apenas relacionar-se com o encaminhamento dos casos clínicos suspeitos de infeção para outras instituições de saúde com diagnóstico laboratorial, o que *per si* reforça a importância da vigilância laboratorial das doenças parasitárias em Portugal. Com respeito aos outros fatores de risco não obtivemos qualquer informação disponível para o poder avaliar.

Apesar da utilização de anti-helmínticos de largo espectro em animais de estimação, campanhas educativas e multas para promover a recolha de fezes pelos donos de animais de companhia, controlo de cães vadios e, mais recentemente, a substituição nos parques infantis de terra por pisos sintéticos e a construção de parques caninos por alguns municípios, a toxocaríase continua com elevados indicadores de transmissibilidade, principalmente nos centros urbanos. Estes indicadores são sustentados pelo atual e rápido crescimento das populações humana e canina em coabitação; pelos fracos recursos financeiros dos “donos” dos animais, para proceder a cuidados veterinários indispensáveis como a desparasitação; pelas más práticas de higiene na recolha dos dejetos dos cães e pela falta de implementação de programas específicos de vigilância e controlo desta parasitose.

Acresce ainda que é necessária uma maior compreensão da biologia molecular, bioquímica, genética, epidemiologia e ecologia de *Toxocara* spp. e para tal são necessárias atividades de investigação que se concentrem no desenvolvimento de ferramentas moleculares para identificação específica e análise genética devem levar a novas e melhores estratégias para o tratamento, diagnóstico e controlo desta parasitose (11). Nomeadamente, o desenvolvimento de uma vacina e/ou de um agente ovicida eficaz, que há muito são objetivos da comunidade científica, o que melhoraria consideravelmente as hipóteses de controlar esta infeção zoonótica que constitui um problema para a saúde pública (11).

Assim, uma estratégia integrada e multidisciplinar *One Health* deveria melhorar a nossa base de conhecimentos e reforçar a prevenção e o controlo da toxocaríase.

Referências bibliográficas:

- (1) Magnaval JF, Glickman LT, Dorchies P, et al. Highlights of human toxocariasis. *Korean J Parasitol*. 2001 Mar;39(1):1-11. <https://doi.org/10.3347/kjp.2001.39.1.1>
- (2) Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Apr;16(2):265-72. Review. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.265-272.2003>
- (3) Taylor MR, Keane CT, O'Connor P, et al. The expanded spectrum of toxocaral disease. *Lancet*. 1988 Mar 26;1(8587):692-5. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)91486-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)91486-9).
- (4) Alho AM, Ferreira PM, Clemente I, et al. Human Toxocariasis in Portugal-An Overview of a Neglected Zoonosis over the Last Decade (2010-2020). *Infect Dis Rep*. 2021 Nov 4;13(4):938-948. <https://doi.org/10.3390/idr13040086>
- (5) Fisher M. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends Parasitol*. 2003 Apr;19(4):167-70. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(03\)00027-8](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(03)00027-8)
- (6) Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for veterinarians: Prevention of zoonotic transmission of ascarids and hookworms of dogs and cats. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/5908>
- (7) Rostami A, Ma G, Wang T, et al. Human toxocariasis - A look at a neglected disease through an epidemiological 'prism'. *Infect Genet Evol*. 2019 Oct;74:104002. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104002>
- (8) Martins S, Vilares A, Júlio C, et al. Helminth larval infections—Toxocariasis, cysticercosis and cystic hydatidosis. *Acta Parasitol Port*. 2005;12:206.
- (9) Rostami A, Riahi SM, Holland CV, et al. Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Dec 19;13(12):e0007809. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007809>
- (10) Smith H, Holland C, Taylor M, et al. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitol*. 2009 Apr;25(4):182-8. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.006>
- (11) Macpherson CN. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. *Int J Parasitol*. 2013 Nov;43(12-13):999-1008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.004>

Infeções por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*: resultados do diagnóstico laboratorial realizado no INSA, 2017-2022

Infections by Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae: results of laboratory diagnosis at INSA, 2017-2022

Inês João, Dora Cordeiro, Cristina Correia, Teresa Carreira, Maria José Borrego

m.jose.borrego@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência das Infecções Sexualmente Transmissíveis. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

Chlamydia trachomatis e *Neisseria gonorrhoeae* são responsáveis pelas duas infeções sexualmente transmissíveis (IST) curáveis mais comuns em todo o mundo. Sendo frequentemente assintomáticas, o rastreio laboratorial destas IST é fundamental, para que possa ser efetuado o tratamento adequado que evite o desenvolvimento de sequelas clínicas graves e para quebrar cadeias de transmissão.

O presente estudo teve por objetivo determinar a frequência das infeções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* no âmbito da prestação de serviços do Laboratório Nacional de Referência das IST no INSA, no período 2017-2022.

A pesquisa laboratorial de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* foi efetuada por uma técnica de PCR em tempo real, tendo sido obtidos resultados válidos para 47 136 amostras biológicas (genitais, anorretais e/ou orofaríngeas) de 21 188 pessoas que, em 22,6% (n=4799) dos casos, revelaram ser positivas para qualquer uma destas IST. Nas mulheres, a infeção por *C. trachomatis* foi a mais frequente (10,5%; 494/4692), enquanto nos homens a infeção por *N. gonorrhoeae* foi a mais comum (16,2%; 2669/16 455). *C. trachomatis* foi mais detetada nas amostras anorretais (10,1%; 1222/12 057), nas quais 19,3% (236/1222) revelaram pertencer ao grupo do linfogranuloma venéreo, e *N. gonorrhoeae* na orofaringe (11,5%; 1621/14 123). Ambas as infeções foram mais frequentemente detetadas nos homens (28,4%; 4680/16455) e nas pessoas (independentemente do sexo) com menos de 25 anos (36,8%; 1389/3777).

Em conclusão, este estudo revelou infeção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em amostras colhidas de diferentes locais anatómicos, tendo sido observadas elevadas frequências de infeção por *N. gonorrhoeae* a nível orofaríngeo e anorretal, assim como de *C. trachomatis* neste último local anatómico, sugerindo que o rastreio destas IST não se deverá restringir à região genital. O aumento (8,6 pontos percentuais entre 2017 e 2022) das infeções por *N. gonorrhoeae* configura motivo de preocupação dada a potencial emergência de estirpes resistentes aos antibióticos.

_Abstract

Chlamydia trachomatis and *Neisseria gonorrhoeae* constitute the two most common curable sexually transmitted infections (STI) worldwide. As they are often asymptomatic, laboratory screening of these STI is essential for establishing adequate treatment that should prevent the development of serious clinical sequelae, and to break transmission chains.

The present study aimed to determine the frequency of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* infections within the scope of the routine laboratory diagnosis at the National STI Reference Laboratory at INSA, in the period 2017-2022.

Laboratory research for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* was carried out using real-time PCR on 47,136 biological samples (genital, anorectal and/or oropharyngeal) from 21,188 people. Infection by any of these STI was detected in 22.6% (n=4799) of the individuals. In women, infection by *C. trachomatis* was the most common (10.5%; 494/4692), while infection by *N. gonorrhoeae* was the most common in men (16.2%; 2669/16,455). *C. trachomatis* was the most frequent in anorectal samples (10.1%; 1222/12057), of which 19.3% (236/1222) revealed to belong to the lymphogranuloma venereum group, and *N. gonorrhoeae* was the most common in the oropharynx (11.5%; 1621/14,123). Both infections were more frequently detected in men (28.4%; 4680/16,455) and in people (regardless of gender) under 25 years of age (36.8%; 1389/3777). In conclusion, laboratory screening for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* in samples collected from different anatomical sites revealed high percentages of *N. gonorrhoeae* infections at the oropharynx and anorectum and of *C. trachomatis* at the anorectum, suggesting that screening for these STIs should not be restricted to the genital region. The rise (8.6 percentage points between 2017 and 2022) of *N. gonorrhoeae* infections represents a serious concern, given the potential emergence of strains resistant to antibiotics.

_Introdução

Mais de 30 microrganismos podem ser transmitidos duma pessoa para outra por contacto sexual, seja este genital, anal ou oral. Entre estes microrganismos e pela sua elevada incidência, destacam-se oito, sendo quatro deles responsáveis por infeções sexualmente transmissíveis (IST) incuráveis: vírus da hepatite B, vírus herpes simplex, vírus da imunodeficiência humana (VIH) e vírus do papiloma humano; e quatro, por IST curáveis: *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* (1). Os sintomas e sinais clínicos das infeções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* são consequência da inflamação das mucosas infetadas, nomeadamente cervicite e uretrite, no caso da infeção genital na mulher e no homem, respetivamente. Contudo, as IST são frequentemente assintomáticas pelo que é recomendado o seu rastreio regular na mulher grávida para

evitar a transmissão vertical e nos grupos populacionais com risco acrescido de infeção, como é o caso dos trabalhadores do sexo, dos homens que têm sexo com homens (HSH) e da população adolescente, de forma a que possa ser efetuado o tratamento atempado e assim contribuir para quebrar cadeias de transmissão (1). O diagnóstico de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* é ainda recomendado em qualquer pessoa com sinais ou sintomas compatíveis com estas infeções, nos parceiros sexuais de indivíduos com uma destas IST e em todas as pessoas com um novo parceiro sexual ou que tenham múltiplos contactos sexuais (2). Os métodos laboratoriais atualmente recomendados para o diagnóstico das IST, nomeadamente de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, são os testes de amplificação de ácidos nucleicos (1,2).

_Objetivo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência e a distribuição das infeções por *C. trachomatis* e por *N. gonorrhoeae* diagnosticadas no âmbito da prestação de serviços, no Laboratório Nacional de Referência das Infeções Sexualmente Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, entre 2017 e 2022.

_Material e métodos

Este estudo é uma análise retrospectiva dos dados de diagnóstico laboratorial das infeções por *C. trachomatis* e *N.*

gonorrhoeae realizado no Laboratório Nacional de Referência num período de seis anos, entre 1 de janeiro de 2017 e 31 de dezembro de 2022. Neste estudo foram incluídas todas as amostras biológicas genitais (urina, exsudado uretral, vaginal ou endocervical) (n=20 981), exsudados anorretais (n=12 111) e orofaríngeos (n=14 133), recebidos no LNR_IST. Estes espécimes foram colhidos em 21 192 indivíduos, conforme descrito na **tabela 1**.

Relativamente à idade, 3784 pessoas tinham menos de 25 anos, incluindo sete crianças com idade entre um e doze anos. Pessoas com idade igual ou superior a 25 anos foram 17 404 (87 anos foi a idade máxima observada).

O diagnóstico laboratorial foi efetuado em amostras biológicas de utentes seguidos nas consultas do grupo de ativistas para o tratamento (GAT), em diversas unidades de saúde familiar da Região de Lisboa e Vale do Tejo e em unidades hospitalares de todo o país.

A pesquisa de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* foi efetuada por método de amplificação de ácidos nucleicos, nomeadamente pelo teste cobas® 4800 CT/NG, Roche Diagnostics (janeiro de 2017 a julho de 2019) e pelo teste Allplex™ STI Essential Assay, Seegene (agosto de 2019 a dezembro de 2022), de acordo com as instruções dos respetivos fabricantes. A pesquisa de linfogranuloma venéreo (LGV) em amostras anorretais positivas para *C. trachomatis*,

Tabela 1: Número de indivíduos e de amostras biológicas em estudo, colhidas entre 1 de janeiro de 2017 e 31 de dezembro de 2022.

	Anos						Total
	2017	2018	2019	2020	2021	2022	
Mulheres	464	461	692	625	952	1498	4692
Homens	1202	1924	2649	2615	3179	4890	16 459
Trans	0	1	7	31	1	1	41
Total de indivíduos	1666	2386	3348	3271	4132	6389	21 192
Total de amostras	2561	4949	7018	7858	9662	15 177	47 225

foi efetuada esporadicamente em 2017 e primeiro trimestre de 2018 com recurso ao teste CLART® STDs, Genomica, tendo passado a ser realizada sistematicamente, a partir do início do 2.º semestre de 2018 e até final de 2022, pelo teste Allplex™ Genital ulcer Assay, Seegene.

Resultados

Para efeitos deste estudo, os resultados das pessoas testadas para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* num intervalo de tempo inferior a três meses foram excluídos. Esta opção teve por objetivo eliminar redundância de resultados negativos ou de positivos decorrentes dum mesmo episódio infeccioso.

Foram consideradas ‘positivas’ as pessoas com pelo menos um resultado positivo para *C. trachomatis* ou *N. gonorrhoeae* em qualquer das amostras biológicas testadas e foram consideradas ‘negativas’ as pessoas sem qualquer resultado positivo; foram excluídas quatro pessoas por terem resultado inválido na única amostra testada, pelo que o total de utentes ficou estabelecido em 21 188 e o total de amostras em 47 221.

Durante o período de seis anos em estudo, 22,6% (4799/21 188) das pessoas revelaram infeção por *C. trachomatis* e/ou *N. gonorrhoeae*, sendo que 644 (3,0%) estavam infetadas por ambos os microrganismos (528 no mesmo local anatómico e 129 em locais anatómicos diferentes; deste total de 657 pessoas, 13 revelaram infeção por *C. trachomatis* num local anatómico, por *N. gonorrhoeae* noutra e ambas as IST no terceiro local anatómico testado). O **gráfico 1** representa a distribuição anual de casos de infeção por *C. trachomatis* e por *N. gonorrhoeae* entre 2017 e 2022.

Das 47 221 amostras biológicas estudadas, 47 136 (99,8%) promoveram resultados válidos. Das 20 956 amostras genitais, 5,8% (1216) foram positivas para *C. trachomatis* e 4,3% (900) para *N. gonorrhoeae*. Quanto às 12 057 amostras anorretais, 10,1% (1222) foram positivas para *C. trachomatis* e 10,9% (1318) para *N. gonorrhoeae*. Em relação às 14 123 amostras orofaríngeas, a infeção por *C. trachomatis* esteve presente em 2,4% (336) das amostras

e *N. gonorrhoeae* em 11,4% (1612). Acrescente-se que entre os casos de infeção anorretal por *C. trachomatis* (n=1222), 236 (19,3%) corresponderam a infeção por estirpes responsáveis por LGV. O **gráfico 2** representa a distribuição anual das amostras biológicas positivas para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* por local anatómico (genital, anorretal e orofaríngeo) entre 2017 e 2022.

Em relação à distribuição por género, das 4692 mulheres estudadas 10,5% (494/4692) revelaram infeção por *C. trachomatis* e 5,4% (254/4692) por *N. gonorrhoeae*. Nos homens, 12,2% (2011/16 455) evidenciaram infeção por *C. trachomatis* e 16,2% (2669/16 455) por *N. gonorrhoeae*. Não foi efetuada análise dos resultados das pessoas trans dado o seu reduzido número no conjunto de pessoas estudadas (**tabela 1**). O **gráfico 3** representa a distribuição anual de casos de infeções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em mulheres e homens no período de 2017 a 2022.

Relativamente à idade, 655 (17,3%) pessoas com menos de 25 anos revelaram infeção por *C. trachomatis* e 691 (18,3%) por *N. gonorrhoeae*. Para efeitos do cálculo da frequência de pessoas infetadas por *C. trachomatis* ou *N. gonorrhoeae* neste grupo etário, foram excluídas as sete crianças, dado poderem configurar casos de transmissão vertical. Entre as pessoas com idade igual ou superior a 25 anos, 1853 (10,6%) evidenciaram infeção por *C. trachomatis* e 2244 (12,9%) por *N. gonorrhoeae*. O **gráfico 4** representa a distribuição anual dos casos de infeções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* entre 2017 e 2022, por grupo etário.

Gráfico 1: Distribuição temporal de casos de infeção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, em %, 2017-2022.

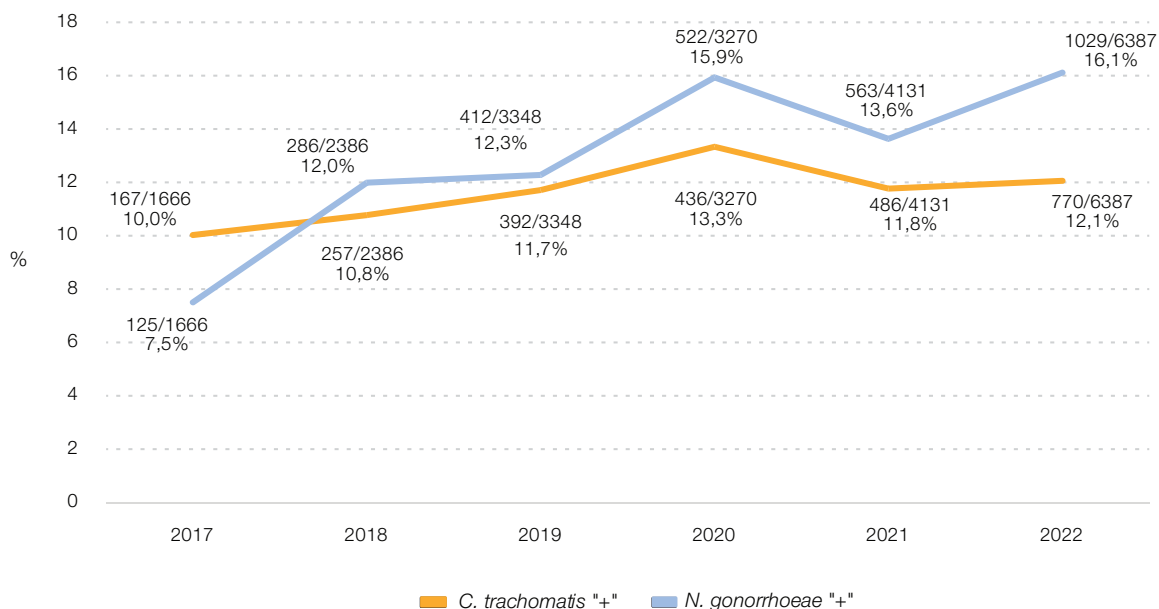
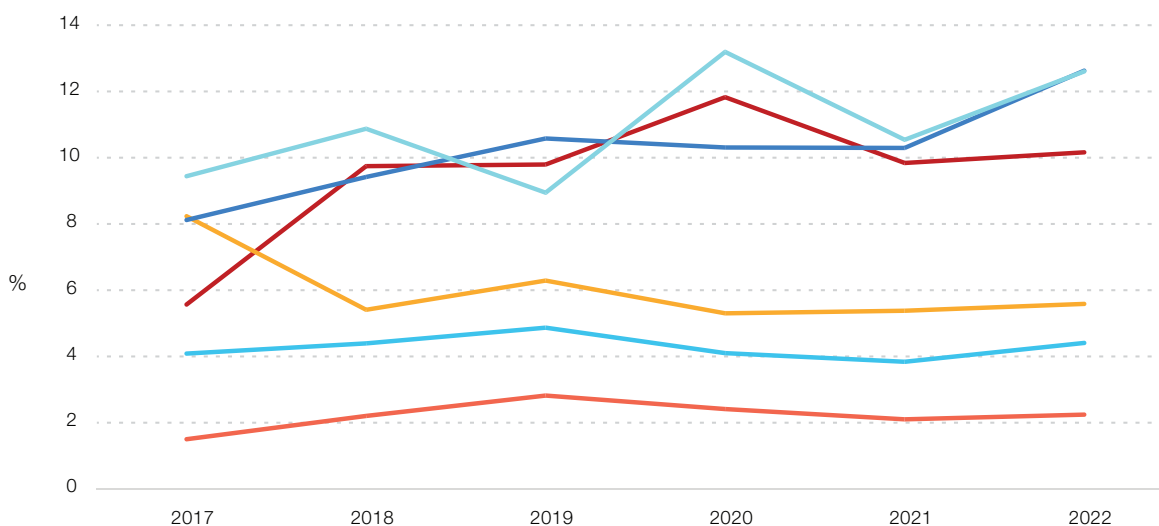
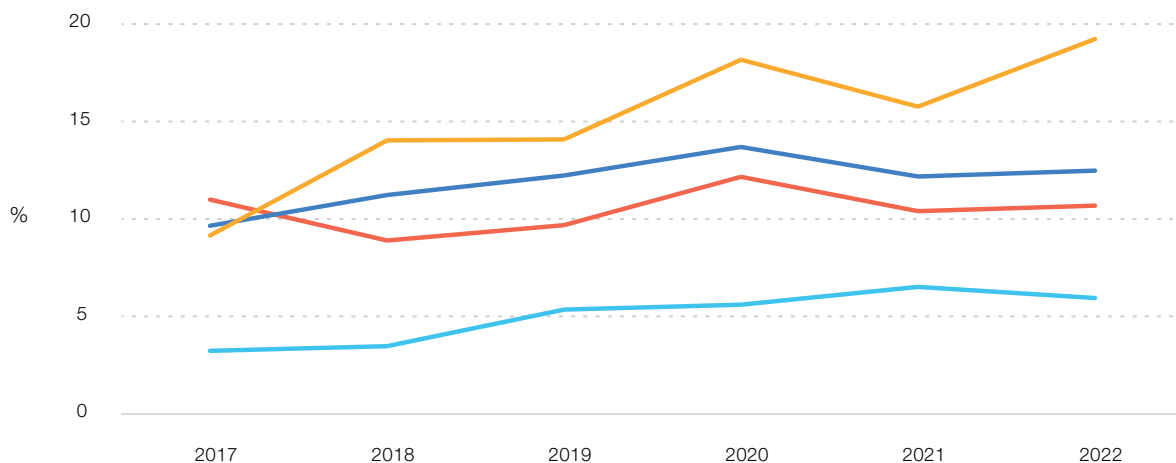


Gráfico 2: Distribuição temporal de casos de infeção por *C. trachomatis* (CT) e *N. gonorrhoeae* (NG) na região anorretal, genital e orofaríngea, 2017-2022.



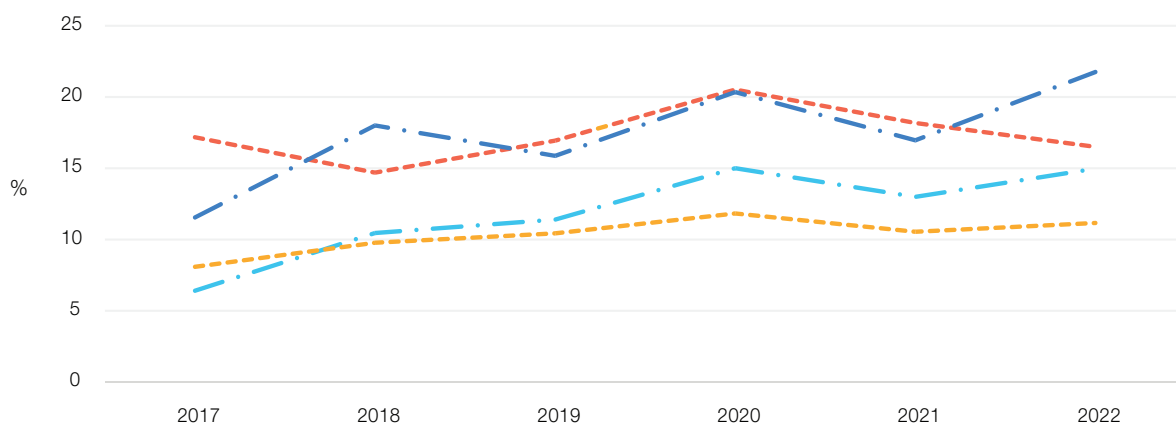
CT "+" Anorretal	24/431	5,6%	119/1221	9,7%	162/1654	9,8%	257/2173	11,8%	260/2642	9,8%	400/3936	10,2%
CT "+" Genital	137/1664	8,2%	128/2367	5,4%	208/3307	6,3%	172/3244	5,3%	220/4090	5,4%	351/6284	5,6%
CT "+" Orofaríngea	7/466	1,5%	30/1361	2,2%	58/2057	2,8%	70/2433	2,9%	61/2903	2,1%	110/4903	2,2%
NG "+" Anorretal	35/431	8,1%	115/1221	9,4%	175/1654	10,6%	224/2173	10,3%	272/2642	10,3%	497/3936	12,6%
NG "+" Genital	68/1664	4,1%	104/2367	4,4%	161/3307	4,9%	133/3244	4,1%	157/4090	3,8%	277/6284	4,4%
NG "+" Orofaríngea	44/466	9,4%	148/1361	10,9%	184/2057	8,9%	321/2433	13,2%	306/2903	10,5%	618/4903	12,6%

Gráfico 3: Distribuição temporal de casos de infeção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, em mulheres e homens, 2017-2022.



CT "+" Mulheres	51/464	11,0%	41/461	8,9%	67/692	9,7%	76/625	12,2%	99/952	10,4%	160/1498	10,7%
NG "+" Mulheres	15/464	3,2%	16/461	3,5%	37/692	5,3%	35/625	5,6%	62/952	6,5%	89/1498	5,9%
CT "+" Homens	116/1202	9,7%	216/1924	11,2%	324/2649	12,2%	358/2614	13,7%	387/3178	12,2%	610/4888	12,5%
NG "+" Homens	110/1202	9,2%	270/1924	14,0%	373/2649	14,1%	475/2614	18,2%	501/3178	15,8%	940/4888	19,2%

Gráfico 4: Distribuição temporal de casos de infeção por *C. trachomatis* (CT) e *N. gonorrhoeae* (NG) (em %), em pessoas com menos de 25 anos e mais anos, 2017-2022.



CT "+" em pessoas <25 anos	61/355	17,2%	71/483	14,7%	111/655	16,9%	116/565	20,5%	120/660	18,2%	176/1066	16,5%
NG "+" em pessoas <25 anos	84/355	11,5%	87/483	18,0%	104/655	15,9%	115/565	20,4%	112/660	17,0%	232/1066	21,8%
NG "+" em pessoas ≥25 anos	84/1311	6,4%	199/1903	10,5%	307/2693	11,4%	406/2705	15,0%	451/3471	13,0%	797/5321	15,0%
CT "+" em pessoas ≥25 anos	106/1311	8,1%	186/1903	9,8%	281/2693	10,4%	320/2705	11,8%	366/3471	10,5%	594/5321	11,2%

_Discussão e conclusões

A frequência de pessoas com diagnóstico laboratorial positivo para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* durante os seis anos a que se refere este estudo, de 2017 a 2022, foi elevada, 4799/21 188 (22,6%). Tal facto pode ser considerado expectável dado que a prestação de serviços de diagnóstico laboratorial de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* do INSA, envolve consultas de rastreio de IST, às quais acorrem pessoas de grupos de risco como, por exemplo, HSH, trabalhadores do sexo e pessoas com múltiplos contactos sexuais.

Como esperado (1), as IST em estudo revelaram-se mais frequentes na população abaixo dos 25 anos de idade, nomeadamente *C. trachomatis*, com mais 6,7 pontos percentuais e *N. gonorrhoeae*, com mais 5,4 pontos percentuais relativamente ao observado nas pessoas com 25 e mais anos (gráfico 4). Tal deverá constituir um alerta para as autoridades de saúde relativamente à necessidade premente de implementar um sistema de rastreio de infeções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* na população jovem, à luz do que é efetuado desde há vários anos em países do norte da Europa (3,4). Tal rastreio, certamente contribuiria para a prevenção das sequelas graves associadas a estas IST, nomeadamente doença inflamatória pélvica e infertilidade tubária, para além de contribuir para minimizar o risco de infeção VIH, uma vez que é facilitada pelas infeções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* (5). Contudo, os resultados do presente estudo alertam para a necessidade de efetuar o rastreio de IST nos diferentes locais anatómicos, algo que não é normalmente tido em conta nos rastreios sistemáticos na população jovem. De facto, no gráfico 2, fica patente que a infeção genital por *C. trachomatis* (entre 5,3% e 8,2% de casos) e por *N. gonorrhoeae* (entre 3,8% e 4,9%) não parece constituir a principal via de disseminação destas IST, eventualmente devido ao uso de métodos de barreira no decurso deste tipo de contacto sexual. Contrastando com estas percentagens, as infeções por *N. gonorrhoeae* na orofaringe (8,9% a 13,2%) e a nível anorretal (8,1% a 12,6%) e por *C. trachomatis* a nível anorretal (5,6%

a 11,8%), parecem evidenciar estas vias de contacto como as de maior importância na disseminação destas IST. Tal constatação é sobretudo importante quando foi detetada uma elevada frequência (19,3%) de estirpes do grupo LGV entre as pessoas com infeção anorretal por *C. trachomatis*, alertando para a necessidade de rastreio sistemático de estirpes LGV nesta amostra biológica, de forma a que os clínicos possam implementar a terapêutica apropriada o mais rapidamente possível. Por outro lado, a elevada percentagem de casos de infeção orofaríngea e anorretal por *N. gonorrhoeae* é preocupante, já que se estima que seja mais elevada a probabilidade de emergirem estirpes multirresistentes aos antibióticos nestes locais anatómicos do que na região genital (6,7).

Relativamente à distribuição por sexo, realçamos que a frequência de casos positivos foi superior nos homens, quer para *C. trachomatis* quer para *N. gonorrhoeae*, o que seria expectável à luz dos dados de Portugal disponibilizados pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), nos quais são referidos 72,2% e 88,5% de casos em homens e 27,8% e 11,5% de casos em mulheres, para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, respetivamente (8). Contudo, embora a frequência destas IST ser menor em mulheres, constitui ainda assim um fator preocupação, pelas potenciais consequências para a saúde reprodutiva feminina.

No que respeita ao alerta do ECDC publicado a 7 de março de 2024, relativo à subida de casos de IST na Europa (9), tal encontra eco na população em que efetuámos diagnóstico laboratorial entre 2017 e 2022, sobretudo nos casos de infeção por *N. gonorrhoeae* que representam uma tendência crescente (7,5% em 2017 e 16,1%, em 2022). As percentagens de infeção por *C. trachomatis* mantêm-se mais estáveis (entre 10,0% em 2017 e 12,1% em 2022, com um pico de 13,3% em 2020) (gráfico 1). Considerando que as situações de risco para adquirir as duas infeções seriam similares, poder-se-ia esperar algum paralelismo na evolução da positividade *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. Contudo, circunstâncias que extravasam os limites deste estudo, poderão exercer alguma influência na diferença observada;

nomeadamente, a toma de azitromicina ou de outros antimicrobianos que poderão tratar, de forma involuntária, algumas infeções por *C. trachomatis*. Contudo, a explicação para uma diferente evolução das duas infeções poderá também relacionar-se com a discrepância do sucesso biológico das duas infeções na orofaringe, local anatómico no qual *N. gonorrhoeae* é mais frequente, em oposição a *C. trachomatis* que revela neste local anatómico um menor número de infeções.

Em conclusão, o rastreio laboratorial regular das infeções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* é fundamental, para melhor compreender o comportamento destas IST ao longo do tempo e em diferentes sexos, idades e locais anatómicos, além de que suscita questões de interesse científico. Os resultados deste estudo podem contribuir para fundamentar políticas de rastreio, de vigilância e de prevenção destas IST e, conseqüentemente, da infeção por VIH ou de outras com impacto em saúde pública, a implementar pelas autoridades de saúde.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Sexually transmitted infections (STIs) [online]. [consult. 11/4/2024]. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))
- (2) Unemo M, Cole M, Lewis D, et al. (eds). Laboratory and point-of-care diagnostic testing for sexually transmitted infections, including HIV. Geneva: World Health Organization, 2023. <https://iris.who.int/handle/10665/374252>
- (3) Finnish Student Health Service. Remote testing for STDs [online]. [consult. 11/4/2024]. <https://www.yths.fi/en/services/birth-control-and-sexual-health/remote-testing-for-stds/?cn-reloaded=1>
- (4) Karolinska Institutet. Sexual health [online]. [consult. 11/4/2024]. <https://education.ki.se/sexual-health>
- (5) Barker EK, Malekinejad M, Merai R, et al. Risk of Human Immunodeficiency Virus Acquisition Among High-Risk Heterosexuals With Nonviral Sexually Transmitted Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sex Transm Dis.* 2022 Jun 1;49(6):383-97. <https://doi.org/10.1097/olq.0000000000001601>
- (6) Unemo M, Ross J, Serwin AB, et al. 2020 European guideline for the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. *Int J STD AIDS.* 2020 Oct 29;956462420949126. <https://doi.org/10.1177/0956462420949126>
- (7) Gaspari V, Djusse ME, Morselli S, et al. Non-pathogenic *Neisseria* species of the oropharynx as a reservoir of antimicrobial resistance: a cross-sectional study. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023 Nov 22;13:1308550. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1308550>
- (8) European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [online]. [consult. 11/4/2024]. <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
- (9) European Centre for Disease Prevention and Control. STI cases on the rise across Europe [online]. [consult. 11/4/2024]. <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/sti-cases-rise-across-europe>

Rede de Vigilância de Vetores - Flebótomos: a importância da vigilância de um vetor menos conhecido

Vector Surveillance Network - sandflies: the importance of the surveillance of a lesser-known vector

Fátima Amaro¹, Hugo Osório¹, Manuel Silva¹, Inês Campos Freitas¹, Patrícia Soares¹, Anabela Vilares², Susana Martins², Tânia Reis², Maria João Gargaté², Maria João Alves¹; Equipa REVIVE³

fatima.amaro@insa.min-saude.pt

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

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

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

_Resumo

O programa REVIVE (Rede de Vigilância de Vetores) resulta de colaboração entre a Direção-Geral da Saúde, as Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Alentejo, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte, a Direção Regional da Saúde da Madeira, a Direção Regional da Saúde dos Açores e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. No âmbito do REVIVE é realizada a vigilância entomológica, a nível nacional, de mosquitos (Culicidae) desde 2008, carraças (Ixodidae) desde 2011 e flebótomos (Psychodidae) desde 2016.

Para se determinar o risco de emergência de doenças transmitidas por flebótomos é indispensável desenvolver procedimentos para uma vigilância entomológica sistematizada. Desta forma, anualmente, de maio a outubro, técnicos colhem, com armadilhas luminosas CDC, flebótomos em todo o território de Portugal continental. Os insetos provenientes das colheitas são enviados para o Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, para identificação de espécies e deteção de agentes patogénicos, nomeadamente flebovírus e *Leishmania* spp. Contrariamente ao que aconteceu com os culicídeos a partir de 2008 ou com os ixodídeos, a partir de 2011, a vigilância dos flebótomos tem vindo a ser implementada de uma forma gradual desde 2016. Verifica-se que a monitorização destes vetores, apesar de ter sofrido constrangimentos devido à pandemia, tem vindo a aumentar substancialmente nos últimos anos.

O objetivo deste trabalho é apresentar, de uma forma sucinta, os resultados obtidos na vigilância de flebótomos em 2023, e no período que decorreu 2016 a 2022, em Portugal continental, realçando os principais riscos em saúde pública relacionados com este vetor em Portugal.

_Abstract

The REVIVE programme (Vector Surveillance Network) is the result of a collaboration between the General Directorate of Health, the Regional Health Administrations of the Algarve, Alentejo, Centro, Lisbon and Tagus Valley and North, the Regional Health Directorate of Madeira, the Regional Health Directorate of the Azores and the National Institute of Health Dr Ricardo Jorge. Within the scope of REVIVE, entomological surveillance is carried out at national level for mosquitoes (Culicidae) since 2008, ticks (Ixodidae) since 2011 and sandflies (Psychodidae) since 2016.

To determine the risk of emergence of diseases transmitted by sandflies, it is essential to develop procedures for systematized entomological surveillance. Therefore, every year, from May to October, technicians collect sandflies throughout mainland Portugal using CDC light traps. The collected insects are sent to the Centre for Vectors and Infectious Diseases Research, National Institute of Health Dr Ricardo Jorge, for species identification and detection of pathogens, namely phleboviruses and *Leishmania* spp. Contrary to what happened with culicids or with ixodids, the surveillance of sandflies has been implemented gradually, since 2016. It appears that the monitoring of these vectors, despite having suffered constraints due to the pandemic, has been increasing substantially in recent years.

The objective of this work is to succinctly present the results obtained in the surveillance of sandflies in 2023, and in the period from 2016 to 2022, in mainland Portugal, highlighting the main public health risks related to this vector in Portugal.

_Introdução

Os flebótomos são insetos que pertencem ao filo Arthropoda, classe Insecta, ordem Diptera, subordem Nematocera e família Psychodidae. Esta família divide-se em duas subfamílias: Psychodinae e Phlebotominae. A subfamília Psychodinae engloba as denominadas moscas-do-esgoto, comuns em instalações sanitárias. Não picam os humanos e não transmitem agentes patogénicos, podendo, no entanto, ser transmissoras oportunistas de miíases ⁽¹⁾. Os insetos da subfamília Phlebotominae são conhecidos por flebótomos e entre eles encontram-se algumas espécies reconhecidas vetoras de agentes causadores de doença.

Estão descritas mais de 1000 espécies de flebótomos (1028 atualmente existentes, 32 extintas), distribuídas por quase todo o mundo, à exceção dos pólos, Nova Zelândia, ilhas do Pacífico e Sudeste asiático ^(2,3). Das 1028 espécies que

existem presentemente, 538 encontram-se no hemisfério ocidental e 490 no hemisfério oriental (2,4). As regiões onde existem mais espécies são a América, mais propriamente, as Américas Central e do Sul e a região que compreende a Europa, Ásia e Norte de África.

As espécies com maior importância médica na Eurásia e África pertencem ao género *Phlebotomus* e nas Américas ao género *Lutzomyia* (4,5). Em Portugal estão descritas, até ao momento, cinco espécies de flebotomos, pertencentes a dois géneros, nomeadamente, *Phlebotomus ariasi*, *Ph. papatasi*, *Ph. perniciosus*, *Ph. sergenti* e *Sergentomyia minuta*.

Os agentes patogénicos com maior importância médica e veterinária transmitidos pelos flebotomos são várias espécies de protozoários intracelulares obrigatórios do género *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), dos quais estes insetos são os vetores exclusivos. A leishmaníase, doença infecciosa resultante da infecção por *Leishmania* spp., é das mais importantes doenças emergentes causadas por protozoários transmitidos por vetores, sendo somente ultrapassada, em termos de números de pessoas afetadas, pela malária (6). A doença atinge populações mais pobres e encontra-se associada a malnutrição, deslocação de populações, um fraco sistema imunitário e falta de recursos (7). A infeção humana é causada por 21 a 30 espécies de *Leishmania*, transmitidas por cerca de 90 espécies de flebotomos. Estas incluem o complexo *L. donovani* com 3 espécies (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*); o complexo *L. mexicana* com 3 espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*); *L. tropicalis*; *L. maior*; *L. aethiopica*; e o subgénero *Viannia* com 4 espécies principais (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana*).

Leishmania donovani, *L. infantum* e *L. chagasi* causam doenças viscerais agudas, as duas primeiras em todo o mundo na área de distribuição dos flebotomos e a última no norte e nordeste do Brasil existindo alguns focos na América latina; *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* causam a maioria das leishmaníases cutâneas crónicas na Europa, Ásia e África, e as leishmaníases cutâneas e mucocutâneas crónicas são causadas por *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* nas Américas (8). *L. infantum* é a principal causa de leishmaníase visceral na

Bacia Mediterrânica (incluindo Portugal) e no Médio Oriente. Os cães são considerados os principais hospedeiros para estes parasitas e consequentemente o maior reservatório da leishmaníase visceral humana. Desta forma, para evitar a propagação da transmissão humana, as infeções nestes animais domésticos devem ser contidas (9).

Entre os agentes transmitidos por flebotomos encontram-se também alguns vírus do género *Phlebovirus* (Bunyivirales, Phenuiviridae). Estes vírus têm vindo a ganhar importância em saúde pública, uma vez que o número de novos agentes descritos tem vindo a aumentar e, por outro lado, diversos estudos de seroprevalência em áreas endémicas indicam circulação significativa de flebovírus transmitidos por flebotomos com o potencial de emergência como sérios causadores de doença humana (10).

Os vírus Nápoles (*Phlebovirus napolense*) e Sicília (*Phlebovirus siciliaense*) e as suas variantes são os mais associados à denominada febre por flebotomos (também conhecida por febre dos três dias ou febre de pappataci) e já foram identificados em vários países da Bacia do Mediterrâneo e do Médio Oriente. Até ao momento não existe mortalidade conhecida associada a estes vírus, no entanto, encontram-se em circulação e causam surtos de doença febril nos países endémicos (11).

O vírus Toscana (vTOS, *Phlebovirus toscanaense*) é o flebovírus transmitido por flebotomos mais importante em termos médicos. O vTOS, tal como acontece com outros arbovírus, pode causar infeções assintomáticas, ou doença ligeira (síndrome febril) mas apresenta neurotropismo, podendo também causar doença neurológica aguda como meningite ou meningoencefalite. Apesar da existência de casos atípicos com consequências graves, o facto de, por vezes, a infeção por vTOS ser assintomática e não necessitar de hospitalização pode conduzir a uma subestimativa das taxas de infeção. Não obstante, em 2012, foi referida a primeira morte por encefalite causada por vTOS num doente que viajou na região da Toscana e em 2021, foram reportados mais cinco casos fatais que ocorreram na Roménia (12,13). O vírus Toscana é uma importante causa de meningites assépticas durante o verão na Bacia do Mediterrâneo.

Apesar de os flebótomos não apresentarem características invasoras como algumas espécies de mosquitos, a sua distribuição está a alargar-se presentemente e é expectável que a área de transmissão dos agentes por eles transmitidos siga o mesmo rumo. A dispersão reportada poderá dever-se não só ao facto de estarem a ser descobertos flebótomos onde antes não eram procurados, mas também devido a uma verdadeira expansão resultante de alterações climáticas e ambientais.

_Objetivo

O objetivo deste trabalho foi apresentar, de uma forma sucinta, os resultados obtidos na vigilância de flebótomos em 2023, e no período que decorreu 2016 a 2022, em Portugal continental, realçando os principais riscos em saúde pública em Portugal.

_Material e métodos

Os programas que envolvem a investigação e vigilância de espécies de flebótomos são focados no estudo da fase adulta do inseto. Assim, no âmbito do REVIVE, os flebótomos foram colhidos pelas equipas nas regiões recorrendo a armadilhas tipo CDC (*Center for Disease Prevention and Control*) com saco coletor modificado, iscadas, sempre que possível, com CO₂.

Apesar de não se poder excluir a possibilidade da ocorrência de flebótomos noutros períodos do ano devido às alterações climáticas, as colheitas foram realizadas, maioritariamente, de maio a outubro, época de maior atividade destes vetores. As amostras foram enviadas ao laboratório, acondicionadas em caixas refrigeradas, seguindo a metodologia de *triple packaging* e até o máximo três dias após o início do trabalho de campo.

Os flebótomos machos recebidos no laboratório foram identificados à espécie com técnicas clássicas baseadas em características morfológicas e utilização de chaves taxonómicas. No caso das fêmeas, quando só existiu um espécime por captura e sempre que possível, foi realizada a identificação molecular da espécie.

A pesquisa de agentes patogénicos, *Leishmania* spp. e flebovírus, foi realizada em *pools* até um máximo de 35 espécimes, de acordo com a data e local de colheita, por extração de ácidos nucleicos totais e pesquisa da presença de DNA por *nested*-PCR e de RNA por RT-PCR respetivamente (14,15).

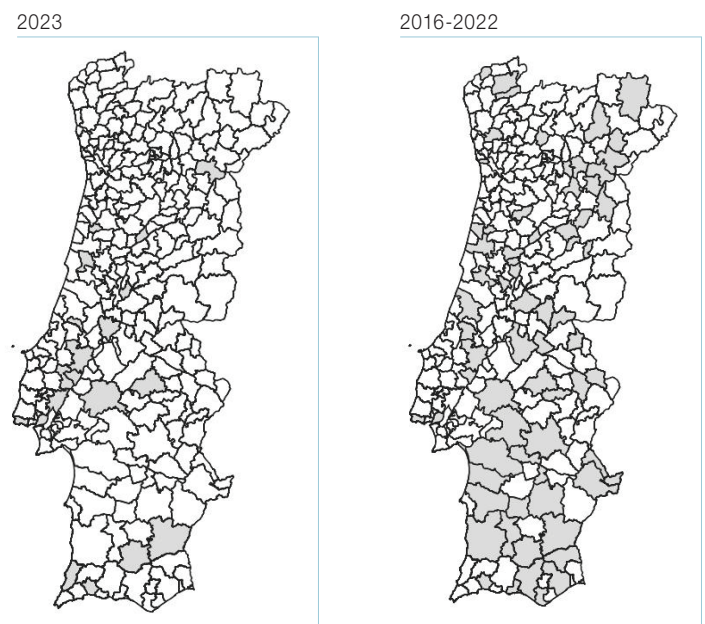
_Resultados

Concelhos

Em 2023, foi realizado esforço de captura de flebótomos pelas Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte, tendo sido efetuadas 207 colheitas que abrangeram 41 concelhos. A presença de flebótomos foi detetada em 18 dessas colheitas (8,7%) que resultaram num total de 101 espécimes. No mesmo período ocorreram ainda 15 colheitas acidentais de flebótomos, ou seja, colheitas dirigidas a mosquitos nas quais se obtiveram flebótomos, em 12 concelhos pertencentes às regiões do Algarve, Alentejo, Centro e Lisboa e Vale do Tejo. Destas colheitas resultaram 660 espécimes.

No período de 2016-2022 foram realizadas 294 colheitas de flebótomos num total de 71 concelhos de Portugal continental tendo sido colhidos 192 flebótomos. Adicionalmente foram colhidos 624 flebótomos em 141 colheitas acidentais efetuadas em 65 concelhos (figura 1).

Figura 1: Portugal continental - Concelhos onde foram realizadas colheitas de flebótomos em 2023 e em 2016-2022.



Espécies identificadas

No caso dos flebotomos, uma vez que a sua identificação é muito morosa, nem todos os espécimes são identificados à espécie, privilegiando-se a pesquisa de agentes patogénicos. Por este motivo existe discrepância entre o número de flebotomos identificados e o número total de flebotomos colhidos. Desta forma, a abundância relativa das espécies não é discutida. Na **figura 2** encontra-se assinalada a distribuição total de *Phlebotomus* spp.

Os mapas representam a cinzento os concelhos onde foram realizadas colheitas e a azul os concelhos onde foram identificadas as espécies. Para cada espécie foram elaborados dois mapas, o primeiro diz respeito às colheitas realizadas no ano 2023 e o segundo representando os dados acumulados no âmbito do REVIVE Flebotomos entre 2016 e 2022.

Num total de 761 flebotomos colhidos em 2023, foram identificados nos laboratórios do Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge 125 flebotomos pertencentes a quatro espécies, nomeadamente *Ph. ariasi*, *Ph. perniciosus*, *Ph. sergenti* e *Sergentomyia minuta*.

Nos flebotomos colhidos entre 2016 e 2022, num total de 1284, foram identificados 348 espécimes pertencentes às 5 espécies referenciadas para o território português: *Ph. ariasi*, *Ph. papatasi*, *Ph. perniciosus*, *Ph. sergenti* e *Se. minuta*. Seguidamente apresentam-se os resultados por espécie.

Phlebotomus ariasi Tonnoir, 1921

Em 2023, foram identificados oito espécimes de *Phlebotomus ariasi*, em cinco concelhos, entre maio e setembro. Nos anos anteriores, entre 2016 e 2022, foram identificados 66 espécimes, tendo sido a sua presença registada em 19 concelhos (**figura 3**).

Figura 2: Portugal continental - Distribuição de *Phlebotomus* spp.

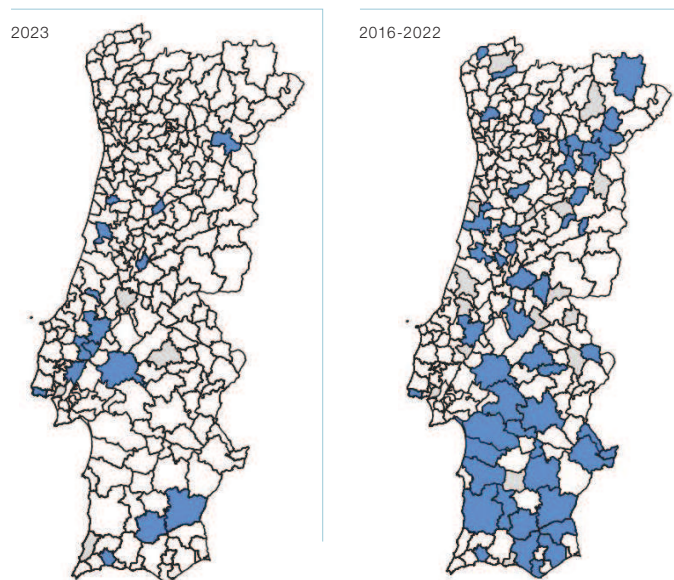


Figura 3: Portugal continental - Distribuição geográfica de *Phlebotomus ariasi*

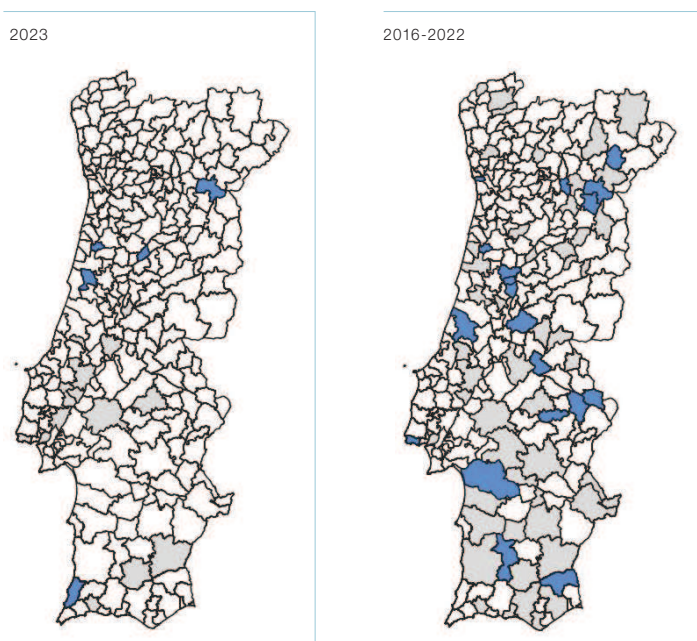


Figura 4: Portugal continental - Distribuição geográfica de *Phlebotomus papatasi*.

Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi Scopoli, 1786

No âmbito do REVIVE, foi registado um exemplar macho de *Ph. papatasi*, colhido no concelho de Alcoutim, em setembro de 2016. Em Portugal, a presença de *Ph. papatasi* é escassa. (figura 4)

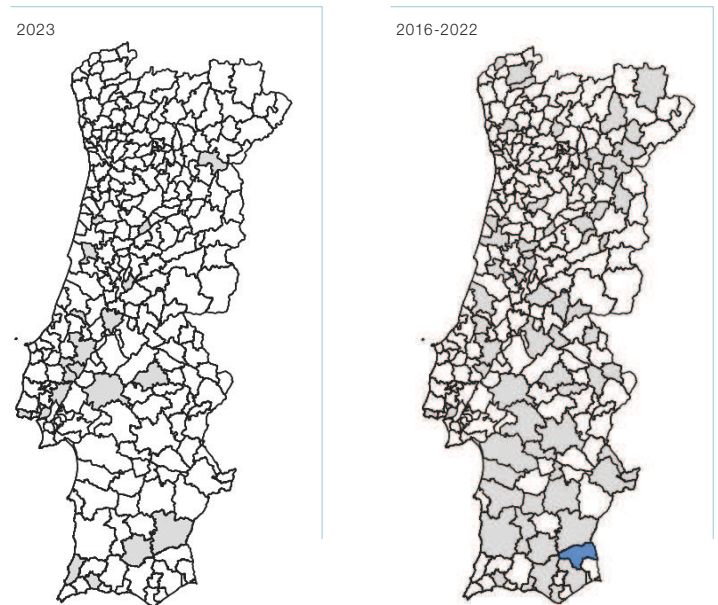


Figura 5: Portugal continental - Distribuição geográfica de *Phlebotomus perniciosus*.

Phlebotomus (Larroussious) perniciosus Newstead, 1911

Em 2023 foram identificados 115 exemplares de *Phlebotomus perniciosus* distribuídos por 12 concelhos, entre maio e outubro. No período de 2016 a 2022 a sua presença foi assinalada em 48 concelhos, tendo sido identificados 244 espécimes entre os meses de maio e outubro (figura 5).

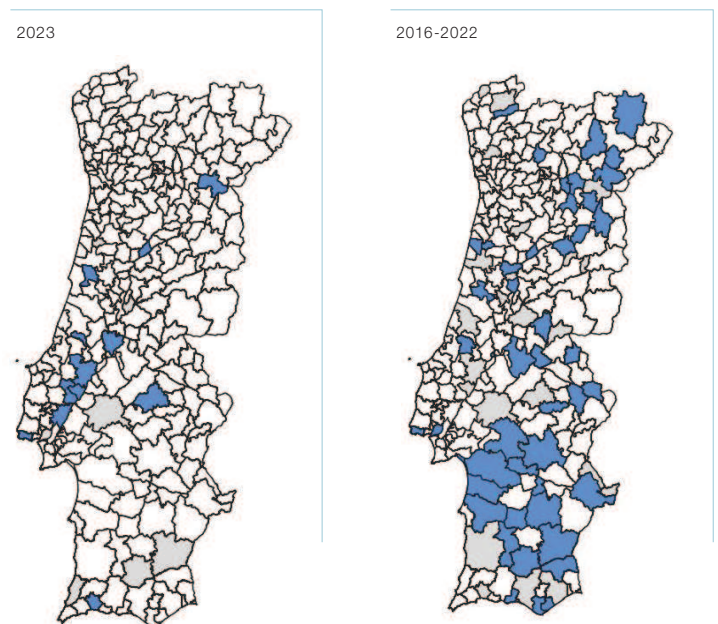


Figura 6: Portugal continental - Distribuição geográfica de *Phlebotomus sergenti*.

Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti Parrot, 1917

Em setembro de 2023 foi identificado um exemplar da espécie *Phlebotomus sergenti* proveniente de Portimão. Nas colheitas que decorreram de 2016 a 2022, foram identificados oito espécimes em quatro concelhos, nos meses de junho e julho (figura 6).

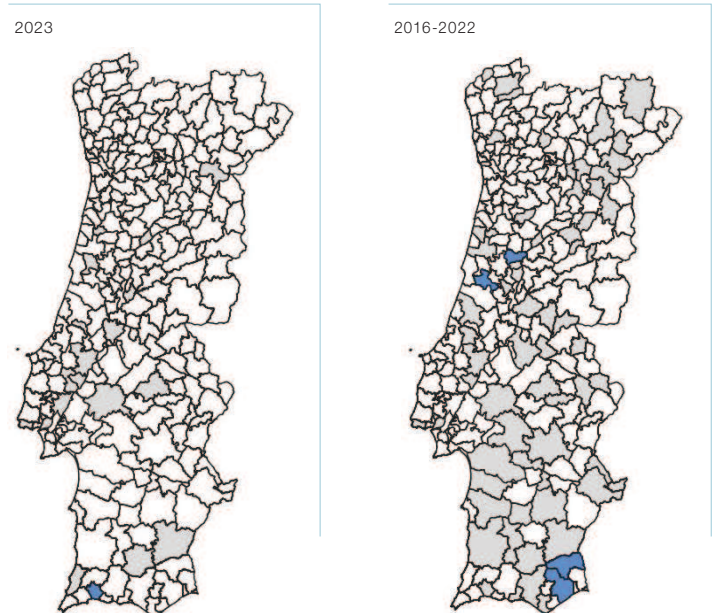
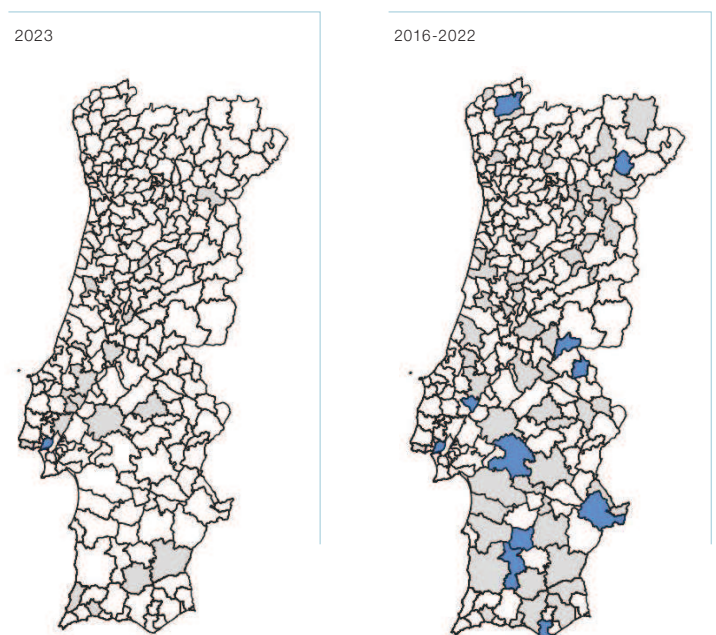


Figura 7: Portugal continental - Distribuição geográfica de *Sergentomyia minuta*.

Sergentomyia (Sergentomyia) minuta Rondani, 1843

A única espécie do género *Sergentomyia* existente em Portugal foi identificada, em 2023 no concelho de Lisboa em setembro (1 exemplar) e, durante os anos de 2016 a 2022, foram identificados 29 indivíduos em 12 concelhos, entre os meses de maio a setembro (figura 7).



Pesquisa de agentes patogénicos

Para a deteção de agentes patogénicos, em 2023, entre colheitas dedicadas e colheitas acidentais, foram pesquisados 645 flebotomos (55 e 590, respetivamente), para a presença de flebovírus e de *Leishmania*, tendo sido identificada a presença de ambos os agentes em dois pools diferentes, cada um deles composto por 30 flebotomos fêmeas, mas provenientes de uma mesma colheita ocorrida, em setembro, no concelho de Portimão. Nestas colheitas foram identificadas as espécies *Ph. perniciosus* e *Ph. sergenti*.

Esta foi a primeira vez que se detetaram agentes patogénicos em flebotomos no âmbito do REVIVE e a primeira vez que se detetou vTOS em flebotomos em Portugal.

Entre 2016 e 2022 foram pesquisados 495 flebotomos, não tendo sido detetado qualquer agente patogénico.

_Discussão

No que diz respeito às espécies de flebotomos colhidas, *Phlebotomus ariasi* é vetor comprovado do flebovírus Sicília e de *Leishmania infantum* (16). Em Portugal esta espécie já foi encontrada parasitada por *Leishmania* spp. e acredita-se que seja um dos seus vetores (17). *Phlebotomus papatasi* é uma das espécies mais estudadas não só por ter uma ampla distribuição geográfica, mas também pela importância médica. É o vetor principal de *Leishmania major* que causa leishmaníase zoonótica cutânea no norte do Saara, sendo que também é transmissor do flebovírus Sicília. Adicionalmente foi encontrado infetado com vTOS (18-21). Em Portugal, devido à sua escassez, será pouco provável que assuma um papel importante na transmissão de agentes. *Phlebotomus perniciosus* desempenha um papel muito importante na epidemiologia da leishmaníase visceral humana e da leishmaníase canina, uma vez que é o principal vetor de *Leishmania infantum* na Bacia do Mediterrâneo (22,23). É também o vetor principal do vTOS (24). Em Portugal esta é a espécie mais ubíqua e já foi encontrada infetada por *Leishmania infantum* pelo que se supõe que seja o seu principal vetor (25,26). A espécie *Ph. sergenti* pode ser encontrada em Portugal continental e na Ilha da Madeira, tendo sido reportada no Funchal (27). É vatora de *Leishmania*

tropica (28) e também já foi encontrada infetada com vTOS (28). No que concerne aos flebotomos do género *Sergentomyia*, estes apresentam uma preferência trófica por répteis e são vetores comprovados de espécies de leishmania que os infetam. Desta forma, tem sido geralmente aceite que não podem transmitir agentes patogénicos aos humanos (29). Contudo, várias espécies do género já foram encontradas após terem efetuado refeições em humanos, e o vTOS e *Leishmania major* foram detetados em *Sergentomyia minuta* em França e em Portugal, respetivamente. Desconhece-se, por enquanto, se esta espécie terá ou não algum papel na transmissão destes agentes ao Homem (30,31).

Relativamente aos agentes patogénicos em estudo, em 2023, no âmbito do REVIVE, foi realizada a primeira deteção de vTOS em flebotomos em Portugal, em espécimes colhidos no Algarve. O primeiro registo de casos humanos de infeção por vTOS em Portugal data de 1983 e tratou-se de um casal sueco que visitou a região de Albufeira (32). Estudos retrospectivos de seroprevalência realizados em pacientes entre 2004 e 2008 (33) indicaram a presença de anticorpos (IgG e/ou IgM) em indivíduos no distrito de Faro. Adicionalmente, em pedidos de diagnóstico, foram igualmente confirmadas infeções recentes (presença de IgM) nos anos de 2010 e de 2012 na mesma região (34). Desta forma, podemos afirmar que, ainda que com baixa incidência, ou, pelo menos, com baixa taxa de deteção, este vírus continua a circular na zona.

A deteção de *Leishmania infantum* em flebotomos era expectável uma vez que o Algarve é reconhecido como zona endémica e todos os anos são detetados numerosos casos de leishmaníose canina. Apesar de na colheita REVIVE não ter sido possível a identificação da espécie de flebotomo infetada, estudos anteriores confirmaram *Ph. perniciosus* como o principal vetor de parasitas de *Leishmania* na região do Algarve (35,36).

Nas colheitas de 2023, não só foram encontrados ambos os agentes pesquisados, como se verificou a sua circulação simultânea na mesma população de flebotomos. A co-circulação de *L. infantum* e flebovírus em populações de flebotomíneos na região do Mediterrâneo já havia sido relatada em estudos anteriores em países como a Tunísia, Chipre e Portugal (36-38).

_Conclusões

Os flebotomos são conhecidos vetores de agentes com importância clínica. Nas últimas décadas a sua distribuição tem vindo a aumentar na Europa, particularmente na Bacia do Mediterrâneo. No entanto, os dados sobre estes vetores continuam a ser escassos em Portugal.

A vigilância realizada no REVIVE Flebotomos é um instrumento valioso para conhecer a ecologia e distribuição das espécies e para a determinação dos agentes patogénicos a eles associados e em circulação em Portugal. Estes dados são importantes para conhecer a epidemiologia das doenças transmitidas por estes vetores e para determinar medidas de controlo e prevenção, caso se justifique.

O facto de *Ph. perniciosus* ser a espécie mais ubíqua no país, reconhecido vetor de ambos os agentes patogénicos encontrados em 2023 e de não se não se poder excluir a possibilidade da ocorrência de co-infecções em humanos, com consequências ainda desconhecidas, reforça a importância da vigilância.

Agradecimento:

A todos os profissionais do país envolvidos no projeto REVIVE, pela colaboração no trabalho de campo e de registo.

Lista completa da equipa disponível em:

REVIVE – *Culicídeos, Ixodídeos e flebotomos: relatório 2023*.

<https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/9172>

Referências bibliográficas:

- (1) Schulz-Stübner S, Danner K, Hauer T, et al. Psychodidae (drain fly) infestation in an operating room. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015 Mar;36(3):366-7. <https://doi.org/10.1017/ice.2014.43>
- (2) Galati EAB, Rodrigues BL. A Review of Historical Phlebotominae Taxonomy (Diptera: Psychodidae). *Neotrop Entomol*. 2023; 52(4):539-59. <https://doi.org/10.1007/s13744-023-01030-8>
- (3) Armed Forces Pest Management Board. Regional disease vector ecology profile. Defense pest management information analysis center. Forest Glen section. Washington DC: Walter Reed Army Medical Center, 2001.
- (4) Maroli M, Feliciangeli MD, Arias J. Metodos de captura, conservacion y montaje de los flebotomos (Diptera: Psychodiade). Organización Panamericana de la Salud, 1997.
- (5) Léger N, Depaquit J. Phlebotominae. In: Rippert C (coord.). *Epidemiologie des maladies parasitaires : arthropodes et affections qu'ils provoquent ou qu'ils transmettent* : Tome 4. Cachan: Editions medicales internationales, 2007, pp. 159-75.
- (6) World Health Organization. Health Topic - Leishmaniasis [online]. (consult. 11/4/2024). https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1
- (7) World Health Organization. Fact Sheet – Leishmaniasis [online]. (consult. 11/4/2024). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- (8) European Centre for Disease Prevention and Control. Facts about leishmaniasis [online]. (consult. 11/4/2024). <https://www.ecdc.europa.eu/en/search?s=facts+about+leishmaniasis>
- (9) Amaro F, Vilares A, Martins S, et al. Co-circulation of Leishmania parasites and phlebotomines in a population of sand flies collected in the South of Portugal. *Trop Med Infect Dis*. 2023; 9(1):3. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9010003>
- (10) Alkan C, Bichaud L, de Lamballerie X, et al. Sandfly-borne phlebotomines of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Res*. 2013;100(1):54-74. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.005>
- (11) Armed Forces Pest Management Board. Regional disease vector ecology profile. Defense pest management information analysis center. Forest Glen section. Washington DC: Walter Reed Army Medical Center, 2001.
- (12) Bartels S, de Boni L, Kretzschmar HA, et al. Lethal encephalitis caused by the Toscana virus in an elderly patient. *J Neurol*. 2012;259(1):175-77. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-6121-y>
- (13) Popescu CP, Cotar AI, Dinu S, et al. Emergence of Toscana Virus, Romania, 2017-2018. *Emerg Infect Dis*. 2021 May;27(5):1482-85. <https://doi.org/10.3201/eid2705.204598>
- (14) Lambert AJ, Lanciotti RS. Consensus amplification and novel multiplex sequencing method for S Segment species Identification of 47 Viruses of the Orthobunyavirus, Phlebotomus, and Nairovirus genera of the family Bunyaviridae. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2398-404. <https://doi.org/10.1128/JCM.00182-09>
- (15) Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, et al.; Spanish HIV-Leishmania Study Group. A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring Leishmania infantum infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96(Suppl 1):S185-9. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90074-x](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90074-x)
- (16) Benallal KE, Garni R, Harrat Z, et al. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of the Maghreb region: A systematic review of distribution, morphology, and role in the transmission of the pathogens. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022 Jan 6;16(1):e0009952. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009952>
- (17) Pires CA. Les Phlébotomes du Portugal. I-Infestation naturelle de Phlebotomus ariasi Tonnoir, 1921 et Phlebotomus perniciosus Newstead, 1911, par Leishmania dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Ann Parasitol Hum Comp*. 1984;59(5):521-4.
- (18) Hamarshah O. Distribution of Leishmania major zymodemes in relation to populations of Phlebotomus papatasi sand flies. *Parasit Vectors*. 2011 Jan 25;4:9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-9>

artigos breves_ n. 8

- (19) Schmidt Jr, Schmidt ML, McWilliams JG. Isolation of phlebotomus fever virus from *Phlebotomus papatasi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1960 Jul;9:450-4. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1960.9.450>
- (20) Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, et al. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill.* 2010 Mar 11;15(10):19507. <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/ese.15.10.19507-en>
- (21) Es-Sette N, Ajaoud M, et al. Épidémiologie moléculaire des phlebovirus dans quatre provinces du Maroc [Molecular epidemiology of phlebovirus in four provinces in Morocco]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2016;109(3):143-50. <https://doi.org/10.1007/s13149-016-0498-x>
- (22) Tabbabi A. Review of Leishmaniasis in the Middle East and North Africa. *Afr Health Sci.* 2019;19(1):1329-37. <https://doi.org/10.4314/ahs.v19i1.4>
- (23) Izri MA, Belazzoug S, Boudjebba Y, et al. *Leishmania infantum* MON-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus*, en Kabylie (Algérie) [*Leishmania infantum* MON-1 isolated from *Phlebotomus perniciosus*, in Kabylia (Algeria)]. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990;65(3):151-2.
- (24) Verani P, Ciufolini MG, Nicoletti L, et al. Studi ecologici ed epidemiologici del virus Toscana, un arbovirus isolato da flebotomi [Ecological and epidemiological studies of Toscana virus, an arbovirus isolated from *Phlebotomus*]. *Ann Ist Super Sanita.* 1982;18(3):397-9.
- (25) Pires CA. Les Phlébotomes du Portugal. I-Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, par *Leishmania* dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Ann Parasitol Hum Comp.* 1984;59(5):521-4.
- (26) Maia C, Afonso MO, Neto L, et al. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. *J Vector Borne Dis.* 2009 Dec;46(4):268-72.
- (27) Alves-Pires C, Capela RA. Phlébotomes du Portugal VIII- Première mention de *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *sergenti* Parrot, 1917 à île de Madère. *Parasite.* 1996;3:94.
- (28) Es-Sette N, Ajaoud M, Bichaud L, et al. *Phlebotomus sergenti* a common vector of *Leishmania tropica* and Toscana virus in Morocco. *J Vector Borne Dis.* 2014 Jun;51(2):86-90. https://journals.lww.com/jvbd/fulltext/2014/51020/phlebotomus_sergenti_a_commonvector_of_leishmania.3.aspx
- (29) Maia C, Depaquit J. Can *Sergentomyia* (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*? *Parasite.* 2016;23:55. <https://doi.org/10.1051/parasite/2016062>
- (30) Campino L, Cortes S, Dionísio L, et al. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2013;108:516-18.
- (31) Charrel RN, Izri A, Temmam S, et al. Toscana virus RNA in *Sergentomyia minuta* flies. *Emerg Infect Dis.* 2006 Aug;12(8):1299-300. <https://doi.org/10.3201/eid1708.060345>
- (32) Ehrnst A, Peters CJ, Niklasson B, et al. Neurovirulent Toscana virus (a sandfly fever virus) in Swedish man after visit to Portugal. *Lancet.* 1985 May 25;1(8439):1212-3. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(85\)92886-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(85)92886-7)
- (33) Amaro F, Luz T, Parreira P, et al. Vírus Toscana na população Portuguesa: vigilância sero-epidemiológica e casos clínicos. *Acta Med Port.* 2011 Dec;24(Suppl 2):503-8. <https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/1443/1031>
- (34) Amaro F, Zé-Zé L, Luz MT, et al. Toscana Virus: Ten Years of Diagnostics in Portugal. *Acta Med Port.* 2021 Oct 1;34(10):677-681. <https://doi.org/10.20344/amp.13308>
- (35) Maia C, Afonso MO, Neto L, et al. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. *J Vector Borne Dis.* 2009 Dec;46(4):268-72.
- (36) Amaro F, Vilares A, Martins S, et al. Co-Circulation of *Leishmania* Parasites and Phleboviruses in a Population of Sand Flies Collected in the South of Portugal. *Trop Med Infect Dis.* 2023 Dec 20;9(1):3. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9010003>
- (37) Fares W, Dachraoui K, Barhoumi W, et al. Co-circulation of Toscana virus and *Leishmania infantum* in a focus of zoonotic visceral leishmaniasis from Central Tunisia. *Acta Trop.* 2020 Apr;204:105342. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105342>
- (38) Ergunay K, Kasap OE, Orsten S, et al. Phlebovirus and *Leishmania* detection in sandflies from eastern Thrace and northern Cyprus. *Parasit Vectors.* 2014 Dec 12;7:575. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0575-6>

Doenças mitocondriais na era da sequenciação de nova geração: estudo de 450 doentes

Mitochondrial diseases in the next generation sequencing era: study of 450 patients

Célia Nogueira^{1,2}, Cristina Pereira², Lisbeth Silva^{1,2}, Mateus Laranjeira¹, Altina Lopes², Raquel Neiva², Esmeralda Rodrigues³, Teresa Campos³, Esmeralda Martins⁴, Anabela Bandeira⁴, Margarida Coelho⁴, Marina Magalhães⁴, Joana Damásio⁴, Ana Gaspar⁵, Patrícia Janeiro⁵, Levy Gomes⁵, Ana Cristina Ferreira⁶, Sandra Jacinto⁶, José Pedro Vieira⁶, Luísa Diogo⁷, Helena Santos⁸, Carla Mendonça⁹, Laura Vilarinho^{1,2}

celia.nogueira@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, Portugal

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

(3) Unidade Local de Saúde de São João, Porto, Portugal

(4) Unidade Local de Saúde de Santo António, Porto, Portugal

(5) Unidade Local de Saúde Santa Maria, Lisboa, Portugal

(6) Unidade Local de Saúde São José, Lisboa, Portugal

(7) Unidade Local de Saúde de Coimbra, Coimbra, Portugal

(8) Unidade Local de Saúde Gaia e Espinho, Vila Nova de Gaia, Portugal

(9) Unidade Local de Saúde do Algarve, Faro, Portugal

_Resumo

As doenças mitocondriais (DM) são doenças raras, clínica e geneticamente heterogêneas, de difícil diagnóstico, para as quais não existe uma terapia eficaz. O desenvolvimento da tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) revolucionou o diagnóstico molecular deste grupo de doenças, permitindo a identificação de novos genes associados a estas patologias. Nesta nova era genética, através da utilização da tecnologia de NGS, estudamos um grupo de 450 doentes suspeitos de DM, sem etiologia molecular. A nossa estratégia combinada de NGS, englobou a sequenciação de um painel de 213 genes nucleares associados a DM e do DNA mitocondrial completo.

Neste estudo, identificamos variantes causais em 134 (30%) doentes analisados, 88 dos quais apresentaram variantes no DNA nuclear e 46 no DNA mitocondrial, tratando-se na maioria de doentes pediátricos (66%). Neste grupo de doentes, identificamos 72 variantes patogénicas descritas na literatura e 20 novas variantes provavelmente patogénicas, assim como 62 variantes de significado indeterminado.

Como laboratório nacional de referência para o estudo e investigação das DM, demonstramos o contributo da tecnologia de NGS para esclarecer a etiologia molecular destes doentes, para expandir o espectro mutacional associado a estas patologias e oferecer um diagnóstico pré-natal e aconselhamento genético aos casais em risco.

_Abstract

Mitochondrial diseases (MD) are rare disorders, clinically and genetically heterogeneous, making their diagnosis a challenge and with hitherto no effective therapy options. The development of Next Generation Sequencing (NGS) technologies has revolutionized the understanding of many genes involved in the pathogenesis of MD. In this new genetic era, using a NGS approach, we studied a cohort of 450 Portuguese patients suspected of MD, and without a molecular etiology. Our combined NGS approach was first based on analysis of a custom-made targeted mitochondrial panel of 213 nuclear genes followed by the whole mitochondrial genome.

In this study, we identified disease related variants in 134 (30%) analyzed patients, 88 with nuclear DNA and 46 with mitochondrial DNA variants, being most of them pediatric patients (66%). The molecular analysis of this cohort revealed 72 already described pathogenic and 20 novel probably pathogenic variants, as well as 62 variants of unknown significance.

As a national laboratory for the study and research of MD, we demonstrated the power of NGS to achieve a molecular etiology of these patients, to expand the mutational spectrum associated to MD and to propose a prenatal diagnosis as well as an accurate genetic counseling for affected families.

_Introdução

As mitocôndrias são organelos celulares que desempenham um papel crucial na fosforilação oxidativa, produzindo mais de 90% da energia celular sob a forma de ATP. Estes organelos possuem o seu próprio material genético, o genoma mitocondrial (mtDNA), que é constituído por uma molécula circular de dupla hélice com 16.569 pares de bases. Este genoma é constituído por 37 genes que codificam 13 polipeptídeos, 22 tRNAs e 2 rRNAs. No entanto, as restantes 1500 proteínas mitocondriais são codificadas por genes nucleares (nDNA), sendo inicialmente traduzidas no citoplasma e posteriormente importadas para a mitocôndria (1-3).

As doenças mitocondriais (DM) são uma causa prevalente de doenças hereditárias do metabolismo, afetando aproximadamente 1:5.000 indivíduos (4). Estas doenças apresentam uma elevada heterogeneidade genética, uma vez que podem resultar de variantes patogénicas ao nível do nDNA e do mtDNA, podendo por este motivo estar associadas a diversos padrões de hereditariedade (5). As taxas de morbilidade e mortalidade entre os indivíduos afetados variam significativamente devido à ação concertada entre os dois genomas, sendo geralmente mais elevadas nos casos de rápida progressão e início pediátrico (6).

Os tecidos mais afetados são os que apresentam elevada dependência energética, como o cérebro, o músculo e o coração, pelo que clinicamente os doentes normalmente manifestam um envolvimento multissistémico, embora certos doentes tenham apenas o comprometimento de um único sistema, frequentemente o sistema neurológico (7,8).

Na era pré-molecular, o diagnóstico de uma DM dependia tradicionalmente de técnicas invasivas, como a biópsia muscular, para a determinação da atividade enzimática dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (CRM).

A era molecular da medicina mitocondrial iniciou-se em 1988 com a descoberta da primeira variante patogénica no mtDNA (9). Atualmente, a tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) tem a capacidade de gerar uma enorme quantidade

de dados num curto espaço de tempo e a um custo mais acessível, tornando este método ideal para a análise de grandes grupos de doentes (10,11). Assim, esta tecnologia não só permite identificar variantes patogénicas descritas na literatura, novas variantes provavelmente patogénicas, variantes de significado indeterminado (VUS), mas também variantes em genes ainda não associados a DM (10). Até à data foram descritas variantes causais associadas a DM em mais de 400 genes, quer mitocondriais, quer nucleares (12).

A aplicação desta tecnologia está a simplificar o diagnóstico das DM e a permitir oferecer um diagnóstico pré-natal e aconselhamento genético às famílias afetadas (13,14).

_Objetivo

Identificar a etiologia genética de 450 doentes com suspeita clínica e/ou bioquímica de doenças mitocondriais utilizando a tecnologia de sequenciação de nova geração para confirmação do diagnóstico.

_Doentes e métodos

Este trabalho complementou um estudo anterior de 146 doentes (15) e avaliou as características fenotípicas e o espectro genético de 450 doentes com DM em Portugal.

O DNA genómico foi extraído a partir de sangue periférico no *Bio Robot EZ1* (QIAGEN).

O NGS foi realizado no sequenciador *MiSeq* (Illumina). Para capturar os genes nucleares, foi utilizado um painel personalizado com 213 genes associados a DM, de acordo com a metodologia *SureSelect XT HS* (Agilent Technologies). Para o mtDNA, fez-se a sequenciação do mtDNA completo, utilizando a metodologia *Nextera XT* (Illumina).

Os ficheiros FASTQ gerados foram alinhados com o genoma de referência usando, para o nDNA, o *software Surecall* (Agilent Technologies) e a deteção e anotação das variantes foi realizada pelos *softwares SureCall* e *wANNOVAR* (<https://wannovar.wglab.org/>), respetivamente. Relativamente

ao mtDNA, os ficheiros FASTQ gerados foram alinhados com o genoma de referência usando o *software SeqMan NGen* (DNASStar) a deteção e anotação das variantes foi realizada com os *softwares SeqMan Pro* e *SeqMan NGen* (DNASStar), respetivamente.

As variantes foram filtradas tendo em consideração os seguintes critérios: i) o tipo de mutação, ii) previsões *in silico*, iii) a sua presença em bases de dados, iv) a frequência populacional e v) heteroplasmia maior que 5% (para variantes no mtDNA).

As variantes já classificadas como patogénicas ou com previsões *in silico* sugestivas de patogenicidade, foram confirmadas por sequenciação tradicional de Sanger, utilizado o protocolo *BigDye Terminator Cycle Sequencing Version 3.1* (Applied Biosystems) e os resultados da sequenciação foram analisados utilizando o sequenciador *ABI 3130XL* (Applied Biosystems). Quando disponíveis amostras de outros membros da família, foram realizados estudos de co-segregação.

_Resultados

Este estudo envolveu doentes provenientes de sete hospitais nacionais, localizados no norte, centro e sul de Portugal. A idade de início da doença foi muito variável, dos 4 dias aos 78 anos de vida. Os sintomas neurológicos foram os mais frequentes (42,8%), seguidos dos musculares (12,9%), oftalmológicos (11,9%), cardíacos (11,2%) e auditivos (4,6%).

O grupo pediátrico foi o mais representado neste estudo, com 58% dos doentes estudados (262/450), sendo os restantes 42% (188/450) constituídos por adultos. Um total de 29 (6%) doentes faleceram, sendo 23 crianças e 6 adultos, permitindo a investigação *post mortem* um diagnóstico molecular de 62% destes casos.

Este estudo permitiu identificar uma causa molecular em 30% dos doentes estudados (134/450), dos quais 66% apresentaram variantes no genoma nuclear e 34% no genoma mitocondrial.

Neste grupo de doentes identificamos 72 variantes patogénicas descritas na literatura, 20 novas variantes provavelmente patogénicas e 62 VUS, segundo os critérios do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) ⁽¹⁶⁾, algumas já previamente descritas pela Unidade de Rastreamento Neonatal, Metabolismo e Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (URN-INSA). ^(15,17).

Genoma Nuclear

Variantes patogénicas e provavelmente patogénicas

Dos 450 doentes, 51 (11%) dos casos apresentavam variantes patogénicas no nDNA, das quais 58 já descritas na literatura e 14 novas variantes provavelmente patogénicas (**gráfico 1**).

O número de variantes identificadas em cada gene variou entre 1% e 3%, no entanto, os genes *EARS2* e *VARS2* apresentaram o maior número de variantes, 9% e 7% respetivamente.

Variantes de significado indeterminado

Neste trabalho foram identificadas 54 VUS no nDNA em 37/450 (8%) doentes. Entre estas, 30 foram previamente descritas na literatura pela URN-INSA ^(15,17), sendo as restantes 24 novas variantes (**gráfico 2**).

Gráfico 1: Distribuição das variantes patogénicas / provavelmente patogénicas no nDNA por genes afetados e de acordo com seus grupos funcionais.

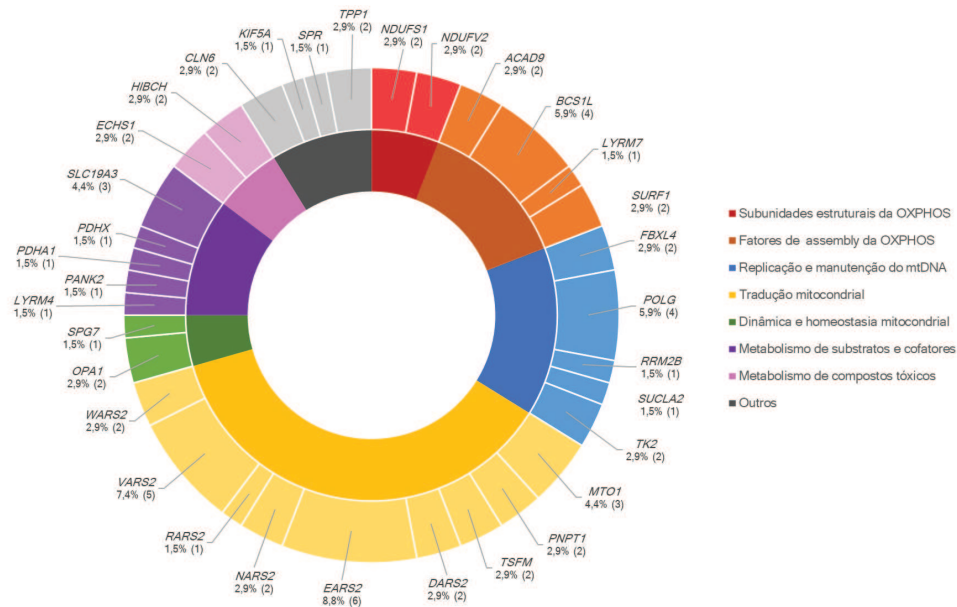
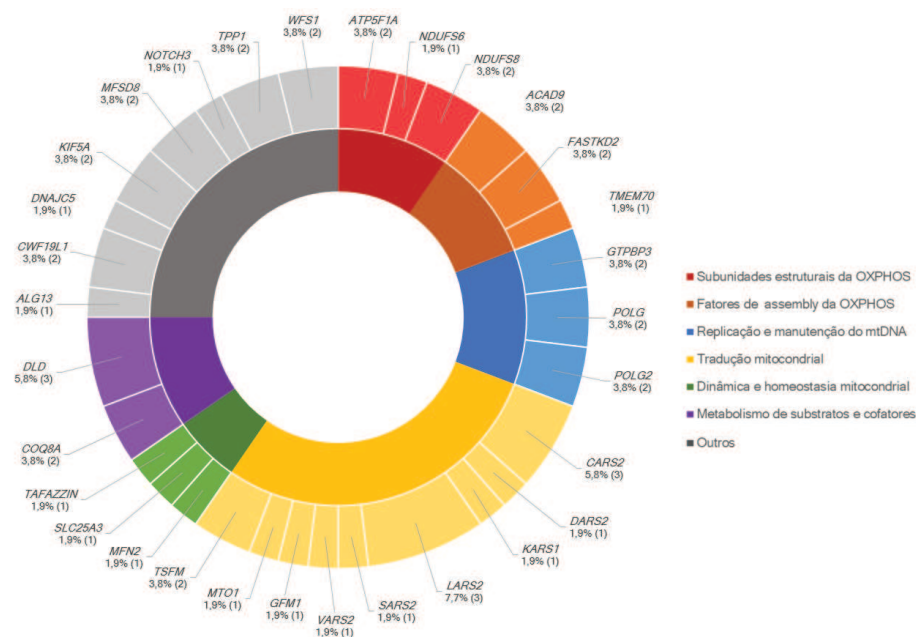


Gráfico 2: Distribuição das variantes de significado indeterminado no nDNA por genes afetados e de acordo com seus grupos funcionais.



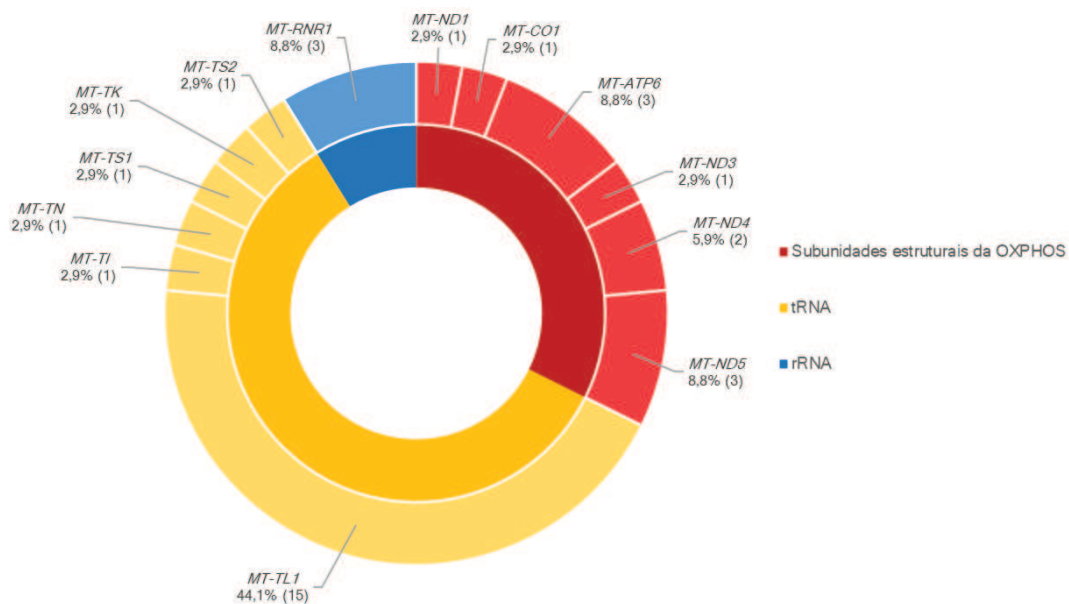
Genoma Mitocondrial

Variantes patogénicas e provavelmente patogénicas

A sequenciação do genoma mitocondrial revelou variantes patogénicas e provavelmente patogénicas bem como grandes deleções, em 38 dos 450 doentes (9%). Entre as variantes identificadas, 16 já tinham sido descritas na literatura, 11 das quais como patogénicas e cinco como provavelmente patogénicas, sendo duas novas variantes. Adicionalmente foram também identificadas quatro deleções simples de grandes dimensões e de diferentes tamanhos.

Os genes que codificam os tRNAs representam o maior grupo de genes com variantes identificadas, particularmente o *MT-TL1* devido à presença da mutação m.3243A>G detetada em 11 doentes. As variantes localizadas nos genes que codificam subunidades da OXPHOS estão equitativamente distribuídas entre eles (**gráfico 3**). A grande maioria das variantes foi detetada em heteroplasmia com percentagens que variaram entre os 5% e 95%.

Gráfico 3: Distribuição das variantes patogénicas / provavelmente patogénicas no mtDNA por genes afetados e de acordo com seus grupos funcionais.

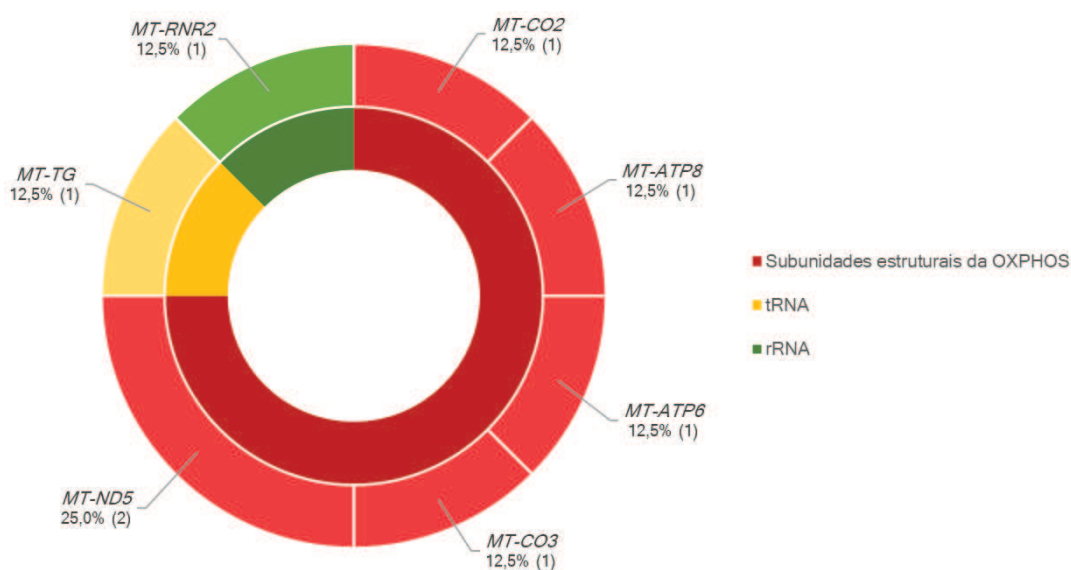


Variantes de significado indeterminado

A sequenciação completa do mtDNA revelou oito VUS em oito indivíduos distintos (8/450) distribuídas aleatoriamente por alguns genes estruturais da OXPHOS e pelos genes

MT-TG e *MT-RNR2* (gráfico 4). Todas as variantes foram identificadas em heteroplasmia exceto a variante localizada no gene *MT-CO3*.

Gráfico 4: Distribuição das variantes de significado indeterminado no mtDNA por genes afetados e de acordo com seus grupos funcionais.



_Discussão

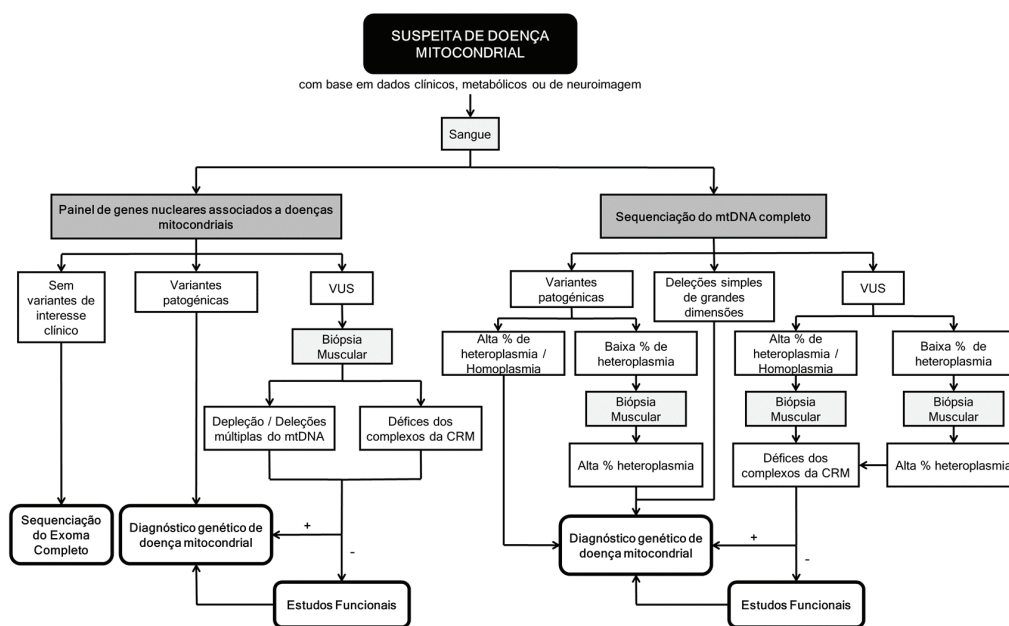
Até 2016, a sequenciação tradicional de Sanger foi utilizada para rastrear as variantes mais comuns do mtDNA bem como um grupo específico de genes nucleares associados a apresentações clínicas específicas e/ou défices enzimáticos dos complexos da CRM. Com os avanços tecnológicos, a abordagem molecular utilizada no laboratório da URN-INSA passou a incluir a tecnologia de NGS para a sequenciação de um painel de 213 genes nucleares associados a DM e do genoma mitocondrial completo. Inicialmente aplicamos esta estratégia a um grupo de 146 doentes com suspeita de DM, mas que não dispunham do diagnóstico molecular

confirmatório, como referido na nossa publicação anterior (15,17). Posteriormente, alargamos esta abordagem a mais 304 doentes suspeitos de DM, o que possibilitou um estudo mais abrangente de 450 doentes. Esta investigação permitiu-nos obter um diagnóstico molecular em 134/450 doentes (30%), 88 no nDNA e 46 no mtDNA, identificando um total de 154 variantes: 126 (82%) no genoma nuclear e 28 (18%) no genoma mitocondrial. Salientamos que, 72 eram variantes patogénicas descritas na literatura, 20 eram novas variantes e 62 eram VUS. As variantes no nDNA e mtDNA foram identificadas maioritariamente em crianças e em adultos, respetivamente, o que está de acordo com a literatura (18,19).

Neste estudo um dos fatores que influenciou a menor percentagem de doentes com variantes no mtDNA foi a idade, uma vez que 58% dos doentes estudados eram crianças, nas quais uma variante causal no nDNA é mais provável.

Com base nestes resultados propomos um algoritmo para as DM apresentado na **figura 1**.

Figura 1: Algoritmo de diagnóstico para suspeita de doença mitocondrial.



Atualmente, o sangue é a amostra de primeira linha para efetuar o painel de genes nucleares e a sequenciação do genoma mitocondrial completo. Apesar do tecido muscular ser rico em mitocôndrias, a análise da biópsia muscular, por se tratar de um procedimento invasivo, deve apenas ser considerada quando a apresentação clínica sugere a presença de uma grande deleção ou depleção do mtDNA. Pode ainda recorrer-se à biópsia muscular numa fase mais avançada da investigação para confirmar a patogenicidade de uma VUS, tornando-se assim relevante efetuar o estudo bioquímico da CRM. O tecido muscular é igualmente importante para determinar o nível de heteroplasmia quando a percentagem de mtDNA mutado detetada no sangue é

baixa, podendo não ser representativa do limiar de expressão da variante em estudo (20).

Salientamos ainda que deverão ser efetuados estudos de segregação familiar para confirmar as variantes patogénicas e/ou VUS, assim como, estudos funcionais em *zebrafish*, para determinar a patogenicidade das VUS identificadas.

O alargamento deste trabalho a um maior grupo de doentes permitiu aumentar a percentagem de diagnóstico definitivo de DM de 25% para 30%. No entanto, os 316 doentes (70%) que permaneceram sem caracterização molecular deverão continuar a ser investigados através da análise do exoma-clínico/total.

Conclusões

O presente estudo realça o espectro genético das doenças mitocondriais (DM) na era da sequenciação de nova geração (NGS), permitindo um avanço significativo na caracterização molecular destes doentes de difícil diagnóstico.

Os resultados do centro de referência para o estudo e investigação das DM do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, permitiram esclarecer a etiologia molecular de 30% dos doentes estudados, alargar o espectro mutacional associado a estas patologias e oferecer em alguns casos um diagnóstico pré-natal e aconselhamento genético aos casais em risco.

Financiamento:

Fundação da Ciência e Tecnologia (PTDC/DTP-PIC/2220/2014, *Genetic Defects of Mitochondrial Diseases: a Next Generation Sequencing Approach*); Ao Programa Norte 2020 (NORTE-01-0246-FEDER-000014, DESVENDAR “DESCobrir, VENcer as Doenças rARas”).

Agradecimentos:

À UTI do DGH_INSA pela colaboração na confirmação das variantes identificadas, pelo método de Sanger. À Marisa Encarnação pelo apoio técnico no sequenciador MiSeq.

Referências bibliográficas:

- (1) Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 2014 Jan 16;505(7483):335-43. <https://doi.org/10.1038/nature12985>
- (2) Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Oct;15(10):634-46. <https://doi.org/10.1038/nrm3877>
- (3) Kotrys AV, Szczesny RJ. Mitochondrial Gene Expression and Beyond—Novel Aspects of Cellular Physiology. *Cells*. 2019 Dec 19;9(1):17. <https://doi.org/10.3390/cells9010017>
- (4) Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol*. 2015 May;77(5):753-9. <https://doi.org/10.1002/ana.24362>
- (5) Rahman S. Mitochondrial disease in children. *J Intern Med*. 2020 Jun;287(6):609-33. <https://doi.org/10.1111/joim.13054>
- (6) Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Oct 20;2:16080. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.80>
- (7) DiMauro S, Schon EA, Carelli V, et al. The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat Rev Neurol*. 2013 Aug;9(8):429-44. <https://doi.org/10.1038/nnrneurol.2013.126>
- (8) Maresca A, Del Dotto V, Romagnoli M, et al.; ER-MITO Study Group. Expanding and validating the biomarkers for mitochondrial diseases. *J Mol Med (Berl)*. 2020 Oct;98(10):1467-78. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01967-y>
- (9) Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 1988 Dec 9;242(4884):1427-30. <https://doi.org/10.1126/science.3201231>
- (10) Stenton SL, Prokisch H. Genetics of mitochondrial diseases: Identifying mutations to help diagnosis. *EBioMedicine*. 2020 Jun;56:102784. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102784>
- (11) Riley LG, Cowley MJ, Gayevskiy V, et al. The diagnostic utility of genome sequencing in a pediatric cohort with suspected mitochondrial disease. *Genet Med*. 2020 Jul;22(7):1254-61. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0793-6>
- (12) Frazier AE, Thorburn DR, Compton AG. Mitochondrial energy generation disorders: genes, mechanisms, and clues to pathology. *J Biol Chem*. 2019 Apr 5;294(14):5386-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.809194>
- (13) French CE, Delon I, Dolling H, et al; NIHR BioResource—Rare Disease; Next Generation Children Project; Rowitch DH, Raymond FL. Whole genome sequencing reveals that genetic conditions are frequent in intensively ill children. *Intensive Care Med*. 2019 May;45(5):627-36. <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05552-x>
- (14) Poulton J, Steffann J, Burgstaller J, et al.; workshop participants. 243rd ENMC international workshop: Developing guidelines for management of reproductive options for families with maternally inherited mtDNA disease, Amsterdam, the Netherlands, 22-24 March 2019. *Neuromuscul Disord*. 2019 Sep;29(9):725-33. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2019.08.004>
- (15) Nogueira C, Silva L, Pereira C, et al. Targeted next generation sequencing identifies novel pathogenic variants and provides molecular diagnoses in a cohort of pediatric and adult patients with unexplained mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion*. 2019 Jul;47:309-317. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2019.02.006>
- (16) Richards S, Aziz N, Bale S, et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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>
- (17) Nogueira C, Pereira C, Silva L, et al. Avanços no diagnóstico das doenças mitocondriais através da sequenciação de nova geração. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2018;7(21):5-8. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5546>
- (18) Pronicka E, Piekutowska-Abramczuk D, Ciara E, et al. New perspective in diagnostics of mitochondrial disorders: two years' experience with whole-exome sequencing at a national paediatric centre. *J Transl Med*. 2016 Jun 12;14(1):174. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0930-9>
- (19) Subathra M, Ramesh A, Selvakumari M, et al. Genetic Epidemiology of Mitochondrial Pathogenic Variants Causing Nonsyndromic Hearing Loss in a Large Cohort of South Indian Hearing Impaired Individuals. *Ann Hum Genet*. 2016 Sep;80(5):257-73. <https://doi.org/10.1111/ahg.12161>
- (20) Lawless C, Greaves L, Reeve AK, et al. The rise and rise of mitochondrial DNA mutations. *Open Biol*. 2020 May;10(5):200061. <https://doi.org/10.1098/rsob.200061>

Rastreio neonatal da deficiência em 3-metilcrotonil-CoA carboxilase em Portugal, 2004-2024

Neonatal Screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in Portugal, 2004-2024

Helena Fonseca, Ana Marcão, Carmen Sousa, Hugo Rocha, Laura Vilarinho

helenafonseca@insa.min-saude.pt

Unidade de Rastreio Neonatal Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A deficiência de 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (3-MCC) é uma acidúria orgânica autossómica recessiva que está incluída nos programas de rastreio neonatal de vários países. Neste estudo são apresentados resultados obtidos principalmente do Programa de Rastreio Neonatal, recolhidos ao longo de um período de 19 anos. A análise dos genes MCCC1 e MCCC2 em 67 casos, permitiram identificar 39 mutações novas das quais 27 mutações descritas anteriormente pela Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Pretende-se com este trabalho dar a conhecer os resultados do rastreio neonatal da deficiência de 3-MCC em Portugal entre outubro de 2004 e março de 2024, e identificar e caracterizar as mutações causais destes doentes. Além disso, estas mutações foram analisadas no contexto do que é conhecido dos espectros mutacionais MCCC1 e MCCC2, informação que será útil na prática clínica e laboratorial.

_Abstract

The deficiency of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (3-MCC) is an autosomal recessive organic aciduria that is included in the newborn screening programs of several countries. This study reports data mainly obtained from the newborn screening program, collected over a nineteen years period. Analysis of the MCCC1 and MCCC2 genes in 67 cases, allowed the identification of 39 unreported mutations, including 27 mutations previously described by the Neonatal Screening, Metabolism and Genetics Unit of the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, Portugal.

The aim of this work is to make known the results of newborn screening for 3-MCC deficiency in Portugal, and to identify and characterize the causal mutations in these patients. In addition, these mutations were analyzed in the context of what is known of the MCCC1 and MCCC2 mutational spectra, information that will be useful in both clinical and laboratory practice.

_Introdução

Em 2004, a introdução da espectrometria de massa em tandem (MS/MS), no rastreio neonatal, veio permitir a deteção de várias acidúrias orgânicas, incluindo a 3-metilcrotonilglicinúria. Esta acidúria orgânica é a mais frequente em programas de rastreio em populações europeias, americanas e australianas (1-6).

A metilcrotonilglicinúria (MCG; MIM 210200 e 210210) é uma doença genética de transmissão autossómica recessiva, causada pela deficiência na enzima 3-metilcrotonil-CoA carboxilase (3-MCC; EC 6.4.1.4). Esta enzima é uma das enzimas responsáveis pelo catabolismo do aminoácido leucina e é uma de quatro carboxilases dependentes de biotina conhecidas nos humanos; as outras três são a acetil-CoA carboxilase (ACC; EC: 6.4.1.2), a propionil-CoA carboxilase (PCC; EC: 6.4.1.3) e a piruvato carboxilase (PC; EC: 6.4.1.1). A deficiência em 3-MCC leva à acumulação de 3-metilcrotonil CoA, dentro da mitocôndria, e por vias alternativas à formação dos biomarcadores 3-metilcrotonilglicina (3-MCG) e ácido 3-hidroxisovalérico (3-HIVA).

O diagnóstico bioquímico é realizado pelo estudo dos ácidos orgânicos urinários, observando-se o aumento dos biomarcadores acima referidos, e pelo estudo do perfil de acilcarnitinas no sangue, onde é relevante o aumento da concentração de 3-hidroxisovalericarnitina (C5-OH) (7). É comum estes doentes terem uma deficiência secundária de carnitina, devido a sua conjugação com o 3-HIVA para uma posterior excreção urinária. Clinicamente, os doentes com deficiência de 3-MCC têm um crescimento e desenvolvimento normais até à ocorrência de um episódio agudo de descompensação metabólica, o que normalmente acontece entre 6 meses e 3 a 5 anos de idade (8). Este episódio é geralmente desencadeado por uma infeção ou pela introdução de alimentos ricos em proteínas na dieta.

A 3-MCC compreende duas hetero-subunidades organizadas num dodecâmero do tipo $\alpha_6\beta_6$. A subunidade α do 3-MCC é codificada pelo gene MCCC1, que está localizado no cromossoma 3q27 e abrange cerca de 70 kb de DNA genómico (9).

Este gene codifica uma proteína de 725 aminoácidos que tem um peso molecular de aproximadamente 80 kDa (7). A subunidade β é uma proteína de 563 aminoácidos, com um peso molecular de aproximadamente 61,8 kDa, codificado pelo gene MCCC2, localizado no cromossoma 5q12-q13 (1,710). Indivíduos com deficiência de 3-MCC possuem mutações nos genes MCCC1 ou MCCC2. As mutações identificadas na literatura estão distribuídas uniformemente em toda a sequência dos dois genes, sem qualquer evidência de “hot-spots” mutacionais (5). Estudos anteriores não estabelecem uma correlação genótipo-fenótipo nesta patologia, uma vez que nenhuma mutação parece estar exclusivamente associada a casos sintomáticos ou assintomáticos, ou a fenótipos leves ou graves da doença (1,5,7,10,11). Assim, é importante realçar que os dados clínicos, bioquímicos e genéticos parecem apoiar a conclusão de que outros fatores além dos genótipos dos loci MCCC1 e MCCC2 podem influenciar as consequências fenotípicas da deficiência de 3-MCC, incluindo genes modificadores e, talvez mais importante, até que ponto a via metabólica é sobrecarregada pela dieta ou outros fatores ambientais, como a metabolização excessiva de proteínas associada a infeções (12).

_Objetivo

Apresentar os resultados de 19 anos do rastreio neonatal da deficiência de 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (3-MCC) em Portugal (entre outubro de 2004 e março de 2024), e identificar e caracterizar as mutações causais dos doentes MCG na população portuguesa.

_Material e métodos

Este estudo inclui 1.871.169 amostras de sangue em papel de filtro de recém-nascidos (RN) portugueses, colhidas maioritariamente entre o 3º e o 6º dia de vida, entre outubro de 2004 e março de 2024. A análise do perfil de acilcarnitinas por MS/MS permitiu identificar 62 RN com valores elevados de C5OH, biomarcador primário das acilcarnitinas para 3-MCC. O “cut-off” de C5OH > 1uM foi estabelecido pelo laboratório de rastreio neonatal (13).

Foram pedidas segundas amostras aos 62 RN e às respetivas mães após envio para Centro de Tratamento, para confirmar os valores elevados de C5OH e excluir aumento por causa materna. Foram excluídas outras doenças metabólicas através da análise bioquímica do perfil de ácidos orgânicos urinários.

Em 20 casos, as mães também tinham um valor aumentado de C5OH. Para além destes casos foram estudados 4 casos identificados no rastreio neonatal espanhol (duas mães e dois doentes) e um caso sintomático com 3 anos de idade de origem espanhola que apresentava atraso de desenvolvimento.

Os estudos genéticos foram efetuados por sequenciação direta de fragmentos amplificados por PCR, a partir de DNA genómico extraído de sangue seco em papel de filtro. Todos os exões dos genes MCCC1 e MCCC2, e as respetivas regiões intrónicas flanqueadoras, foram sequenciados pelo método de Sanger ou next generation sequencing (NGS).

Foram utilizadas ferramentas bioinformáticas para fazer as previsões *in silico* das mutações *missense* identificadas, bem como foram consultadas as bases de dados dos 1000 genomas e ExAC.

_Resultados e discussão

Foram identificados 67 casos, 62 portugueses e 5 espanhóis, com C5OH elevado. Em todos os casos foram estudados os genes MCCC1 e MCCC2, e em 65 casos foi identificado pelo menos um dos alelos mutado (tabela 1). Em dois casos (casos 15 e 16) não foi identificada nenhuma mutação em ambos os genes. Neste estudo foram identificadas 53 mutações diferentes: 27 destas mutações foram descritas em 2016 (14) e 12 são mutações ainda não descritas (figura 1A e B). A maioria das mutações foi identificada no gene MCCC2 (69%) (figura 1C) o que esta de acordo com publicações anteriores (11,15). A maioria dos casos (em 26 casos) são compostos heterozigóticos com mutações nos genes MCCC1 (3 casos) e MCCC2 (23 casos). Em 19 casos foram identificadas mutações em homozigotia, sete no gene MCCC1 (casos 1,

27, 39, 49, 50, 51 e 52) e doze no gene *MCCC2* (casos 5, 9, 14, 17, 26, 31, 37, 44, 46, 56, 58 e 64). Em 20 casos foi identificado apenas um alelo mutado (casos 2, 3, 4, 13, 20, 28, 33, 41, 42, 47, 53, 54, 55, 57, 61, 62, 63, 65, 66 e 67).

Quarenta e uma das mutações encontradas estão descritas na literatura, das quais 27 foram descritas por Fonseca *et al.* (figura 1A a vermelho) (1,10,11,14-19), enquanto 12 mutações são novas (p.Ser406Cys, p.Lys284Argfs*15, IVS10+2T>G, IVS15-1G>T e del exão1-6 no gene *MCCC1* e p.Asp340Gly, p.Phe359Leu, p.Asn480Ser, p.Ser498Phe, p.Glu456Serfs*10, c.1151delG e del exão7-8) no gene *MCCC2* (figura 1B).

Figura 1: ↓ Espectro molecular dos genes *MCCC1* e *MCCC2*.



Tabela 1: Fenótipo bioquímico e genótipo dos casos estudados.

Caso	Género	Origem	Fenótipo bioquímico			Genótipo			Fenótipo clínico
			CSOH	3-HIVA	3MCG	Gene afetado	alteração nucleotídeo	consequência na proteína	
1	M	portuguesa	4	++	++	MCCC1	c.388G>A/c.388G>A	p.Gly130Ser/p.Gly130Ser	assintomático
2	F	portuguesa	1.5	+	+	MCCC1	c.1147G>A/wt	p.Glu383Lys/wt	assintomático
3	M	portuguesa	1.3	nd	nd	MCCC1	c.924_925delAG/wt	p.Arg308Serfs*3/wt	assintomático
4	F	portuguesa	2.3	nd	nd	MCCC1	c.1155A>C/wt	p.Arg385Ser/wt	assintomático
5	F	portuguesa	14	++	++	MCCC2	c.100C>T/c.100C>T	p.Gln34*/p.Gln34*	assintomático
6	M	portuguesa	4.2	nd	nd	MCCC2	c.688A>G/c.641G>C	p.Asn230Asp/p.Gly214Ala	assintomático
7	F	portuguesa	1.9	+	nd	MCCC2	c.463C>T/c.1015G>A	p.Arg155Trp/p.Val339Met	assintomático
8	F	portuguesa	1	+	nd	MCCC2	c.203G>T/c.688A>G	p.G68V/p.Asn230Asp	assintomático
9	M	portuguesa	13.2	nd	nd	MCCC2	c.1229G>A/c.1229G>A	p.Gly410Asp/p.Gly410Asp	assintomático
10	F	portuguesa	4	+	nd	MCCC2	c.463C>T/c.1423G>A	p.Arg155Trp/ p.Gly475Arg	assintomático
11	F	portuguesa	2.4	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1635dupT	p.Val339Met/ p.Ser546*	assintomático
12	F	portuguesa	na	++	++	MCCC2	c.313G>C/c.487A>G	p.Gly105Arg/p.Asn230Asp	mãe assintomática
13	F	portuguesa	5.5	nd	nd	MCCC2	c.1015G>A/wt	p.Val339Met/wt	mãe assintomática
14	F	portuguesa	3	nd	nd	MCCC2	c.688A>G/c.688A>G	p.Asn230Asp/p.Asn230Asp	mãe assintomática
15	F	portuguesa	1	+	nd		wt/wt		mãe assintomática
16	F	portuguesa	1.2	nd	nd		wt/wt		mãe assintomática
17	M	espanhola	3.7	+	nd	MCCC2	c.517_518insT/c.1015G>A	p.Ser173Phefs*25/p.Val339Met	sintomático atraso de desenvolvimento
18	M	portuguesa	2.8	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1159T>G	p.Val339Met/p.Phe387Val	assintomático
19	F	portuguesa	2.9	nd	nd	MCCC2	c.599T>A/c.1216+2T>C	p.Ile200Asn/ IVS 13+2T>C	mãe assintomática
20	F	portuguesa	1.7	+	nd	MCCC1	c.98delT/wt	p.Val33Glyfs*7/wt	assintomático
21	M	portuguesa	4.7	nd	nd	MCCC2	c.688A>G/c.641G>C	p.Asn230Asp/p.Gly214Ala	assintomático
22	F	portuguesa	17	nd	nd	MCCC2	c.688A>G/c.1178A>C	p.Asn230Asp/p.Gln393Pro	assintomático
23	M	portuguesa	2.3	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1635_36insT	p.Val339Met/ p.Ser546*	assintomático
24	F	portuguesa	1.2	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1423G>A	p.Val339Met/ p.Gly475Arg	assintomático
25	F	espanhola	Na	++	++	MCCC2	c.648C>G/c.1176C>A	p.Cys216Trp/p.Cys392*	mãe assintomática
26	M	portuguesa	3.9	++	++	MCCC2	c.688A>G/c.688A>G	p.Asn230Asp/p.Asn230Asp	assintomático
27	F	portuguesa	15.5	nd	nd	MCCC1	c.1888_1892delGACAT/ c.1888_1892delGACAT	p.D630Sfs*27/ p.D630Sfs*27	mãe assintomática
28	F	espanhola	Na	nd	nd	MCCC1	c.640-2A>G/wt	IVS6-2A>G /wt	assintomático
29	M	portuguesa	4.3	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1228G>C	p.Val339Met/p.Gly410Arg	assintomático
30	M	portuguesa	2.9	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1570G>A	p.Val339Met/p.Ala524Thr	assintomático
31	F	portuguesa	27.6	++	++	MCCC2	c.1228G>C/c.1228G>C	p.Gly410Arg/p.Gly410Arg	mãe assintomática
32	F	portuguesa	2.1	+	nd	MCCC2	c.1015G>A/c.1381T>G	p.Val339Met/p.Phe461Val	assintomático
33	M	portuguesa	1.1	nd	nd	MCCC1	c.841C>A/wt	p.Arg281*/wt	assintomático
34	M	portuguesa	1.9	+	nd	MCCC2	1-100 A>G/c.652G>A	?/p.Ala218Thr	assintomático
35	F	portuguesa	5	nd	nd	MCCC2	1-100 A>G/c.1228G>C	?/ p.Gly410Arg	mãe assintomática
36	F	portuguesa	13.9	++	++	MCCC2	c.249delC/c.641G>C	p.Arg84Glufs*8/p.Gly214Ala	assintomático
37	F	espanhola	Na	nd	nd	MCCC2	c.953A>G/c.953A>G	p.Tyr318Cys/ p.Tyr318Cys	mãe assintomática
38	F	portuguesa	2.8	nd	nd	MCCC2	c.100C>T/ c.599T>A	p.Gln34*/ p.Ile200Asn	mãe assintomática
39	F	portuguesa	18.6	nd	nd	MCCC1	c.359C>T/c.359C>T	p.Ser120Phe/p.Ser120Phe	mãe assintomática
40	M	portuguesa	0.9	+	nd	MCCC2	c.304C>T/c.1322T>G	p.Gln102*/p.Ile441Thr	sintomático
41	M	espanhola	0.7	+	+	MCCC1	c.873G>A/ WT	?/WT	assintomático
42	M	portuguesa	1.36			MCCC1	c.388G>A/WT	p.Gly130Ser/WT	assintomático
43	M	portuguesa	3.4			MCCC1	c.872C>T/ c.640-2A>G	p.Ala291Val/?	assintomático
44	F	portuguesa	16.1	+	+	MCCC2	c.688A>G/c.688A>G	p.Asn230Asp/p.Asn230Asp	mãe assintomática
45	M	portuguesa	2.2	+	+	MCCC1	c.1155A>C/c.1772G>A	p.Arg385Ser/p.Ser591Asn	assintomático
46	F	portuguesa	5	+	+	MCCC2	c.1075T>C/c.1075T>C	p.Phe359Leu/p.Phe359Leu	mãe assintomática
47	F	portuguesa	1.27	+	na	MCCC2	c.1439A>G/WT	p.Asn480Ser/WT	assintomático
48	F	portuguesa	2.7	+	na	MCCC2	c.1015G>A/c.1381T>G	p.Val339Met/p.Phe461Val	assintomático

(cont.)

artigos breves_ n. 10

Caso	Género	Origem	Fenótipo bioquímico			Genótipo			Fenótipo clínico
			C5OH	3-HIVA	3MCG	Gene afetado	alteração nucleotídeo	consequência na proteína	
49	M	portuguesa	2.7	+	+	MCCC1	c.1302T>G/c.1302T>G	p.Ile434Met/p.Ile434Met	assintomático
50	F	portuguesa	17.9	+	+	MCCC1	c.872C>T/c.872C>T	p.Ala291Val/p.Ala291Val	mãe assintomática
51	F	portuguesa	5.6	+	+	MCCC1	c.1302T>G/c.1302T>G	p.Ile434Met/p.Ile434Met	mãe assintomática
52	F	portuguesa	15.2	+	+	MCCC1	c.388G>A/c.388G>A	p.Gly130Ser/p.Gly130Ser	mãe assintomática
53	F	portuguesa	1.1	+	na	MCCC1	c.1083+2T>G/wt	?/WT	assintomático
54	F	portuguesa	2.9	+	+	MCCC2	c.1019A>G/WT	p.Asp340Gly/WT	assintomático
55	M	portuguesa	1.5	-	+	MCCC1	c.851delA/WT	p.Lys284Argfs*15/WT	assintomático
56	F	portuguesa	24.2	+	+	MCCC2	del7-8/del7-8	?	mãe assintomática
57	M	portuguesa	1	+	na	MCCC1	c.1155A>C/WT	p.Arg385Ser/WT	assintomático
58	F	portuguesa	10.2	+	+	MCCC2	c.688A>G/c.688A>G	p.Asn230Asp/p.Asn230Asp	mãe assintomática
59	M	portuguesa	2.8	+	+	MCCC1	c.872C>T/c.1217C>G	p.Ala291Val/p.Ser406Cys	assintomático
60	M	portuguesa	1.97	+	na	MCCC2	c.1493C>T/c.1632dupT	p.Ser498Phe/p.Ser546*	assintomático
61	M	portuguesa	1.5	na	na	MCCC1	c.924_925delAG/WT	p.Arg308Serfs*3/WT	assintomático
62	F	portuguesa	1.2	+	+	MCCC1	c.1732-1G>T/WT	?/WT	assintomático
63	F	portuguesa	1.5	na	na	MCCC2	c.1426delG/WT	p.Glu456Serfs*10/WT	mãe assintomática
64	F	?	19.9	+	+	MCCC2	c.653C>T/ c.653C>T	p.Ala218Val/p.Ala218Val	mãe assintomática
65	M	portuguesa	1	na	na	MCCC1	c.872C>T/WT	p.Ala291Val/WT	assintomático
66	M	portuguesa	1.1	+	na	MCCC1	del1-6/WT	?/WT	assintomático
67	F	portuguesa	1.6	na	na	MCCC2	c.1151delG/WT	?/WT	assintomático

Em dois doentes não foi identificada nenhuma mutação nos genes MCCC1 e MCCC2 (casos 15 e 16), enquanto que em vinte doentes foi identificada uma única mutação, 15 no gene MCCC1 (casos 2, 3, 4, 20, 28, 33, 41, 42, 53, 55, 57, 61, 62, 65 e 66) e cinco no gene MCCC2 (caso 13, 47, 54, 63 e 67), embora todos apresentassem um aumento de C5OH. Nestes casos, é possível estarmos perante uma grande deleção/ inserção, mutações em zonas regulatórias ou mutações intrónicas profundas podendo contribuir para o fenótipo bioquímico observado (20; 21; 22; 23), portanto, mais estudos são necessários para validar estas hipóteses. No entanto, há evidências recentes que sugerem que a presença de uma única mutação patogénica em heterozigotia nos genes MCCC1 ou MCCC2 pode levar à elevação dos metabolitos característicos da deficiência de 3-MCC, embora os autores ressalvem a necessidade de ensaios da atividade enzimática para confirmar a deficiência da enzima envolvida (24). Em relações quinze doentes portadores de uma única mutação no gene MCCC1, em dois deles foi identificada uma mutação descrita (Arg385Ser) como tendo um efeito dominante negativo na presença do alelo *wild-type* (25); cinco são mutações *frameshift*,

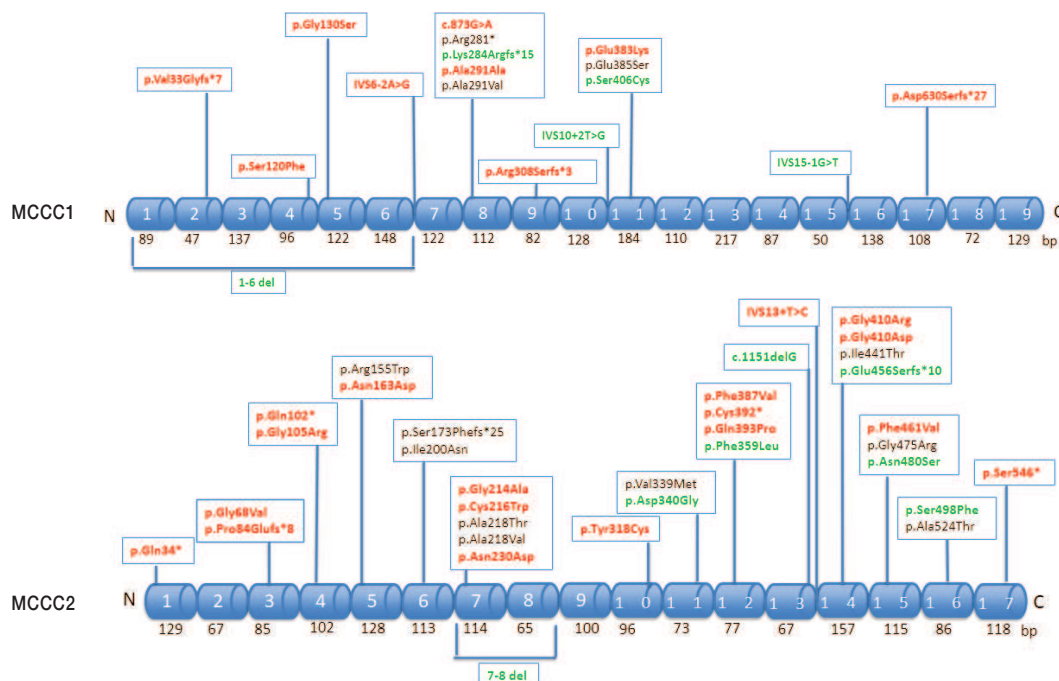
uma mutação *nonsense*; duas são mutações *missense*; três mutações de *splicing* e uma grande deleção. A outra mutação *missense* identificada num dos doentes, Glu383Lys está próxima da mutação Arg385Ser e, portanto, pode também ter um efeito dominante negativo. Todos esses doentes têm valor médio de C5OH de 1,3 µM, o que está de acordo com um fenótipo bioquímico *mild*. No gene MCCC2 foi identificado uma única mutação nos casos 13, 47, 54, 63 e 67, sendo três mutações *missense*; uma mutação *frameshift* e uma deleção que ocorre numa zona repetitiva de G, na junção intrão/ exão 13. No caso do doente 13, que apresentou um valor de C5OH de 5,5 µM, é provável que o segundo alelo afetado possa ser uma grande duplicação/deleção ou uma mutação na zona regulatória uma vez que este doente tem uma mutação *missense* que também está presente em outros doentes heterozigotos compostos com valores de C5OH mais baixos (casos 7, 11, 17, 18, 23, 24, 29, 30, 32 e 48). Apesar da maioria dos casos identificados serem devidos a mutações no gene MCCC2, como referido anteriormente, é entre os doentes com alteração no gene MCCC1 que se observa o maior número de casos apenas com um alelo identificado. As mutações

encontradas nestes casos são mutações *missense* com efeito dominante negativo ou mutações que originam um efeito severo na proteína como sejam grandes deleções ou mutações *frameshift*. Este facto poderá sugerir uma maior relevância para a subunidade α da 3-MCC, correspondente ao domínio biotina carboxilase da proteína, podendo uma ligeira diminuição da sua atividade ser suficiente para desencadear um fenótipo bioquímico e eventualmente clínico. Em relação aos casos 15 e 16, duas mães assintomáticas sem mutações identificadas nos genes MCCC1 e MCCC2, os níveis aumentados de C5OH podem estar relacionados com um défice de biotina, que comprometeria o funcionamento normal das enzimas dependentes de biotina (26). A deficiência parcial em biotinidase (OMIM 253260), também poderá explicar o perfil bioquímico observado nestas mães, uma vez que a reciclagem de biotina estaria comprometida. Mais estudos serão necessários para confirmar ou refutar estes pressupostos.

Updated espectro mutacional

Até a data foram descritas um total de 341 mutações nos genes MCCC1 e MCCC2, das quais 27 foram descritas pela Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (14) e este número continua a aumentar com o crescente número de casos descritos a partir do rastreio neonatal (*Human Gene Mutation Database*). Neste estudo, foram identificadas 12 novas mutações, correspondendo a cinco *missense*, duas microdeleções, três mutações que afetam o *splicing*. A figura 2 representa o espectro mutacional dos genes MCCC1 e MCCC2 nos doentes incluídos neste estudo. As mutações estão distribuídas ao longo dos genes MCCC1 e MCCC2 que codificam o domínio da biotina carboxilase e o domínio carboxi-transferase, respetivamente. Como seria esperado as mutações surgem nos locais mais conservados

Figura 2: Mapa linear dos genes MCCC1 (painel superior) e MCCC2 (painel inferior) com mutações encontradas neste estudo, representadas conforme ocorrem nos respetivos exões.



Os tamanhos dos exões são indicados abaixo da caixa de cada exão. Novas mutações estão a verde e as mutações descritas em 2016 por Fonseca *et al.* a vermelho, mutações descritas noutros estudos estão a preto. A nomenclatura seguiu as recomendações do HGVS (27)

artigos breves_ n. 10

dos genes, sendo também importante notar que, para ambos os genes, as mutações associadas à doença foram descritas em todas as zonas exónicas, o que aponta para a necessidade de sequenciação de todo o gene, bem como junções exão / intrão em indivíduos afetados. No gene *MCCC1* são atualmente conhecidas, 110 mutações *missense/nonsense*, 18 mutações que afetam o *splicing*, uma mutação regulatória, 26 microdeleções, nove microinserções, três indels e seis grandes deleções. No gene *MCCC2* foram descritas 125 mutações *missense/nonsense*, 22 mutações de *splicing*, nove microdeleções, seis microinserções, quatro *indels* e duas grandes deleções (*Human Gene Mutation Database*).

_Conclusões

Vários estudos mostraram que, em alguns casos de deficiência de 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase (3-MCC), o fenótipo clínico compreende a descompensação metabólica com hipoglicemia, cetonemia e acidose metabólica grave.

O diagnóstico é importante, porque pode evitar ou encurtar os períodos de descompensação metabólica associadas a doenças intercorrentes nos doentes afetados.

Embora a deficiência de 3-MCC não possa ser considerada uma deficiência com risco de vida, pode ser melhor definida como um fenótipo bioquímico com baixa penetrância clínica, o seu rastreio é importante para estabelecer um tratamento em situações de *stress* metabólico, tais como infeções recorrentes (doenças intercorrentes).

A prevenção de uma deficiência de carnitina, que é muito comum observar nestes doentes, e que pode levar à fadiga extrema, é também importante, sendo facilmente resolvida após suplementação com L-carnitina (5,15,28,29).

Referências bibliográficas:

- (1) Baumgartner MR, Almashanu S, Suormala T, et al. The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Clin Invest*. 2001 Feb;107(4):495-504. <https://doi.org/10.1172/JCI11948>
- (2) Frazier DM, Millington DS, McCandless SE, et al. The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. *J Inher Metab Dis*. 2006 Feb;29(1):76-85. <https://doi.org/10.1007/s10545-006-0228-9>
- (3) Gibson KM, Bennett MJ, Naylor EW, et al. 3-Methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency in Amish/Mennonite adults identified by detection of increased acylcarnitines in blood spots of their children. *J Pediatr*. 1998 Mar;132(3 Pt 1):519-23. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(98\)70032-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(98)70032-0)
- (4) Koeberl DD, Millington DS, Smith WE, et al. Evaluation of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening. *J Inher Metab Dis*. 2003;26(1):25-35. <https://doi.org/10.1023/a:1024015227863>
- (5) Stadler SC, Polanetz R, Maier EM, et al. Newborn screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: population heterogeneity of MCCA and MCCB mutations and impact on risk assessment. *Hum Mutat*. 2006 Aug;27(8):748-59. <https://doi.org/10.1002/humu.20349>
- (6) Wilcken B, Wiley V, Hammond J, et al. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *N Engl J Med*. 2003 Jun 5;348(23):2304-12. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa02522>
- (7) Holzinger A, Röschinger W, Lagler F, et al. Cloning of the human MCCA and MCCB genes and mutations therein reveal the molecular cause of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Hum Mol Genet*. 2001 Jun 1;10(12):1299-306. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.12.1299>
- (8) Sweetman L. Branched chain organic acidurias. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001. pp. 2125-63.
- (9) Obata K, Fukuda T, Morishita R, et al. Human biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase gene (MCCA): cDNA sequence, genomic organization, localization to chromosomal band 3q27, and expression. *Genomics*. 2001 Mar 1;72(2):145-52. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6366>
- (10) Gallardo ME, Desviat LR, Rodríguez JM, et al. The molecular basis of 3-methylcrotonylglycinuria, a disorder of leucine catabolism. *Am J Hum Genet*. 2001 Feb;68(2):334-46. <https://doi.org/10.1086/318202>
- (11) Dantas MF, Suormala T, Randolph A, et al. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: mutation analysis in 28 probands, 9 symptomatic and 19 detected by newborn screening. *Hum Mutat*. 2005 Aug;26(2):164. <https://doi.org/10.1002/humu.9352>
- (12) Wolfe LA, Finegold DN, Vockley J, et al. Potential misdiagnosis of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency associated with absent or trace urinary 3-methylcrotonylglycine. *Pediatrics*. 2007 Nov;120(5):e1335-40. <https://doi.org/10.1542/peds.2007-0674>
- (13) Vilarinho L, Rocha H, Sousa C, et al. Four years of expanded newborn screening in Portugal with tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis*. 2010 Dec;33 Suppl 3:S133-8. <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9048-z>
- (14) Fonseca H, Azevedo L, Serrano C, et al. 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: Mutational spectrum derived from comprehensive newborn screening. *Gene*. 2016 Dec 15;594(2):203-210. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.09.003>
- (15) Grünert SC, Stucki M, Morscher RJ, et al. 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: clinical, biochemical, enzymatic and molecular studies in 88 individuals. *Orphanet J Rare Dis*. 2012 May 29;7:31. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-31>
- (16) Arnold GL, Salazar D, Neidich JA, et al. Outcome of infants diagnosed with 3-methylcrotonyl-CoA-carboxylase deficiency by newborn screening. *Mol Genet Metab*. 2012 Aug;106(4):439-41. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.04.006>
- (17) Calvo SE, Tucker EJ, Compton AG, et al. High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in *NUBPL* and *FOXRED1* in human complex I deficiency. *Nat Genet*. 2010 Oct;42(10):851-8. <https://doi.org/10.1038/ng.659>

artigos breves_ n. 10

- (18) Morscher RJ, Grünert SC, Bürer C, et al. A single mutation in MCCC1 or MCCC2 as a potential cause of positive screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2012 Apr;105(4):602-6. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.12.018>
- (19) Adhikari AN, Gallagher RC, Wang Y, et al. The role of exome sequencing in newborn screening for inborn errors of metabolism. *Nat Med.* 2020 Sep;26(9):1392-97. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0966-5>
- (20) Ferreira F, Esteves S, Almeida LS, et al. Trimethylaminuria (fish odor syndrome): genotype characterization among Portuguese patients. *Gene.* 2013 Sep 15;527(1):366-70. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.05.025>
- (21) Quental R, Azevedo L, Rubio V, et al. Molecular mechanisms underlying large genomic deletions in ornithine transcarbamylase (OTC) gene. *Clin Genet.* 2009 May;75(5):457-64. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01172.x>
- (22) Wang J, Zhan H, Li FY, et al. Targeted array CGH as a valuable molecular diagnostic approach: experience in the diagnosis of mitochondrial and metabolic disorders. *Mol Genet Metab.* 2012 Jun;106(2):221-30. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.005>
- (23) Azevedo L, Stojanaj L, Tietzeova E, et al. New polymorphic sites within ornithine transcarbamylase gene: population genetics studies and implications for diagnosis. *Mol Genet Metab.* 2003 Feb;78(2):152-7. [https://doi.org/10.1016/s1096-7192\(03\)00019-2](https://doi.org/10.1016/s1096-7192(03)00019-2)
- (24) Morscher RJ, Grünert SC, Bürer C, et al. A single mutation in MCCC1 or MCCC2 as a potential cause of positive screening for 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *Mol Genet Metab.* 2012 Apr;105(4):602-6. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.12.018>
- (25) Baumgartner MR. Molecular mechanism of dominant expression in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Inher Metab Dis.* 2005;28(3):301-9. <https://doi.org/10.1007/s10545-005-7054-3>
- (26) Mock DM, Quirk JG, Mock NI. Marginal biotin deficiency during normal pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 2002 Feb;75(2):295-9. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.2.2956>
- (27) den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat.* 2000;15(1):7-12. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200001\)15:1<7::AID-HUMU4>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<7::AID-HUMU4>3.0.CO;2-N). Erratum in: *Hum Mutat* 2002 Nov;20(5):403
- (28) Thomsen JA, Lund AM, Olesen JH, et al. Is L-Carnitine Supplementation Beneficial in 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Deficiency? *JIMD Rep.* 2015;21:79-88. https://doi.org/10.1007/8904_2014_393
- (29) Gonçalves MM, Marcão A, Sousa C, et al. Portuguese Neonatal Screening Program: A Cohort Study of 18 Years Using MS/MS. *Int J Neonatal Screen.* 2024 Mar 20;10(1):25. <https://doi.org/10.3390/ijns10010025>

Análise de uma rede de similaridade genética entre a perturbação do espectro do autismo e comorbilidades do foro neurológico e neuropsiquiátrico

Disease similarity network analysis of autism spectrum disorder and comorbid neurological and neuropsychiatric disorders

Joana Vilela^{1,2}, Hugo Martiniano^{1,2}, Ana Rita Marques^{1,2}, João Xavier Santos^{1,2}, Célia Rasga^{1,2}, Guiomar Oliveira^{3,4}, Astrid Moura Vicente^{1,2}

astrid.vicente@insa.min-saude.pt

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

(2) BiolSI-Biosystems & Integrative Sciences Institute. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

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

(4) Clínica Universitária de Pediatria e Centro de Imagem Biomédica e Investigação Translacional de Coimbra. Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

_Resumo

A Perturbação do Espectro do Autismo (PEA) é uma perturbação do neurodesenvolvimento com apresentação clínica heterogénea, nível de gravidade variável e ocorrência de múltiplas comorbilidades. A PEA tem uma arquitetura genética complexa que se reflete na sua heterogeneidade clínica, existindo evidência de uma sobreposição de genes alterados entre esta condição e diversas comorbilidades do foro neurológico e neuropsiquiátrico. Neste estudo, construímos uma rede de interação entre doenças baseada na similaridade genética, para explorar a componente genética partilhada entre a PEA e comorbilidades neurológicas e neuropsiquiátricas. As doenças analisadas incluem o Défice Intelectual (DI), a Perturbação de Hiperatividade/Défice de Atenção (PHDA) e a Epilepsia, bem como outras doenças neuropsiquiátricas como a Esquizofrenia (SCZ) e a Perturbação Bipolar (PB). Usando a base de dados de doenças da DisGeNET, a similaridade genética entre as doenças analisadas foi calculada a partir do coeficiente de Jaccard entre pares de doenças, e o algoritmo de Leiden foi usado para identificar comunidades de doenças na rede. Identificámos uma comunidade heterogénea de doenças geneticamente mais semelhantes à PEA, que inclui a Epilepsia, a PB, a PHDA com apresentação combinada, e algumas perturbações no espectro da SCZ. Esta abordagem permitiu obter uma maior clarificação acerca da componente genética partilhada entre a PEA e comorbilidades neurológicas e neuropsiquiátricas, com implicações importantes para a nosologia, fisiopatologia e o tratamento o personalizado da doença.

_Abstract

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder with heterogeneous clinical presentation, variable severity, and multiple comorbidities. A complex underlying genetic architecture matches the clinical heterogeneity, and evidence indicates that several co-occurring brain disorders share a genetic component with ASD. In this study, we established a genetic similarity disease network approach to explore the shared genetics between ASD and frequent comorbid brain diseases, namely Intellectual Disability (ID), Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD), and Epilepsy, as well as other rarely co-occurring neuropsychia-

tric conditions in the Schizophrenia (SCZ) and Bipolar Disease spectrum (BP). Using sets of disease-associated genes curated by the DisGeNET database, disease genetic similarity was estimated from the Jaccard coefficient between disease pairs, and the Leiden detection algorithm was used to identify network disease communities. We identified a heterogeneous brain disease community that is genetically more similar to ASD, and that includes Epilepsy, BP, ADHD combined type, and some disorders in the SCZ. This approach enabled further clarification of genetic sharing between ASD and brain disorders. Understanding gene sharing across disorders has important implications for disease nosology, pathophysiology, and personalized treatment.

_Introdução

A Perturbação do Espectro do Autismo (PEA) é uma perturbação do neurodesenvolvimento caracterizada por défices na comunicação e na interação social, e por padrões comportamentais repetitivos (1). A PEA apresenta-se como um espectro clínico, dado que os indivíduos afetados apresentam graus variáveis de gravidade clínica, agravados por diversas comorbilidades. A PEA tem uma arquitetura genética complexa, com centenas de genes implicados na sua etiologia (2).

Diversas comorbilidades neurológicas e neuropsiquiátricas podem acompanhar a PEA (3). No entanto, a combinação de diferentes comorbilidades varia entre os indivíduos afetados, o que poderá ser resultado da contribuição de diferentes fatores de risco. Frequentemente, a PEA ocorre simultaneamente com a Perturbação de Hiperatividade/Défice de Atenção (PHDA) e a Epilepsia em crianças com alterações cromossó-

micas raras (4). Existe evidência de que a PEA e a Epilepsia têm uma sobreposição significativa de genes com alterações (5). Em linha com esta constatação, foi demonstrado que as crianças que têm um irmão mais velho diagnosticado com PEA têm 70% maior probabilidade de ter Epilepsia do que crianças sem irmãos mais velhos com PEA (6). A análise de dados genómicos resultantes de estudos com um grande número de participantes com PEA mostram que a PEA e a Esquizofrenia (SCZ) têm uma partilha genética significativa (7), e que a PEA e o Défice Intelectual (DI) compartilham múltiplos genes com alterações (8). Esta sobreposição genética é mais evidente no quadro de síndromes nas quais os indivíduos apresentam tanto PEA como DI, como é o caso da síndrome de Phelan-McDermid. Esta síndrome envolve alterações estruturais numa região cromossómica que inclui o gene *SHANK3*, gene que está associado tanto ao DI como à PEA. Existe evidência de que mutações neste gene ocorrem em cerca de 1,7% dos indivíduos com DI, 0,5% dos indivíduos com PEA e 2% das pessoas com PEA que também apresentam DI moderado a profundo (9).

_Objetivos

Neste estudo, procurámos identificar o nível de similaridade genética entre a PEA e as comorbilidades do foro neurológico e neuropsiquiátrico, incluindo os subtipos de algumas das doenças analisadas, que possa explicar em parte a heterogeneidade clínica da PEA.

_Material e métodos

Acedemos à base de dados da DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>), que inclui dados genéticos relativos a todo o espectro de doenças humanas (10) como fonte de informação sobre associações doença-doença e associações gene-doença. Para cada par de doenças, a DisGeNET fornece o Índice de Jaccard de similaridade de doenças, que calcula a fração de genes compartilhados entre as doenças, de acordo com a proporção do número de genes compartilhados pelo número total de genes implicados em ambas as doenças de um determinado par.

Procedemos à seleção dos termos incluídos na DisGeNet relacionados com a PEA e com diversas perturbações neuropsiquiátricas (3) elencadas na **tabela 1**. Seleccionámos ainda os termos relacionados com a Epilepsia. A correspondência entre a nomenclatura definida pelo *Unified Medical Language System* (UMLS) usada na DisGeNET e o *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th edition* (DSM-5) (1), foi feita usando os códigos da *International Classification of Diseases ICD-10/ICD-10-CM*, que pertencem ao sistema de codificação médica desenvolvido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (11).

A rede de semelhanças doença-doença foi construída utilizando o Índice de Jaccard para calcular a similaridade genética entre cada par de doenças, e usando a similaridade como peso das ligações que conectam cada par de doenças na rede. A rede foi gerada usando o pacote *igraph* do R (<https://igraph.org/>). As comunidades de doenças da rede foram identificadas usando o algoritmo de Leiden de deteção de comunidades (12) implementado no pacote do R *LeidenAlg* (13).

O nível de conectividade de cada doença dentro da rede é medido pelo número de ligações a outras doenças, definido pelo grau do nó correspondente a essa doença. Os tamanhos dos círculos na rede refletem o grau do nó. A espessura da linha que liga cada par de doenças é proporcional ao peso da ligação e representa o grau de similaridade entre pares de doenças, calculado pelo índice de Jaccard.

Tabela 1: ↓ Termos relativos às doenças selecionadas, de acordo com os códigos da *International Classification of Diseases ICD-10/ICD-10-CM*, o sistema de codificação médica desenvolvido pela OMS para catalogar diversas condições de saúde por categorias de doenças semelhantes. Todas as categorias de doenças foram obtidas a partir do DSM-5, exceto a Epilepsia, por ser uma doença neurológica.

Código ICD-10/ ICD-10-CM	Designação do <i>Unified Medical Language System</i> (UMLS)	Categoria do DSM-5
F23; F23.9	Perturbação Psicótica Breve (PPB)	Espetro da Esquizofrenia e outras perturbações psicóticas
F90; F90.9	Perturbação de Hiperatividade/Défice de Atenção (PHDA)	Perturbações do neurodesenvolvimento
F90.2	Perturbação de Hiperatividade/Défice de Atenção (PHDA), apresentação combinada	Perturbações do neurodesenvolvimento
F84.0	Perturbação do Espectro do Autismo (PEA)	Perturbações do neurodesenvolvimento
F31; F31.9	Perturbação Bipolar (PB)	Perturbação bipolar e perturbações relacionadas
F31.81	Perturbação Bipolar (PB) tipo II	Perturbação bipolar e perturbações relacionadas
F06.1	Catatonía	Ocorre no contexto de diversas categorias
F34.0	Perturbação Ciclotímica (PC)	Perturbação bipolar e perturbações relacionadas
F22.0	Perturbação Delirante (PD)	Espetro da Esquizofrenia e outras perturbações psicóticas
G40;G40.9; G40.909	Epilepsia	(não se aplica)
F90.1	Perturbação Hipercinética (PC)	Perturbações do neurodesenvolvimento
F21	Perturbação da Personalidade Esquizotípica (PPE)	Espetro da Esquizofrenia e outras perturbações psicóticas
F79	Défice Intelectual (DI)	Perturbações do neurodesenvolvimento
F70-F79.9	Défice Intelectual (DI)	Perturbações do neurodesenvolvimento
F70	Défice Intelectual (DI), leve	Perturbações do neurodesenvolvimento
F71	Défice Intelectual (DI), moderado	Perturbações do neurodesenvolvimento
F72	Défice Intelectual (DI), grave	Perturbações do neurodesenvolvimento
F73	Défice Intelectual (DI), profundo	Perturbações do neurodesenvolvimento
F29	Psicose não-orgânica (PNO) não especificada	Espetro da Esquizofrenia e outras perturbações psicóticas
F42;F42.9; F42.8	Perturbação obsessivo-compulsiva (POC)	Perturbação obsessivo-compulsiva e perturbações relacionadas
F25	Perturbação esquizoafetiva (PE), tipo bipolar	Espetro da Esquizofrenia e outras perturbações psicóticas
F20.81	Perturbação esquizofreniforme (PEF)	Espetro da Esquizofrenia e outras perturbações psicóticas

_Resultados

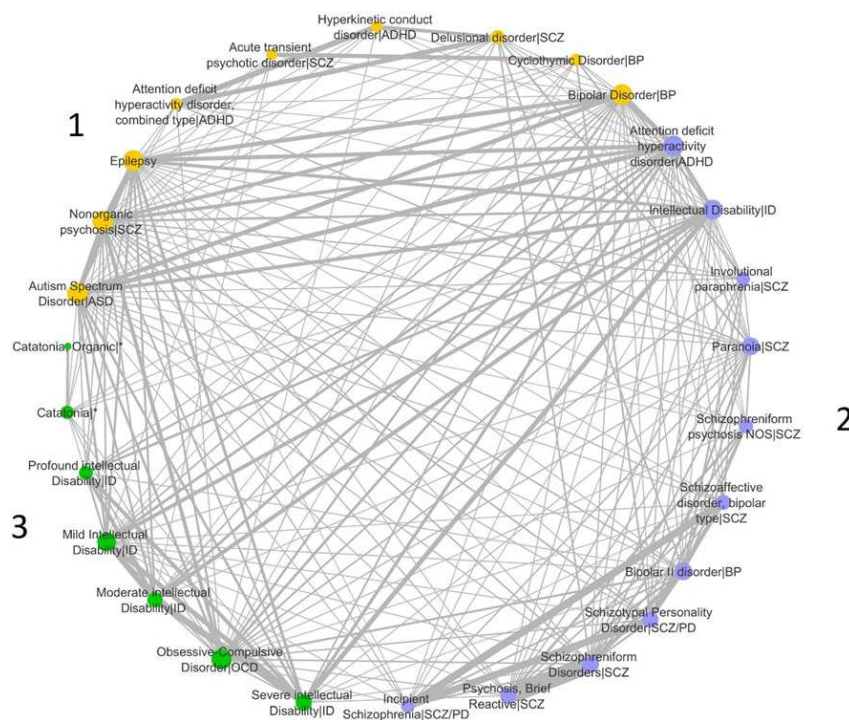
Neste estudo analisámos 309 associações doença-doença com base na similaridade genética entre um conjunto de doenças (**tabela 1**) extraídas das associações doença-doença presentes na DisGeNET. Foram identificadas três comunidades de doenças (**figura 1**). A PEA insere-se na Comunidade 1 juntamente com a Epilepsia, a PHDA (apresentação combinada), a Perturbação Hipercinética (PH), a Perturbação Bipo-

lar (PB), a Perturbação Ciclotímica (PC), e algumas das doenças incluídas no SCZ como a Perturbação Psicótica Breve (PPB). A Comunidade 2 integra a maioria das doenças do espectro da SCZ como a Perturbação da Personalidade Esquizotípica (PPE), a Perturbação esquizoafetiva (PE) tipo bipolar, ou a Perturbação esquizofreniforme (PEF), bem como a PHDA, a PB do tipo II e o DI. Os subtipos de DI estão também presentes na Comunidade 3, juntamente com a POC e a Catatonía (**figura 1**).

A PEA, a PB, a Epilepsia e a Psicose Não Orgânica (PNO) na Comunidade 1, são as doenças que apresentam um maior número de conexões com outras doenças em toda a rede (**figura 1**). A força da conexão entre doenças, definida pelo índice de Jaccard que calcula a similaridade genética entre cada par, é representada pela espessura da linha que as une (**figura 1**), sendo as linhas mais espessas representativas das conexões mais fortes. Observámos que as conexões mais fortes dentro da comunidade da PEA são estabelecidas com a Epilepsia e a PB. A PEA apresenta ainda conexões muito fortes com PHDA e o DI na Comunidade 2 (**figura 1**). PHDA e DI são as doenças

com maior número de ligações a outras doenças (maior grau de nó) na Comunidade 2. Na comunidade 3, a POC e o DI leve (incluindo dificuldades discretas de aprendizagem, comunicação e autonomia), e grave (necessidade de apoio em todas as atividades quotidianas) apresentam o maior número de ligações com outras doenças (**figura 1**). Os subtipos de DI estão agrupados principalmente na Comunidade 3, e podemos observar uma forte conexão entre o DI (na Comunidade 2) e a maioria desses subtipos, independentemente do nível de gravidade. Fortes conexões são também detetadas entre a PHDA e a Perturbação Delirante (PD), e entre a Epilepsia e a PB.

Figura 1: Rede de similaridade de doenças.



As diferentes comunidades estão indicadas com cores diferentes na rede, e as doenças incluídas em cada comunidade são exibidas na figura. Os nós da rede (círculos) representam as doenças. As ligações representam as associações doença-doença. A espessura da linha é proporcional ao peso da ligação e representa o grau de similaridade entre pares de doenças, calculado pelo índice de Jaccard. Os tamanhos dos círculos refletem o número de ligações que uma doença possui com outras doenças da rede, definido pelo grau do nó. ASD, Perturbação do Espectro do Autismo; ADHD, Perturbação de Hiperatividade/Défice de Atenção; SCZ, Doença incluída no Espectro da Esquizofrenia e outras perturbações psicóticas; ID, Doença incluída no Défice Intelectual; BP, Doença incluída na Perturbação Bipolar e perturbações relacionadas; SCZ/PD, Doença incluída na Perturbação da Personalidade e no Espectro da Esquizofrenia e outras perturbações psicóticas; OCD, Doença incluída na Perturbação obsessivo-compulsiva e perturbações relacionadas; *Ocorre no contexto de distúrbios de diferentes categorias de doenças.

_Discussão

Neste estudo investigámos a componente genética comparilhada entre a PEA e comorbilidades do foro neurológico e neuropsiquiátrico. A nossa hipótese era a de que a variabilidade clínica que caracteriza a PEA, nomeadamente a ocorrência variável de comorbilidades nos doentes, possa ser parcialmente explicada por alterações genéticas compartilhadas com as referidas comorbilidades. Através da análise de uma rede de interações doença-doença, demonstrámos que a PEA é uma das cinco doenças com mais conexões na rede de similaridade de doenças produzida. Este resultado indica que a PEA compartilha alterações em genes com várias das doenças analisadas.

A natureza heterogénea da Comunidade 1 sugere que a PEA tem semelhanças genéticas com um número maior de doenças do que a SGZ, a PB e o DI. Esta observação é concordante com a nossa hipótese, dado que a apresentação clínica da PEA é bastante variável, composta por múltiplas comorbilidades, e tendo em consideração que esta variabilidade é frequentemente atribuída ao grande número de genes que têm sido implicados na sua etiologia (2).

O algoritmo de deteção de comunidades usado posicionou o DI e a PEA em comunidades separadas. Embora se saiba que a PEA e o DI partilham genes, estes resultados mostram que a sobreposição genética existente entre PEA e DI não é suficiente para colocar ambas as doenças na mesma comunidade. Isto pode indicar que indivíduos com PEA e DI podem ter mutações num subconjunto de genes que estão mais relacionados com o DI do que os que caracterizam os indivíduos com PEA sem DI.

_Conclusões

Este estudo fornece novas evidências de uma arquitetura genética compartilhada entre a PEA e outras doenças neurológicas e neuropsiquiátricas, incluindo comorbilidades frequentes da PEA.

Estudos adicionais deverão ser desenvolvidos no futuro com o objetivo de expandir esta análise para outras comorbilidades da PEA que não estão no âmbito da doença mental. Pretende-se focar em outros tipos de doenças, como as que afetam o sistema imunitário e que representam um fator de risco para a ocorrência de alterações no desenvolvimento neurológico (14), podendo estar relacionadas com uma constituição geneticamente determinada do microbioma (15).

Referências bibliográficas:

- (1) American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5. 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013.
- (2) Ramaswami G, Geschwind DH. Genetics of autism spectrum disorder. *Handb Clin Neurol*. 2018;147:321-29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00021-X>
- (3) White SW, Maddox BB, Mazefsky CA. The Oxford Handbook of Autism and Co-Occurring Psychiatric Conditions. Oxford: Oxford University Press, 2020. doi: 10.1093/oxfordhb/9780190910761.001.0001
- (4) Lo-Castro, A., and Curatolo, P. Epilepsy associated with autism and attention deficit hyperactivity disorder: Is there a genetic link? *Brain Dev*. 36, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2013.04.013>
- (5) Novarino G, Baek ST, Gleeson JG. The sacred disease: the puzzling genetics of epileptic disorders. *Neuron*. 2013 Oct 2;80(1):9-11. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.019>
- (6) Christensen J, Overgaard M, Parner ET, et al. Risk of epilepsy and autism in full and half siblings-A population-based cohort study. *Epilepsia*. 2016 Dec;57(12):2011-2018. <https://doi.org/10.1111/epi.13595>
- (7) Brainstorm Consortium; Anttila V, Bulik-Sullivan B, Finucane HK, et al. Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science*. 2018 Jun 22;360(6395):eaap8757. <https://doi.org/10.1126/science.aap8757>
- (8) Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, et al. Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell*. 2020 Feb 6;180(3):568-584.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.036>
- (9) Soorya L, Leon J, Trelles MP, et al. Framework for assessing individuals with rare genetic disorders associated with profound intellectual and multiple disabilities (PIMD): the example of Phelan McDermid Syndrome. *Clin Neuropsychol*. 2018 Aug-Oct;32(7):1226-1255. <https://doi.org/10.1080/13854046.2017.1413211>
- (10) Piñero J, Ramírez-Anguita JM, Saüch-Pitarch J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update. *Nucleic Acids Res*. 2020 Jan 8;48(-D1):D845-D855. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1021>
- (11) World Health Organization. ICD-10: International statistical classification of diseases and related health problems: 10th revision, 2nd ed. Geneva: WHO, 2004. (v.3 Alphabetical index). <https://iris.who.int/handle/10665/42980>
- (12) Traag VA, Waltman L, van Eck NJ. From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities. *Sci Rep*. 2019 Mar 26;9(1):5233. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41695-z>
- (13) Kharchenko P, Petukhov V, Traag VA, et al. leidenAlg: Implements the Leiden Algorithm via an R Interface (1.0.2) [online]. [consult. 01/03/2024]. <https://CRAN.R-project.org/package=leidenAlg>
- (14) Meltzer A, Van de Water J. The Role of the Immune System in Autism Spectrum Disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2017 Jan;42(1):284-98. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.158>
- (15) Liu Z, Mao X, Dan Z, et al. Gene variations in autism spectrum disorder are associated with alteration of gut microbiota, metabolites and cytokines. *Gut Microbes*. 2021 Jan-Dec;13(1):1-16. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1854967>

Classificação de variantes de hipercolesterolemia familiar pelo painel de peritos do Clinical Genome Resource

Familial hypercholesterolemia variant classification by the Clinical Genome Resource expert panel

Joana Rita Chora^{1,2}, Mafalda Bourbon^{1,2}; em nome do FH Variant Curation Expert Panel

joana.chora@insa.min-saude.pt

(1) Grupo de Investigação Cardiovascular. Unidade Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Promoção da Saúde e 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

_Resumo

A hipercolesterolemia familiar (FH) é a patologia monogénica mais comum e caracteriza-se por valores muito elevados de colesterol em circulação, levando à sua deposição nas artérias e causando aterosclerose prematura. Indivíduos com FH têm variantes patogénicas, principalmente no gene *LDLR* (>90%), mas também nos genes *APOB* e *PCSK9*, genes estes muito importantes no metabolismo lipídico. O diagnóstico genético é o diagnóstico definitivo, mas existem atualmente mais de 3500 variantes diferentes no *LDLR* listadas na ClinVar, e no início deste trabalho, 565 apresentavam classificações conflituosas de patogenicidade, não permitindo assim confirmar o diagnóstico clínico nos indivíduos portadores destas variantes. Neste trabalho apresentamos o progresso da classificação de variantes no *LDLR* pelo FH Variant Curation Expert Panel (VCEP) do Clinical Genome Resource (ClinGen), segundo a recomendação publicada pelo mesmo grupo para classificação de variantes no gene *LDLR*.

No processo de classificação das variantes no gene *LDLR*, laboratórios associados enviam dados internos de casos índice com a variante em estudo, que são colocados no Variant Curation Interface e complementados com evidências publicadas em artigos científicos e outros dados obtidos de outras bases de dados como descrito na recomendação. Cada variante é avaliada por um *biocurador* sénior ou dois juniores e aprovada por três revisores antes de ser publicada oficialmente na ClinVar.

Atualmente avaliamos 531 variantes no gene *LDLR*. O FH VCEP classificou 5% destas variantes como benignas/provavelmente benignas, 39% como patogénicas/provavelmente patogénicas, 48% como variantes de significado incerto, 1% como conflituosas e 7% estão ainda em avaliação. As classificações definitivas aumentaram de 34% para 44%, e as classificações conflituosas diminuíram de 56% para 1%.

O trabalho do FH VCEP visa melhorar o diagnóstico genético da FH, para o qual a classificação correta das variantes no *LDLR* é de extrema importância. As recomendações do FH VCEP diminuem significativamente as classificações conflituosas, melhorando o diagnóstico da FH no mundo inteiro.

_Abstract

Familial hypercholesterolemia (FH) is the most common monogenic disorder and is characterized by very high levels of circulating cholesterol, leading to its deposition in arteries and causing premature atherosclerosis. Individuals with FH have pathogenic variants, mainly in *LDLR* gene (>90%), but also in *APOB* and *PCSK9* genes, which are highly important genes in lipid metabolism. Genetic diagnosis is the definite diagnosis, but there are

currently over 3500 different variants in *LDLR* listed in ClinVar and, at the beginning of this work, 565 had conflicting classifications of pathogenicity, thus not confirming the clinical diagnosis in individuals carrying these variants. In this work, we present the progress of *LDLR* variant classification by the Clinical Genome Resource's (ClinGen) FH Variant Curation Expert Panel (VCEP), according to the *LDLR* consensus variant classification recommendations published by said group.

In the process of classifying *LDLR* variants, associated labs send internal data on index cases with the variants under study, which is uploaded into the Variant Curation Interface (VCI) and supplemented by evidence published in literature and data obtained from other databases, as described in the recommendations. Each variant is assessed by one senior or two junior biocurators and approved by three reviewers before being officially published to ClinVar.

We have currently evaluated 531 *LDLR* variants. FH VCEP classified 5% of the variants as benign/likely benign, 39% as pathogenic/likely pathogenic, 48% as variants of uncertain significance, 1% as conflicting and 7% are still under evaluation. Definite classifications increased from 34% to 44%, and conflicting classifications decreased from 56% to 1%.

Efforts of the FH VCEP aim to improve FH genetic diagnosis, for which the correct *LDLR* variant classification is of utmost importance. FH VCEP's recommendations significantly decrease conflicting classifications, improving the diagnosis of FH worldwide.

_Introdução

Com a incorporação de tecnologias de sequenciação massiva no diagnóstico genético, o número de variantes potencialmente causadoras de doença aumentou significativamente nos últimos anos. No entanto, a identificação de uma variante genética num gene associado ao diagnóstico clínico do indivíduo em estudo não é o passo final no diagnóstico genético desse indivíduo, uma vez que nem todas as variantes raras identificadas são causadoras de doença ⁽¹⁾. O ênfase é agora colocado na correta interpretação da patogenicidade de cada variante identificada, e na rapidez com que se consi-

ga avaliar o significado clínico desse grande número de variantes.

Deste modo, em 2015, a *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)* e a *Association for Molecular Pathology (AMP)* publicaram recomendações para a classificação da patogenicidade de variantes genéticas associadas a patologias com padrão Mendeliano (2). Os dados usados para avaliar a sua patogenicidade incluem o tipo de variante, a sua frequência populacional, se foi estudada funcionalmente, predição *in silico* do impacto da variante ao nível de RNA ou proteína, co-segregação da variante com o fenótipo em famílias, e análise do fenótipo de casos índice. Todas estas informações são utilizadas num algoritmo com diferentes níveis de evidência resultando numa classificação final da variante em 5 classes possíveis: patogénica, provavelmente patogénica, benigna, provavelmente benigna e variantes de significado incerto (VUS). Estas recomendações foram elaboradas de maneira a poderem ser aplicadas a todos os tipos de patologias e, portanto, precisam de ser adaptadas a cada par doença/gene específico.

Nesse sentido, o *Clinical Genome Resource (ClinGen)*, um consórcio internacional especializado na avaliação da relevância clínica de genes e variantes, promoveu a criação de painéis de especialistas em classificação de variantes, os *Variant Curation Expert Panels (VCEP)*, para desenvolver essas adaptações e aplicar essas recomendações às variantes descritas. Foi também criada uma parceria entre a ClinGen e a ClinVar (3), uma base de dados pública de variantes genéticas que contém informação relevante para avaliar o significado clínico de cada variante. A ClinVar recolhe as classificações de patogenicidade de cada laboratório assim como os dados usados na sua interpretação, e agrupa-as numa classificação única. Assim, se houver discrepância na classificação da mesma variante entre os vários laboratórios, esta fica com uma classificação conflituosa (*conflicting*), e marcada com apenas 1 estrela, enquanto classificações concordantes ficam com 2 estrelas (4). As classificações dos VCEPs usando as suas adaptações específicas são apresen-

tadas com 3 estrelas. A classificação dos VCEPs foi aprovada pela *Food and Drug Administration (FDA)* para utilização direta em testes genéticos.

A Hipercolesterolemia Familiar (FH) é a patologia monogénica mais comum e caracteriza-se por valores muito elevados de colesterol em circulação, levando à sua deposição nas artérias e causando aterosclerose prematura (5). O diagnóstico de FH pode ser feito segundo critérios clínicos, que incluem a presença de valores muito elevados de colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), história familiar de doença cardiovascular ou hipercolesterolemia e/ou xantomas, deposições lipídicas subcutâneas (6); mas apenas um diagnóstico genético pode confirmar o diagnóstico de FH. A FH é causada por variantes patogénicas nos genes *LDLR*, *APOB* e *PCSK9*. O gene *LDLR* codifica o receptor das lipoproteínas de baixa densidade, que tem como função internalizar as partículas de LDL, diminuindo assim a sua concentração nos vasos sanguíneos. Cerca de 90% dos casos de FH devem-se a variantes patogénicas no gene *LDLR*, mas este é muito heterogéneo, existindo atualmente mais de 3500 variantes diferentes listadas na ClinVar. À data de início deste trabalho existiam 565 variantes com classificações de patogenicidade conflituosas (3), o que dificulta o diagnóstico genético atempado.

Assim, em 2016 foi criado o VCEP de Hipercolesterolemia Familiar (FH VCEP) incluindo clínicos, geneticistas e investigadores de vários países, e em 2022, foram publicadas as adaptações do FH VCEP para classificar variantes do gene *LDLR* (7).

_Objetivo

Neste trabalho apresentamos o progresso da classificação de patogenicidade de variantes no gene *LDLR* associadas a hipercolesterolemia familiar pelo painel de especialistas em classificação de variantes (FH VCEP) do *Clinical Genome Resource (ClinGen)* segundo a recomendação publicada pelo mesmo grupo.

_ Métodos

Equipa

A equipa de classificação de variantes do FH VCEP (<https://clinicalgenome.org/affiliation/50004/>) é composta atualmente por 13 revisores, 15 *biocurators* e 11 laboratórios associados (**tabela 1**). A formação de *biocurators*, elementos que pesquisam e avaliam a evidência existente para aplicar

as recomendações do FH VCEP e chegar a uma classificação para cada variante, começou em agosto de 2021 e a ronda mais recente (12.ª) terminou em fevereiro de 2024 (**tabela 2**).

Tabela 1: 📄 Equipa atual de classificação de variantes do FH VCEP.

Nome	País	Instituição	Função
Mafalda Bourbon	Portugal	INSA	Codiretor, Revisor
Iftikhar Kullo	EUA	Mayo Clinic	Codiretor, Revisor
Joana Rita Chora	Portugal	INSA	<i>Scientific lead</i> , Revisor
Carolyn McCormick	EUA	University of North Carolina	Coordenadora
Christina Gutierrez Ford	EUA	University of North Carolina	Coordenadora
Emma Owens	EUA	University of North Carolina	Coordenadora
Alain Carrié	França	Pierre and Marie Curie University	Revisor
Amanda Hooper	Austrália	PathWest Laboratory Medicine	Revisor
Heather Zimmermann	EUA	Ambry Genetics	Revisor
Tomas Freiburger	Chéquia	Centre for Cardiovascular Surgery and Transplantation	Revisor
Sarah Leigh	Reino Unido	Genomics England	Revisor
Robert Hegele	Canadá	Robarts Research Institute	Revisor
Damon Bell	Austrália	PathWest Laboratory Medicine	Revisor
Michael Iacocca	Canadá	Deep Genomics	Revisor
Mathilde Di Filippo	França	Centre Hospitalier Universitaire de Lyon	Revisor
Lukas Tichy	Chéquia	University Hospital Brno	Revisor
Ana Medeiros	Portugal	INSA	<i>Biocurator</i> sénior
Jian Wang	Canadá	Robarts Research Institute	<i>Biocurator</i> sénior
Olivier Bluteau	França	Pitié-Salpêtrière Hospital	<i>Biocurator</i> sénior
Alborz Sherafati	EUA	Mayo Clinic	<i>Biocurator</i> sénior
Marwan Hamed	EUA	Mayo Clinic	<i>Biocurator</i> sénior
Jake Petzelka	EUA	Mayo Clinic	<i>Biocurator</i> sénior
Catarina Alves	Portugal	INSA	<i>Biocurator</i> responsável por estudos funcionais
Xiangqiang Shao	EUA	University of Wisconsin	<i>Biocurator</i>
Alessia Di Costanzo	Itália	Sapienza University of Rome	<i>Biocurator</i>
Jessica Chonis	EUA	Stanford Healthcare	<i>Biocurator</i>
Kyle Hilliard	EUA	University of North Carolina	<i>Biocurator</i>
Beatriz Miranda	Portugal	INSA	<i>Biocurator</i>
Oriane Marmontel	França	Centre Hospitalier Universitaire de Lyon	<i>Biocurator</i>
Lan Nguye	Austrália	PathWest Laboratory Medicine	<i>Biocurator</i>
Azin Teymourzadeh	EUA	Mayo Clinic	<i>Biocurator</i>

Seleção de variantes e introdução de dados no VCI

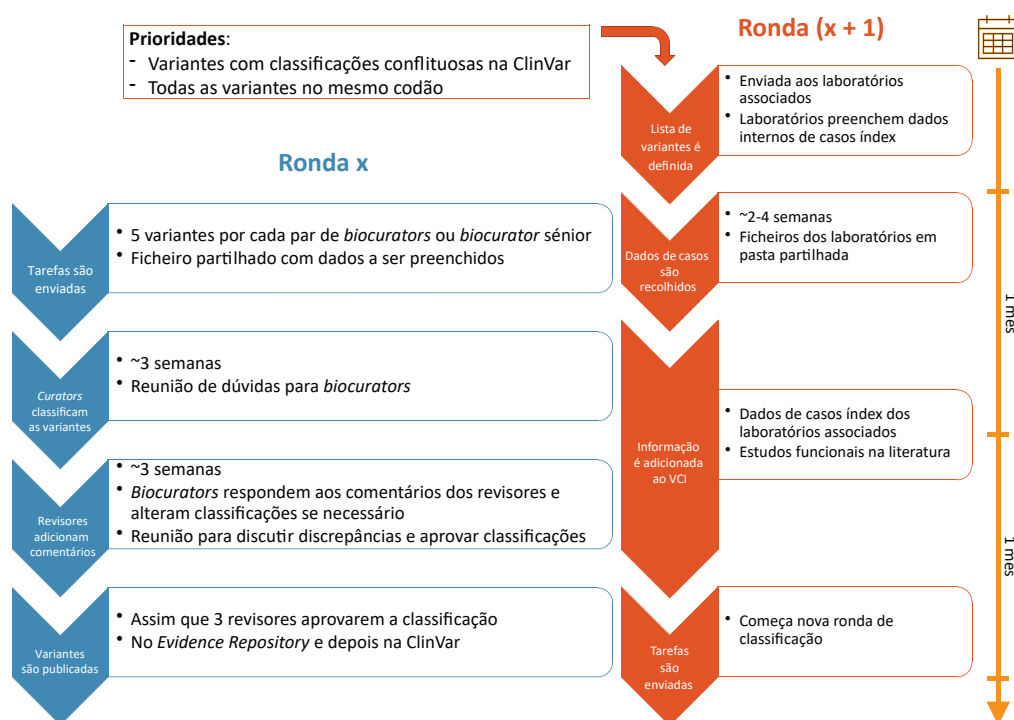
Foi dada prioridade às variantes com classificações conflituosas na ClinVar e outras variantes no mesmo codão, necessárias para classificar adequadamente as variantes conflituosas (figura 1). A lista de variantes de cada ronda é definida com antecedência e enviada aos laboratórios associados, que devolvem dados internos de casos índice que tenham identificado com essas variantes (cumprindo normas de proteção de dados pessoais). Estes dados são carregados no *Variant Curation Interface* (8) (VCI), um *software* da ClinGen que facilita a compilação da informação para a classificação de cada variante, por um *biocurator* que vai alternando em cada ronda. Na equipa de preparação do FH VCEP existe também um elemento dedicado que pesquisa, analisa e insere informações sobre

estudos funcionais publicados das variantes e coloca toda a informação também no VCI, antes da próxima ronda de classificação. Assim, quando a ronda de classificação começa, os *biocurators* já têm informação disponível no VCI que pode depois ser completada com mais evidências encontradas na literatura por cada *biocurator* (figura 1).

Classificação de variantes

Com base nas recomendações publicadas (7), cada variante no *LDLR* é avaliada e classificada por um *biocurator* sénior ou por dois *biocurators* juniores independentemente no VCI, e depois aprovada por três revisores antes de ser publicada oficialmente no Repositório de Evidências da ClinGen (*ClinGen Evidence Repository*) e na ClinVar com status de 3 estrelas (figura 1).

Figura 1: Representação esquemática da metodologia atual de classificação de variantes do FH VCEP.



FH, hipercolesterolemia familiar; VCEP, painel de especialistas em classificação de variantes; VCI, *variant curation interface* da ClinGen.

_Resultados

Até ao final da ronda 12, o FH VCEP avaliou 531 variantes no gene *LDLR* (tabela 2 e gráfico 1). A classificação que estava presente na ClinVar de cada variante antes do FH VCEP as classificar com as recomendações específicas para o gene *LDLR*, encontra-se ilustrada no gráfico 1A, onde se pode ver que 351 variantes (66%) apresentavam uma classificação conflituosa ou de significado incerto e, apenas 178 variantes (34%), apresentavam uma classificação definitiva (benigna ou patogénica).

As classificações do FH VCEP distribuem-se em 26 variantes benignas ou provavelmente benignas (B/LB) (5%), 206 variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas (P/LP) (39%), 253 variantes de significado incerto (48%) e apenas 7 variantes com classificação conflituosa (1,3%),

por reunirem evidências ao mesmo tempo benignas e patogénicas (gráfico 1B). Apenas 39 variantes (7%) ainda estão em avaliação. A classificação do FH VCEP aumentou assim o número de variantes com uma classificação definitiva para 232 (44%) e diminuiu assim as classificações conflituosas de 56% para 1%.

No total, as classificações de 338 variantes estão atualmente publicadas tanto na ClinVar, com *status* de 3 estrelas, como no ClinGen *Evidence Repository*, 5 variantes estão publicadas ainda apenas no ClinGen *Evidence Repository*, 150 variantes estão aprovadas e em processo de publicação nas 2 bases de dados, e 39 encontram-se ainda em avaliação (tabela 2).

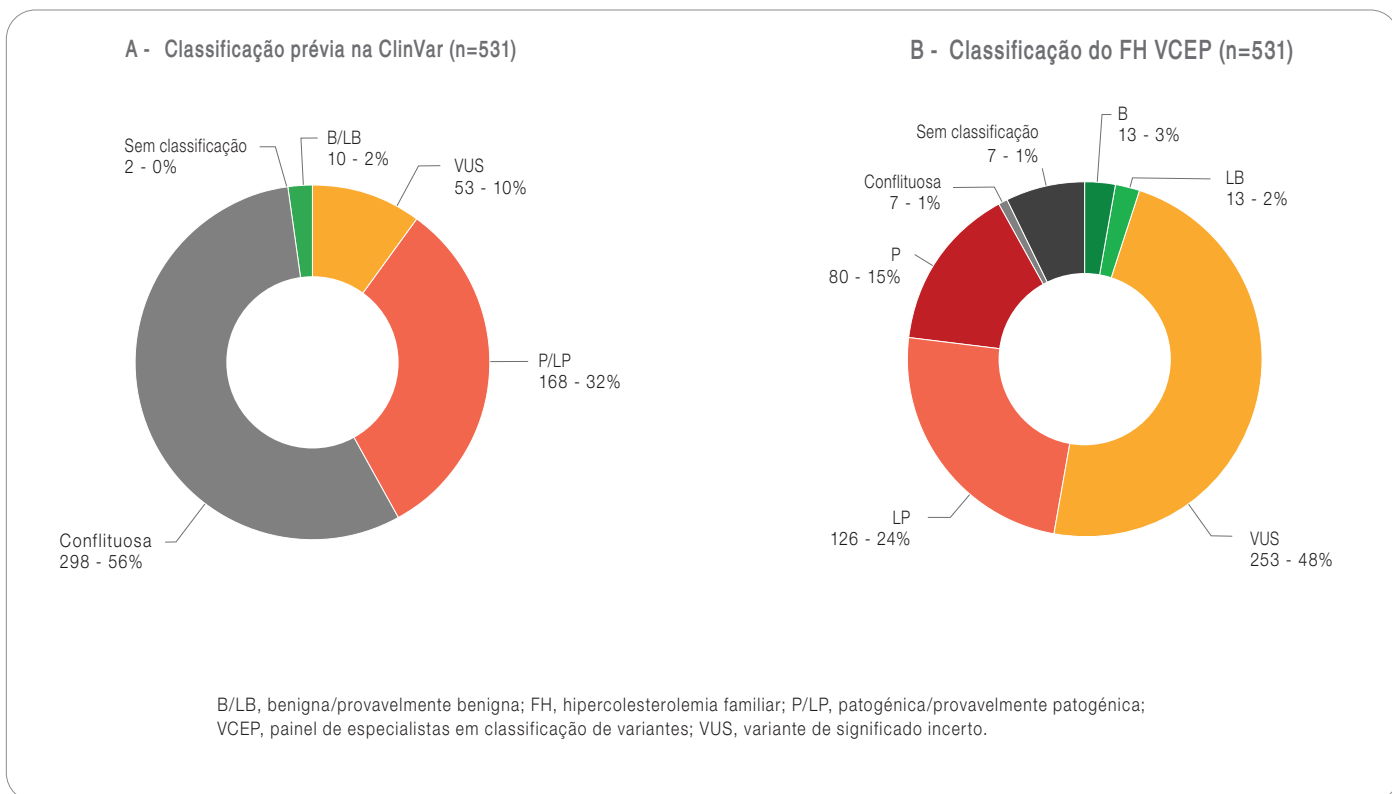
Tabela 2: Características de todas as rondas de classificação, incluindo estudo-piloto, rondas de formação (A), e rondas de classificação (B).

A - Ronda de formação	Piloto	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Data-fim	Ago 2020	Out 2021	Dez 2021	Mar 2022	Ago 2022	Mar 2023	Em curso
<i>Biocurators</i>	3	10	3	4	3	3	5
Revisores	2	8	3	9	5	3	3
Variantes aprovadas	54/54	13/16	4/4	7/7	10/11	3/5	-/10
Variantes publicadas*	54/54	13/16	4/4	5/7	10/11	-	-

B - Ronda de classificação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Data-fim	Dez 2021	Jan 2022	Fev 2022	Mar 2022	Mai 2022	Jul 2022	Out 2022	Jan 2023	Mar 2023	Jun 2023	Out 2023	Fev 2024
<i>Biocurators</i>	11	11	11	12	14	14	16	13	12	14	14	13
Revisores	9	9	10	12	11	12	13	10	12	12	13	13
Variantes aprovadas	20/20	30/30	23/24	29/30	30/30	35/40	49/50	39/40	38/40	38/45	37/45	36/40
Variantes publicadas*	20/20	30/30	23/24	28/30	30/30	35/40	30/50	30/40	26/40	5/45**	-	-

* no repositório de evidências da ClinGen e na ClinVar ** só no repositório de evidências da ClinGen F, Ronda de formação

Gráfico 1: ↓ Classificação das variantes no gene *LDLR* avaliadas pelo FH VCEP até ao momento. (A) classificação prévia na ClinVar, (B) Classificação atual pelo FH VCEP.



_Discussão

A aplicação das adaptações do FH VCEP na classificação de variantes no gene *LDLR* associadas a hipercolesterolemia familiar (7) permitiu-nos distinguir variantes verdadeiramente conflituosas (com evidências tanto patogénicas como benignas) de variantes de significado incerto, ainda com evidências insuficientes para chegar a uma classificação definitiva.

Cerca de metade das variantes que tinham uma classificação prévia conflituosa (n=298), têm agora uma classificação definitiva, ou seja, foram classificadas como provavelmente patogénica/patogénica ou provavelmente benigna/benigna (127/298, 43%). O aparente aumento de variantes de significado incerto, pode ser explicado pelo facto que, em 76% dessas variantes, a sua classificação prévia na ClinVar tinha apenas 0 ou 1 estrelas, ou seja, foram submetidas à

ClinVar sem informação do critério de classificação usado ou por apenas 1 único laboratório (4), não sendo assim a sua classificação prévia suficientemente fidedigna. No total, em 60% das variantes a classificação manteve-se semelhante, em apenas 13% a classificação passou de P/LP ou B/LB para VUS, e em 26% a classificação passou de VUS ou conflituosa para P/LP ou B/LB. O grande avanço nestas classificações deve-se principalmente à partilha de dados entre laboratórios e ao trabalho voluntário de todos os *biocurators* e revisores.

Existem ainda 39 variantes em avaliação por os revisores ainda não terem chegado a um consenso na avaliação de todas as evidências ou por ter sido necessário contactar autores de artigos ou laboratórios para elucidar alguma dúvida na interpretação dos seus dados.

Conclusão

O principal objetivo do painel de especialistas em classificação de variantes de Hipercolesterolemia Familiar (FH VCEP) é melhorar o diagnóstico genético da FH, criando sinergias e meios para standardizar a classificação correta de variantes genéticas identificadas no gene *LDLR* em indivíduos com FH.

O FH VCEP pretende classificar todas as >3500 variantes presentes na base de dados ClinVar com 3 estrelas para facilitar o diagnóstico da FH.

As recomendações do FH VCEP diminuirão significativamente as classificações conflituosas (de ~300 para menos de 10), o que facilitará o diagnóstico presente e futuro e contribuirá, em última análise, para uma melhor identificação e prognóstico de indivíduos com FH.

Referências bibliográficas:

- (1) Cotton RG, Scriver CR. Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat.* 1998;12(1):1-3. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)12:1<1::AID-HUMU1>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:1<1::AID-HUMU1>3.0.CO;2-M)
- (2) Richards S, Aziz N, Bale S, et al.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. 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>
- (3) Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062-D1067. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKX1153>
- (4) National Center for Biotechnology Information. Review status in ClinVar [online]. [consult. 16/4/2024]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/review_status/
- (5) Akoyamen LE, Genest J, Shan SD, et al. Estimating the prevalence of heterozygous familial hypercholesterolaemia: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2017;7(9):e016461. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-016461>
- (6) Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *BMJ.* 1991;303(6807):893-96. <https://doi.org/10.1136/bmj.303.6807.893>
- (7) 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;24(2):293-306. <https://doi.org/10.1016/J.GIM.2021.09.012>
- (8) Preston CG, Wright MW, Madhavrao R, et al. ClinGen Variant Curation Interface: a variant classification platform for the application of evidence criteria from ACM-G/AMP guidelines. *Genome Med.* 2022;14(1):1-12. <https://doi.org/10.1186/S13073-021-01004-8/FIGURES/6>

Monitorização de formaldeído (HCHO) em amostras de água: avaliação de eventuais riscos para a saúde pública decorrentes da exposição a este composto

Monitoring of formaldehyde (HCHO) in water samples: assessment of possible risks to public health from exposure to this compound

Sílvia S José, José Grossinho, Helena Rebelo

silvia.jose@insa.min-saude.pt

Unidade de Água e Solos. Laboratório de Química e Toxicologia de águas, Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A literatura descreve para o formaldeído diversos efeitos nefastos para a saúde. Contudo, não existe, até ao momento, uma limitação legal quanto ao teor máximo admissível em uma água.

Pretende-se com este estudo avaliar a eventual presença e aferir os níveis de formaldeído em amostras de água de diversas origens.

Das 107 amostras de água analisadas, apenas duas revelaram a presença deste composto, uma amostra de água de processo com uma concentração de 0,087 mg/L e uma amostra de água de piscina com 0,058 mg/L. Dado que não existe um valor paramétrico definido legalmente, a interpretação dos resultados baseou-se na Norma NSF/ANSI 60 - 2016 que admite uma concentração máxima admissível de formaldeído em água de 1 mg/L.

Face aos resultados obtidos e por se tratar de um composto indesejável devido ao risco para a saúde, considera-se de todo o interesse a sua monitorização em amostras de água destinadas ao consumo humano de modo a avaliar a eventual exposição e conseqüente risco para a saúde pública.

_Abstract

The literature describes several harmful health effects for formaldehyde. However, to date, there is no legal limitation regarding the maximum permissible content in water.

The aim of this study is to evaluate the possible presence and compare the levels of formaldehyde in water samples from different sources.

Of the 107 proven water samples, only two revealed the presence of this compound, one in a process sample with a concentration of 0.087 mg/L and another in a pool water sample with 0.058 mg/L. Given that there is no legally defined parametric value, the interpretation of the results is based on the NSF/ANSI 60 Standard - 2016, which admits a maximum allowable concentration of formaldehyde in water of 1mg/L.

In view of the results obtained and because it is an undesirable compound due to possible health risk, it is considered to be of great interest to monitor it in water samples intended for human consumption in order to assess possible exposure and risk to public health.

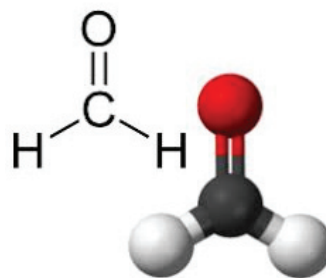
_Introdução

A água é um recurso natural essencial para a existência e sobrevivência das várias formas de vida. No entanto, várias são as atividades de origem antropogénica que podem contribuir para a contaminação das águas, com efeitos frequentemente graves para a saúde humana.

O formaldeído (**figura 1**) é um gás incolor de odor sufocante, solúvel em água e bastante reativo, de elevada volatilidade e extremamente inflamável. Quando inalado, é tóxico podendo causar dificuldade respiratória severa, e lesões na pele por contacto dérmico (1).

Este composto é amplamente utilizado, nomeadamente como conservante em produtos de cosmética e cabeleireiro, como desinfetante em medicação humana e animal, e ainda no fabrico de plásticos e resinas aglomeradas que são parte constituinte de mobiliário.

Figura 1: Estrutura e fórmula molecular do formaldeído (HCHO).



Pode estar presente no ar, como resultado da foto-oxidação natural de hidrocarbonetos emitidos pela combustão automóvel, poluição de fábricas e refinarias. Na água, pode ter origem em descargas de águas residuais ou na lixiviação do plástico utilizado nas redes de distribuição de água potável em caso de desgaste das mesmas. No caso particular das águas tratadas para consumo humano, pode ocorrer a sua formação em resultado da oxidação da matéria orgânica durante o processo de desinfeção (2,3).

Este composto constitui um fator de risco ambiental com repercussões na saúde humana, podendo causar lesões carcinogénicas no trato respiratório e leucemias bem como irritação no nariz, garganta e olhos. Em altas concentrações pode causar falta de ar, salivação excessiva, espasmos musculares, danos da córnea, coma e morte. Está classificado no grupo 1 pela Agência de Investigação para o Cancro (IARC) como carcinogénico em humanos.

No caso específico da água, a literatura refere que a formação deste composto ocorre habitualmente em concentrações abaixo dos valores considerados prejudiciais para a saúde, pelo que, até ao momento não há legislação aplicável para a sua monitorização.

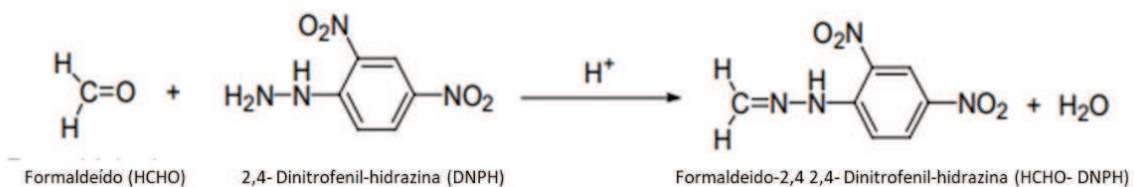
_Objetivo

Este trabalho teve como objetivo estudar a eventual presença de formaldeído e respetiva concentração em amostras de água de diferentes origens: rede pública de abastecimento, piscinas, residuais, processo, minerais naturais e nascente e naturais doces (superficiais e subterrâneas) de modo a avaliar eventuais riscos para a saúde pública decorrentes da exposição a este composto.

_Método de análise

Foi desenvolvida e validada no laboratório uma metodologia para a determinação e quantificação do formaldeído em amostras de água. O método inclui uma reação prévia de derivatização com o agente derivatizante dinitrofenil-hidrazina (DNPH), dando origem ao produto formaldeído 2,4-2,4-dinitrofenilhidrazina (HCNO-DNPH) (figura 2). Para a identificação e a quantificação do composto foi usada a cromatografia líquida em fase reversa (HPLC) com detetor de ultravioleta (VWD). Como fase móvel foi utilizada uma mistura de acetonitrilo/água e como fase estacionária uma coluna C18 (4).

Figura 2:  Mecanismo de reação proposto entre Formaldeído e (DNPH) originando o produto de derivatização (HCHO-DNPH) (5).



_Amostragem

Este estudo decorreu entre março e outubro de 2023. Foram analisadas um total de 107 amostras de água obtidas de diferentes localizações geográficas (**tabela 1**) e diferentes naturezas: água residual (R), água de consumo tratada (ACT), água de consumo não tratada (ACNT), água de processo (PRO), água de piscina (PIS), água mineral natural e de nascente (MNN) e água natural doce (ND).

Tabela 1: ↓ Distribuição geográfica das amostras de água estudadas.

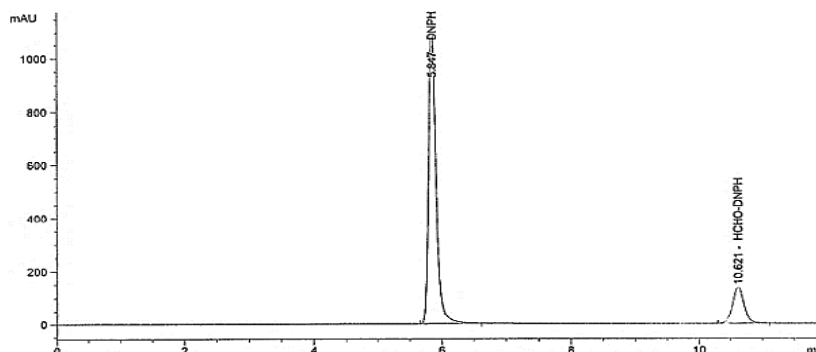
Distribuição de amostras estudadas	
Distrito	Conselho
Braga	Guimarães, Terras Bouro
Bragança	Vila Flor
Porto	V. N. Gaia
Aveiro	Albergaria-a-velha, Mealhada
Viseu	Tondela
Guarda	Gouveia
Coimbra	Arganil
Leira	Caldas da Rainha
Castelo Branco	Fundão
Santarém	Chamusca, Mação, Santarém
Lisboa	Amadora, Cascais, Lisboa, Loures, Mafra, Malveira, Sacavém, Sintra, V. F. Xira
Portalegre	Crato, Ponto de Sor, Portalegre
Setúbal	Almada, Grândola, Palmela, Sesimbra
Évora	Évora
Beja	Moura
Faro	Faro

_Resultados

A gama de trabalho situa-se entre 0,05 mg/L e 4 mg/L com um critério de linearidade correspondente a um coeficiente de correlação $r \geq 0,995$. O valor da incerteza expandida ($k=2$) calculado para um intervalo de confiança de 95% é de 14%.

A identificação do composto é feita através do tempo de retenção obtido na corrida cromatográfica. A **figura 3** representa um cromatograma típico em que o pico aos 5,847min correspondente ao reagente de derivatização, em excesso na reação, e o pico aos 10,621min corresponde ao composto derivatizado, cuja área é proporcional ao teor de formaldeído nas amostras.

Figura 3: ↓ Cromatograma obtido nas condições otimizadas para a metodologia de determinação do HCHO-DNPH derivatizado, por HPLC - UV ($\lambda=360\text{nm}$) para uma concentração de 4,0 mg/L de formaldeído, com um tempo de retenção (t_r) de 10,621min.



artigos breves_ n. 13

Os resultados obtidos revelam a presença de formaldeído em teores quantificáveis ($> 0,05$ mg/L) em 2 amostras, correspondendo uma a água de processo (unidade de tratamento de ar) com um teor de 0,087 mg/L e outra a água de piscina de utilização coletiva com um teor de 0,058 mg/L. Em 48 amostras foi detetada a presença deste composto, mas em teores não quantificáveis ($> 0,017$ mg/L $< 0,05$ mg/L).

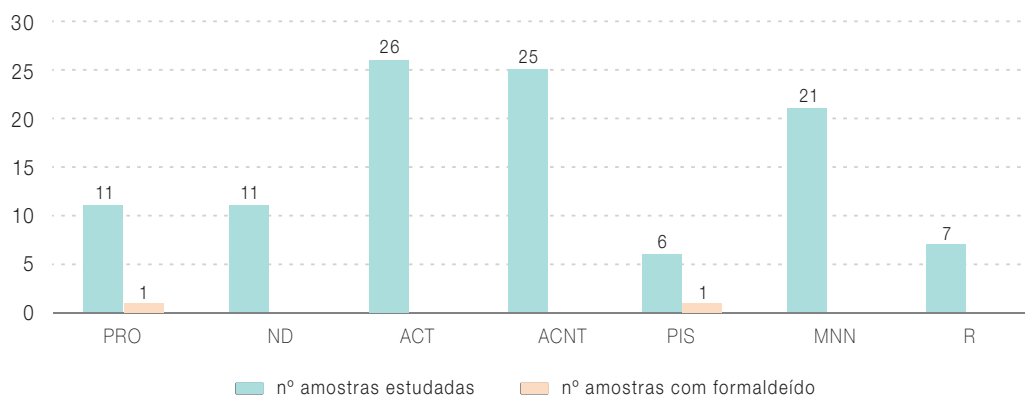
O gráfico 1 (a-b) traduzem a representação dos resultados obtidos.

Baseado no risco para a saúde a 4MS da *Umwelt Bundesant* recomenda uma concentração máxima tolerável de 0,75 mg/L e a Norma NSF/ANSI 60 de 2016 define uma concentração máxima admissível em água de 1 mg/L (6-7).

Considerando o valor indicado pela referida Norma, as duas situações encontradas com valores quantificáveis são consideradas aceitáveis. Assim sendo, estes resultados sugerem que seria conveniente alargar o trabalho de amostragem, dando eventualmente especial enfoque às águas de processo e piscina.

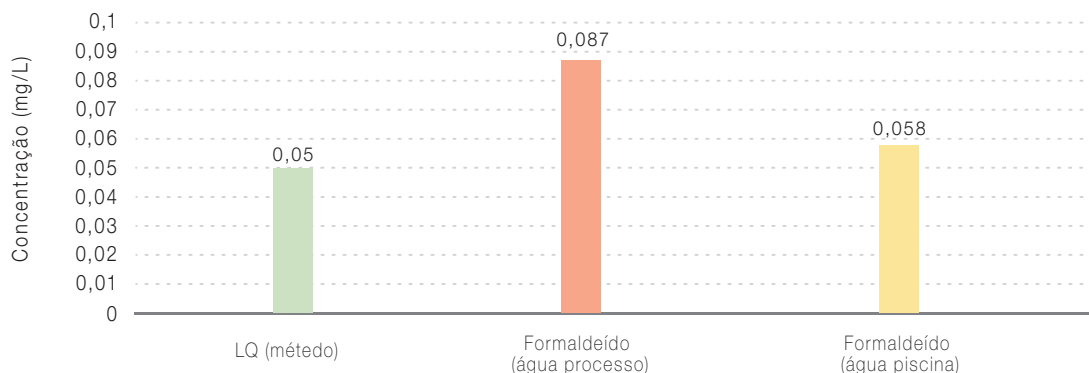
Gráfico 1 (a-b): Resultados da monitorização de formaldeído (HCHO) nas amostras de água estudadas, em função da quantidade e natureza das amostras.

A - Total de amostras analisadas, agrupadas pela natureza



B - Caso particular das amostras onde se encontrou formaldeído

(água de processo - Unidade de tratamento de ar, UTA e água de piscina - utilização coletiva)



De acordo com a Norma NSF/ANSI 60 - 2016, a concentração máxima admissível de formaldeído na água é 1mg/L.

_Conclusões

Face aos resultados obtidos para a amostragem estudada, podemos dizer que não foi encontrada evidência da presença regular desta substância na água. Contudo, esta ilação não exclui a possibilidade de eventual risco para a saúde pública, uma vez que se trata de um composto de uso mais ou menos generalizado.

Estando cientificamente comprovada a toxicidade do formaldeído, que o relaciona com ocorrências cancerígenas, considera-se pertinente a continuidade de estudos de monitorização, nomeadamente em amostras de piscinas, residuais e naturais doces, para avaliar o eventual risco de exposição a este contaminante orgânico nas águas.

Agradecimentos:

Os autores agradecem à equipa de amostragem: Carla Ferreira, Ana Elisabete Carvalho, Filipe Marques e João Sousa do Departamento de Saúde Ambiental da Unidade de Água e Solos (DSA-UAS) pela colaboração na recolha das amostras.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Formaldehyde in Drinking-water. In: Guidelines for drinking-water quality. Vol. 2, Health criteria and other supporting information : addendum, 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1996. <https://iris.who.int/handle/10665/63844>
- (2) APHA/AWWA/WEF. Standard methods for examination of water and wastewater. 21st ed. Washington, DC: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, 2005.
- (3) World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating first addendum, 4th ed + 1st add. Geneva: World Health Organization, 2017. <https://iris.who.int/handle/10665/254637>
- (4) Soman A, Qiu Y, Chan Li Q. HPLC-UV method development and validation for the determination of low level formaldehyde in a drug substance. J Chromatogr Sci. 2008 Jul;46(6):461-5. <https://doi.org/10.1093/chromsci/46.6.461>
- (5) Yilmaz B, Küçükoğlu K, Asci A, et al. Determination of Formaldehyde in human tissue through derivatization with 2,4-Dinitrophenylhydrazine by square wave polarography method. Int'l J Int J Adv Chem Eng & Biol Sci. 2016;3(1):168-173. <http://iicbe.org/upload/7650EAP616203.pdf>
- (6) 4MSI Joint Mangement Committee. 4MSI Common Approach on Organic Materials in contact with Drinking Water. 2nd rev. 2020. https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/5620/dokumente/common_approach_on_organic_materials_-_part_a_methodologies_for_testing_and_accepting_starting_substances_0.pdf
- (7) NSF International Standard/American National Standard. NSF/ANSI 60-2016: Drinking water treatment chemicals - health effects. https://d2evkimvhatqav.cloudfront.net/documents/NSF-ANSI_60_watemarked.pdf?v=1594929800

Programa nacional de avaliação externa da qualidade de microbiologia do ar (2010-2022)

Portuguese external quality assessment programme of air microbiology (2010-2022)

Manuela Cano¹, Ana Paula Faria², Helena Correia², Cristina Almeida¹, Nuno Rosa¹, Cláudia Júlio¹

manuela.cano@insa.min-saude.pt

(1) Unidade do Ar e Saúde Ocupacional, Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Unidade de Avaliação Externa da Qualidade, Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A Unidade de Ar e Saúde Ocupacional (UASO) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge implementou os procedimentos necessários para a acreditação dos ensaios de amostragem e determinação analítica de microrganismos cultiváveis em suspensão no ar, de acordo com o referencial da norma NP EN ISO/IEC 17025 que estabelece os requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. Face à inexistência de programas de avaliação externa da qualidade (AEQ), a Unidade de Ar e Saúde Ocupacional organizou, em colaboração com o Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ), os programas de AEQ – Microbiologia do Ar e de Identificação de Fungos em Cultura.

O Programa de Microbiologia do Ar consiste na avaliação do processo de amostragem de ar e posterior análise laboratorial, tendo como objetivo a quantificação de bactérias e fungos em suspensão no ar, sendo complementado com o programa de AEQ de Identificação de Fungos em Cultura, que avalia a competência laboratorial para identificação de fungos.

O tratamento dos resultados de AEQ do Programa de Microbiologia do Ar inclui o cálculo do índice de desvio (avaliação do desempenho) e do coeficiente de variação. No programa de AEQ de identificação de fungos em cultura os resultados são classificados de acordo com a identificação à espécie/género, através da atribuição de scores.

O presente trabalho pretende realizar uma avaliação crítica dos resultados, obtidos ao longo de 12 anos de atividade do Programa de Avaliação Externa da Qualidade de Microbiologia do Ar e do Programa de Identificação de Fungos em Cultura, salientando a sua importância para a avaliação da qualidade do ar.

_Abstract

The Air and Occupational Health Unit (UASO) from the National Institute of Health Doctor Ricardo Jorge has implemented the necessary procedures to accredit the sampling and analytical determination of airborne cultivable microorganisms in accordance with the NP EN ISO/IEC 17025 standard, an indicator of technical competence and quality assurance. Given the lack of proficiency testing schemes, the Air and Occupational Health Unit organized, in collaboration with the Portuguese External Quality Assessment Programme (PNAEQ), the External Quality Assessment - Air Microbiology and Identification of Fungi in Culture programmes. The Air Microbiology Program consists of evaluating the air sampling process and subsequent laboratory analysis, with the aim of quantifying bacteria and fungi suspended in the air, and the Fungus Identification Program, which in addition, evaluates laboratory competence in identifying fungi in culture.

The Air Microbiology Program's results processing, includes the calculation of the Z-score and the coefficient of variation, making it possible to classify the results into categories. Results classification in fungi identification program are according to the species/genus identification, by assigning scores. The aim of this work is to carry out, a critical evaluation of the results obtained over 12 years of the External Quality Assessment Programme for Air Microbiology and Fungi Identification, highlighting its importance in air quality evaluation.

_Introdução

A avaliação do risco de exposição profissional a agentes biológicos pode basear-se na determinação da concentração de bactérias e fungos cultiváveis em suspensão no ar dos locais de trabalho, onde é exetável a sua libertação durante a realização das diversas atividades pelos trabalhadores. O Decreto-Lei n.º 84/97, de 16 de abril, estabelece as regras de proteção dos trabalhadores contra riscos de exposição a agentes biológicos. A presença de agentes biológicos com efeitos nocivos para a saúde humana pode dever-se a diversos processos, designadamente em resultado do desenvolvimento das biotecnologias, através das quais se procede à sua produção e utilização, ou na sequência da sua libertação sem que os mesmos sejam o objeto de trabalho. Os trabalhadores podem estar potencialmente expostos a agentes biológicos com risco para a saúde em diversas atividades, nomeadamente: agricultura; pecuária; recolha e tratamento de resíduos; tratamento de águas residuais, diversos ramos da indústria, entre outros.

Por outro lado, a legislação nacional relativa à qualidade do ar interior (QAI), o Decreto-Lei n.º 101-D/2020, de 7 de dezembro, e a Portaria n.º 138-G/2021, de 1 de julho, estabelecem, entre outros, concentrações máximas de referência para poluentes microbiológicos (bactérias e fungos), sendo necessária a determinação da sua concentração no ar.

Como consequência da aplicação da legislação verificou-se o aumento significativo do número de avaliações da QAI e de avaliações de risco de exposição profissional, sendo imperativo harmonizar os procedimentos de amostragem e de análise, tendo como objetivo obter resultados comparáveis, entre os diversos prestadores de serviços nesta área.

Face à inexistência de programas de AEQ, a UASO, em colaboração com o PNAEQ, organizou em 2010 o programa-piloto de AEQ em Microbiologia do Ar - contagem de bactérias e fungos, e em 2012 o programa de Microbiologia do Ar - identificação de fungos em cultura, que se mantém atualmente.

_Objetivo

Apreciar os resultados obtidos ao longo dos 12 anos (2010 e 2022) do Programa de Avaliação Externa da Qualidade de Microbiologia do Ar, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

_Material e métodos

Os Programas de Avaliação Externa da Qualidade – Microbiologia do Ar e Identificação de Fungos em cultura - avaliam a amostragem de ar e a análise laboratorial, no que respeita à quantificação de bactérias e de fungos em suspensão no ar e à identificação de espécies de fungos filamentosos em cultura. Os laboratórios participantes são, na sua maioria, nacionais, contudo, a partir de 2019 os Programas passaram a contar com laboratórios estrangeiros, dois de países europeus e um de país africano.

O PNAEQ elabora as cartas de instruções e respetivos formulários de resposta, disponibilizando aos participantes as informações necessárias para a realização de cada ensaio.

No Programa de Microbiologia do Ar são realizados dois ensaios por ano, de modo a contemplar as variações sazonais, expectáveis para a contaminação microbiológica do ar (estação quente e estação fria). São efetuadas colheitas em vários locais com diferentes graus de contaminação microbiológica e com ocupação variável, tais como: sala limpa, laboratório, biblioteca, refeitório, sala de reuniões/formação, anfiteatro e exterior.

A colheita é realizada em simultâneo por todos os participantes, com recurso aos amostradores e meios de cultura utilizados em rotina nos respetivos laboratórios, em dois pontos de amostragem (PC1 e PC2), preferencialmente, com diferentes graus de contaminação. As placas são posteriormente incubadas, sendo calculada a concentração de microrganismos com base na contagem obtida e no volume de ar colhido por cada laboratório.

A análise, tratamento e apreciação dos resultados (Excelente; Bom; Satisfatório; Insatisfatório) são realizados pelo PNAEQ, nomeadamente os cálculos da média de consenso, do desvio padrão, do coeficiente de variação, do viés e do índice de desvio, com base no referencial normativo, norma NP EN ISO/IEC 17043 (1).

Para a identificação de fungos em cultura são enviadas, uma vez por ano, duas estirpes para identificação (ao género ou à espécie). A identificação dos fungos filamentosos em cultura é classificada com scores: 0 - identificação incorreta; 1 - identificação correta ao género; 2 - identificação correta ao género e/ou espécie conforme o requerido pelo PNAEQ.

No final de cada ano, o organizador do programa, apresenta aos Laboratórios participantes os resultados do ano anterior tratados e promove a formação dos participantes nas áreas que identifica como mais sensíveis.

_Resultados e discussão

Ao longo do período de 12 anos em que decorreu o Programa Microbiologia do Ar, no qual o número de participantes foi variável, utilizaram-se 14 equipamentos diferentes, embora com o mesmo princípio de funcionamento, o impacto do ar em meio de cultura semissólido, após passar por um crivo. Os caudais de amostragem variaram entre 90 e 360 L/min.

As concentrações de microrganismos no ar são expressas em UFC/m³ e calculam-se tomando por base a contagem em cada placa (nº de unidades formadoras de colónias-UFC) e o volume de ar colhido.

artigos breves_ n. 14

Nos gráficos seguintes apresentam-se os resultados obtidos para as concentrações de bactérias (**gráfico 1**) e fungos (**gráfico 2**) para a estação fria (outono/inverno), nos dois pontos de colheita (PC1 e PC2), para o período em estudo (2010 a 2022).

Gráfico 1: ▾ Concentração de bactérias no ar (UFC/m³) para os dois ensaios que decorreram durante a estação fria (outono/inverno), de 2010 a 2022.

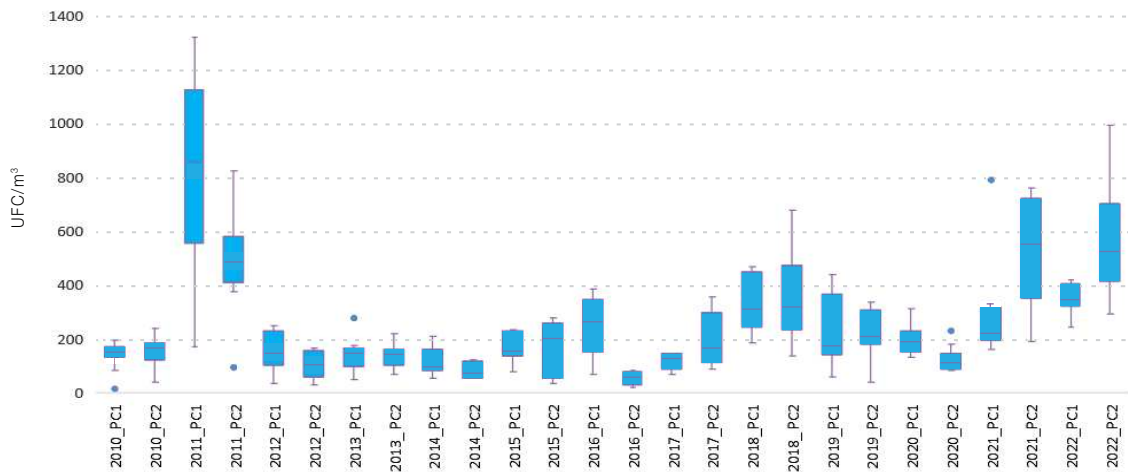
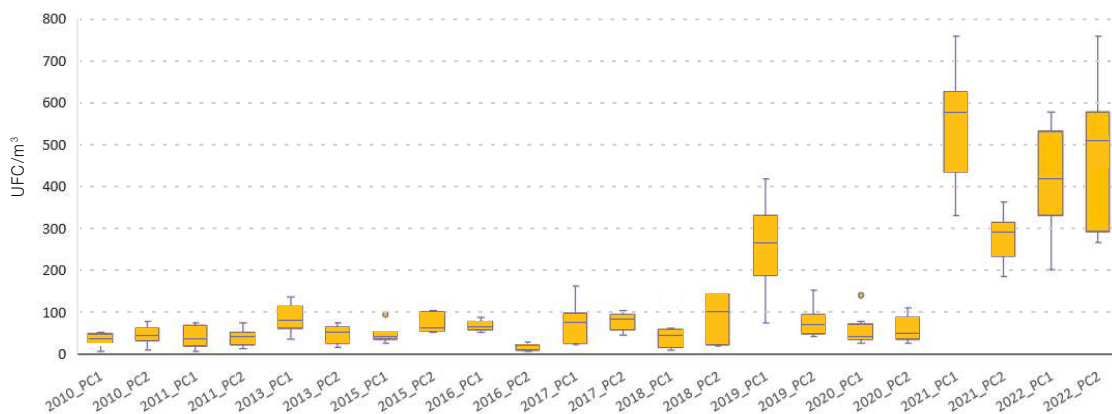


Gráfico 2: ▾ Concentração de fungos no ar (UFC/m³) para os 2 ensaios que decorreram durante a estação fria (outono/inverno), de 2010 a 2022.



artigos breves_ n. 14

A análise dos resultados obtidos pelos participantes, para a estação fria, durante o período de estudo (2010-2022), revelou que as concentrações de bactérias variaram entre 14-1316 UFC/m³, com uma mediana de 190 UFC/m³ e as concentrações de fungos variaram entre 4-924 UFC/m³, com uma mediana de 65 UFC/m³.

Verifica-se uma grande homogeneidade nos resultados das concentrações de bactérias, para concentrações inferiores a 200 UFC/m³. Para valores de concentração superiores verifica-se um aumento na dispersão dos resultados dos participantes, como pode ser verificado pela análise dos resultados

obtidos para os ensaios PC1(2011), PC2 (2021) e PC2 (2022), cujas medianas das contagens de bactérias ficaram acima de 800 UFC/m³ (2011) e das 500 UFC/m³ (2021 e 2022).

Para os fungos verificou-se maior dispersão de resultados nos ensaios PC1 em 2021 e PC1 e PC2 em 2022 com concentrações acima de 400 UFC/m³.

Nos gráficos seguintes são apresentadas as concentrações de bactérias (**gráfico 3**) e de fungos (**gráfico 4**) para a estação quente (primavera/verão) ao longo do período de estudo 2010-2022.

Gráfico 3: ▾ Concentração de bactérias no ar (UFC/m³) durante a estação quente (primavera/verão) de 2010 a 2022.

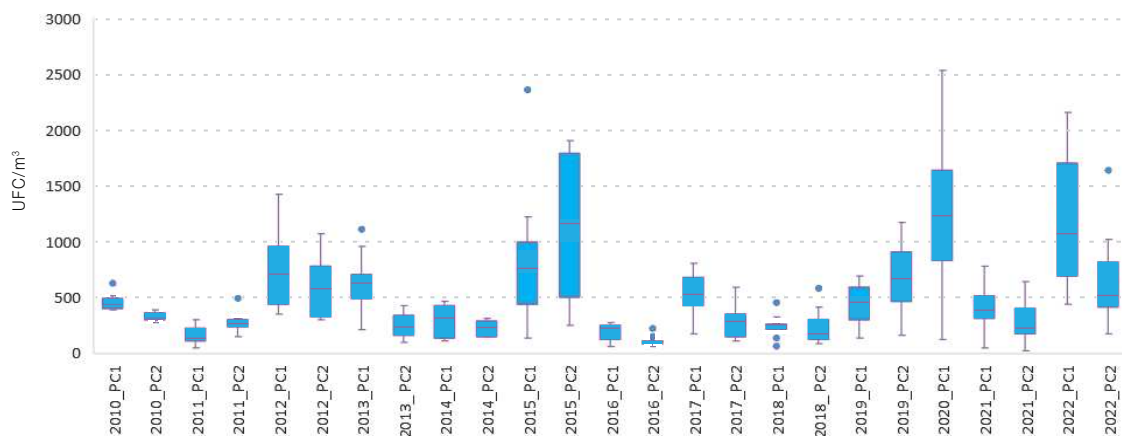
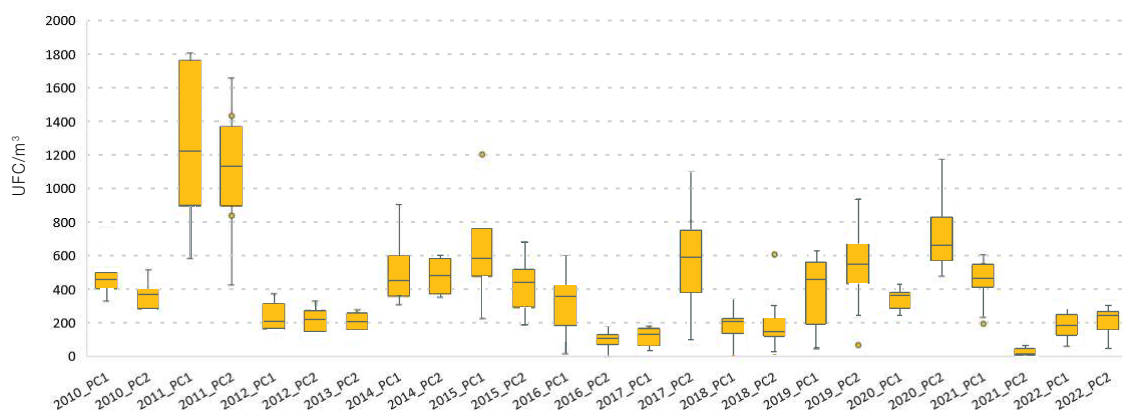


Gráfico 4: ▾ Concentração de fungos no ar (UFC/m³) durante a estação quente (primavera/verão) de 2010 a 2022.



artigos breves_ n. 14

A análise dos resultados obtidos na estação quente (2010-2022) revelou concentrações de bactérias entre 20-2538 UFC/m³, com uma mediana de 373 UFC/m³ e concentrações de fungos variaram entre 0-3496 UFC/m³, com uma mediana de 310 UFC/m³.

Nesta estação, as concentrações de microrganismos cultiváveis são, de um modo geral, mais elevadas.

Por outro lado, verificou-se que os menores coeficientes de variação, de 9,6% no caso das bactérias e de 13,4% para fungos, foram obtidos para concentrações de cerca de 400 UFC/m³ que corresponde a contagens da ordem das 100 UFC/placa, referidas na norma como aquelas em que o erro nas contagens é menor. Estes resultados vão de encontro à recomendação da Norma EN 13098 (2) de ajustar o volume de ar colhido em placas de 90 mm de modo a obter cerca de 100 UFC/placa.

Não foram incluídos neste estudo os resultados das colheitas de fungos relativos aos ensaios de 2012 (ensaio 2), de 2013 (PC1) e 2014 (ensaio 2), devido à contaminação das placas pela espécie *Chrysonilia sitophila* ou obtenção de contagens acima ou abaixo do limite de quantificação.

A análise dos resultados obtidos para a determinação de bactérias no ar, no período em estudo, demonstrou que a percentagem de participantes com desempenho de excelente, bom ou satisfatório foi de 92%, para ambas as estações (quente e fria).

Por outro lado, para determinação de fungos no ar, o desempenho foi excelente, bom ou satisfatório em 92% e 96% dos participantes, para as estações quente e fria, respetivamente.

Os resultados revelam que foi na estação quente que se obtiveram as concentrações mais elevadas tanto para as bactérias como para os fungos, resultados concordantes com outros estudos que sugerem que há variações sazonais na concentração de microrganismos em suspensão no ar e que justificam a existência duas rondas (estação quente e estação fria). Segundo Kumar *et al*, 2021 (3) a concentração

de bactérias e fungos no ar interior foi significativamente maior no verão e no outono comparativamente com outras estações.

A abundância e diversidade dos bioaerossóis também são influenciadas por outros fatores, como ventilação e a atividade humana. Por outro lado, o estudo sistemático de revisão sobre a concentração de esporos de fungos no exterior em países europeus, confirmou que o verão e o outono são reconhecidos como as estações com maior concentração de esporos de fungos (4).

Os gráficos 5 e 6 apresentam os resultados dos ensaios do Programa de Identificação de Fungos em Cultura, ao género e à espécie, respetivamente.

Gráfico 5: Resultados da identificação de fungos ao género (%), entre 2012 e 2022.

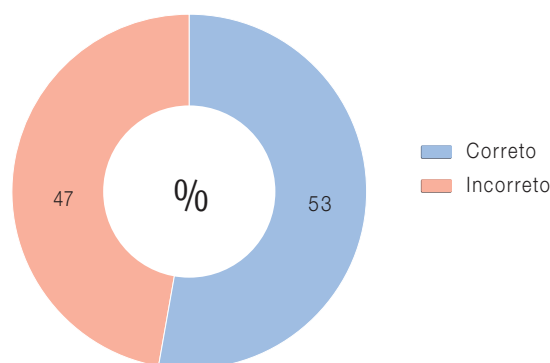
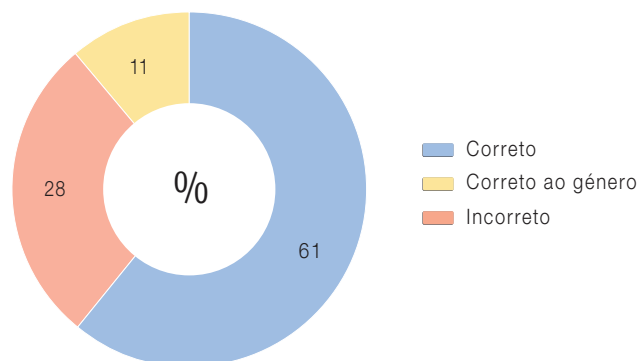


Gráfico 6: Resultados da identificação de fungos à espécie (%), entre 2012 e 2022.



Foram enviadas um total 20 culturas de fungos comuns no ambiente interior/exterior, para identificação ao género ou à espécie, conforme solicitação do programa (2012 a 2022). Identificação para as seguintes espécies: *Epicoccum nigrum*; *Scopulariopsis candida*; *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*); *Syncephalastrum racemosus*; *Penicillium chrisogenum*; *Verticillium tenerum*; *Beauveria bassiana*; *Trichosporom asahii*; *Mucor racemosus*; *Trichotecium roseum*; *Tritirachium ortzae*; *Sporothrix schenki*; *Acremonium strictum*; *Paecilomyces lilacinus*; *Bipolaris rostrata* e para os seguintes géneros: *Eurotium chevalieri*; *Ulocladium botrytis*; *Trichoderma viride*; *Phoma herbarum*.

Quando solicitada a identificação de fungos ao género, verifica-se que a percentagem de resultados corretos foi de 53% (9/17). Quando a identificação foi solicitada à espécie, 61% (22/36) identificaram corretamente, 11% (4/36) apenas identificaram o género e em 28% (10/36) o resultado foi incorreto.

Ao longo dos 12 anos do programa foram identificadas diversas necessidades de formação por parte dos participantes, tendo sido organizadas sessões de formação subordinadas aos temas: Estimativa de Incertezas em Ensaios Microbiológicos (2011); Garantia da Qualidade dos Resultados (2013); Otimização das Condições de Ensaio (2014).

_Conclusão

A análise dos resultados obtidos no período em estudo, demonstrou que a percentagem de participantes com um desempenho de excelente, bom ou satisfatório foi superior a 90% para qualquer dos microrganismos.

O programa Microbiologia do Ar tem permitido, além de comparação os resultados dos seus participantes, uma harmonização de procedimentos, melhorando o controlo de qualidade, a rastreabilidade das medições, facilitando a validação de resultados e todo o processo conducente à acreditação dos ensaios.

Os temas mais debatidos nas ações de formação relativas à Microbiologia do Ar têm sido a calibração de equipamentos, a estimativa de incertezas, os critérios de aceitação de duplicados de colheitas e o controlo das condições dos ensaios de amostragem e laboratoriais.

A identificação correta de fungos em cultura baseia-se em grande medida, no treino dos Técnicos pelo que é muito importante manter este tipo de ensaios para que os Laboratórios tenham oportunidade de proceder à identificação de espécies de fungos, que embora comuns no ambiente, nem sempre se encontram nas amostras naturais.

A participação em programas de avaliação externa da qualidade permite, além do contacto privilegiado com outros profissionais da mesma área de trabalho e do acesso a ações de formação de acordo com as necessidades, a avaliação do desempenho e a implementação de ações corretivas se aplicável.

Referências bibliográficas:

- (1) ISO/IEC 17043:2023. Conformity assessment – General requirements for the competence of proficiency testing providers.
- (2) Norma EN 13098: 2019. Workplace exposure – Measurement of airborne microorganisms and microbial compounds – General requirements.
- (3) Kumar P, Singh AB, Singh R. Seasonal variation and size distribution in the airborne indoor microbial concentration of residential houses in Delhi and its impact on health. *Aerobiologia* (Bologna). 2021;37(4):719-732. <https://doi.org/10.1007/s10453-021-09718-3>
- (4) Anees-Hill S, Douglas P, Pashley CH, et al. A systematic review of outdoor airborne fungal spore seasonality across Europe and the implications for health. *Sci Total Environ*. 2022 Apr 20;818:151716. Epub 2021 Nov 17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151716>

Quedas em pessoas idosas em Portugal: uma abordagem epidemiológica a partir dos dados de 2023 do sistema EVITA

Falls in elderly people in Portugal: epidemiological approach based on 2023 data from the EVITA system

Tatiana Alves, Susana Silva, Paula Braz, Carlos Aniceto, Ricardo Mexia, Carlos Matias Dias

tatiana.alves@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

Em Portugal, as quedas têm sido identificadas como um dos problemas de saúde mais relevantes no envelhecimento da população, com expressão ao nível da morbilidade e mortalidade, causa de sofrimento, porventura evitável. Dada a tendência de envelhecimento da população é expectável que nos próximos anos o número de quedas aumente. Tal cenário implicará uma maior procura dos serviços de urgência por este motivo.

Desenvolveu-se assim, o presente estudo de modo a melhorar o conhecimento das circunstâncias em que este fenómeno ocorre nas pessoas idosas (≥ 65 anos).

No ano de 2023, através do sistema EVITA, foram registados 40 842 episódios de queda com recurso ao serviço de urgência nas pessoas com 65 e mais anos. A proporção de quedas foi aumentando ao longo dos grupos etários, tendo 31,4% do total de quedas ocorrido no grupo dos 85 e mais anos, diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$). Observou-se em todos os grupos etários que as proporções de quedas nas mulheres representaram entre 63,7% e 70% dos episódios. Cerca de 63,9% das quedas ocorreram em casa. A probabilidade de sofrer uma queda em casa, área institucional e recintos públicos foi superior nas pessoas com 85 e mais anos.

Os resultados deste estudo revelam que as quedas nas pessoas idosas tendem a ocorrer mais frequentemente à medida que a idade avança, numa maior proporção nos locais onde permanecem mais tempo.

_Abstract

In Portugal, falls have been identified as one of the most relevant health problems in the aging population, with expression in terms of morbidity and mortality, cause of suffering, perhaps preventable. With the increase in the number of elderly people in the coming years, the number of falls will tend to increase. This scenario will imply a greater demand for emergency departments.

The present study was therefore developed in order to improve knowledge of the circumstances in which this phenomenon occurs in elderly people.

In 2023, through the EVITA system, 40 842 episodes of fall using the emergency departments were recorded. The proportion of falls increased across age groups, with 31.4% of total falls occurred in the group aged 85 and over, these differences were statistically significant ($p < 0.001$). It was observed in all age groups that fall in women represented between 63.7% and 70.0% of episodes. Around 63.9% of fall occurred at home. The probability of fall at home, institutional areas and public spaces was higher in the older group (85+).

The results of this study confirm that falls in elderly people tend to occur more frequently as age advances, with a greater proportion in places where they remain longer.

_Introdução

As quedas representam uma problemática de saúde pública a nível mundial, sendo a segunda causa de morte por acidente, seguida dos acidentes rodoviários (1,2). Apesar de se tratar de um evento comum nas pessoas de todas as idades, associado a este evento tem sido evidenciado o papel da idade (3), pelo que, dado o contexto global do envelhecimento demográfico da população afigura-se de relevo a melhor compreensão das quedas no grupo populacional das pessoas idosas.

Em Portugal, o envelhecimento demográfico da população é uma realidade, mantendo-se essa tendência em resultado não só da redução da população jovem e em idade ativa, mas também do aumento do número de pessoas idosas (4).

Deste modo, estudos indicam que o número de quedas tenderá a aumentar, não só devido ao aumento do número de pessoas idosas nos próximos anos, mas também devido à comorbilidade, à polimedicação e à fragilidade associada ao envelhecimento (5,6). Tal cenário poderá levar a uma maior procura dos serviços de urgência (SU) por este motivo (2).

Em Portugal, dados do sistema EVITA – Epidemiologia e Vigilância dos Traumatismos e Acidentes revelam que as quedas representam mais de 70% dos mecanismos de lesão quando a população idosa recorre ao SU por acidente doméstico e de lazer (7). Dados nacionais relativos às admissões aos SU, em 2023, revelam que cerca de 11% das pessoas com 65 e mais anos procuraram assistência nas urgências hospitalares por queda (8).

Diversos estudos sublinham a importância da prevenção de quedas na população idosa dadas as suas implicações ao nível da disfunção motora, da imobilidade, da perda de autonomia, da confiança (1,3), podendo levar à depressão (6,9), à ansiedade (6,9) e ao isolamento social (5).

A literatura descreve a queda como um fenómeno multifatorial, para a qual concorrem fatores de natureza intrínseca e extrínseca à pessoa idosa, destacando-se a importância do ambiente que rodeia a pessoa idosa. Assim, as características das quedas diferem em função do contexto e local, dando-se destaque aos espaços no interior da habitação, casa ou instituição de residência para pessoas idosas (10,11).

_Objetivo

O presente estudo tem como objetivo descrever as características das quedas na população com 65 e mais anos, que recorreu aos Serviços de Urgências do Serviço Nacional de Saúde, no ano 2023, em Portugal.

_Materiais e métodos

Realizou-se um estudo epidemiológico observacional, descritivo e transversal, com análise dos dados recolhidos através do sistema de monitorização EVITA relativos a episódios de recurso à urgência hospitalar no ano 2023 em pessoas com 65 e mais anos, em Portugal (12).

Foi realizada a análise descritiva (contagens) dos dados por grupo etário, sexo, dia da semana e hora do acidente, local de ocorrência, prioridade atribuída pela triagem de Manchester e destino após a alta. A análise bivariada foi realizada através do teste do Qui-quadrado de Pearson, considerando um nível de significância de 5%. A *odds ratio* (OR) foi calculada para quantificar as associações entre o local de ocorrência da queda e o grupo etário. A análise foi realizada utilizando o programa *R Statistical Computing Environment* (13).

_Resultados

Neste estudo, foram analisados os 40 842 episódios de admissão ao SU por queda ocorridos nos idosos e descritos em EVITA. Observou-se um aumento da proporção de episódios de queda ao longo dos grupos etários, tendo 31,4% do total de quedas ocorrido no grupo dos 85 e mais anos.

Na análise dos episódios de queda por idade e sexo, observou-se que em todos os grupos etários as quedas nas mulheres eram mais frequentes, representando entre 63,7% e 70% dos episódios, sendo estas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) (tabela 1).

O período do dia em que as quedas ocorreram variou, tendo sido no período da manhã e tarde, entre as 09:00h e as 17:00h, que se observou a maioria das quedas (entre 58,7% nos 85 e mais anos e 63,7% nos 75-79 anos). O domingo foi o dia da semana com menor registo de episódios de admissão ao SU por quedas em todos os grupos etários em análise, embora não se encontre associação entre o dia da semana e o grupo etário.

As quedas ocorreram em diferentes locais, destacando-se as quedas em casa (26 120; 63,9%). De referir, o aumento da proporção de quedas em casa ao longo dos grupos etários, entre 58,6% (65-69 anos) e 67,2% (80-84 anos). No grupo etário dos 65-79 anos, depois da casa, os locais ar livre (12,8%) e área de transporte (13,4%) foram aqueles onde as quedas ocorreram em maior proporção. Nos grupos dos 80 e mais anos, a proporção de quedas na categoria “área institucional, recintos públicos e escola” constituiu a segunda localização mais frequente (16,9%). Dentro desta categoria foi nos locais “lar” e “casa de repouso” que aconteceram mais de 90% das quedas.

A triagem de Manchester revelou em todos os grupos etários que na maioria dos episódios de queda a prioridade atribuída foi elevada, classificada como urgente, aumentando desde 61,9% nos 65-69 anos até 69,8% nos 85 e mais anos, associação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) (tabela 1).

artigos breves_ n. 15

Análise respeitante ao destino após a alta, permitiu verificar que a proporção de episódios de queda que resultaram em internamento aumentou com a idade (7,9% - 65-69 anos e 19,9% - 85 e mais anos). Pelo contrário, com o avançar da

idade (50,0% - 65-69 anos e 42,4% - 85 + anos) diminuíram os episódios de queda sem necessidade de referenciação para consulta posterior, quer em contexto de cuidados de saúde primários, quer ao nível hospitalar.

Tabela 1: Distribuição dos episódios de Quedas nas pessoas com 65 e mais anos, por sexo, dia da semana, hora do dia do acidente, local de ocorrência, triagem atribuída e destino após a alta, registados em EVITA, 2023.

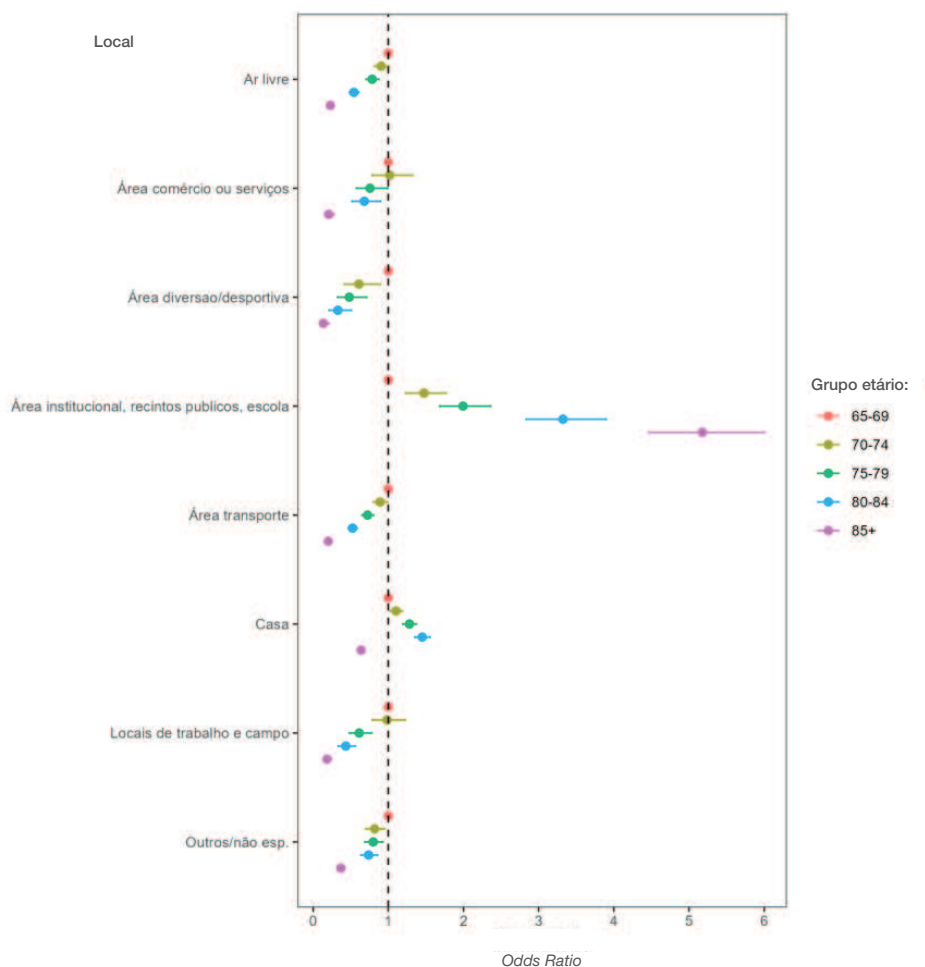
	Grupo Etário										p-value*
	65-69		70-74		75-79		80-84		≥ 85		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Total	5801	14,2	6564	16,1	7565	18,5	8078	19,7	12834	31,4	
Sexo											<0,001
Masculino	2107	36,3	2324	35,4	2498	33,0	2669	33,0	3849	30,0	
Feminino	3694	63,7	4240	64,6	5067	70,0	5409	67,0	8985	70,0	
Dia da semana											0,355
Domingo	792	13,7	865	13,2	1009	13,3	1066	13,2	1691	13,2	
Segunda-feira	802	13,8	917	14,0	1052	13,9	1213	15,0	1898	14,8	
Terça-feira	801	13,8	971	14,8	1086	14,3	1140	14,1	1806	14,1	
Quarta-feira	838	14,4	936	14,3	1109	14,7	1182	14,6	1915	14,9	
Quinta-feira	800	13,8	1001	15,3	1124	14,9	1133	14,0	1845	14,4	
Sexta-feira	878	15,1	941	14,3	1101	14,5	1137	14,1	1800	14,0	
Sábado	885	15,3	928	14,1	1082	14,3	1200	14,9	1869	14,6	
Hora do acidente											<0,001
00:00 - 08:59	733	12,6	869	13,2	1051	13,9	1295	16,0	2480	19,3	
09:00 - 16:59	3579	61,7	4131	62,9	4819	63,7	4966	61,5	7530	58,7	
17:00 - 23:59	1489	25,7	1564	23,8	1695	22,4	1817	22,5	2824	22,0	
Local de ocorrência											<0,001
Casa	3401	58,6	4002	60,9	4878	64,5	5435	67,2	8404	65,5	
Ar livre	744	12,8	772	11,8	783	10,3	596	7,4	578	4,5	
Área transporte	778	13,4	796	12,1	763	10,1	606	7,5	536	4,2	
Área comércio ou serviços	106	1,8	122	1,8	105	1,4	101	1,3	68	0,5	
Área diversão ou desportiva	65	1,1	45	0,7	41	0,5	30	0,4	27	0,2	
Escola, área institucional, recintos públicos	196	3,4	286	4,3	493	6,5	841	10,4	2713	21,1	
Locais de trabalho e campo	150	2,6	167	2,5	121	1,6	92	1,1	86	0,7	
Outros/não especificado	361	6,2	374	5,7	381	5,0	377	4,6	422	3,3	
Triagem atribuída											<0,001
Azul	14	0,2	18	0,3	19	0,2	6	0,1	8	0,1	
Verde	863	14,9	877	13,4	861	11,4	805	10,0	1202	9,4	
Amarelo	3592	61,9	4155	63,3	5004	66,1	5518	68,3	8962	69,8	
Laranja	301	5,2	321	4,9	363	4,8	395	4,9	614	4,8	
Vermelho	6	0,1	5	0,1	4	0,1	10	0,1	9	0,1	
Não especificado/outras	1025	17,7	1188	18,1	1314	17,4	1344	16,6	2036	15,9	
Destino após alta											<0,001
Abandono	196	3,4	174	2,6	177	2,3	136	1,7	94	0,7	
Exterior não referenciado	2902	50,0	3205	48,8	3561	47,1	3720	46,1	5437	42,4	
Referenciado para consulta	2068	35,6	2361	36,0	2694	35,6	2846	35,2	4346	33,9	
Internamento	457	7,9	631	9,6	893	11,8	1149	14,2	2554	19,9	
Transferido outro hospital	139	2,4	148	2,3	188	2,5	172	2,1	256	2,0	
Óbito	3	0,1	3	0,0	3	0,0	12	0,1	29	0,2	
Outro	36	0,3	42	0,6	49	0,6	43	0,5	117	0,9	

Para quantificar as associações entre a ocorrência de queda por local e grupo etário, procedeu-se à estimativa da *odds ratio* (OR).

A análise das quedas por local e grupo etário, considerando o grupo etário dos 65-69 anos como categoria de referência, revelou que a maior probabilidade de ocorrência de quedas em casa verificou-se nos idosos entre os 80-84 anos (OR=1,45). Por outro lado, as quedas em casa, nos idosos com 85 e mais anos, apresentaram um valor da *odds* inferior (OR=0,64) quando comparadas às quedas nos 65-69 anos (figura 1).

A probabilidade de queda em área institucional e recintos públicos foi superior em 5,18 vezes no grupo dos 85 e mais anos, face ao grupo dos 65-69 anos. Nas quedas registadas ao ar livre (OR=0,23), em área de comércio ou serviços (OR=0,21), em área desportiva (OR=0,13), em área de transporte (OR=0,20) e nos locais de trabalho e campo (OR=0,18) os valores da *odds* foram inferiores no grupo dos 85 e mais anos, quando comparados com os do grupo etário dos 65-69 anos (figura 1).

Figura 1: Odd ratio (OR) de Quedas em pessoas idosas por local de ocorrência e grupo etário, registados em EVITA, 2023.



_Discussão

As quedas nas pessoas idosas constituem um problema de saúde pública, dada a frequência da sua ocorrência, utilização dos serviços de saúde e causa importante de procura de cuidados de saúde nas urgências hospitalares.

Neste grupo populacional dos 65 e mais anos, de entre os mecanismos de lesão, a queda tem constituído o mecanismo mais frequente. Neste estudo, observou-se um aumento da proporção de quedas com a idade, à semelhança do verificado em estudos internacionais, que apontam as quedas na população idosa como a principal causa de admissão ao SU por lesão não intencional (5,6,9,14-16). A este respeito a literatura esclarece que apesar de a queda ser um fenómeno multifatorial, a idade tem sido identificada como um dos fatores biológicos mais reportado. Diversos autores salientam o papel da idade associada ao envelhecimento e ao consequente declínio funcional, levando a uma maior fragilidade e predisposição à ocorrência de quedas (3-6,14,15).

À semelhança do observado em outros países, também em Portugal este evento das quedas afetou, em 2023, mais as mulheres do que os homens, no âmbito das quedas em contexto comunitário (14-17). Alguns autores apontam diversas condições biológicas associadas ao sexo feminino, como as musculo-esqueléticas, que concorrem para uma maior predisposição à ocorrência de quedas (11,15).

Relativamente ao momento do acidente, o período no qual as quedas ocorreram variou, tendo a maior proporção de quedas ocorrido nos últimos dias da semana e no período diurno, parecendo estar associado às atividades desenvolvidas pelos idosos. Este resultado nacional está alinhado com o observado em outros estudos (2,11,14,15). No entanto, um estudo realizado na Turquia não encontrou diferenças quanto ao período do dia em que ocorreu o acidente (9).

As pessoas idosas vítimas de queda que necessitaram de internamento hospitalar tenderam a ser mais velhas, tal como evidenciado em outros estudos, referindo que à idade estavam associadas situações de saúde mais graves e maior

tempo de internamento (10,18,19). Estes autores defendem a necessidade de se conhecer o impacto desta problemática nos serviços de saúde, dada a necessidade de planeamento dos cuidados, ao nível da prevenção secundária e terciária, num contexto de envelhecimento populacional.

As circunstâncias em que as quedas nas pessoas idosas ocorrem têm vindo a ser cada vez mais estudadas, sendo notório em vários estudos o predomínio deste acontecimento ocorrer em casa e em áreas de institucionalização para pessoas idosas, à semelhança do que observamos no presente estudo. Nos outros locais analisados, fora de casa ou residência, a idade parece ser protetora, provavelmente pela menor mobilidade e frequência das pessoas idosas nesses locais, estando assim, menos expostas ao risco.

Estes autores destacam ainda a relevância de serem identificados e eliminados os riscos, através de medidas de prevenção das quedas devidas à exposição a perigos existentes nesses locais (10,11,15,17).

É de referir que este estudo, focado nas quedas em pessoas idosas que procuraram os SU dos hospitais do SNS, poderá induzir a uma sub-representação desta problemática, dado que desconhecemos as quedas que, tendo ocorrido, foram percecionados como de menor gravidade, não conduzindo à procura de cuidados de saúde, e, ou, tendo ocorrido, foram assistidas noutros serviços de saúde.

_Conclusões

Em 2023, em Portugal, observou-se um aumento da proporção de quedas ao longo dos grupos etários. A probabilidade de queda em casa, área institucional e recintos públicos foi maior no grupo dos mais velhos (85+).

Considera-se a necessidade de continuar a aprofundar o conhecimento, como tem sido evidenciado na literatura, sobre os fatores associados à ocorrência de quedas em pessoas idosas, sobretudo no contexto do atual envelhecimento da população e das projeções respeitantes à demografia em Portugal.

É oportuno o estudo continuado desta temática para a realidade nacional, na medida em que se afigura útil para o desenho de programas de prevenção de quedas e na preparação da resposta nos diferentes níveis de cuidados.

- (17) Boyé ND, Mattace-Raso FU, Van der Velde N, et al.; IMPROVeFALL trial collaborators. Circumstances leading to injurious falls in older men and women in the Netherlands. *Injury*. 2014 Aug;45(8):1224-30. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2014.03.021>
- (18) Scuffham P, Chaplin S, Legood R. Incidence and costs of unintentional falls in older people in the United Kingdom. *J Epidemiol Community Health*. 2003 Sep;57(9):740-4. <https://doi.org/10.1136/jech.57.9.740>
- (19) Reider L, Falvey JR, Okoye SM, et al. Cost of U.S emergency department and inpatient visits for fall injuries in older adults. *Injury*. 2024 Feb;55(2):111199. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2023.111199>. Epub 2023 Nov 14.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Fact sheets- Falls (16 abril 2021) [online]. [consult. 16/4/2024]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/falls>
- (2) Cox S, Roggenkamp R, Bernard S, et al. The epidemiology of elderly falls attended by emergency medical services in Victoria, Australia. *Injury*. 2018 Sep;49(9):1712-19. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2018.06.038>
- (3) Ganz DA, Latham NK. Prevention of Falls in Community-Dwelling Older Adults. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20;382(8):734-43. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1903252>
- (4) Instituto Nacional de Estatística. As Pessoas: 2022. Lisboa: INE, 2024. <https://www.ine.pt/xurl/pub/71883720>
- (5) Montero-Odasso MM, Kamkar N, Pieruccini-Faria F, et al.; Task Force on Global Guidelines for Falls in Older Adults. Evaluation of Clinical Practice Guidelines on Fall Prevention and Management for Older Adults: A Systematic Review. *JAMA Netw Open*. 2021 Dec 1;4(12):e2138911. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2021.38911>
- (6) National Institute for Health and Care Excellence. Surveillance of falls in older people: assessing risk and prevention (NICE Guideline CG161). London: NICE, 2019. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551819/pdf/Bookshelf_NBK551819.pdf
- (7) Alves T, Rodrigues E, Neto M, et al. Acidentes domésticos e de lazer ocorridos em pessoas com 65 e mais anos durante a pandemia da COVID-19: comparação entre 2019 e 2020. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2021;10(30):62-66. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7768>
- (8) Serviços Partilhados do Ministério da Saúde. Dashboard BI-Hospitalar [online]. [consult. 8/3/2024]. <https://bi-hospitalar.spms.min-saude.pt/>
- (9) Lewis SR, Griffin XL. Preventing falls in older people: the evidence for environmental interventions and why history matters. *Cochrane Database Syst Rev*. 2023 Mar 10;3(3):ED000162. <https://doi.org/10.1002/14651858.ed000162>
- (10) Akyol AD. Falls in the elderly: what can be done? *Int Nurs Rev*. 2007 Jun;54(2):191-6. <https://doi.org/10.1111/j.1466-7657.2007.00505.x>
- (11) Almeida A. Funcionalidade e vulnerabilidade em pessoas idosas: implicações para os cuidados de enfermagem. Tese de doutoramento em Enfermagem, Universidade Católica Portuguesa, 2017. <http://hdl.handle.net/10400.14/24191>
- (12) Alves T, Silva S, Braz P, et al. EVITA - Epidemiologia e Vigilância dos Traumatismo e Acidentes: relatório 2021. Lisboa: INSA, 2022.
- (13) R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2022. <https://www.R-project.org/>
- (14) O' Keeffe A, O' Grady S, Cronin F, Dolan C, O' Hea A, O' Shea KL, Naughton C. Evaluation of an emergency department falls pathway for older people: A patient chart review. *Int Emerg Nurs*. 2020 Jul;51:100869. <https://doi.org/10.1016/j.ienj.2020.100869>
- (15) Rubenstein LZ. Falls in older people: epidemiology, risk factors and strategies for prevention. *Age Ageing*. 2006 Sep;35 Suppl 2:ii37-ii41. <https://doi.org/10.1093/ageing/af1084>
- (16) Tripathy NK, Jagnoor J, Patro BK, et al. Epidemiology of falls among older adults: A cross sectional study from Chandigarh, India. *Injury*. 2015 Sep;46(9):1801-5. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2015.04.037>

ficha técnica

_ Título: Boletim Epidemiológico Observações

_ Periodicidade: Quadrimestral

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

_ Numeração: 2ª série

Volume 13, número 35

janeiro - maio 2024

_ 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

João Paulo **Gomes**, 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 2024.

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

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