

# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES**

### **INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DO VÍRUS MONKEYPOX E AVALIAÇÃO DAS MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA NOS LABORATÓRIOS EM PORTUGAL**

Trabalho submetido por  
**Rafaela Maria da Costa Godinho Dias Francisco**  
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em  
Ciências Forenses

**novembro de 2025**



# **INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

## **MESTRADO EM TECNOLOGIAS LABORATORIAIS EM CIÊNCIAS FORENSES**

### **INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DO VÍRUS MONKEYPOX E AVALIAÇÃO DAS MEDIDAS DE BIOSSEGURANÇA NOS LABORATORIOS EM PORTUGAL**

Trabalho submetido por  
**Rafaela Maria Da Costa Godinho Dias Francisco**  
para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologias Laboratoriais em  
Ciências Forenses

Trabalho orientado por  
**Dra. Rita Rego Jesus Cordeiro**

e coorientado por  
**Prof. Doutora Helena de Sousa Barroso**

**novembro de 2025**



## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, por me ter acolhido e por me ter proporcionado um trabalho com o qual me identifico tanto, assim como à Egas Moniz School of Health and Science pela colaboração e auxílio durante todo o projeto.

Em especial, gostaria de agradecer à minha orientadora, Dra. Rita Cordeiro, por toda a ajuda e dedicação e pelos conhecimentos transmitidos ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço também à Prof. Doutora Helena Barroso, pela orientação e por se ter disponibilizado durante todo o trabalho.

Agradeço à Dra. Ana Pelerito pela sua disponibilidade e por me ter dado a oportunidade de a auxiliar noutras tarefas.

Quero agradecer também a todos os colegas que conheci durante o estágio pois fizeram com que a realização deste trabalho se tornasse ainda melhor.

Tenho a agradecer à minha madrinha, por toda a ajuda e por ser o meu ídolo a seguir na vida académica.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família e namorado Pedro por todo o apoio prestado e pela oportunidade de poder realizar este trabalho, principalmente à minha mãe que sempre me apoia e nunca me deixou cair mesmo nos momentos mais complicados.

Um grande beijo e muito, muito obrigada por tudo.



## Declaração de Honra

Código | IMP-EM-EI-1111\_01

Declaro, por minha honra, que o presente trabalho académico é original e foi elaborado por mim próprio (a), não se tendo recorrido a quaisquer outras fontes, para além das indicadas, usadas, adotadas literalmente ou adaptados a partir dos seus originais (em fontes impressas, não impressas ou na internet) e encontram-se adequados, identificados e citados, com observância das convenções do trabalho académico em vigor.

Mais declaro que esta Dissertação (Investigação laboratorial do vírus monkeypox e avaliação das medidas de biossegurança nos laboratórios em Portugal) não foi apresentada, para efeitos de avaliação, a qualquer outra entidade ou instituição, para além da(s) diretamente envolvida(s) na sua elaboração, e que os conteúdos das versões impressa e eletrónica são inteiramente coincidentes.

Declaro, igualmente, encontrar-me ciente de que a inclusão, neste texto, de qualquer falsa declaração terá consequências legais.

Data: 21/11/2025



## Declaração Conflito de Interesses (DCI)

Código | IMP-EM-EI-110\_01

Eu Rafaela Maria Da Costa Godinho Dias Francisco, referente a Dissertação (Investigação laboratorial do vírus monkeypox e avaliação das medidas de biossegurança nos laboratórios em Portugal) declaro que não possuo conflitos de interesse de ordem pessoal, comercial, académica, político ou financeiro.

\*caso exista conflito de interesse deve o autor sob compromisso de honra, declarar existir conflito (s) de interesse na sua participação do referido trabalho.

Data: 21/11/2025



## Declaração de Financiamento

Código | IMP-EM-EI-113\_01

Eu Rafaela Maria da Costa Godinho Dias Francisco, referente a Dissertação Investigação laboratorial do vírus monkeypox e avaliação das medidas de biossegurança nos laboratórios em Portugal, declaro que o meu trabalho não se encontra financiado.

Data: 21/11/2025



## Resumo

O vírus monkeypox (MPXV), pertencente ao género *Orthopoxvirus* (OPXV), emergiu como um agente patogénico de relevância crescente devido à sua capacidade de transmissão sustentada fora das regiões endémicas e ao declínio da imunidade populacional após a interrupção da vacinação contra a varíola. Na sequência do surto multinacional de 2022 e da continuidade de novas cadeias de transmissão nos anos seguintes, tornou-se essencial reforçar a investigação virológica, epidemiológica e serológica, bem como avaliar de forma sistemática as condições de biossegurança e bioproteção nos laboratórios de referência.

Este trabalho teve como objetivos: analisar os aspetos epidemiológicos, virológicos e genómicos dos casos suspeitos e confirmados durante o terceiro surto de mpox registado em Portugal; avaliar o potencial de diagnóstico clínico incorreto com varicela durante o primeiro surto; determinar a resposta serológica IgG anti-OPXV em indivíduos com e sem confirmação laboratorial de mpox; e caracterizar as práticas de biossegurança e bioproteção em laboratórios portugueses, incluindo laboratórios BSL-3.

Os resultados revelaram a circulação de múltiplas sublinhagens do clade IIb, demonstrando que o surto resultou de várias introduções independentes. Verificou-se um predomínio de casos em homens adultos jovens e maior positividade em exsudados de lesão. A investigação do diagnóstico diferencial mostrou que uma proporção significativa das amostras inicialmente suspeitas correspondia a infeções por VZV. A análise serológica evidenciou variação dos títulos de IgG entre grupos etários e clínicos, destacando a influência da imunidade prévia à varíola nos indivíduos mais velhos. A avaliação da biossegurança e bioproteção identificou níveis heterogéneos de maturidade e áreas prioritárias de melhoria, especialmente nos sistemas de gestão e nas práticas de resposta a emergências.

Globalmente, este estudo contribui para o reforço da vigilância laboratorial e epidemiológica da mpox em Portugal, fornecendo evidência científica crucial para a preparação e resposta a futuras emergências biológicas. Os resultados sublinham ainda a importância estratégica da biossegurança e bioproteção na manipulação de agentes emergentes e na mitigação dos riscos associados.

**Palavras-chave:** vírus monkeypox; *Orthopoxvirus*; vigilância genómica; diagnóstico diferencial; anticorpos IgG; biossegurança; bioproteção; laboratórios BSL-3.



## Abstract

The monkeypox virus (MPXV), a member of the genus *Orthopoxvirus* (OPXV), has emerged as a pathogen of increasing global significance due to its ability to sustain transmission outside endemic regions and the progressive decline in population immunity following the cessation of smallpox vaccination. Following the multinational outbreak in 2022, and with new transmission chains persisting in subsequent years, it became essential to strengthen virological, epidemiological and serological investigations, as well as to systematically evaluate biosafety and biosecurity capacities in reference laboratories.

This study aimed to: analyse the epidemiological, virological and genomic characteristics of suspected and confirmed cases during the third mpox outbreak recorded in Portugal; assess the potential for clinical misdiagnosis with varicella during the first outbreak; determine the IgG anti-OPXV serological response in individuals with and without laboratory confirmation of mpox; and evaluate biosafety and biosecurity practices in Portuguese laboratories, including BSL-3 facilities.

The results revealed the circulation of multiple sublineages within clade IIb, indicating that the outbreak was driven by several independent introductions. A predominance of cases in young adult men was observed, along with higher molecular positivity in lesion swabs. Differential diagnosis analysis showed that a substantial proportion of cases initially suspected to be mpox corresponded to VZV infections. Serological assessment demonstrated variation in IgG titres across age groups and clinical categories, with higher responses in older individuals, consistent with immunity derived from historic smallpox vaccination. The evaluation of biosafety and biosecurity practices revealed heterogeneous levels of maturity and highlighted priority areas for improvement, particularly in management systems and emergency preparedness.

Overall, this study strengthens laboratory and epidemiological surveillance of mpox in Portugal and provides essential scientific evidence to support preparedness and response to future biological emergencies. The findings also underscore the strategic importance of biosafety and biosecurity in handling emerging pathogens and mitigating associated risks.

**Keywords:** monkeypox virus; *Orthopoxvirus*; genomic surveillance; differential diagnosis; IgG antibodies; biosafety; biosecurity; BSL-3 laboratories.



## Índice

<b>Capítulo I: Introdução</b> .....	13
1. <b><i>Orthopoxvirus</i>: enquadramento e importância histórica</b> .....	13
2. <b>Vírus monkeypox</b> .....	14
2.1 <b>Características morfológicas e fisiológicas do MPXV</b> .....	16
2.2 <b>Diversidade genética do MPXV</b> .....	18
2.3 <b>Resposta imunitária do hospedeiro à infeção mpox</b> .....	20
2.4 <b>Transmissão do MPXV</b> .....	21
2.5 <b>Manifestações clínicas da mpox</b> .....	23
2.6 <b>Situação epidemiológica atual nacional e internacional</b> .....	24
2.7 <b>Diagnóstico laboratorial da mpox</b> .....	28
2.8 <b>Diagnóstico diferencial</b> .....	32
2.9 <b>Prevenção e tratamento da mpox</b> .....	35
3. <b>Biossegurança e bioproteção nos laboratórios em Portugal</b> .....	36
4. <b>Objetivos</b> .....	37
<b>Capítulo II: Materiais e Métodos</b> .....	39
1. <b>Análise epidemiológica e caracterização genética do MPXV em amostras biológicas dos casos suspeitos e confirmados de mpox durante o terceiro surto em Portugal</b> .....	39
1.1 <b>Amostras biológicas dos casos suspeitos e confirmados</b> .....	39
1.2 <b>Extração de DNA viral</b> .....	39
1.3 <b>Deteção de OPXV e MPXV por PCR em Tempo Real</b> .....	39
1.4 <b>Genotipagem do MPXV</b> .....	41
2. <b>Investigação do potencial de diagnóstico clínico incorreto de mpox no diagnóstico diferencial com varicela</b> .....	44
3. <b>Determinação dos títulos de anticorpos IgG anti- OPXV utilizando a técnica ELISA</b> .....	45
4. <b>Caracterização das medidas de biossegurança e bioproteção implementadas nos laboratórios em Portugal</b> .....	46
4.1 <b>Avaliação da cultura de biossegurança, bioproteção e conduta responsável</b> .....	46
4.2 <b>Avaliação da implementação dos sistemas de gestão de risco biológico nos laboratórios BSL-3 de Portugal</b> .....	47
<b>Capítulo III: Resultados</b> .....	49
1. <b>Análise epidemiológica e caracterização genética do MPXV em amostras biológicas dos casos suspeitos e confirmados de mpox durante o terceiro surto em Portugal</b> .....	49
2. <b>Investigação do potencial de diagnóstico clínico incorreto de mpox no diagnóstico diferencial com varicela</b> .....	55

<b>3. Determinação dos títulos de anticorpos IgG anti- OPXV utilizando a técnica ELISA .....</b>	<b>57</b>
<b>4. Caracterização das medidas de biossegurança e bioproteção implementadas nos laboratórios em Portugal .....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo IV: Discussão e Conclusão .....</b>	<b>87</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>95</b>

## **Índice de figuras**

Figura 1. Cronologia da infeção do MPXV (adaptado de Papukashvili et al., 2022). ...	15
Figura 2. Estrutura celular do MPXV (adaptado de Papukashvili et al., 2022). .....	16
Figura 3. Ciclo de infeção do MPXV (Manju et al., 2022). .....	18
Figura 4. Árvore filogenética das sequências de 979 genomas de MPXV, disponíveis na plataforma Nextstrain (atualizada a 16/11/2025). .....	19
Figura 5. Transmissão do vírus monkeypox (Adaptado de Niu et al., 2023). .....	22
Figura 6. Manifestações clínicas da mpox (Adaptado de Papukashvili, et al., 2022). ...	23
Figura 7. Evolução das lesões cutâneas causadas pelo MPXV (Adaptado de Medical University of South Carolina. (s.d.)). .....	23
Figura 8. Casos confirmados do MPXV no mundo desde setembro de 2024 a setembro de 2025 (Adaptado de (World Health Organization, 2025e)). .....	25
Figura 9. Transmissão global do clade Ib do MPXV, com dados de outubro de 2025 (Adaptado de World Health Organization, 2025f)). .....	27
Figura 10. A) Casos confirmados do MPXV em África, nos últimos 12 meses; B) Clades do MPXV detetados em África, desde 1 de janeiro de 2022 até 02 de novembro de 2025. (Adaptado de World Health Organization, 2025c) .....	28
Figura 11. Cronologia da mpox e testes utilizados no diagnóstico (adaptado de Zhou & Chen., 2023). .....	31
Figura 12. Algoritmo para o diagnóstico laboratorial de mpox para a gestão clínica e vigilância da doença (adaptado World Health Organization, 2024a). .....	32
Figura 13. Diferenças da localização das lesões cutâneas causadas pelas doenças varicela, varíola e mpox (Adaptado de Rasizadeh et al., 2023). .....	33
Figura 14. Representação gráfica da localização dos laboratórios BSL-3 em Portugal, pertencentes à Lab-PTBioNet. ....	37
Figura 15. Escala cromática utilizada para representar graficamente os níveis de maturidade da cultura de biossegurança, bioproteção e conduta responsável. ....	47
Figura 16. Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real para um caso positivo de OPXV (Ct=20), controlo positivo (Ct=26) e controlo interno RNase P do caso positivo (Ct=31), leitura realizada no canal FAM. No controlo negativo não se obteve curva de amplificação. ....	49
Figura 17. Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real para um caso positivo de MPXV (Ct=18) e controlo positivo (Ct=25), leitura realizada no canal ROX. No controlo negativo não se obteve curva de amplificação. ....	49

Figura 18. Distribuição temporal do número de amostras biológicas analisadas e de casos suspeitos no INSA, durante o terceiro surto de MPXV. A linha a vermelho indica os casos confirmados. ....	51
Figura 19. Taxa de positividade nos diferentes tipos de amostras dos 42 casos positivos, do terceiro surto de mpox. ....	51
Figura 20. Carga viral de MPXV nas amostras positivas, expressa em valores de Ct. ..	52
Figura 21. Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real para a diferenciação dos clades de MPXV. O canal VIC (a verde) apresenta amplificação correspondente a um caso positivo para o clade II (Ct=19) e para o controlo positivo (Ct=20). No canal FAM, observou-se amplificação apenas do controlo positivo (Ct=31), enquanto o controlo negativo permaneceu sem amplificação. ....	53
Figura 22. Curva de amplificação obtida por PCR em tempo real para o controlo positivo (Ct=31), leitura realizada no canal FAM. No controlo negativo não se obteve curva de amplificação.....	53
Figura 23. Sublinhagens do MPXV identificadas durante o terceiro surto do MPXV, desde junho de 2024 a junho de 2025.....	54
Figura 24. Árvore filogenética temporal construída no Nextstrain, incluindo as sequências de MPXV (n=27) obtidas em Portugal durante o período de estudo (junho de 2024 e junho de 2025). A árvore está enraizada nas duas referências utilizadas na construção do Nextstrain (MK783030 e MK783032). ....	55
Figura 25. Distribuição mensal dos resultados de PCR para deteção de VZV, nas amostras analisadas em 2022. A linha preta representa o número total de amostras testadas por mês. ....	57
Figura 26. Distribuição dos títulos de anticorpos IgG anti-MPXV (ng/mL) nos três grupos estudados: população controlo (cinzento), casos MPXV PCR positivos (vermelho) e casos MPXV PCR negativos (verde). A linha tracejada representa o valor de cut-off (6,6 ng/mL) determinado a partir da população controlo. ....	58
Figura 27. Concentrações de anticorpos IgG nos doentes com título positivo (n=207) e negativo (n=318). A linha central representa a mediana; os limites da caixa correspondem ao intervalo interquartil (IQR) e as extensões indicam os valores mínimo e máximo...	59
Figura 28. Percentagem de casos positivos detetados por PCR (65,9%; n=346) e por ELISA IgG (39,4%; n=207) entre as amostras analisadas. ....	61
Figura 29. Concentrações de anticorpos IgG nos doentes com título positivo distribuídas por grupo etário: 10-19 (n=1), 20-29 (n=62), 30-39 (n=85), 40-49 (n=45), 50-59 (n=10)	

e 60+ (n=4). A linha central representa a mediana; os limites da caixa correspondem ao intervalo interquartil (IQR) e as extensões indicam os valores mínimo e máximo.....	62
Figura 30. Relação entre as concentrações dos títulos de anticorpos IgG e o tempo decorrido desde o início dos sintomas. Cada ponto representa a concentração de IgG em doentes MPXV positivos (vermelho) ou negativos (verde) por PCR. ....	63
Figura 31. Resultados gerais obtidos nos quatro domínios analisados.....	66
Figura 32. Distribuição das respostas por grupo profissional no domínio “Sistemas de gestão”.....	67
Figura 33. Distribuição das respostas por grupo profissional no domínio “Comportamento de liderança e do pessoal. ....	68
Figura 34. Distribuição das respostas por grupo profissional no domínio “Princípios para orientar decisões e comportamentos”.....	69
Figura 35. Distribuição das respostas por grupo profissional no domínio “Crenças, opiniões e atitudes”.....	70
Figura 36. Resultados obtidos relativos às secções analisadas: desenho do laboratório e infraestruturas; câmaras de segurança biológica; barreira de contenção: aquecimento, ventilação e ar condicionado; integridade do laboratório; perímetro de contenção e funcionamento de chuveiros de descontaminação e serviços de laboratório. ....	75
Figura 37. Resultados obtidos relativos às secções analisadas: planos e resposta a emergências; manutenção preventiva, calibração e certificação; comissionamento e descomissionamento; equipamento de proteção individual e recrutamento, competência e formação de pessoal.....	80
Figura 38. Resultados obtidos relativos às secções analisadas: Procedimentos operacionais e práticas especiais: A) Boas práticas microbiológicas e laboratoriais; Procedimentos operacionais e práticas especiais: B) Manuseamento de material infeccioso; Procedimentos operacionais e práticas especiais: C) Manuseamento de objetos cortantes; Procedimentos operacionais e práticas especiais: D) Cilindros de gás comprimido; Bioproteção e documentação necessária. ....	83

## Índice de tabelas

Tabela 1. Visão geral dos testes de diagnóstico de mpox, incluindo o estado da doença e as amostras recomendadas a colher. ....	29
Tabela 2. Características das infeções mpox, varíola e varicela. (Adaptado de Antunes et al., 2022). ....	34
Tabela 3. <i>Primers</i> e sondas utilizados na reação de amplificação de OPXV, MPXV e genoma humano. (Nitsche et al., 2004; Shchelkunov et al. 2011, Kurth et al., 2007). ..	40
Tabela 4 <i>Primers</i> e sondas utilizados nas reações de amplificação dos clades I, II e Ib do MPXV (Schuele et al., 2024). ....	42
Tabela 5. Dados demográficos dos casos positivos referentes ao terceiro surto de MPXV. ....	50
Tabela 6. Distribuição de sublinhagens de MPXV identificadas em Portugal, entre junho de 2024 e junho de 2025. ....	54
Tabela 7. Dados demográficos dos casos positivos de VZV, durante o primeiro surto de MPXV em Portugal .....	56
Tabela 8. Distribuição mensal do número de amostras analisadas e dos resultados de PCR de VZV, em 2022. ....	57
Tabela 9. Dados demográficos dos casos com título positivo de anticorpos IgG. ....	60
Tabela 10. Dados demográficos dos participantes que responderam ao questionário “ <i>Culture of Biosafety, Biosecurity and Responsible Conduct in the Life Sciences</i> ” .....	64
Tabela 11. Dados demográficos dos participantes que responderam ao questionário da avaliação da implementação dos sistemas de gestão de risco biológico nos laboratórios BSL-3. ....	71
Tabela 12. Síntese dos resultados obtidos da avaliação da implementação de gestão de risco biológico nos laboratórios BSL-3 em Portugal. ....	84

**Lista de Abreviaturas:**

CSB: Câmaras de segurança biológica

CDC: *Centers for Diseases Control and Prevention*

Ct: *Cycle threshold*

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*

DO: Densidade ótica

ECDC: *European Centers for Diseases Control and Prevention*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic Acid*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPI: Equipamento de proteção individual

EUA: Estados Unidos da América

GAT: Grupo de Ativistas em Tratamento

HIV: *Human Immunodeficiency Virus*

HSH: Homens que têm sexo com homens

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

INSA: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

MPXV: Vírus monkeypox

NAAT: *Nucleic Acid Amplification Test*

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPXV: *Orthopoxvirus*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PHEIC: *Public Health Emergency of International Concern*

RDC: República Democrática do Congo

UREB: Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação

VZV: Vírus varicella-zoster

WGS: Sequência do genoma completo



## Capítulo I: Introdução

### 1. *Orthopoxvirus*: enquadramento e importância histórica

O género *Orthopoxvirus* (OPXV) pertence à família *Poxviridae* e engloba vírus de DNA de cadeia dupla com relevância histórica devido ao seu impacto na saúde humana e animal. Entre estes, destaca-se o vírus da varíola, responsável por uma das doenças mais devastadoras da história. O género OPXV inclui também outros vírus capazes de infetar o Homem, como o vírus *cowpox*, o vírus *vaccinia* e o vírus *monkeypox* (MPXV) (Antunes et al., 2022; Breman et al., 2002; Christoph et al., 2010).

Os OPXV caracterizam-se por infetarem uma ampla gama de hospedeiros e pela capacidade de persistir em reservatórios animais, o que favorece a ocorrência de infeções zoonóticas ocasionais. Embora muitas destas infeções sejam autolimitadas, a sua emergência reforça a necessidade de compreender a diversidade genética, os mecanismos de adaptação e o potencial de transmissão entre espécies, aspetos essenciais para avaliar o risco de disseminação e o impacto na saúde pública (Antunes et al., 2022).

As zoonoses, doenças transmissíveis entre animais e humanos, representam uma proporção substancial das infeções emergentes identificadas nas últimas décadas. A história dos OPXV demonstra a sua capacidade de cruzar barreiras de espécie e de adaptar-se a novos hospedeiros, constituindo um exemplo paradigmático de ameaça infecciosa de origem animal décadas (World Health Organization, 2020b).

O último caso de varíola endémica foi registado na Somália, em 1977, e a doença foi declarada erradicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1980. Desde então, o vírus da varíola permanece apenas em dois laboratórios autorizados: um nos Estados Unidos da América (EUA) e outro na Rússia, sob supervisão internacional (Berman et al., 2022; World Health Organization, 2023). A erradicação da varíola representa um marco sem precedentes em saúde pública; contudo, a cessação da vacinação de rotina reduziu significativamente a imunidade cruzada contra outros OPXV, aumentando a suscetibilidade da população (Lu et al., 2023).

Uma eventual libertação accidental ou deliberada do vírus da varíola constituiria um risco biológico de elevada gravidade, uma vez que grande parte da população mundial se encontra atualmente não imunizada. O vírus da varíola é classificado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) como um agente de bioterrorismo de categoria A, a categoria de maior risco para a saúde pública, devido à sua elevada transmissibilidade, virulência e potencial para causar epidemias de grande escala (Center

for Disease Control and Prevention, 2006). O bioterrorismo envolve a utilização deliberada de agentes biológicos com o objetivo de causar pânico, provocar vítimas ou gerar instabilidade económica (Rathjen et al., 2021). Os agentes biológicos são divididos em três categorias (A, B e C), de acordo com o respetivo nível risco (Center for Disease Control and Prevention, 2006).

Nas últimas décadas, a emergência de novas infeções por OPXV, incluindo o aumento de casos de vírus cowpox em países europeus, surtos de vírus vaccinia na América do Sul e o crescimento alarmante de casos de mpox em África e em regiões não endémicas, tem suscitado uma crescente preocupação quanto ao seu potencial pandémico e à necessidade de reforçar a vigilância laboratorial e epidemiológica (Berman et al., 2002; Campe et al., 2009; Luciani et al., 2022; Silva et al., 2010).

Perante este contexto, é essencial manter laboratórios de referência com capacidade para apoiar a vigilância, detetar precocemente surtos e implementar medidas de contingência e resposta a emergências, assegurando uma preparação adequada face a potenciais emergências de origem biológica (Berman et al., 2002; World Health Organization, 2023).

## **2. Vírus monkeypox**

O MPXV foi identificado pela primeira vez em 1958, durante um surto numa instalação animal em Copenhaga, na Dinamarca (Figura 1). O surto afetou macacos *Macaca fascicularis*, provenientes de Singapura, que apresentavam lesões cutâneas características no tronco, membros e face. Na década seguinte, entre 1960 e 1968, registaram-se vários surtos semelhantes em macacos mantidos em cativeiro nos EUA e nos Países Baixos, incluindo colónias na Filadélfia e em Roterdão. Apesar da elevada mortalidade observada nos animais infetados, não foram registados casos humanos, sugerindo inicialmente que o vírus não apresentava potencial zoonótico (Gessain et al., 2022; Huang et al., 2022).

O primeiro caso humano foi reportado em 1970, na República Democrática do Congo (RDC), no âmbito do programa de vigilância e erradicação da varíola. O caso envolveu um menino de nove meses que apresentou febre, adenopatia e lesões cutâneas características, tendo sido confirmado o diagnóstico de mpox laboratorialmente (Ladnyj et al., 1972; Gessain et al., 2022). Entre setembro de 1970 e março de 1971, foram notificados mais seis casos humanos em países da África Central e Ocidental, maioritariamente em crianças não vacinadas contra a varíola (Gessain et al., 2022).

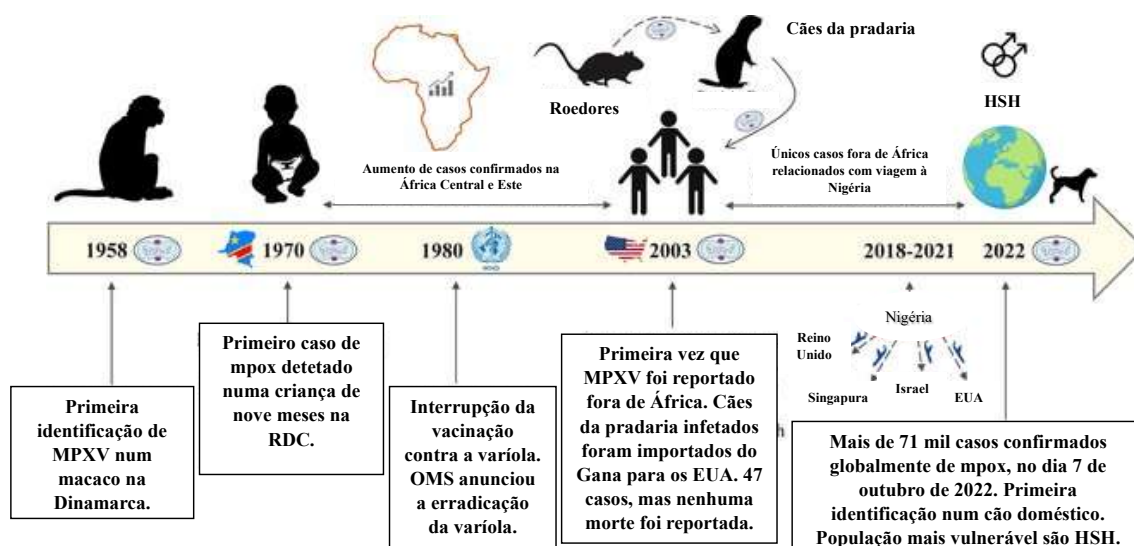


Figura 1. Cronologia da infecção do MPXV (adaptado de Papukashvili et al., 2022).

Em 2003, verificou-se o primeiro surto documentado fora do continente africano, nos EUA, associado a cães da pradaria infectados após contactado com roedores importados do Gana, resultando em cerca de 40 infeções humanas. Mais tarde, entre 2018 e 2019, foram reportados casos importados no Reino Unido, Israel e Singapura, ligados a um grande surto que decorria na Nigéria desde 2017 (Gessain et al., 2022).

Em maio de 2022, foram detetados múltiplos casos em países não endémicos, incluindo na Europa, nomeadamente, no Reino Unido, Portugal, Espanha e Itália, afetando predominantemente entre homens que têm sexo com homens (HSH). Este padrão de transmissão, distinto das cadeias zoonóticas clássicas, demonstrou a capacidade do vírus para uma disseminação sustentada entre humanos (Gessain et al., 2022).

Atualmente, cerca de 40 espécies animais são reconhecidas como naturalmente ou experimentalmente suscetíveis ao MPXV (Antunes et al., 2022). Na natureza, a circulação do vírus permanece predominantemente restrita à Bacia do Congo e à África Ocidental, onde é mantido em reservatórios animais ainda não completamente identificados. Os seres humanos e os primatas não humanos apresentam elevada suscetibilidade, manifestando quadros clínicos semelhantes aos provocados pelo vírus da varíola (Antunes et al., 2022; Vaughan et al., 2018).

Em novembro de 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou a alteração oficial do nome da infeção por vírus monkeypox para mpxv, com o objetivo de evitar estigmas sociais e culturais associados ao nome anterior. Apesar desta alteração terminológica, a designação vírus monkeypox mantém-se em uso científico e

taxonómico, de acordo com as normas do *International Committee on Taxonomy of Viruses* (World Health Organization, 2022).

Historicamente, a mpox era considerada uma zoonose rara e endémica em áreas florestais africanas. Contudo, a emergência global em 2022 transformou o MPXV num desafio significativo para a saúde pública internacional (Antunes et al., 2022).

## 2.1 Características morfológicas e fisiológicas do MPXV

O MPXV apresenta uma morfologia típica dos vírus do género OPXV, com formato oval ou em “tijolo” (*brick-shaped*). As partículas virais são de grandes dimensões, com cerca de 200-250nm, podendo ser facilmente observadas por microscopia eletrónica de transmissão (Huang et al., 2022; Liang et al., 2022; Li et al., 2023).

O MPXV possui uma estrutura complexa, composta por uma cápside, envolta por múltiplas camadas membranares e proteínas estruturais associadas (Figura 2). Durante o ciclo replicativo, partícula viral apresenta-se sob duas formas principais: partícula viral intracelular madura (MV), com uma única membrana, responsável pela estabilidade no ambiente; e partícula viral extracelular envelopada (EV), rodeada por membranas adicionais que facilitam a disseminação intercelular e sistémica (Huang et al., 2022).

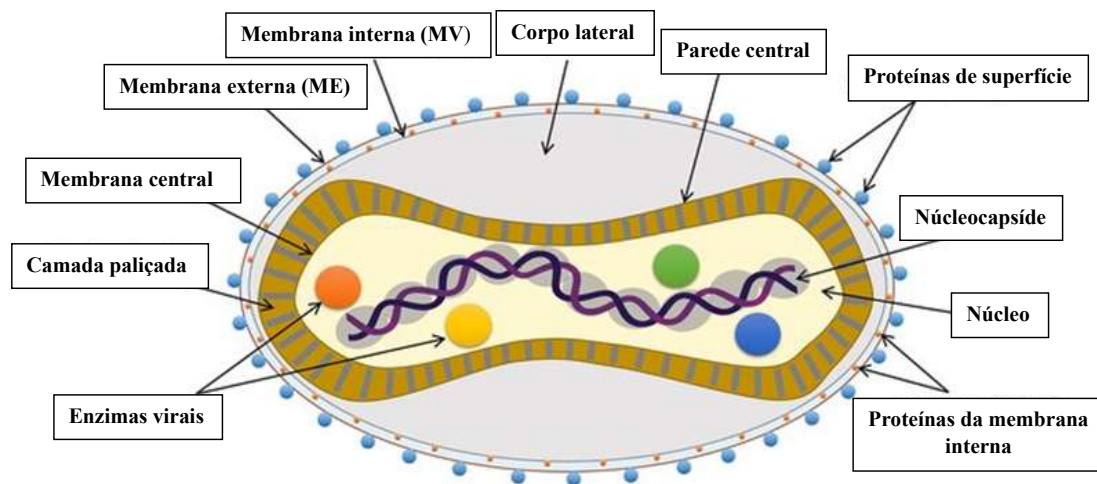


Figura 2. Estrutura celular do MPXV (adaptado de Papukashvili et al., 2022).

O genoma do MPXV é constituído por DNA linear de cadeia dupla, com aproximadamente 197 kb, flanqueado por regiões terminais invertidas típicas dos poxvírus. Este genoma codifica cerca de 180 proteínas envolvidas em replicação viral, morfogénese, evasão imunitária e interação com o hospedeiro (Wilson et al., 2025).

Tal como nos restantes poxvírus, a replicação do MPXV ocorre inteiramente no citoplasma da célula infetada. Para tal, o vírus transporta as enzimas necessárias à replicação e transcrição do seu DNA, incluindo DNA polimerase, RNA polimerase e fatores de transcrição específicos (Manju et al., 2022).

O ciclo de infeção do MPXV pode ser descrito em quatro fases principais, decorrendo inteiramente no citoplasma da célula hospedeira, dado que o vírus transporta as enzimas necessárias para a transcrição e replicação do seu genoma, minimizando o envolvimento com o núcleo celular (Figura 3):

1. Entrada: o processo inicia-se com a ligação da partícula viral às glicoproteínas e a outros componentes da superfície da célula-alvo, seguida da fusão da membrana viral com a membrana celular, permitindo a entrada da partícula viral no citoplasma.
2. Libertação do genoma viral: após a entrada, o core viral é libertado no citoplasma, permitindo a libertação do DNA viral, que é imediatamente transcrito por enzimas virais transportadas na própria partícula viral.
3. Replicação e morfogénese: o MPXV replica o seu DNA e estabelece “fábricas virais” no citoplasma, onde são produzidas proteínas estruturais e não estruturais. Nesta fase, formam-se partículas virais imaturas que sofrem maturação e originam vírus intracelulares maduros (MV).
4. Libertação: os MV podem permanecer no citoplasma ou adquirir membranas adicionais, originando vírus extracelulares envelopados (EV). Estes são libertados por mecanismos dependentes de gemulação ou, mais tardiamente, por lise celular, permitindo a disseminação local e sistémica do vírus. Este ciclo intracitoplasmático altamente eficiente sustenta a capacidade replicativa do MPXV e explica a formação abundante de partículas virais nas lesões cutâneas e nos fluidos corporais, principais fontes de transmissão (Manju et al., 2022).

Estas características morfológicas e fisiológicas conferem ao MPXV uma notável robustez no meio ambiente, elevada eficiência replicativa e múltiplos mecanismos de evasão imunitária, que em conjunto contribuem para a sua patogenicidade (Li et al., 2023).

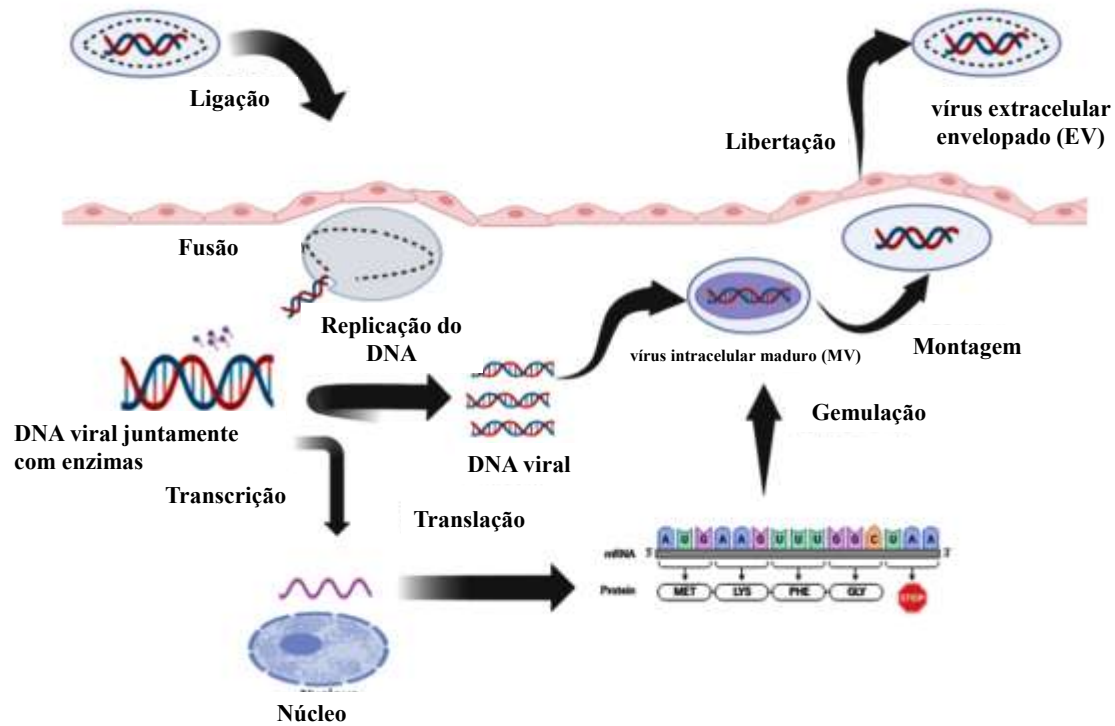


Figura 3. Ciclo de infecção do MPXV (Manju et al., 2022).

## 2.2 Diversidade genética do MPXV

Devido à sua variabilidade genética, o MPXV é atualmente classificado em dois clades principais, cada um subdividido em subclades. O clade I (anteriormente designado *Congo Basin clade*) inclui os subclades Ia e Ib, é endêmico na África Central e é associado a uma maior gravidade clínica, com taxas de mortalidade mais elevadas e maior transmissibilidade, quando comparado com o clade II. O clade II (anteriormente *West African clade*) subdivide-se em IIa e IIb, sendo endêmico na África Ocidental, e, de forma geral, associado a quadros clínicos mais ligeiros (Antunes et al., 2022) (Figura 4).

O clade Ia circula em vários países da África Central, estando frequentemente relacionado com eventos de transmissão zoonótica esporádica a partir de reservatórios animais, seguidos por cadeias limitadas de transmissão entre humanos. A diversidade genética deste subclade sugere movimentação transfronteiriça de estirpes do vírus dentro da região (World Health Organization, 2025c).

O clade Ia circula em vários países da África Central, estando frequentemente relacionado com eventos de transmissão zoonótica esporádica a partir de reservatórios animais, seguidos por cadeias limitadas de transmissão entre humanos. A diversidade genética

deste subclade sugere movimentação transfronteiriça de estirpes do vírus dentro da região (World health Organization, 2025c).

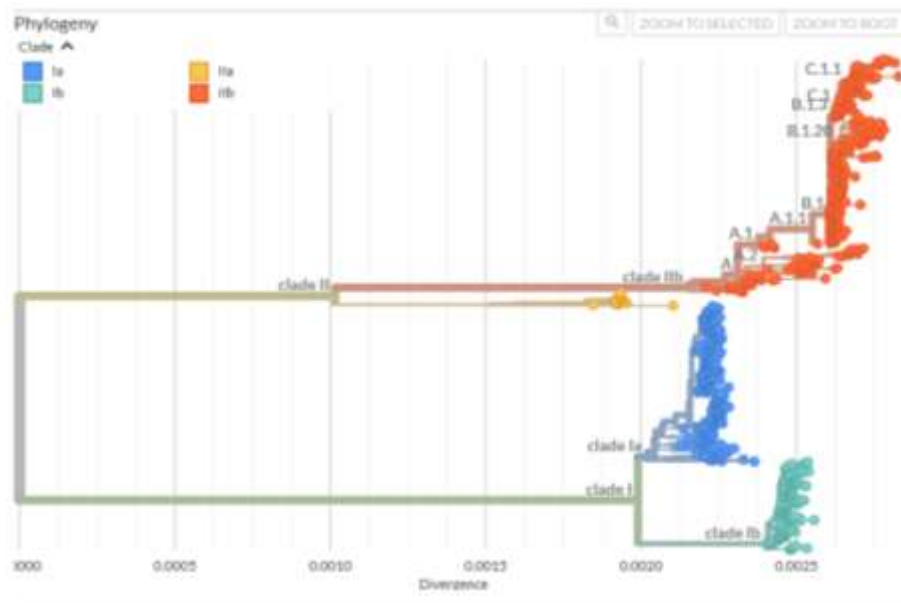


Figura 4. Árvore filogenética das sequências de 979 genomas de MPXV, disponíveis na plataforma Nextstrain (atualizada a 16/11/2025).

O clade Ib foi responsável por um grande surto em 2023, na região oriental da RDC, tendo evoluído para transmissão humana sustentada em vários países. Este clade representa, atualmente uma das principais preocupações epidemiológicas no continente africano, pela sua expansão geográfica e potencial adaptação ao Homem (World health Organization, 2025c).

O clade IIa, por sua vez, é predominantemente detetado em espécies animais, com um número reduzidos de infeções humanas. Contudo, o aumento recente de casos em países da África Ocidental indica uma circulação mais ampla do que anteriormente reconhecida, podendo refletir mudanças ecológicas ou comportamentais dos reservatórios (World health Organization, 2025c).

Por fim, o clade IIb, inicialmente detetado na Nigéria, mantém circulação sustentada no Homem desde pelo menos 2016 e foi responsável pelo surto global iniciado em 2022, que ainda persiste. Durante este surto, a transmissão ocorreu maioritariamente entre HSH, atingindo o seu pico em agosto de 2022 e mantendo-se, desde então, em níveis baixos, mas constantes, em vários países. (World Health Organization, 2020b).

Os diferentes surtos ocorridos nos últimos anos modificaram o panorama genómico do clade IIb, levando a uma maior divergência de linhagens, com base numa série de eventos moleculares evolutivos. No surto internacional começado em maio de 2022, as estirpes que circularam pertenciam maioritariamente à linhagem B.1, com diversas diferenças nas regiões codificantes, que têm sido associadas a determinantes antigénicos imunomoduladores e de reconhecimento do hospedeiro (Luna et al., 2023).

Outras linhagens de MPXV (por exemplo, A.2.1, A.2.2, A.2.3 ou A.3) foram detetadas esporadicamente em países onde a mpox não é endémica (por exemplo, EUA, Vietname, Egito e Reino Unido), corroborando a ligação anteriormente referida com a epidemia na Nigéria e a probabilidade de que outras cadeias de transmissão de pessoa a pessoa estejam a ocorrer para além do grande surto de B.1 reconhecido. No entanto, o número de sequências reportadas ao longo dos anos (até 2022) é ainda muito limitado, dificultando o estabelecimento de origens precisas e rotas evolutivas. As sequências reunidas durante o surto de 2022 divergem em cerca de 50 polimorfismos de nucleótidos únicos (SNPs) das sequências pré-surto. Isto indica uma taxa de substituição inesperadamente elevada para os OPXV de DNA de cadeia dupla de evolução lenta (Borges et al., 2023).

Recentemente, foram designadas novas linhagens como E.1 a E.3, descendentes da sublinhagem C.1.1, e F.1 a F.6, descendentes da sublinhagem B.1.20, que foram propostas por plataformas internacionais de vigilância genómica, como GISAID e Nextstrain (Figura 4). Estas atualizações aprofundam e tornam mais precisa a classificação filogenética do clade IIb, permitindo um enquadramento mais detalhado da diversidade genética atualmente observada (Li et al., 2025).

### **2.3 Resposta imunitária do hospedeiro à infeção mpox**

O sistema imunitário desempenha um papel determinante na defesa contra o MPXV, envolvendo mecanismos tanto da imunidade inata como adaptativa. A resposta adaptativa, em particular, é crucial para a eliminação do vírus e para o estabelecimento de imunidade protetora duradoura (Parnian et al., 2024).

Durante a infeção, os anticorpos imunoglobulinas G e M (IgG e IgM) específicos contra MPXV são detetáveis, e constituem importantes marcadores de diagnóstico. As células B exercem um papel central na proteção mediada pela vacinação, através da produção de anticorpos neutralizantes, responsáveis por inibir a entrada e disseminação do vírus. Em paralelo, as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> contribuem significativamente para o controlo da

infecção, promovendo a destruição de células infetadas e a ativação de outros componentes imunitários (Parnian et al., 2024).

Estudos demonstram que indivíduos vacinados contra a varíola apresentam respostas imunitárias cruzadas robustas contra MPXV, atribuídas à semelhança antigénica entre os OPXV. Assim, indivíduos nascidos antes da década de 1970, altura em que terminou gradualmente a vacinação de rotina contra a varíola, mantêm alguma imunidade residual que confere proteção cruzada contra a mpox (Parnian et al., 2024).

A eficácia desta resposta imunitária é influenciada por diversos fatores. A idade influencia a competência imune, sendo que indivíduos mais jovens tendem a apresentar respostas mais eficazes, enquanto o envelhecimento imunológico reduz a capacidade de ativação e memória imunológica (Parnian et al., 2024). Por outro lado, doentes imunocomprometidos, nomeadamente portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV, *Human immunodeficiency virus*) ou doentes oncológicos sob terapêuticas imunossupressoras, exibem maior suscetibilidade e evolução mais grave, devido à limitação da resposta antiviral e à replicação prolongada do vírus. (Parnian et al., 2024)

Em conjunto, estes fatores determinam a variabilidade observada na apresentação clínica e no prognóstico da infecção por MPXV, reforçando a importância da vacinação e da vigilância imunológica em populações de maior risco (Parnian et al., 2024).

## 2.4 Transmissão do MPXV

A mpox é uma zoonose que pode ser adquirida por diferentes vias de transmissão, dependendo da origem da infecção, animal ou humana (World Health Organization, 2024b).

A transmissão zoonótica ocorre através do contacto direto com animais infetados, nomeadamente primatas ou roedores terrestres e arborícolas (como esquilos) (Figura 5). A exposição pode acontecer por mordeduras, arranhões ou durante atividades como caça, captura, esfolagem ou preparação da carne de animais infetados. O consumo de carne contaminada mal cozinhada representa também uma via potencial de transmissão do vírus (World Health Organization, 2024b).

A prevenção da transmissão zoonótica baseia-se em evitar o contato desprotegido com animais selvagens, sobretudo os que aparentam estar doentes, e na confeção correta de produtos de origem animal provenientes de regiões onde o vírus foi identificado nos animais (World Health Organization, 2024b).

A transmissão entre humanos ocorre principalmente através do contacto próximo com indivíduos infetados, incluindo contacto pele com pele (como toques ou relações sexuais) e por exposição a aerossóis (como durante conversas ou respiração próxima, devido à libertação de partículas respiratórias infecciosas) (World Health Organization, 2024b).

Durante o surto global iniciado em 2022, a propagação verificou-se sobretudo por contacto direto pele com pele, predominando a transmissão por via sexual (Antunes et al., 2022; World Health Organization, 2024b).

O vírus pode também persistir em superfícies e objetos contaminados, como vestuário, roupas de cama, toalhas, dispositivos eletrónicos ou utensílios pessoais. O contato direto com estes materiais pode transmitir o vírus, sobretudo na presença de lesões cutâneas ou quando há contacto inadvertido com mucosas (olhos, nariz e boca). Assim, a limpeza e desinfecção regulares de superfícies e objetos, assim como a lavagem ou higienização das mãos, são medidas fundamentais de prevenção (Huang et al., 2022).

A transmissão vertical é também possível, podendo ocorrer durante a gravidez ou durante o parto, através do contacto direto pele com pele (World Health Organization, 2024b; Antunes et al., 2022). Embora os estudos sobre o impacto do MPXV na gravidez em África sejam escassos, os dados disponíveis indicam um elevado risco de desfecho adverso, com aborto ou morte fetal em cerca de 75% dos casos (Mbala et al., 2017).

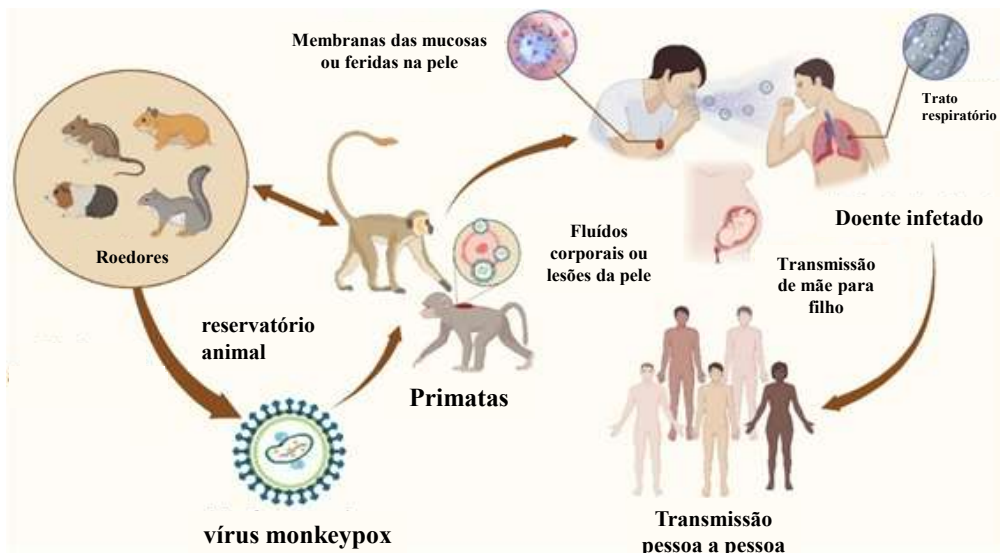


Figura 5. Transmissão do vírus monkeypox (Adaptado de Niu et al., 2023).

## 2.5 Manifestações clínicas da mpox

A mpox apresenta um quadro clínico semelhante ao da varíola, embora, na maioria dos casos, com evolução mais ligeira. Após um período de incubação que varia entre cinco a 21 dias, inicia-se a fase prodrômica, caracterizada por febre, mal-estar geral, cefaleias, mialgias e fadiga (Figura 6). Esta fase é frequentemente acompanhada por linfadenopatia, uma característica distintiva de outras doenças, nomeadamente da varíola e da varicela (Antunes et al., 2022; Huang et al., 2022).

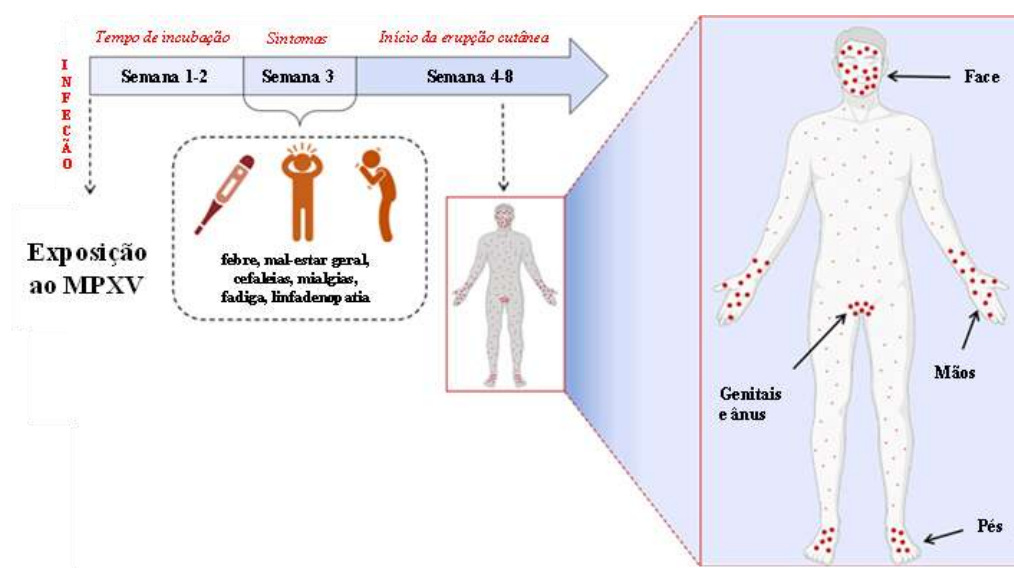


Figura 6. Manifestações clínicas da mpox (Adaptado de Papukashvili, et al., 2022).

Segue-se a fase eruptiva, marcada pelo aparecimento de lesões cutâneas que evoluem, tipicamente de forma síncrona, através de várias etapas morfológicas: máculas, pápulas, vesículas, pústulas e crostas, até à cicatrização completa e formação de nova epiderme (Figura 7).

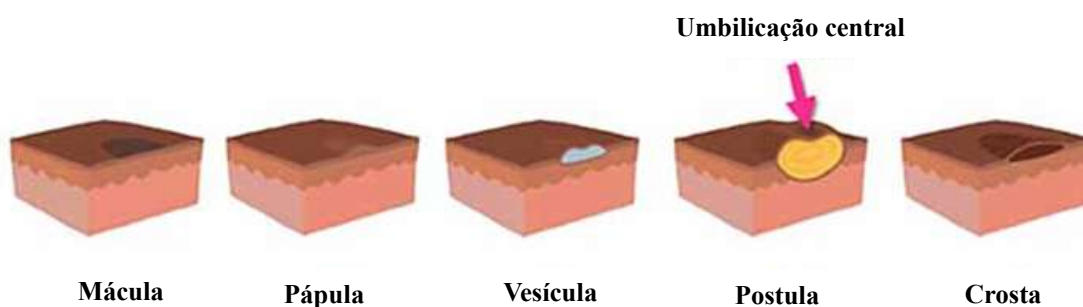


Figura 7. Evolução das lesões cutâneas causadas pelo MPXV (Adaptado de Medical University of South Carolina. (s.d.)).

As lesões apresentam distribuição centrífuga, afetando frequentemente a face, tronco e extremidades, incluindo palmas das mãos e plantas dos pés. Podem causar dor, prurido e desconforto local. O curso clínico dura, em geral, duas a quatro semanas, até à queda completa das crostas (Antunes et al., 2022; Cabanillas et al., 2024).

Nos surtos mais recentes (desde 2022), têm sido descritas formas clínicas atípicas, com lesões localizadas predominantemente nas regiões genital, anal ou orofaríngea, frequentemente associadas à transmissão sexual. Nestes casos, o número de lesões tende a ser mais reduzido, podendo ocorrer sem a fase prodrómica clássica, e, em alguns doentes, as lesões não se encontram em estádios evolutivos síncronos, apresentando diferentes etapas morfológicas ao mesmo tempo (Antunes et al., 2022; Cabanillas et al., 2024).

Os sintomas surgem, habitualmente, entre o quinto e o 21º dia após a exposição. Em doentes com sintomas semelhantes aos da gripe, as lesões cutâneas costumam desenvolver-se entre o primeiro e o quarto dia após a exposição (Centers for disease Control and Prevention, 2024b; Huang et al., 2022).

As complicações secundárias são mais frequentes em doentes imunocomprometidos e incluem: infeções bacterianas secundárias, broncopneumonia, gastroenterite, encefalite e infeção ocular, que pode evoluir para cegueira (Antunes et al., 2022; Centers for disease Control and Prevention, 2024b).

Os doentes são considerados contagiosos desde o início dos sintomas até à completa cicatrização das lesões. Dados recentes sugerem que a transmissão pré-sintomática, até quatro dias antes do aparecimento dos sintomas, pode ocorrer, embora a sua relevância epidemiológica permaneça incerta. Até à data, não há evidência de transmissão por indivíduos assintomáticos (Centers for disease Control and Prevention, 2024b).

## **2.6 Situação epidemiológica atual nacional e internacional**

Em maio de 2022, foi identificado um surto global causado por estirpes do MPXV do clade IIb em vários países, afetando sobretudo HSH, com mais de 80 000 casos registados em mais de 100 países (World Health Organization, 2025c). Devido à rápida propagação do vírus, a OMS declarou, em julho de 2022, a mpox como uma Emergência de Saúde Pública de Âmbito Internacional (*Public Health Emergency of International Concern*, PHEIC). Esta primeira PHEIC foi levantada a 11 de maio de 2023, após uma redução sustentada da transmissão global.

Atualmente, mais de 165 000 casos confirmados foram reportados pela OMS em cerca de 140 países (World Health Organization, 2025a) (Figura 8).

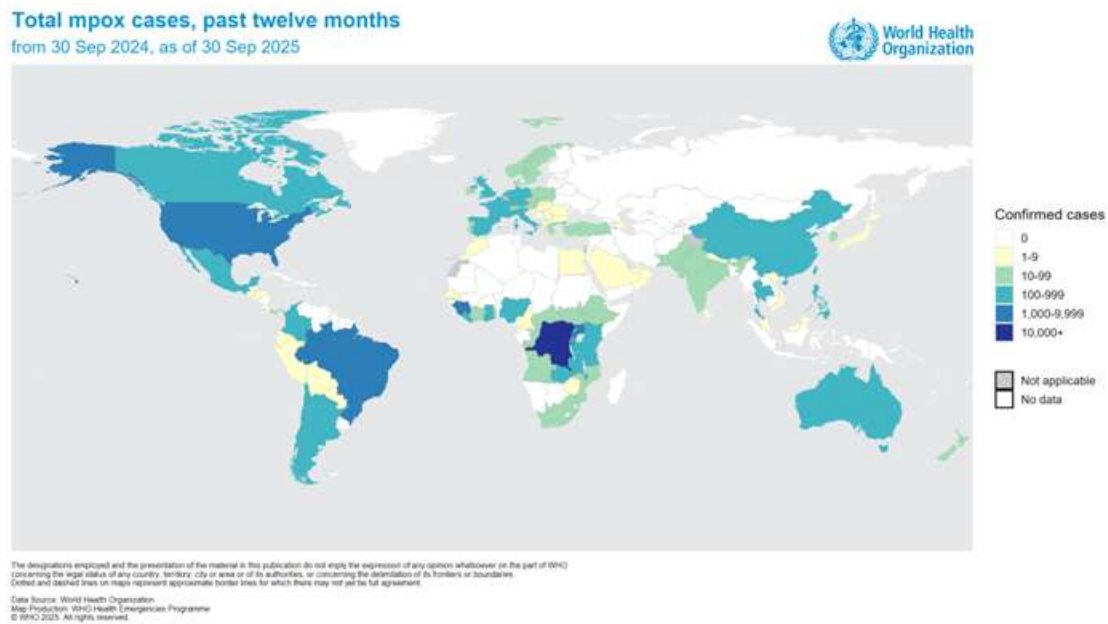


Figura 8. Casos confirmados do MPXV no mundo desde setembro de 2024 a setembro de 2025 (Adaptado de (World Health Organization, 2025e).

A análise epidemiológica recente evidencia que a transmissão permanece fortemente concentrada em redes específicas: 87,1% dos casos com informação disponível ocorreram em HSH (n=33 129/38 051), e 51,1% dos infectados referiram viver com HIV (n=19 909/38 984). A transmissão sexual continua a ser dominante, representando 88,5% dos casos com resposta (n=21 525/24 328) (World Health Organization, 2025c).

A maioria dos doentes apresentou doença ligeira a moderada, com baixa necessidade de hospitalização (8,9%; n=6 726/75 437). As admissões em cuidados intensivos foram raras (0,4%; n=51/12 041), e a mortalidade em países não endêmicos manteve-se reduzida (201 óbitos; 0,3%), sobretudo em doentes imunocomprometidos (World Health Organization, 2025c).

Quanto à distribuição etária e por sexo, observa-se uma forte concentração em adultos jovens e de meia-idade, predominantemente do sexo masculino. Entre 1 de outubro de 2024 e 30 de setembro de 2025, dos 4 738 casos com dados completos, destacam-se as faixas 30–39 anos (n=1 995), 40–49 anos (n=999) e 18–29 anos (n=1 186). Os casos femininos foram pouco frequentes e raramente se observaram infecções em menores de 18 anos ou em indivíduos acima dos 70 anos (World Health Organization, 2025c).

Em Portugal, o primeiro alerta surgiu a 3 de maio de 2022, com a identificação de casos clínicos ainda sem confirmação laboratorial. Estudos posteriores sugerem que o vírus terá circulado silenciosamente no país cerca de 50 dias antes da notificação oficial, o que pode explicar o aumento abrupto dos casos iniciais (Cordeiro et al., 2025c).

Os primeiros cinco casos confirmados foram diagnosticados a 18 de maio pela Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação (UREB) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), tornando Portugal o segundo país a notificar casos num surto que rapidamente se tornou global (Direção-Geral da Saúde, 2025).

Desde então, Portugal registou três surtos de mpox, totalizando 1269 casos confirmados até 31 de outubro de 2025. O primeiro surto ocorreu entre 17 de maio de 2022 e 27 de março de 2023, com 956 casos, incluindo dois óbitos em doentes imunocomprometidos. O segundo decorreu entre 14 de junho de 2023 e 31 de março de 2024, com 229 casos confirmados (Cordeiro et al., 2024). O terceiro, ainda em curso, iniciou-se a 1 de junho de 2024, contabilizando 84 casos até 31 de outubro de 2025 (Cordeiro et al., 2025b; Direção-Geral da Saúde, 2025).

O clade Ib foi identificado pela primeira vez em agosto de 2023, na província de Kivu do Sul, na RDC, sendo posteriormente associado a transmissão sustentada entre humanos. Inicialmente restrito à RDC, expandiu-se a partir de agosto de 2024 para Burundi, Quênia, Ruanda e Uganda. Em resposta, a OMS voltou a declarar mpox uma PHEIC a 14 de agosto de 2024, devido ao aumento significativo das infeções e à sua disseminação regional. Esta PHEIC permaneceu ativa até 5 de setembro de 2025, quando foi oficialmente levantada (World Health Organization, 2025a; World Health Organization, 2025b).

Casos importados do clade Ib foram posteriormente identificados fora de África, na Suécia, Tailândia, Índia, Alemanha, Reino Unido, Estados Unidos, Canadá, Bélgica, Paquistão, Omã, China, França e Brasil, maioritariamente associados a viagens a regiões endémicas (World Health Organization, 2024a; World Health Organization, 2025b).

Durante 2025, registaram-se ainda casos secundários em países sem histórico de viagem, como Canadá, Japão, Tailândia, Austrália e Irlanda. A 10 de outubro de 2025, Espanha notificou o primeiro caso autóctone de clade Ib, seguido por Itália (n=2), Portugal (n=1) e Países Baixos (n=1). Todos os casos foram ligeiros, sem necessidade de hospitalização, com início dos sintomas entre 16 de setembro e 7 de outubro de 2025 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2025).

Estes acontecimentos demonstram a capacidade do clade Ib para se disseminar além da sua região endémica, reforçando a importância da vigilância laboratorial e epidemiológica contínua (World Health Organization, 2025a; World Health Organization, 2025b).

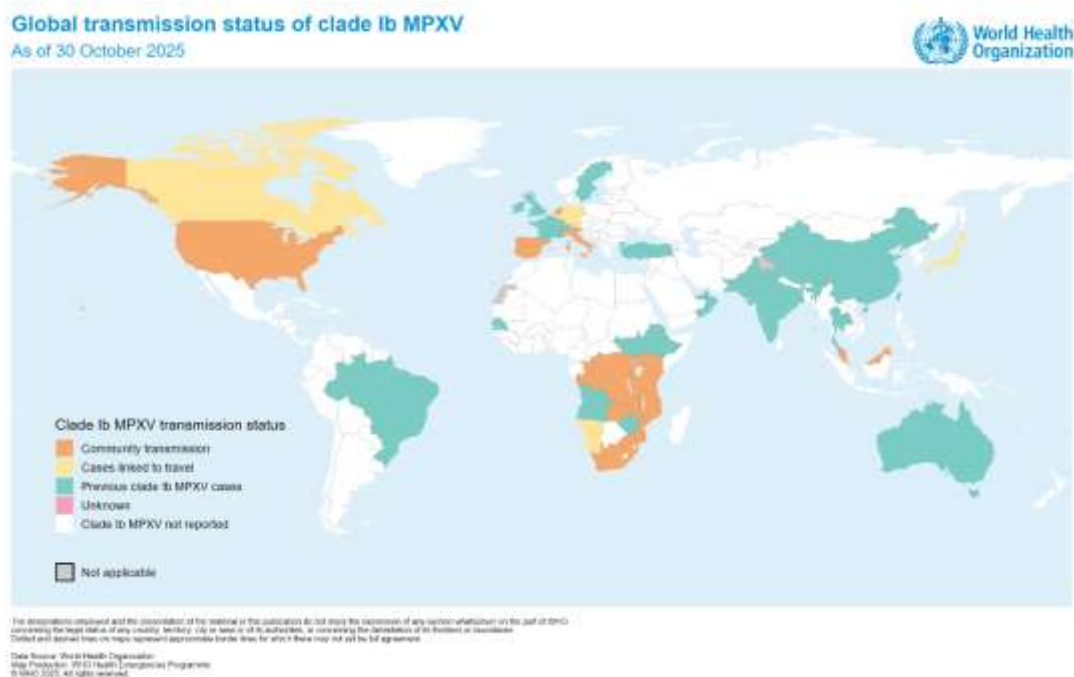


Figura 9. Transmissão global do clade Ib do MPXV, com dados de outubro de 2025 (Adaptado de World Health Organization, 2025f).

Portugal notificou o seu primeiro caso confirmado de infeção por MPXV do clade Ib, a 19 de outubro de 2025, num doente estrangeiro a residir na Área Metropolitana de Lisboa, sem histórico de viagem. A infeção por MPXV foi diagnosticada laboratorialmente a 14 de outubro, tendo o INSA confirmado MPXV do clade Ib a 19 de outubro.

Em África, desde 1 de janeiro de 2022, 33 Estados-Membros notificaram casos de mpox. Até 2 de novembro de 2025, foram reportados 60 774 casos confirmados, incluindo 258 óbitos (World Health Organization, 2025c).

Nos últimos 12 meses, até 2 de novembro de 2025, 27 países notificaram 44 923 casos confirmados, com 200 óbitos. A maioria ocorreu na RDC (n = 24 720), Uganda (n = 8087) e Serra Leoa (n = 5442), onde circulam predominantemente os clades Ia e Ib (World Health Organization, 2025c) (Figura 9).

Na RDC, muitos casos clinicamente compatíveis permanecem por testar devido a limitações laboratoriais, e vários países mantêm sistemas de vigilância fragilizados, o que sugere subnotificação (World Health Organization, 2025c).

Os relatórios epidemiológicos indicam que 70% dos casos de mpox na RDC ocorrem em crianças com menos de 15 anos, grupo que também representa 88% dos óbitos. Historicamente, a mpox apresenta elevada incidência e mortalidade infantil na RDC, refletindo sobretudo transmissão não sexual em contexto familiar, após infecção de adultos por via sexual, não sexual ou por contacto com animais (Africa Centres for Disease Control and Prevention, 2024; Beer & Rao, 2019) (Figura 10).

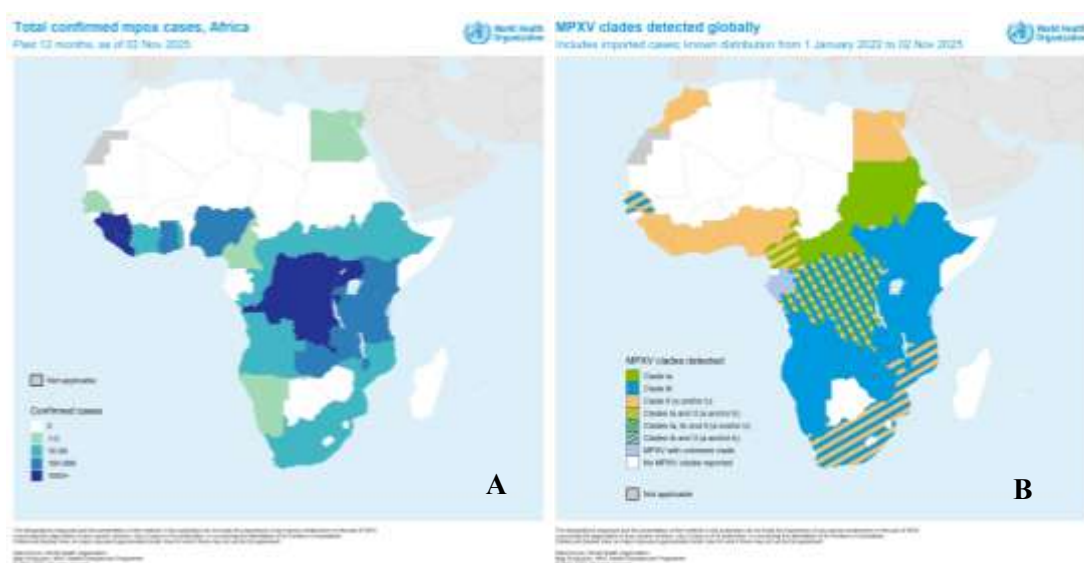


Figura 10. A) Casos confirmados do MPXV em África, nos últimos 12 meses; B) Clades do MPXV detetados em África, desde 1 de janeiro de 2022 até 02 de novembro de 2025. (Adaptado de World Health Organization, 2025c)

## 2.7 Diagnóstico laboratorial da mpox

A deteção laboratorial de mpox deve ser realizada exclusivamente em laboratórios devidamente equipados, com profissionais qualificados e com a implementação rigorosa de medidas de biossegurança adequadas ao risco biológico associado. A manipulação de amostras provenientes de casos suspeitos ou confirmados de infecção por MPXV deve basear-se numa avaliação de risco que considere o tipo de amostra, os procedimentos laboratoriais a executar e o nível de contenção requerido (World Health Organization, 2024a).

No que diz respeito ao transporte, as amostras clínicas devem ser acondicionadas segundo as normas aplicáveis às substâncias infecciosas de categoria B (UN 3373), e as culturas do

vírus como categoria A (UN 2814), dada a maior perigosidade associada (Antunes et al., 2022; World Health Organization, 2024a).

As amostras preferenciais para diagnóstico são as provenientes de lesões cutâneas, nomeadamente, exsudado de lesão ou crostas. De forma complementar, recomenda-se a colheita de um exsudado orofaríngeo. Dependendo das manifestações clínicas, outras amostras podem ser consideradas para investigação clínica, tais como, exsudados retais, e/ou genitais, urina, sémen, líquido cefalorraquidiano ou humor vítreo. Amostras de sangue em EDTA podem também ser colhidas durante a fase prodrómica, antes do aparecimento das lesões cutâneas. Adicionalmente, devem ser colhidas duas amostras de soro ou plasma, com um intervalo mínimo de 21 dias, sendo a primeira obtida na fase aguda da doença e a segunda durante a convalescença (Antunes et al., 2022).

O diagnóstico laboratorial de mpox pode ser realizado através de várias metodologias: testes de amplificação de ácidos nucleicos (*Nucleic Acid Amplification Test - NAAT*), cultura ou isolamento viral, microscopia eletrónica, serologia para a deteção de anticorpos específicos (IgG e IgM), e imunohistoquímica para deteção de antigénios (Antunes et al., 2022; Huang et al., 2022) (Tabela 1).

Tabela 1. Visão geral dos testes de diagnóstico de mpox, incluindo o estado da doença e as amostras recomendadas a colher.

<b>Teste de diagnóstico</b>	<b>Estadio da doença</b>	<b>Amostras recomendadas</b>	<b>Descrição</b>
NAAT (PCR) (deteção de ácidos nucleicos)	Estado febril	Exsudado orofaríngeo ou sangue em EDTA	Deteta o DNA do MPXV e identifica o clade. O NAAT pode ser genérico para OPXV ou específico para MPXV.
	Fase de erupção cutânea	Exsudado de lesão*	
Imunohistoquímica (deteção de antigénios)	Fase de erupção cutânea	Exsudado de lesão	Utiliza um anticorpo dirigido contra um antigénio de OPXV e comprova a presença de uma infeção atual. Não é específico para MPXV.
Cultura viral/isolamento (deteção do vírus)	Fase de erupção cutânea	Exsudado de lesão	Deteta partículas virais. Requer instalações apropriadas e um especialista. Técnica morosa e exigente. Não é específico para MPXV.

Teste de diagnóstico	Estadio da doença	Amostras recomendadas	Descrição
Microscopia eletrónica (deteção do vírus)	Fase de erupção cutânea	Exsudado de lesão	Identifica a morfologia do vírus. Requer instalações apropriadas e um especialista. Técnica morosa e exigente. Não é específico para MPXV
Serologia para deteção de anticorpos específicos (deteção de anticorpos IgM e IgG)	Fase de erupção cutânea e recuperação	Soro ou plasma (duas amostras com 21 dias de diferença, a primeira amostra colhida na primeira semana de doença)	Utiliza um antígeno direcionado contra os anticorpos, mas tem um valor de diagnóstico limitado, pois apenas comprova uma infeção/vacinação atual ou passada. Não é específico para MPXV.

\* Outras amostras clínicas podem ser consideradas para investigação.

Entre estes métodos, o NAAT, particularmente o PCR em Tempo Real, é considerado o melhor teste laboratorial devido à sua elevada especificidade e sensibilidade. Atualmente, estão disponíveis vários protocolos para NAAT, como a Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) em tempo real ou convencional. O NAAT pode ser genérico para o género OPXV ou específico para MPXV. Complementarmente, a sequenciação do genoma viral permite caracterizar a dinâmica da transmissão e, assim, contribuir para a vigilância e investigação epidemiológica (Antunes et al., 2022, Zhou & Chen, 2023; World Health Organization, 2024a).

A dinâmica temporal da infeção por MPXV define, de forma decisiva, quais os testes laboratoriais que apresentam maior sensibilidade em cada fase clínica (Figura 11).

Durante o período de incubação (cinco a 21 dias após a exposição), a carga viral é baixa e a deteção por métodos moleculares é improvável. Na fase prodrómica ou febril, entre o primeiro e o quarto dia após o início dos sintomas, a carga viral começa a aumentar, permitindo já detetar MPXV num exsudado orofaríngeo. O pico da carga viral ocorre com o aparecimento de lesões cutâneas, geralmente entre a primeira e a quarta semana da doença, fase em que as amostras de lesão permitem uma maior sensibilidade no diagnóstico. À medida que a carga viral diminui, há um aumento dos títulos de anticorpos IgM e, posteriormente, IgG, tornando os métodos serológicos mais informativos nas fases tardias da infeção (Zhou & Chen., 2023).

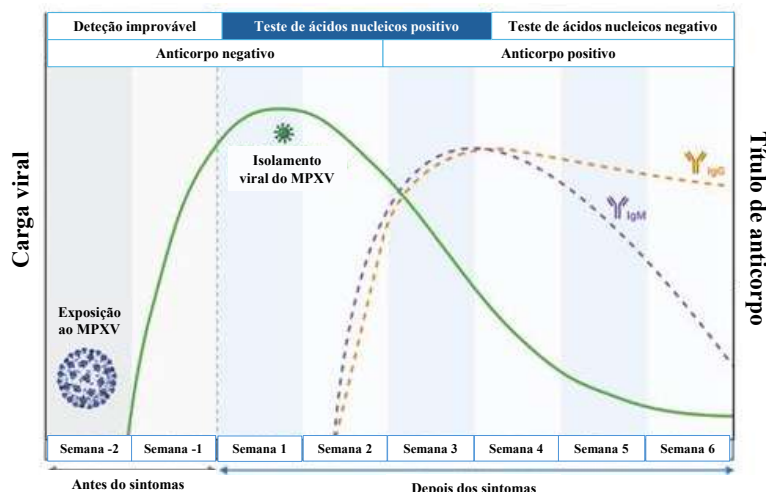


Figura 11. Cronologia da mpxv e testes utilizados no diagnóstico (adaptado de Zhou & Chen., 2023).

O algoritmo recomendado para o diagnóstico integra uma abordagem sequencial. A primeira etapa consiste na realização de NAAT dirigidos ao género OPXV ou especificamente ao MPXV (Figura 12). Após a confirmação da infeção, procede-se à genotipagem por métodos de diferenciação molecular ou por sequenciação genómica, permitindo identificar o clade e/ou a linhagem responsável. Esta informação é crucial para a resposta de saúde pública, uma vez que os diferentes clades apresentam perfis distintos de transmissão, virulência e comportamento epidemiológico (World Health Organization, 2024a).

Assim, o processo de diagnóstico e genotipagem do MPXV combina a confirmação rápida da infeção com a caracterização molecular do agente, assegurando uma resposta mais precisa e uma vigilância genómica contínua, fundamentais para o controlo da mpxv (World Health Organization, 2024a).

A mpxv é uma doença de notificação obrigatória, assim, todos os resultados laboratoriais, positivos ou negativos, devem ser comunicados às autoridades de saúde competentes (World Health Organization, 2024a).

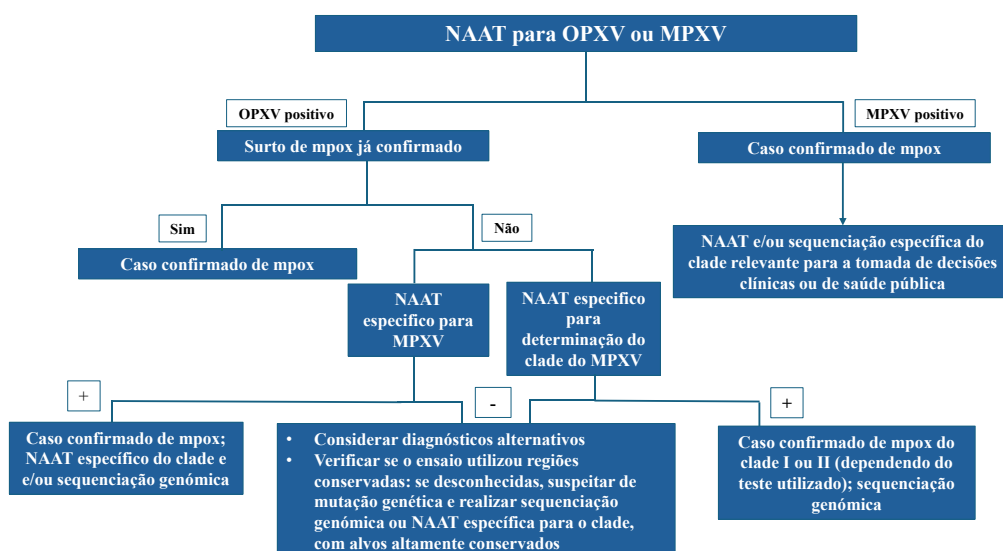


Figura 12. Algoritmo para o diagnóstico laboratorial de mpxo para a gestão clínica e vigilância da doença (adaptado World Health Organization, 2024a).

## 2.8 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial da mpxo é fundamental para assegurar a identificação precoce de casos e limitar a transmissão comunitária. A distinção clínica pode ser difícil, uma vez que várias infeções partilham características semelhantes, incluindo doenças causadas por outros vírus do género OPXV ou por vírus de outras famílias. Esta distinção torna-se particularmente relevante em contextos de surtos, onde a rápida identificação e diferenciação das doenças exantemáticas contribui de forma decisiva para uma intervenção de saúde pública eficaz (Antunes et al., 2022).

No género OPXV, várias infeções humanas podem mimetizar a apresentação clínica da mpxo. O vírus cowpox, tipicamente transmitido por roedores, felinos ou bovinos, causa lesões cutâneas dolorosas, únicas ou múltiplas, que podem ser indistinguíveis das lesões iniciais do MPXV. As infeções por vírus vaccinia, ainda endémico em algumas regiões do mundo e associado tanto à vacina contra a varíola como ao vírus vaccinia zoonótico, podem originar lesões ulceradas ou pustulosas que se confundem com as lesões iniciais da mpxo (Viguier et al., 2025).

Para além destas, existem infeções clinicamente semelhantes provocadas por vírus de outros géneros dentro da família *Poxviridae*. O vírus Orf, pertencente ao género *Parapoxvirus* e associado a contacto com ovelhas e cabras, causa lesões nodulares localizadas que, embora geralmente únicas, podem ser confundidas com lesões iniciais de mpxo. O molusco contagioso, causado pelo vírus molluscipox, origina pápulas

umbilicadas que, em estadios precoces, também podem suscitar dúvidas no diagnóstico. A estes vírus somam-se ainda doenças mais comuns, como impetigo ou outras infeções bacterianas da pele, que devem ser consideradas sobretudo quando as lesões são numerosas ou exsudativas (Huang et al., 2022).

Entre o diagnóstico diferencial mais clássico destacam-se a variola e a varicela (Figura 13 e Tabela 2). A mpox partilha com a variola um padrão eruptivo frequentemente centrífugo e lesões que evoluem de forma relativamente síncrona, embora a variola apresentasse um curso clínico mais grave, altamente contagioso e com letalidade que podia atingir 30% (Niu et al., 2023). A presença de linfadenopatia, observada em cerca de 90% dos doentes com mpox, constitui um dos sinais mais úteis na diferenciação entre as duas doenças, uma vez que este sintoma é tipicamente ausente na variola (Antunes et al., 2022; Huang et al., 2022).

A varicela, causada pelo vírus varicella-zoster (VZV), apresenta erupção em múltiplos estadios evolutivos simultâneos e distribuição predominantemente centrípeta, características que contrastam com a evolução mais lenta e síncrona das lesões da mpox e a sua distribuição centrífuga clássica. Contudo, existem casos de coinfeção por MPXV e VZV documentados na literatura, o que demonstra que a apresentação clínica pode ser atípica e dificultar ainda mais a diferenciação clínica (Coppens et al., 2023).

A gravidade das manifestações ajuda também na distinção: a varicela apresenta, em geral, um curso benigno em crianças; a variola era altamente letal; e a mpox situa-se entre ambas, podendo causar doença sistémica relevante e complicações em doentes imunocomprometidos (Niu et al., 2023).

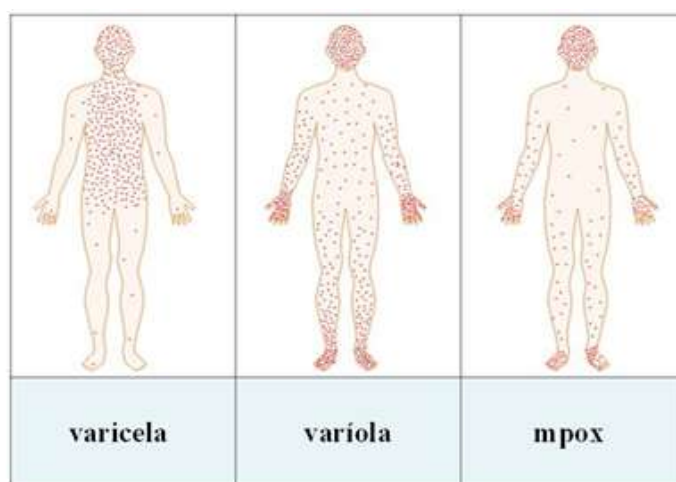


Figura 13. Diferenças da localização das lesões cutâneas causadas pelas doenças varicela, variola e mpox (Adaptado de Rasizadeh et al., 2023).

Tabela 2. Características das infeções mpox, varíola e varicela. (Adaptado de Antunes et al., 2022).

<b>Características</b>	<b>mpox</b>	<b>varíola</b>	<b>varicela</b>
Vírus	MPXV	vírus da varíola	VZV
Febre	1-3 dias antes da erupção	1-3 dias antes da erupção	1-2 dias antes da erupção
Erupção cutânea	Geralmente num único estadio de desenvolvimento; evolução lenta; lesões mais densas no rosto; presentes nas palmas das mãos e plantas dos pés	Geralmente num único estadio de desenvolvimento; evolução lenta; lesões mais densas no rosto e mucosas (nariz e boca); presentes nas palmas das mãos e plantas dos pés	Frequentemente em múltiplos estadios de desenvolvimento; evolução rápida; lesões mais densas no tronco; ausentes nas palmas das mãos e plantas dos pés
Linfadenopatia	Presente	Ausente	Ausente
Mortalidade	Até 10%	Até 30%	Rara

A extensão das lesões pode ainda fornecer pistas importantes: infeções pelo clade I do MPXV tendem a manifestar lesões mais generalizadas do que as causadas pelo clade II, muitas vezes limitadas a regiões anatómicas específicas, especialmente no contexto epidemiológico recente associado à transmissão sexual (Coppens et al., 2023).

A partir de 2022, a mpox passou a apresentar formas clínicas atípicas, frequentemente localizadas nas regiões genital, anal ou orofaríngea, com menor número de lesões, por vezes em diferentes estadios evolutivos e nem sempre precedidas da fase prodrómica clássica. Este padrão pode confundir-se com outras infeções sexualmente transmissíveis (IST), como o Herpes simplex, sífilis secundária ou úlceras causadas por *Haemophilus ducreyi*. Estas apresentações reforçam a importância de integrar os sintomas clínicos com o contexto epidemiológico, características das lesões, presença de linfadenopatia e, sempre que possível, com testes laboratoriais específicos (Huang et al., 2022; Antunes et al., 2022).

A diferenciação clínica entre mpox e outras doenças exantemáticas é complexa e frequentemente insuficiente sem confirmação laboratorial. A sobreposição de sinais e sintomas entre mpox, varíola, varicela, outras infeções por OPXV e doenças

dermatológicas diversas torna imperativa a utilização de testes moleculares específicos e uma avaliação epidemiológica integrada. Esta abordagem é essencial não só para o correto diagnóstico individual, mas também para o controlo de surtos e a vigilância contínua de agentes emergentes (Antunes et al., 2022; Coppens et al., 2023; Niu et al., 2023).

## **2.9 Prevenção e tratamento da mpox**

Atualmente, não existe um tratamento antiviral específico dirigido exclusivamente ao MPXV. No entanto, devido à elevada homologia genética entre o vírus da varíola e MPXV, diversos antivirais e vacinas inicialmente desenvolvidos para a varíola demonstraram eficácia contra a mpox (Antunes et al., 2022).

A maioria dos indivíduos infetados apresenta doença autolimitada e recupera em poucas semanas sem necessidade de terapêutica específica (Antunes et al., 2022).

Entre as opções terapêuticas disponíveis, destaca-se o tecovirimat, um antiviral desenvolvido especificamente para infeções por poxvírus. O fármaco atua inibindo a proteína envolvida na formação das partículas virais extracelulares, reduzindo a disseminação viral. Ensaio pré-clínicos e dados observacionais sugerem que o tecovirimat, administrado por via oral, é eficaz e seguro no tratamento de mpox, sendo recomendado sobretudo para casos graves ou em indivíduos com risco acrescido de complicações (Grosenbach et al., 2018).

No domínio da prevenção, estudos realizados em 1998, demonstraram que a vacina de vírus vaccinia Ankara (MVA-BN), originalmente desenvolvida para a varíola, apresenta cerca de 85% de eficácia na prevenção da infeção por MPXV e na atenuação da gravidade clínica (Antunes et al., 2022; Direção-Geral da Saúde, 2022a).

Atualmente, a utilização da vacina contra a varíola em Portugal integra uma estratégia dupla:

- Vacinação pré-exposição: dirigida a pessoas com risco acrescido de mpox (pessoas com comportamento sexual de risco, profissionais de saúde, profissionais de laboratório, entre outros);
- Vacinação pós-exposição: indicada para pessoas assintomáticas que sejam contacto próximo de um caso e que nunca tenham sido diagnosticadas com mpox, idealmente deve ser administrada até quatro dias após a exposição para máxima eficácia.

Mesmo após completar o esquema recomendado de duas doses, os indivíduos vacinados devem continuar a evitar contacto direto com casos confirmados, uma vez que a vacinação reduz, mas não elimina totalmente, o risco de infeção (Centers for Disease Control and Prevention, 2024b; Centers for Disease Control and Prevention, 2025).

Por fim, o controlo da doença mpox requer uma abordagem integrada que inclui o reforço da vigilância e diagnóstico laboratorial e das campanhas de vacinação em populações-alvo (Liang et al., 2022).

### **3. Biossegurança e bioproteção nos laboratórios em Portugal**

Perante a emergência internacional do MPXV e o crescente impacto de agentes emergentes e reemergentes com potencial epidémico, torna-se evidente que a capacidade de diagnóstico e investigação depende não apenas da competência técnico-científica dos laboratórios, mas também da implementação rigorosa de medidas de biossegurança e bioproteção. A manipulação de amostras potencialmente infecciosas, sobretudo em fases que envolvem procedimentos geradores de aerossóis ou técnicas de cultura viral, exige níveis de contenção biológica adequados e uma avaliação de risco sistemática, adaptada ao agente, às características da amostra e ao procedimento laboratorial (World Health Organization, 2020a; Resnik, 2024).

A biossegurança estabelece os princípios e práticas destinados a prevenir a exposição acidental a agentes biológicos, enquanto a bioproteção visa impedir o seu uso indevido, desvio ou libertação intencional. Em conjunto, constituem pilares essenciais para a proteção dos profissionais, das infraestruturas laboratoriais e da comunidade. A contenção primária, baseada em boas práticas, equipamento de proteção individual e dispositivos de segurança como câmaras de segurança biológica, e a contenção secundária, assegurada pelo desenho das instalações, ventilação, pressão negativa e barreiras arquitetónicas (World Health Organization, 2020a; Resnik, 2024).

A classificação dos microrganismos segundo grupos de risco e a avaliação de risco associada a cada procedimento laboratorial orientam a atribuição do nível de contenção ou segurança biológica necessário (*Biosafety levels*, BSL-1 a BSL-4). No caso do MPXV, cuja manipulação pode envolver risco elevado de infeção, os procedimentos especializados devem ser realizados em laboratórios BSL-3 (World Health Organization, 2020a).

Em Portugal, existem cerca de 30 laboratórios BSL-3 pertencentes a 19 instituições públicas e privadas, dos setores da saúde humana, saúde animal, defesa e investigação, e

distribuídos maioritariamente pela Área Metropolitana de Lisboa e pelo Norte (Figura 12). Desde 2012, o INSA coordena a Rede Laboratorial Portuguesa de Biossegurança (LabPTBioNet), cuja missão é promover uma política de biossegurança e bioproteção e harmonizar boas práticas entre os laboratórios BSL-3 (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2025).

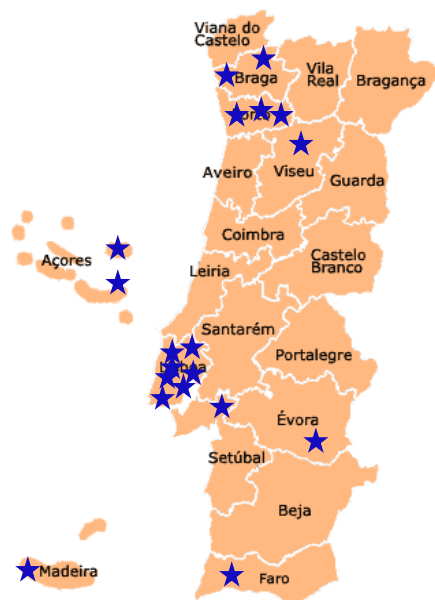


Figura 14. Representação gráfica da localização dos laboratórios BSL-3 em Portugal, pertencentes à LabPTBioNet.

Num contexto de agentes emergentes e reemergentes, como o MPXV ou outros Orthopoxvirus, uma elevada cultura de biossegurança, da formação técnica e da conformidade com normas internacionais constitui elemento central para uma resposta laboratorial eficaz, garantindo simultaneamente a proteção dos profissionais e a preparação nacional para futuras emergências biológicas.

#### 4. Objetivos

O MPXV tem evidenciado uma crescente relevância epidemiológica, especialmente após o surto multinacional de 2022, que demonstrou a sua capacidade de transmissão sustentada fora das regiões endémicas. A evolução recente de outros OPXV, como o vírus cowpox e o vírus vaccinia, reforça a necessidade de realizar estudos genómicos e seroepidemiológicos destes agentes e de fortalecer os sistemas laboratoriais capazes de os detetar e caracterizar de forma segura. (Antunes et al., 2022; Breman et al., 2002). Neste contexto, torna-se essencial integrar a investigação virológica do MPXV com a

avaliação das condições de biossegurança e bioproteção dos laboratórios portugueses que manipulam agentes biológicos de risco elevado, particularmente os de nível BSL-3.

Assim, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Desenvolver e aplicar metodologias laboratoriais para o diagnóstico, análise epidemiológica e caracterização genética do MPXV, incluindo a variabilidade genética e filogenética, nos casos suspeitos e confirmados do terceiro surto de mpox em Portugal.
2. Investigar o potencial de diagnóstico clínico incorreto de mpox através da análise dos casos negativos do primeiro surto, investigando a possibilidade de diagnóstico diferencial com varicela.
3. Determinar os títulos de anticorpos anti-OPXV em casos confirmados e não confirmados de mpox, durante o primeiro surto de mpox em Portugal, avaliando a resposta serológica associada.
4. Caracterizar as medidas de biossegurança e bioproteção implementadas nos laboratórios portugueses, com especial enfoque nos BSL-3, abrangendo, aspetos estruturais, operacionais, formativos e organizacionais, de forma a descrever a cultura de biossegurança e bioproteção e a preparação nacional para agentes biológicos de elevada perigosidade, como o MPXV.

## Capítulo II: Materiais e Métodos

### 1. Análise epidemiológica e caracterização genética do MPXV em amostras biológicas dos casos suspeitos e confirmados de mpox durante o terceiro surto em Portugal

#### 1.1 Amostras biológicas dos casos suspeitos e confirmados

As amostras biológicas estudadas foram colhidas de doentes com suspeita de infeção mpox, com base na observação clínica e de acordo com a Orientação Técnica N°4/2022, em unidades de saúde públicas e privadas distribuídas por todo o país (Direção Geral de Saúde, 2022b). As colheitas foram realizadas durante o terceiro surto em Portugal, que decorreu entre junho de 2024 e junho de 2025. Todas as amostras foram enviadas para UREB, no INSA, para deteção do MPXV, conforme previsto na mesma orientação técnica (Direção Geral de Saúde, 2022b). Após receção no laboratório, as amostras foram armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até ao seu processamento.

No total, foram analisadas 488 amostras clínicas provenientes de 297 doentes, nomeadamente: exsudados de lesão (n=286; 58,6%), exsudados orofaríngeos (n=139; 28,5%), exsudados anais (n=44; 9,0%), urina (n=4; 0,8%), e outras amostras (n=15; 3,1%), incluindo, exsudados genitais, sangue periférico e soro.

#### 1.2 Extração de DNA viral

A extração de DNA viral, a partir das amostras clínicas, foi realizada utilizando o kit comercial *ANDiS Viral RNA Auto Extraction & Purification* no equipamento *ANDiS 350 Automated Nucleic Acid Extraction System* (3DMed, Shanghai, China), de acordo com as instruções do fabricante (Anexo I).

A etapa de inativação do vírus foi realizada previamente num laboratório BSL-3, seguindo protocolos validados, assegurando as condições adequadas de contenção e manipulação segura das amostras.

#### 1.3 Deteção de OPXV e MPXV por PCR em Tempo Real

O diagnóstico laboratorial de mpox foi realizado por amplificação de ácidos nucleicos, seguindo as recomendações da OMS, que orientam a utilização de ensaios dirigidos a

regiões altamente conservadas do genoma de OPXV, seguidos da confirmação específica para MPXV quando aplicável (World Health Organization, 2024a). Em conformidade, as amostras foram inicialmente analisadas por PCR em tempo real para deteção de OPXV, sendo apenas as positivas submetidas a um ensaio específico para MPXV, minimizando o risco de falsos negativos associados a eventuais variações genómicas e assegurando a adequada interpretação dos casos suspeitos em contexto de surto.

A deteção inicial foi realizada por PCR em tempo real dirigida ao gene *rpo18*, específico de OPXV, conforme descrito anteriormente (Nitsche et al., 2004; Kurth et al., 2007).

A reação de PCR foi preparada num volume final de 25µl, contendo: 7µl de água livre de nucleases, 0,5µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 10µl de *AmpliTaq Gold™ Fast PCR Master Mix 2X* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos da América (EUA)), 1µl de cada *primer* (*rpo OPV F1* e *rpo OPV R1*, 10µM), 0,5µl de sonda (*rpo OPV TM*, 20µM) e 5µl de DNA da amostra ou de controlo positivo e negativo. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas na tabela 3.

Tabela 3. *Primers* e sondas utilizados na reação de amplificação de OPXV, MPXV e genoma humano. (Nitsche et al., 2004; Shchelkunov et al. 2011, Kurth et al., 2007).

<b>Região genómica</b>	<b>Nome do <i>primer</i></b>	<b>Sequência (5'→3')</b>
rpo18	rpo OPV F1	ctgtagttataaacgttccgtgtg
	rpo OPV R1	ttatcatacgcattaccatttcga
	rpo OPV TM	5'-6FAM-atcgctaaatgatacagtagtaccgaaxtctctact-PH
B7R	MPXV_B7R_forward	acgtgttaaaccaatgggtgatg
	MPXV_B7R_reverse	aacatttccatgaatcgtagtcc
	MPXV_B7R_probe	5'-5TAMRA-tgaatgaatgcgatactgtatgtgtggg-BHQ2
RNaseP	RNaseP_F	agatttgacactgcgagcg
	RNaseP_R	gagcggctgtctccacaagt
	RNaseP_P	5'-6FAM-ttctgacctgaaggctctgcgcg-BBQ

A confirmação da infeção por MPXV foi realizada pela deteção do gene B7R, conforme descrito anteriormente (Shchelkunov et al., 2011).

A mistura reacional foi preparada num volume final de 25µl, contendo: 2,9µl de água livre de nucleases, 3,5µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 10µl de *AmpliTaq Gold™ Fast PCR Master Mix 2X* (Thermo Fisher Scientific), 0,75µl de cada *primer* (MPXV\_B7R\_forward, MPXV\_B7R\_reverse, RNaseP\_F e RNaseP\_R, 10µM) e 0,3µl de cada sonda (MPXV\_B7R\_probe e RNaseP\_P, 20µM), e 5µl de DNA da amostra ou de controlo positivo e negativo.

A reação de amplificação, para ambas as misturas reacionais de OPXV e MPXV, consistiu num ciclo inicial de 10 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos constituídos por 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 58°C, realizada num termociclador *CFX Opus Real-Time PCR System* (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Nas reações de amplificação foram incluídos os seguintes controlos: positivo (DNA de uma estirpe do MPXV), negativo (água livre de nucleases) e interno (amplificação do gene humano *RNase\_P*).

Para a análise dos resultados, verificou-se a presença de curvas de amplificação nos seguintes canais de leitura: FAM, para deteção de OPXV e *RNase P*, e ROX, para MPXV. Os resultados da deteção de OPXV e MPXV foram definidos como negativo ( $Ct \geq 40$ ), fracamente positivo ( $35 \leq Ct < 40$ ) ou positivo ( $Ct < 35$ ). Os controlos positivo, negativo e interno foram avaliados em cada corrida, garantindo a validade técnica dos resultados. A confirmação laboratorial da infeção por MPXV foi estabelecida com base na obtenção de pelo menos uma amostra positiva por PCR.

Para a análise estatística, as características das amostras entre os grupos positivo e negativo foram comparadas utilizando o teste *Fisher's exact*, com um nível de significância de  $p < 0,05$ , recorrendo ao *GraphPad QuickCalcs* (GraphPad Software, 2025).

## 1.4 Genotipagem do MPXV

### 1.4.1 Clades

Considerando o surgimento do clade Ib na Europa, foram implementados ensaios adicionais para diferenciação entre os clades I e II do MPXV, bem como um ensaio específico para o clade Ib, para aplicação em amostras eventualmente positivas para o clade I.

A diferenciação entre os clades I e II foi realizada por PCR em tempo real, utilizando um protocolo distribuído pela rede DURABLE – *Research Network against Epidemics* (não publicado). A mistura de PCR foi realizada num volume final de 20µl, contendo: 8,6µl de água livre de nucleases, 5µl de *TaqMan<sup>™</sup> Fast Virus 1-Step Multiplex Master Mix (NO ROX<sup>™</sup>)* (Thermo Fisher Scientific), 0,5µl de cada *primer* (MPXV\_F3L forward e MPXV\_F3L rev3, 10µM), 0,2µl de cada sonda (MPXV\_F3L CL1 pr e MPXV\_F3L CL2 pr, 20µM) e 5µl de DNA de amostra ou de controlo positivo e negativo.

A reação de amplificação consistiu num ciclo inicial de 1 minuto a 95°C, seguido de 50 ciclos constituídos por 10 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C, e foi realizada num termociclador *CFX Opus Real-Time PCR System* (Bio-Rad).

A deteção específica do clade Ib foi também realizada por PCR em tempo real, conforme descrito anteriormente (Schuele et al., 2024). A mistura de PCR foi realizada num volume final de 20µl, contendo: 3,2µl de água livre de nucleases, 10µl de *TaqMan<sup>tm</sup> Universal PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 0,8µl de cada *primer* (Mpox-K-F e Mpox-K-R, 10µM), 0,2µl de sonda (Mpox-K-P, 20µM) e 5µl de DNA de amostra ou de controlo positivo e negativo. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas na tabela 4.

Tabela 4 *Primers* e sondas utilizados nas reações de amplificação dos clades I, II e Ib do MPXV (Schuele et al., 2024).

<b>Região genómica</b>	<b>Nome do <i>primer</i></b>	<b>Sequência (5'→3')</b>
F3L	MPXV_F3L_forward	catctattatagcatcagcatcaga
	MPXV_F3L_rev3	tgcggttattaaaaacattggactaag
	MPXV_F3L_CL1_pr	5'-atto425-cgtcgggaactgtacacatagtag-BHQ1
	MPXV_F3L_CL2_pr	5'-atto532-Cgttggagctgtaaaccatagcac-BHQ1
FD14-16	Mpox-K-F	aagacttccaaacttaatcactcct
	Mpox-K-R	cgtttgatatagcatgtggacattt
	Mpox-K-P	5'-6FAM-atattcaggcgcataccaccacgt-BHQ1

A reação de amplificação consistiu num ciclo inicial de 5 minutos a 50°C, seguido de 20 segundos a 94°C, seguidos de 45 ciclos constituídos por 3 segundos a 94°C e 30 segundos a 60°C, e foi realizada num termociclador *CFX Opus Real-Time PCR System* (Bio-Rad). Nas reações de amplificação foram incluídos os seguintes controlos: positivo (DNA de uma estirpe do MPXV do clade I, clade II e clade Ib) e negativo (água livre de nucleases). A análise dos resultados, baseou-se na deteção de curvas de amplificação nos canais de leitura: FAM, para deteção do MPXV do clade I e clade Ib, e VIC, para MPXV do clade II.

### 1.4.2 Linhagens

A identificação das linhagens do MPXV foi efetuada por sequenciação genómica completa e análise filogenética, com o objetivo de caracterizar a diversidade genética dos vírus em circulação em Portugal durante o período em estudo.

A amplificação do DNA viral foi realizada utilizando um esquema baseado em amplicões, conforme descrito anteriormente (Chen et al., 2023). Para cada amostra, foram realizadas

duas reações independentes contendo: 3,7µl da respetiva *primer pool* (1,5µM por *pool* na reação final), juntamente com 12,5µl de *NEB Next Q5 Hot Start HiFi PCR Master Mix* (New England Biolabs, Massachusetts, EUA), 3,8µl de água livre de nucleases e 5µl de DNA, num volume final de reação de 25µl. As condições de amplificação por PCR foram: 3 minutos a 98°C, seguidos de 35 ciclos de 15 segundos a 98°C e 5 minutos a 63°C. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se descritas numa tabela disponível no [link: https://docs.google.com/spreadsheets/d/1I\\_IlxTxai89WCKh6HDSoim8X7yWjXXAj/edit?usp=sharing&oid=116434341296103375583&rtpof=true&sd=true](https://docs.google.com/spreadsheets/d/1I_IlxTxai89WCKh6HDSoim8X7yWjXXAj/edit?usp=sharing&oid=116434341296103375583&rtpof=true&sd=true).

Os produtos de PCR de cada amostra foram depois combinados (*pooled*) e entregues à Unidade de Tecnologia e Inovação (*core-facility* de sequenciação) do INSA onde foram submetidos ao protocolo de preparação de bibliotecas de sequenciação com o kit *Nextera XT DNA Library Prep* (Illumina, Califórnia, EUA) com desvios de otimização como, por exemplo, a purificação dos produtos amplificados de acordo com o protocolo como previamente descrito (Quick, 2020). De seguida, as bibliotecas foram sequenciadas no equipamento *MiSeq System* (Illumina), definindo o comprimento máximo de leituras (*reads*, porções de fragmentos sequenciados) de 150pb.

Os dados gerados na sequenciação, os *reads*, foram então carregados na plataforma *INSaFLU* (<https://insaflu.insa.pt/>) e as sequências *consensus* dos genomas foram obtidas por montagem com base numa sequência de referência (*reference-based assembly*) como previamente descrito (Borges et al., 2018). De referir, que foi necessária uma etapa adicional de remoção das porções relativas às sequências dos *primers* em todos os *reads* (*primer clipping*) utilizando o software *iVar* (Grubaugh et al., 2019) após o alinhamento genómico, e conforme implementado no *INSaFLU* (v2.0) (Santos et al., 2024). As sequências *consensus* dos genomas resultantes foram consideradas para análises posteriores se mais de 90% apresentasse cobertura superior a 10x, ou seja, se mais de 90% das posições nucleotídicas do genoma fossem suportadas por pelo menos 10 *reads*. A classificação das sub-linhagens do MPXV seguiu a nomenclatura internacional proposta em <https://github.com/mpxv-lineages>.

A árvore filogenética global foi construída utilizando o software *IQ-TREE* (Nguyen et al., 2015), incluindo todas as sequências *consensus* portuguesas de amostras no período entre junho de 2024 e junho de 2025 (n=27). A árvore foi gerada utilizando o módulo hMPXV-1 da plataforma Nextstrain (Hadfield et al., 2018), disponível no *INSaFLU* ([https://github.com/INSaFLU/nextstrain\\_builds/tree/main/mpx](https://github.com/INSaFLU/nextstrain_builds/tree/main/mpx)) (Borges et al., 2018).

Em resumo, as sequências *consensus* foram alinhadas com a ferramenta Nextalign contra a referência MPXVM5312\_HM12\_Rivers ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_063383](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_063383)), mascarando várias regiões do genoma, incluindo os primeiros 800 e os últimos 6422pb, além de várias regiões repetitivas de extensão variável. A reconstrução filogenética realizada com o software *IQ-TREE*, foi seguida pela reconstrução de estados ancestrais e inferência temporal usando a ferramenta TreeTime (Sagulenko et al., 2018). Por fim, as linhagens hMPXV1 foram atribuídas utilizando os marcadores especificados em [https://github.com/INSAFLU/nextstrain\\_builds/blob/main/mpx/config/clades.tsv](https://github.com/INSAFLU/nextstrain_builds/blob/main/mpx/config/clades.tsv). Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados com recurso a métodos validados e assegurando condições adequadas de biossegurança, garantindo a fiabilidade dos resultados obtidos ao longo do estudo.

## **2. Investigação do potencial de diagnóstico clínico incorreto de mpox no diagnóstico diferencial com varicela**

Com o objetivo de investigar o potencial de diagnóstico clínico incorreto de mpox, foram analisadas para a deteção de VZV todas as amostras negativas para MPXV colhidas durante o primeiro surto de mpox em Portugal, período compreendido entre maio e dezembro de 2022.

Foram analisados exsudados de lesões de 484 doentes com idades entre 0 e 39 anos. Os doentes provenientes de consultas de IST de alto risco foram excluídos, de modo a focar a análise numa população geral com lesões cutâneas, evitando enviesamentos relacionados com comportamentos de risco elevado ou com condições imunológicas ou clínicas subjacentes.

A deteção de VZV foi realizada por PCR em tempo real, amplificando o gene codificador da proteína gp19, utilizando o kit *ARGENE HSV1&2 VZV R-GENE* (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, França), de acordo com as instruções do fabricante. A mistura de PCR foi realizada para um volume final de 20µl contendo: 15µl da mistura de amplificação e 5µl de DNA de amostra a analisar. A reação de amplificação consistiu num ciclo inicial de 15 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos constituídos por 10 segundos a 95°C e 40 segundos a 60°C, e foi realizada num termociclador *CFX Opus Real-Time PCR System* (Bio-Rad). Em todas as reações de amplificação foram incluídos os seguintes controlos: positivo (QS3), negativo (W0), interno (IC2) e de sensibilidade (SC), garantindo a validade técnica

dos resultados. A análise dos resultados baseou-se na presença de curvas de amplificação nos seguintes canais de leitura: FAM, para deteção de VZV, e VIC, para IC2. Os resultados da deteção de VZV foram considerados positivos quando a amplificação apresentou um valor de Ct inferior ao do controlo SC.

### **3. Determinação dos títulos de anticorpos IgG anti- OPXV utilizando a técnica ELISA**

A quantificação de anticorpos IgG específicos para OPXV foi realizada em amostras de soro provenientes de casos confirmados e não confirmados de mpox em Portugal, recolhidas entre 2022 e 2025, com o objetivo de avaliar a resposta imunitária humoral na população estudada. No total, foram analisados 346 soros de casos confirmados e 179 de casos não confirmados de mpox. Para a definição de *cut-off*, foram incluídos 18 soros de indivíduos não vacinados e sem historial prévio de infeção por OPXV, utilizados como população-controlo.

Este estudo foi conduzido de acordo com os padrões éticos e aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde do INSA (Aprovação n.º 179/2025). Todas as amostras foram anonimizadas, não tendo sido acedidos quaisquer dados pessoalmente identificáveis.

A deteção de anticorpos IgG anti-OPXV foi realizada por ELISA utilizando o kit *Human ANTI-MPV IgG ELISA (FineTest)*, Hubei, China), segundo as instruções do fabricante (Anexo II). A leitura ótica foi efetuada a 450nm, sendo a concentração de anticorpos nas amostras determinada pela criação de uma curva logística de quatro parâmetros, utilizando a plataforma online *MyAssays* (<https://www.myassays.com/>), de acordo com as instruções do fabricante (Anexo II). As amostras foram consideradas positivas sempre que o valor obtido excedeu o *cut-off* estabelecido.

A análise estatística e a visualização dos dados obtidos foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism* (versão 8.3.0), considerando-se estatisticamente significativo um valor de  $p < 0,05$  (*two-sided*). As comparações entre grupos positivos e negativos foram efetuadas através dos testes *chi-square* ou *Fisher's exact*, conforme aplicável. Para a comparação das concentrações de anticorpos IgG entre os diferentes grupos etários, foi utilizado o teste de *Kruskal–Wallis*.

#### 4. Caracterização das medidas de biossegurança e bioproteção implementadas nos laboratórios em Portugal

A caracterização das medidas de biossegurança e bioproteção em Portugal foi realizada através da aplicação de dois questionários distintos, dirigidos a profissionais com atividades laboratoriais em Portugal. O objetivo consistiu em analisar aspetos estruturais e organizacionais, formação técnico-científica, sensibilização e práticas de segurança, bem como a existência de códigos de conduta e medidas de proteção face ao risco biológico.

Os questionários foram elaborados na plataforma *Google Forms* (<https://docs.google.com/forms/u/0/>) e distribuídos a instituições nacionais com atividade laboratorial relevante na área das ciências da vida.

##### 4.1 Avaliação da cultura de biossegurança, bioproteção e conduta responsável

A avaliação da cultura de biossegurança e bioproteção e conduta responsável, foi realizada através do questionário intitulado “*Culture of Biosafety, Biosecurity and Responsible Conduct in the Life Sciences*”, adaptado da ferramenta desenvolvida pelo *International Working Group on Strengthening the Culture of Biosafety, Biosecurity, and Responsible Conduct in the Life Sciences* (International Working Group on Strengthening the Culture of Biosafety, Biosecurity, and Responsible Conduct in the Life Sciences, 2020).

O questionário foi enviado a diversas universidades e laboratórios portugueses, com o objetivo de avaliar as perceções, atitudes e práticas de biossegurança e bioproteção entre estudantes e profissionais que desempenham funções laboratoriais. As respostas foram recolhidas de forma anónima, não sendo obtida qualquer informação que permitisse a identificação dos participantes. O instrumento de recolha encontra-se disponível em: [https://drive.google.com/file/d/116-y89QkvEVakW3GLPUCY1\\_JfvYeCHaK/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/116-y89QkvEVakW3GLPUCY1_JfvYeCHaK/view?usp=sharing).

Os participantes responderam a itens estruturados segundo uma escala *Likert*, com valores de 0 a 5, permitindo a quantificação de cada elemento avaliado e a obtenção de dados brutos para análise estatística. A atribuição de uma escala cromática possibilitou a interpretação visual do estado geral da cultura organizacional, correspondendo: 0-1 a vermelho, 2-3 a amarelo e 4-5 a verde (Figura 1), refletindo gradualmente níveis inferiores ou superiores de maturidade da cultura em biossegurança e bioproteção.

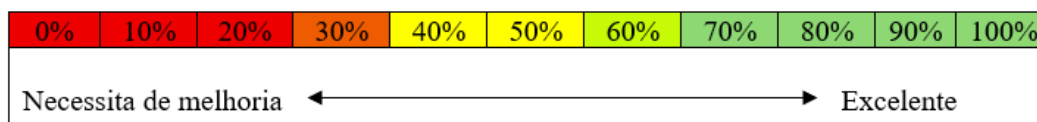


Figura 15. Escala cromática utilizada para representar graficamente os níveis de maturidade da cultura de biossegurança, bioproteção e conduta responsável.

#### 4.2 Avaliação da implementação dos sistemas de gestão de risco biológico nos laboratórios BSL-3 de Portugal

A avaliação da implementação dos sistemas de gestão de risco biológico nos laboratórios BSL-3 em Portugal foi realizada utilizando o questionário intitulado “*European Checklist for Laboratory Biorisk Management in Handling of High Consequence Risk Group 3 and 4 Agents (ECL-Biorisk)*”. Esta ferramenta desenvolvida e acordada por 29 laboratórios europeus BSL-3 e seis laboratórios BSL-4 no âmbito da ação conjunta “*Quality Assurance Exercises and Networking on the Detection of Highly Infectious Pathogens – QUANDHIP*” (Robert Koch-Institut & EMERGE, 2013) segue normas e orientações internacionalmente reconhecidas para avaliação de desempenho em gestão de risco biológico.

O questionário abrangeu aspetos relacionados com a biossegurança, bioproteção, conceção, operação, manutenção e desativação das instalações, bem como a formação, competência e práticas do pessoal, de acordo com normas e orientações internacionalmente reconhecidas. O questionário foi enviado aos 32 laboratórios BSL-3 identificados em 22 instituições nacionais, com o objetivo de caracterizar o estado atual da aplicação de sistemas de biossegurança e bioproteção em Portugal. O instrumento de recolha encontra-se disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1oRtq-3GFDHTn2PKve4P2YXOsYIIP07Rf/view?usp=sharing>.

Os participantes responderam a cada item com uma das seguintes opções: “sim”, “não”, “não sei” ou “não se aplica”, permitindo caracterizar o nível de implementação de cada requisito.



### Capítulo III: Resultados

#### 1. Análise epidemiológica e caracterização genética do MPXV em amostras biológicas dos casos suspeitos e confirmados de mpox durante o terceiro surto em Portugal

Para a análise das amostras biológicas de casos suspeitos e confirmados de mpox durante o terceiro surto em Portugal, foram processadas no INSA, 488 amostras provenientes de 297 casos suspeitos. Entre junho de 2024 e junho de 2025, um total de 42 desses casos foram confirmados para MPXV.

As Figuras 16 e 17 mostram perfis de amplificação representativos da deteção de OPXv e MPXV, respetivamente.

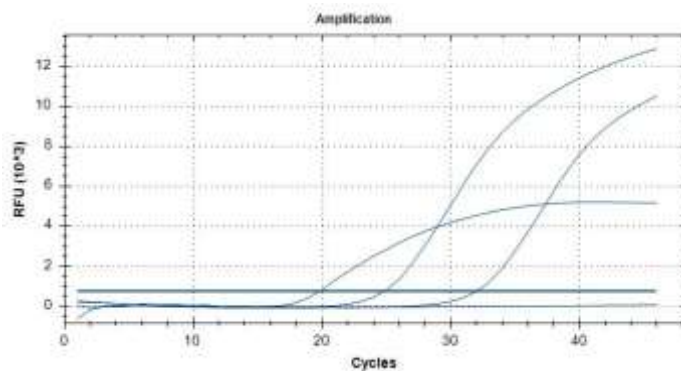


Figura 16. Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real para um caso positivo de OPXV (Ct=20), controlo positivo (Ct=26) e controlo interno RNase P do caso positivo (Ct=31), leitura realizada no canal FAM. No controlo negativo não se obteve curva de amplificação.

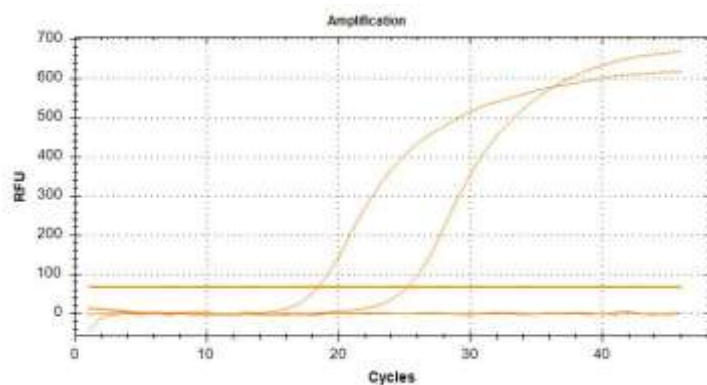


Figura 17. Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real para um caso positivo de MPXV (Ct=18) e controlo positivo (Ct=25), leitura realizada no canal ROX. No controlo negativo não se obteve curva de amplificação.

Em termos epidemiológicos, todos os casos ocorreram em doentes do sexo masculino (n=42; 100,0%), com uma idade mediana de 34 anos (intervalo: 20–59 anos). A maioria correspondia a jovens adultos, sendo 71,4% (n=30) dos casos registados em doentes entre os 20 e os 39 anos (Tabela 5).

Geograficamente, a maioria dos casos concentrou-se na Área Metropolitana de Lisboa (n=19; 45,2%) e na região Norte (n=15; 35,7%), tendo sido detetados apenas casos esporádicos nas regiões Centro, Algarve, Açores e Madeira. Não foram reportados casos na região do Alentejo (Tabela 5).

Tabela 5. Dados demográficos dos casos positivos referentes ao terceiro surto de MPXV.

<b>Dados demográficos</b>	<b>Número de casos positivos (%)</b>
<b>Sexo</b>	
Masculino	42 (100,0)
Feminino	0
<b>Grupo etário</b>	
20 - 29	11 (26,2)
30 - 39	19 (45,2)
40 - 49	9 (21,4)
50 - 59	3 (7,1)
<b>Região NUTS*</b>	
Região do Norte	15 (35,7)
Região Central	3 (7,1)
Área Metropolitana de Lisboa	19 (45,2)
Região do Alentejo	0
Região do Algarve	3 (7,1)
Região Autónoma dos Açores	1 (2,4)
Região Autónoma da Madeira	1 (2,4)
<b>Total</b>	<b>42</b>

\*A Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos (NUTS) é desenvolvida pelo Eurostat e é utilizada tanto em Portugal como em toda a União Europeia para fins estatísticos.

A distribuição temporal evidenciou um aumento no número de casos suspeitos, coincidindo com os alertas internacionais. No entanto, este incremento não se traduziu num aumento proporcional de casos confirmados, tendo sido detetados apenas três casos positivos durante as semanas correspondentes a esse pico (Figura 18). Este padrão sugere

uma testagem com precaução excessiva, e não uma diminuição da vigilância, uma vez que a atividade de testagem se manteve consistente.

A taxa de positividade global foi baixa ( $n=42/297$ ; 14,1%), refletindo uma transmissão limitada de mpox durante o período em estudo.

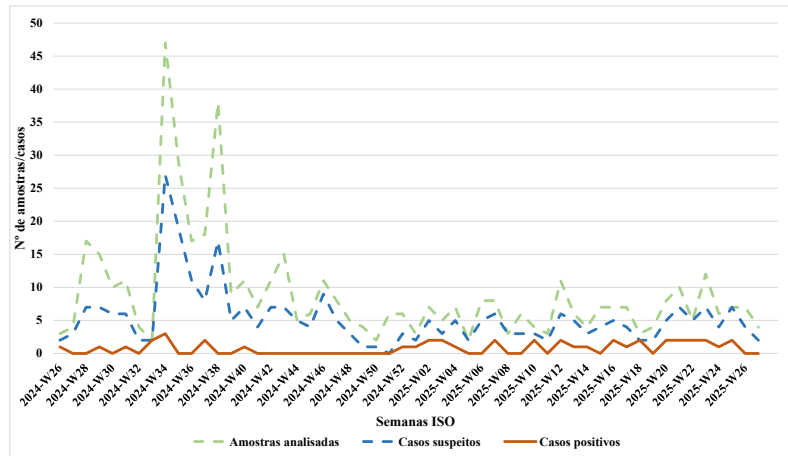


Figura 18. Distribuição temporal do número de amostras biológicas analisadas e de casos suspeitos no INSA, durante o terceiro surto de MPXV. A linha a vermelho indica os casos confirmados.

O MPXV foi detetado em 488 amostras de 42 doentes. Para avaliar a precisão diagnóstica dos diferentes tipos de amostras na deteção de MPXV, foram analisadas todas as amostras, independentemente do resultado (i.e. positivas, negativas e indeterminadas,  $n=63$ ) dos 42 doentes com diagnóstico de mpox confirmado. Assim, verificou-se que a taxa de positividade foi superior no exsudado de lesão ( $n=42/43$ ; 97,7%) e no exsudado anal ( $n=4/4$ ; 100,0%), quando comparada com o exsudado orofaríngeo ( $n=9/16$ ; 56,3%) (Figura 19).

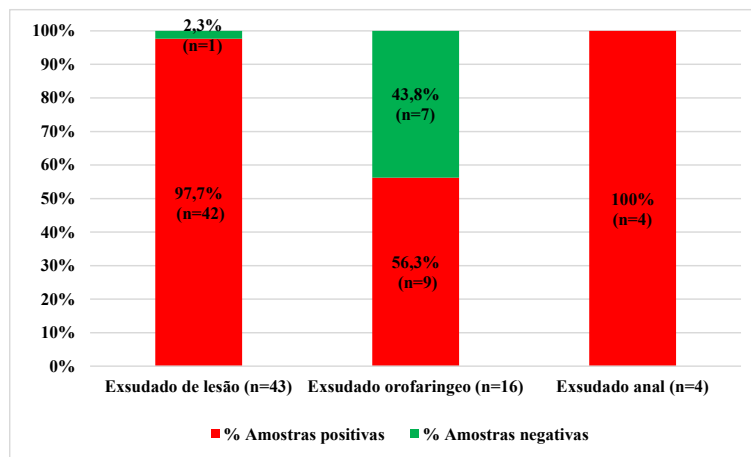


Figura 19. Taxa de positividade nos diferentes tipos de amostras dos 42 casos positivos, do terceiro surto de mpox.

Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0002$ ) na taxa de positividade entre os exsudados de lesão e orofaríngeo (Figura 20). Relativamente às amostras de exsudados de lesão e anal, apresentaram valores medianos de Ct mais baixos (Ct=21 e Ct=22,5, respetivamente), compatíveis com cargas virais mais elevadas em comparação com os exsudados orofaríngeos (Ct=29) (Figura 20).

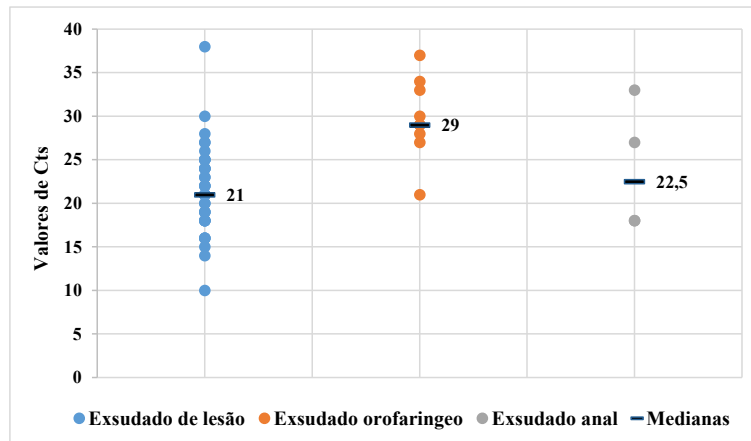


Figura 20. Carga viral de MPXV nas amostras positivas, expressa em valores de Ct.

Todas as amostras positivas para MPXV foram analisadas para diferenciação de clades, tendo sido identificada exclusivamente a circulação do clade II em Portugal, durante o período do estudo. Nenhuma amostra apresentou resultado de clade I, pelo que não se aplicou o ensaio específico dirigido ao clade Ib.

A Figura 21 apresenta as curvas de amplificação referentes à diferenciação dos clades de MPXV. O ensaio permite distinguir entre o clade I e o clade II com base em alvos genéticos específicos detetados nos canais FAM e VIC, respetivamente.

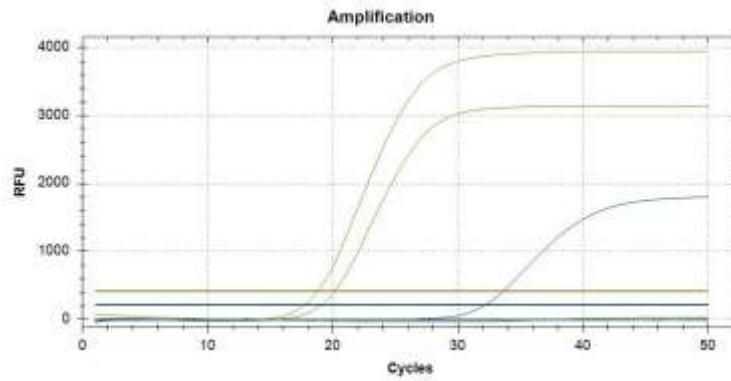


Figura 21. Curvas de amplificação obtidas por PCR em tempo real para a diferenciação dos clades de MPXV. O canal VIC (a verde) apresenta amplificação correspondente a um caso positivo para o clade II (Ct=19) e para o controlo positivo (Ct=20). No canal FAM, observou-se amplificação apenas do controlo positivo (Ct=31), enquanto o controlo negativo permaneceu sem amplificação.

A Figura 22 apresenta o resultado do ensaio de deteção do clade Ib de MPXV.

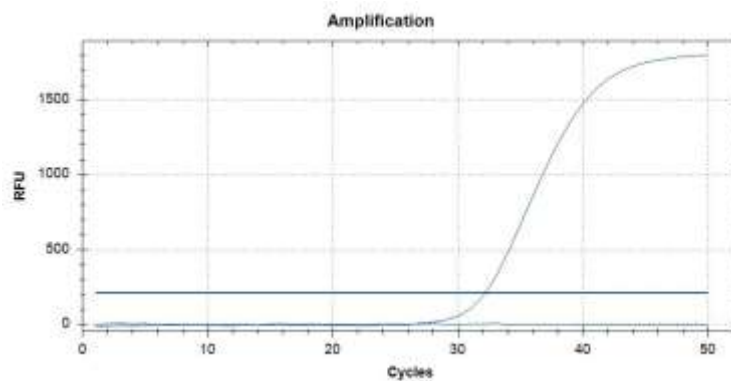


Figura 22. Curva de amplificação obtida por PCR em tempo real para o controlo positivo (Ct=31), leitura realizada no canal FAM. No controlo negativo não se obteve curva de amplificação.

Foi possível realizar a sequenciação total do genoma em 37 amostras positivas para MPXV. A mediana dos valores de Ct destas amostras foi de 21 (intervalo: 10–30), suportando a adequação do material para sequenciação.

A classificação das sequências demonstrou a circulação de múltiplas sublinhagens do clade Ib, sendo a mais prevalente a F.4 (43,2%), seguida pela E.1 (24,3%) e F.2 (10,8%), conforme apresentado na Tabela 6 e Figura 23. As sublinhagens menos frequentes incluíram B.1.23, D.1, C.1, E.3 e F.1. (2,7-5,4%). E um caso (2,7%) não foi classificado. Foi identificado um caso pertencente à sublinhagem A.2.1, constituindo o segundo caso não pertencente à linhagem B.1 reportado em Portugal até ao momento (Tabela 2 e Figura 8).

Tabela 6. Distribuição de sublinhagens de MPXV identificadas em Portugal, entre junho de 2024 e junho de 2025.

Sublinhagens do clade IIb	Número de casos (%)
F.4	16 (43,2)
E.1	9 (24,3)
F.2	4 (10,8)
D.1	2 (5,4)
A.2.1	1 (2,7)
B.1.23	1 (2,7)
C.1	1 (2,7)
E.3	1 (2,7)
F.1	1 (2,7)
Não identificada	1 (2,7)
<b>Total</b>	<b>37 (100,0)</b>

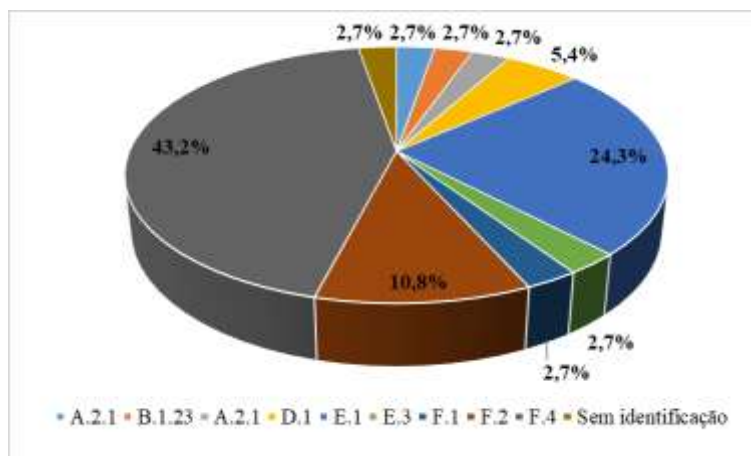


Figura 23. Sublinhagens do MPXV identificadas durante o terceiro surto do MPXV, desde junho de 2024 a junho de 2025.

Foram obtidas com sucesso sequências de consenso quase completas do genoma ( $\geq 90\%$  de cobertura genómica a  $\geq 10X$ ) para 27 destas amostras, as quais foram utilizadas para construir uma árvore filogenética no Nextstrain (Figura 24).

A análise filogenética demonstrou que o terceiro surto em Portugal resultou de múltiplas introduções independentes, refletindo a diversidade de sublinhagens em circulação durante esse período (Figura 24). As sequências obtidas agruparam-se em várias sublinhagens, incluindo B.1.23, F.2, F.4, E.1, D.1 e A.2.1, sugerindo origens distintas das cadeias de transmissão. Entre estas, a sublinhagem F.4 formou um *cluster* bem definido, composto maioritariamente por amostras portuguesas com colheita em 2025, o que indica transmissão local sustentada e possível evolução viral contínua após a introdução inicial.

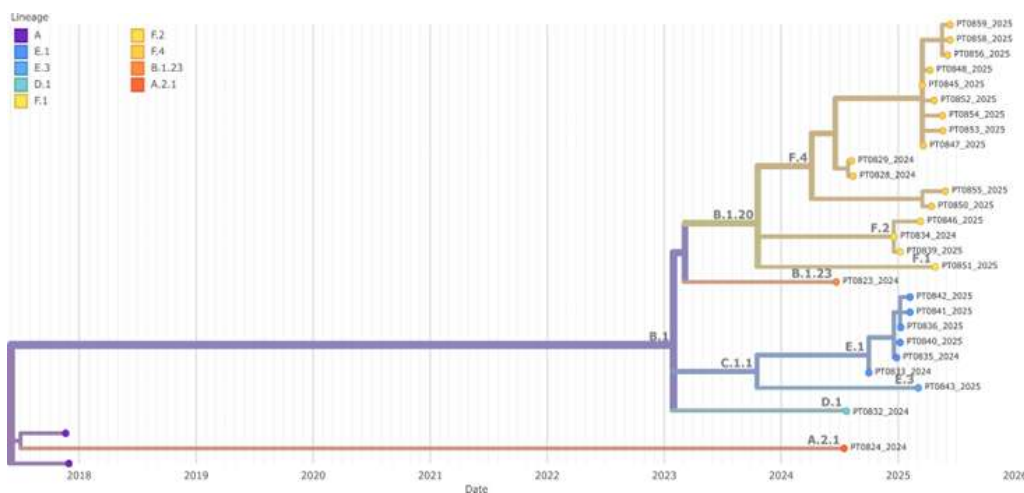


Figura 24. Árvore filogenética temporal construída no Nextstrain, incluindo as sequências de MPXV (n=27) obtidas em Portugal durante o período de estudo (junho de 2024 e junho de 2025). A árvore está enraizada nas duas referências utilizadas na construção do Nextstrain (MK783030 e MK783032).

Em contraste, as restantes linhagens apresentaram apenas um número reduzido de amostras e não evidenciaram diversificação local, sendo compatíveis com eventos de introdução isolados sem estabelecimento de cadeias de transmissão prolongadas.

## 2. Investigação do potencial de diagnóstico clínico incorreto de mpox no diagnóstico diferencial com varicela

Durante o primeiro surto de mpox em Portugal, observou-se uma sobreposição significativa entre as manifestações clínicas de mpox, como febre e lesões cutâneas vesiculares, e as apresentadas na varicela, causada pelo VZV. Esta semelhança clínica aumentou a probabilidade de classificação incorreta dos casos quando não era realizada a confirmação laboratorial específica.

Para avaliar o impacto deste possível diagnóstico clínico incorreto, foram testadas para VZV as amostras de lesão negativas para MPXV (n=484), colhidas entre maio e dezembro de 2022, período correspondente ao primeiro surto de mpox em Portugal.

Das amostras analisadas, 119 (24,6%) foram positivas para VZV, indicando que cerca de um em cada quatro casos negativos para mpox correspondia, na verdade, a infeções por varicela.

A maioria dos doentes positivos para VZV era do sexo masculino (n=91/119; 76,5%), com uma idade mediana de 27 anos, sendo que 53,8% (n=64/119) pertenciam ao grupo etário dos 20–29 anos (Tabela 7). Os casos positivos foram registados em todo o território nacional, com 55,5% (n=66/119) concentrados na Área Metropolitana de Lisboa.

A testagem para MPXV atingiu o pico em agosto, coincidindo com o aumento da sensibilização pública e clínica, enquanto a deteção de VZV apresentou o seu pico em junho, em consonância com o padrão sazonal conhecido da varicela em Portugal (Tabela 8 e Figura 25).

A taxa mensal de positividade para VZV variou significativamente, com o valor mais baixo observado em outubro (n=3/85; 8,6%) e os mais elevados em novembro e dezembro (cerca de 42%). Estes dados sugerem que uma proporção substancial dos casos inicialmente suspeitos de mpox, sobretudo nos meses mais tardios, correspondia, na realidade, a infeções por VZV.

Tabela 7. Dados demográficos dos casos positivos de VZV, durante o primeiro surto de MPXV em Portugal

<b>Dados demográficos</b>	<b>Número de casos VZV positivos (%)</b>
<b>Sexo</b>	
Masculino	91 (76,5)
Feminino	28 (23,5)
<b>Grupo etário</b>	
0 - 9	5 (4,2)
10 - 19	8 (6,7)
20 - 29	64 (53,8)
30 - 39	42 (35,3)
<b>Região NUTS*</b>	
Região do Norte	31 (26,1)
Região Central	8 (6,7)
Área Metropolitana de Lisboa	66 (55,5)
Região do Alentejo	0
Região do Algarve	11 (9,2)
Região Autónoma dos Açores	0
Região Autónoma da Madeira	3 (2,5)
<b>Total</b>	<b>119</b>

\*A Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos (NUTS) é desenvolvida pelo Eurostat e é utilizada tanto em Portugal como em toda a União Europeia para fins estatísticos.

Tabela 8. Distribuição mensal do número de amostras analisadas e dos resultados de PCR de VZV, em 2022.

Mês/2022	Nº de amostras	Nº casos VZV positivo (%)	Nº casos VZV Negativo (%)
mai/22	32	7 (21,9)	25 (78,1)
jun/22	86	33 (38,4)	53 (61,6)
jul/22	89	20 (22,5)	69 (77,5)
ago/22	129	28 (21,7)	101 (78,3)
set/22	73	11 (15,1)	62 (84,9)
out/22	35	3 (8,6)	32 (91,4)
nov/22	19	8 (42,1)	11 (57,9)
dez/22	21	9 (42,9)	12 (57,1)
<b>Total</b>	<b>484</b>	<b>119</b>	<b>365</b>

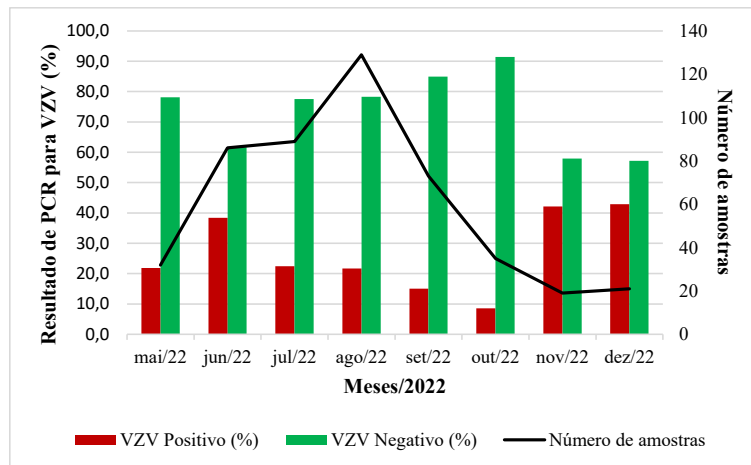


Figura 25. Distribuição mensal dos resultados de PCR para detecção de VZV, nas amostras analisadas em 2022. A linha preta representa o número total de amostras testadas por mês.

### 3. Determinação dos títulos de anticorpos IgG anti- OPXV utilizando a técnica ELISA

Para a determinação dos títulos de anticorpos IgG anti-OPXV, foram analisadas 525 amostras de soro provenientes de 346 casos confirmados de mpox e 179 casos não confirmados por PCR em tempo real, colhidas durante o primeiro surto de mpox em Portugal. Adicionalmente, foram incluídos 18 indivíduos saudáveis não vacinados, sem historial conhecido de exposição a OPXV, que constituíram a população controlo utilizada para a definição do valor de referência do ensaio. A seleção deste grupo permitiu estabelecer um valor basal de reatividade esperado na ausência de contacto prévio com OPXV, assegurando a definição rigorosa do *cut-off* para interpretação do ensaio

serológico. Todos os participantes do grupo controlo integraram o estudo de forma voluntária, mediante obtenção de consentimento informado.

A deteção de IgG anti-OPXV foi realizada por ELISA utilizando o kit comercial, cujo antigénio consiste numa proteína recombinante do MPXV. As concentrações de IgG foram determinadas através de uma curva logística de quatro parâmetros.

A partir da população controlo, foi estabelecido um *cut-off* de 6,6 ng/mL, abaixo do qual se situaram todas as amostras deste grupo (Figura 26).

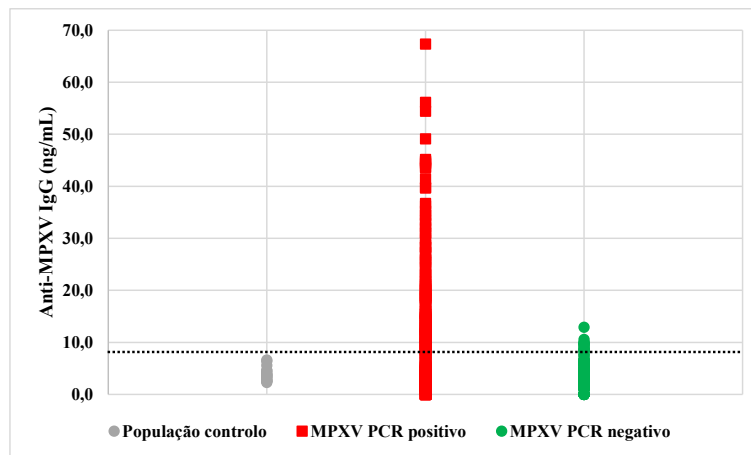


Figura 26. Distribuição dos títulos de anticorpos IgG anti-MPXV (ng/mL) nos três grupos estudados: população controlo (cinzento), casos MPXV PCR positivos (vermelho) e casos MPXV PCR negativos (verde). A linha tracejada representa o valor de *cut-off* (6,6 ng/mL) determinado a partir da população controlo.

Entre os casos confirmados de mpox por PCR, 189/346 (54,6%) apresentaram títulos de IgG anti-MPXV superiores ao *cut-off* previamente definido, exibindo uma ampla variabilidade, incluindo respostas humorais robustas. Nos casos não confirmados, apenas 18/179 (10,1%) ultrapassaram este valor, apresentando maioritariamente títulos baixos ou próximos do limiar.

No total de amostras analisadas (n=525), 207 (39,4%) casos apresentaram títulos superiores ao *cut-off*, enquanto 318 (60,6%) permaneceram abaixo do mesmo (Figura 27). Entre os casos com valores superiores ao *cut-off* (n=207), a mediana foi de 14,20 ng/mL, com um intervalo de 6,9–67,3 ng/mL. Nos doentes com valores iguais ou inferiores ao *cut-off* (n=318), a mediana foi de 2,65 ng/mL, com um intervalo entre 0–6,6 ng/mL. A comparação estatística entre os dois grupos revelou uma diferença altamente significativa ( $p < 0,0001$ ), confirmando que os doentes com títulos acima do *cut-off* apresentam níveis de anticorpos significativamente superiores aos doentes abaixo desse valor (Figura 27).

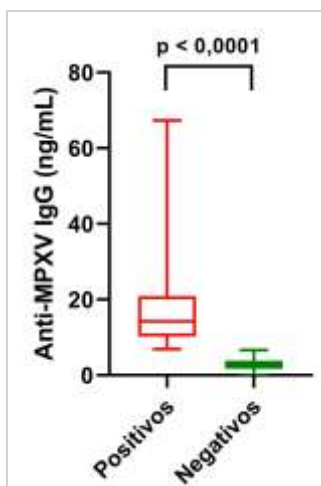


Figura 27. Concentrações de anticorpos IgG nos doentes com título positivo (n=207) e negativo (n=318). A linha central representa a mediana; os limites da caixa correspondem ao intervalo interquartil (IQR) e as extensões indicam os valores mínimo e máximo.

Em termos epidemiológicos, observou-se um predomínio marcado de casos com título positivo de anticorpos IgG no sexo masculino, que representou 98,5% do total (n = 204), enquanto apenas 1,5% dos casos (n = 3) ocorreram em doentes do sexo feminino.

No que respeita à distribuição por grupos etários, não se registaram casos positivos no grupo dos 0–9 anos. No grupo etário seguinte (10–19 anos), foi identificado um único caso positivo (0,5%). A proporção de casos aumentou substancialmente nos grupos etários jovens adultos, com 62 casos (30%) entre os 20–29 anos e 85 casos (41,1%) no grupo dos 30–39 anos, este último constituindo a faixa etária mais representada. Entre os 40–49 anos, foram registados 45 casos positivos (21,7%). A partir dos 50 anos, verificou-se um decréscimo acentuado do número de casos, com 10 casos (4,8%) no grupo dos 50–59 anos e apenas 4 casos (1,9%) em indivíduos com 60 ou mais anos (Tabela 9).

Relativamente à região de testagem, a maioria dos casos com título positivo de anticorpos IgG foi registada na Área Metropolitana de Lisboa, com 146 casos (70,5%). Seguiram-se a Região do Norte com 49 casos (23,7%), o Algarve com seis casos (2,9%) e a Região Centro com quatro casos (1,9%). Apenas um caso (0,5%) foi identificado na Região Autónoma dos Açores e outro (0,5%) na Região Autónoma da Madeira (Tabela 9).

Não estão disponíveis dados relativos ao historial de vacinação e ao estado imunológico relativamente ao HIV dos doentes incluídos no estudo.

Tabela 9. Dados demográficos dos casos com título positivo de anticorpos IgG.

Dados demográficos	Número de casos positivos (%)
<b>Sexo</b>	
Feminino	3 (1,5)
Masculino	204 (98,5)
<b>Grupo etário</b>	
0 - 9	0
10 - 19	1 (0,5)
20 - 29	62 (30)
30 - 39	85 (41,1)
40 - 49	45 (21,7)
50 - 59	10 (4,8)
60+	4 (1,9)
<b>Região NUTS*</b>	
Região do Norte	49 (23,7)
Região Central	4 (1,9)
Área Metropolitana de Lisboa	146 (70,5)
Região do Algarve	6 (2,9)
Região Autónoma dos Açores	1 (0,5)
Região Autónoma da Madeira	1 (0,5)
<b>Total</b>	<b>207 (100)</b>

\*A Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos (NUTS) é desenvolvida pelo Eurostat e é utilizada tanto em Portugal como em toda a União Europeia para fins estatísticos.

Globalmente, 65,9% (n=346) das amostras analisadas foram positivas por PCR, enquanto 39,4% (n=207) apresentaram títulos de IgG acima do *cut-off* por ELISA (Figura 28). Esta diferença confirma a maior capacidade de deteção do método molecular face à análise serológica, como esperado. A PCR permite identificar infeção ativa por MPXV, enquanto que a técnica de ELISA deteta a presença de anticorpos IgG específicos, refletindo a exposição prévia ao vírus.

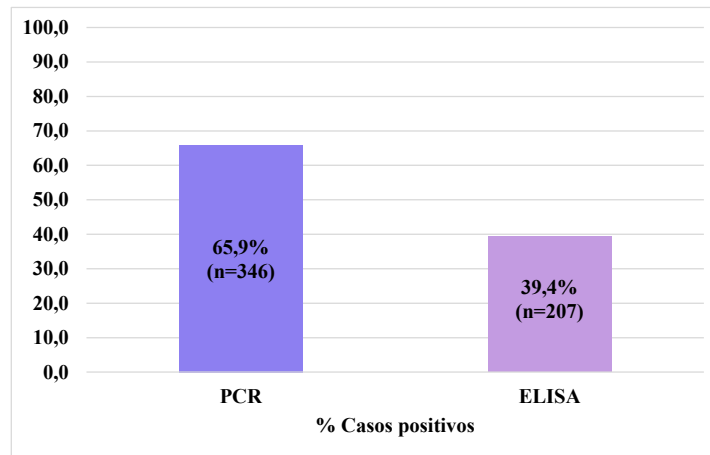


Figura 28. Percentagem de casos positivos detetados por PCR (65,9%; n=346) e por ELISA IgG (39,4%; n=207) entre as amostras analisadas.

Para além da caracterização epidemiológica, procedeu-se à análise das concentrações de anticorpos IgG entre os diferentes grupos etários (Figura 29). Considerando apenas os grupos com dimensão amostral adequada, a mediana das concentrações de IgG foi de 14,1 ng/mL (intervalo 6,9-44,9 ng/mL) no grupo dos 20–29 anos (n=62), 13,1 ng/mL (intervalo 7,2-67,3 ng/mL) nos 30–39 anos (n=85) e 15,5 ng/mL (intervalo 8,4-45,2 ng/mL) nos 40–49 anos (n=45). No grupo dos 50–59 anos (n=10), verificou-se uma mediana de 11 ng/mL (intervalo 7,0-19,8 ng/mL), enquanto o grupo dos  $\geq 60$  anos (n=4) apresentou a mediana mais elevada, atingindo 26,5 ng/mL (intervalo 18,5-49,1 ng/mL) (Figura 29).

Observou-se uma tendência para o aumento gradual das concentrações de IgG com a idade nas faixas etárias superiores, acompanhada de elevada variabilidade dentro de cada grupo. A análise comparativa revelou que a única diferença estatisticamente significativa ocorreu entre o grupo dos 50–59 anos e o grupo dos  $\geq 60$  anos ( $p=0,0463$ ), indicando concentrações superiores no grupo de maior idade.

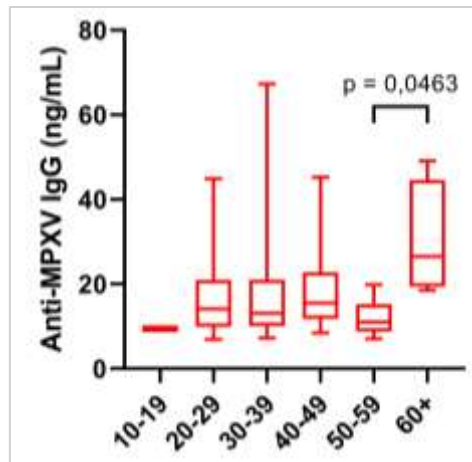


Figura 29. Concentrações de anticorpos IgG nos doentes com título positivo distribuídas por grupo etário: 10-19 (n=1), 20-29 (n=62), 30-39 (n=85), 40-49 (n=45), 50-59 (n=10) e 60+ (n=4). A linha central representa a mediana; os limites da caixa correspondem ao intervalo interquartil (IQR) e as extensões indicam os valores mínimo e máximo.

Posteriormente, analisou-se a relação entre as concentrações de IgG e o número de dias após o início dos sintomas. Em doentes com PCR positivo, observou-se uma ampla dispersão dos valores de IgG, com concentrações que variam desde níveis próximos de zero até valores superiores a 60 ng/mL, sobretudo nos primeiros 20 dias após o início dos sintomas. A maior densidade de dados concentra-se no intervalo entre 0 e 15 dias, período no qual se verificam também os valores mais elevados.

Nos doentes com PCR negativo, as concentrações de IgG foram globalmente baixas, permanecendo maioritariamente abaixo do valor de *cut-off*. Estes doentes apresentam menor dispersão e não se observaram valores elevados de IgG ao longo do período analisado.

De forma geral, os casos confirmados de mpox, com PCR positivo, concentraram-se nos primeiros dias após o início dos sintomas e exibiram uma variação mais ampla das concentrações de IgG, enquanto os casos não confirmados, com PCR negativo, mantiveram valores consistentemente baixos ao longo de todo o intervalo temporal (0–70 dias) (Figura 30).

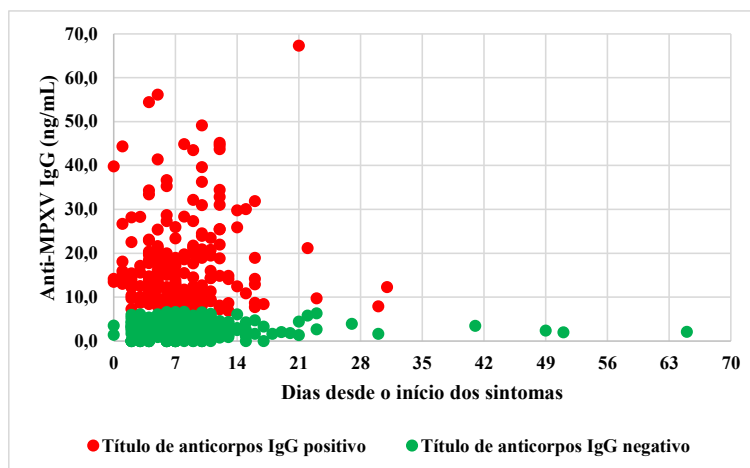


Figura 30. Relação entre as concentrações dos títulos de anticorpos IgG e o tempo decorrido desde o início dos sintomas. Cada ponto representa a concentração de IgG em doentes MPXV positivos (vermelho) ou negativos (verde) por PCR.

#### 4. Caracterização das medidas de biossegurança e bioproteção implementadas nos laboratórios em Portugal

A avaliação da cultura de biossegurança, bioproteção e conduta responsável nas ciências da vida foi realizada através do questionário “*Culture of Biosafety, Biosecurity and Responsible Conduct in the Life Sciences*”, destinado a estudantes do ensino superior e a profissionais com funções em laboratórios. Foram obtidas 96 respostas válidas.

Os participantes avaliaram os diferentes elementos da cultura organizacional através de uma escala de *Likert* de 0 a 5, cujos valores numéricos foram convertidos em percentagens médias de concordância, permitindo quantificar o grau de adesão aos princípios avaliados.

Posteriormente, os resultados foram correlacionados com uma escala de cores, representando o estado atual de cada elemento da cultura organizacional: 0–20% (vermelho): elemento de grande preocupação, requerendo ações corretivas imediatas; 21–60% (amarelo): elemento sinalizado como preocupante, exigindo reforço das práticas de biossegurança, bioproteção e conduta responsável; e 61–100% (verde): elemento adequado ou excelente, podendo haver espaço para melhoria contínua e ações de manutenção e sustentabilidade.

A maioria dos participantes era do sexo feminino (81,3%; n=78), enquanto 18,8% (n=18) eram do sexo masculino. Relativamente à nacionalidade, 99,0% (n=95) dos participantes eram portugueses, verificando-se apenas 1,0% (n=1) de outra nacionalidade.

No que diz respeito ao tipo de instituição, a maioria integrava o setor público (85,4%; n=82), e 14,6% (n=14) pertenciam a instituições privadas (Tabela 10).

A análise da distribuição geográfica revelou que a Área Metropolitana de Lisboa concentrou a maior proporção de participantes (65,6%; n=63), seguida da Região Norte (25,0%; n=24), Região Centro (4,2%; n=4), Região Autónoma dos Açores (3,1%; n=3), Região Autónoma da Madeira (1,0%; n=1) e Região do Algarve (1,0%; n=1) (Tabela 5). Quanto à atividade principal das instituições, verificou-se maior representação na área da saúde humana (63,6%; n=61), seguida pela pesquisa e investigação (15,6%; n=15), saúde animal (5,2%; n=5), saúde ambiental (3,1%; n=3), defesa (3,1%; n=3), académica (7,3%; n=7) e industrial (2,1%; n=2) (Tabela 10).

Em relação à profissão, a maioria dos participantes era técnico de laboratório (57,3%; n=55), seguida por supervisores de laboratório (13,5%; n=13), estudantes (17,7%; n=17), gestores de médio e alto nível (5,2%; n=5) e outros profissionais (6,3%; n=6), tais como professores universitários e pessoas da administração e suporte (Tabela 10).

No que respeita ao nível de educação, 40,6% (n=39) possuíam grau de Mestrado, 37,5% (n=36) Doutoramento, 18,8% (n=18) Bacharelato, e 3,1% (n=3) Licenciatura. Observou-se uma predominância de participantes com graus académicos de pós-graduação.

Por fim, a experiência profissional mostrou-se diversificada: 29,2% (n=28) tinham entre 10 e 20 anos de experiência, 21,9% (n=21) entre 21 e 30 anos, 19,8% (n=19) entre 31 e 40 anos, 17,7% (n=17) menos de 10 anos, 8,3% (n=8) não possuíam experiência profissional, e 3,1% (n=3) mais de 40 anos. Verificou-se uma distribuição relativamente homogénea entre os diferentes intervalos de experiência profissional (Tabela 10).

Tabela 10. Dados demográficos dos participantes que responderam ao questionário “*Culture of Biosafety, Biosecurity and Responsible Conduct in the Life Sciences*”.

<b>Dados demográficos</b>	<b>Número de participantes (%)</b>
<b>Sexo</b>	
Masculino	18 (18,8)
Feminino	78 (81,3)
<b>Nacionalidade</b>	
Portuguesa	95 (99)
Outra	1 (1)
<b>Tipo de Instituição</b>	
Público	82 (85,4)
Privado	14 (14,6)

<b>Região NUTS</b>	
Região do Norte	24 (25,0)
Área Metropolitana de Lisboa	63 (65,6)
Região do Algarve	1 (1,0)
Região do Centro	4 (4,2)
Região Autónoma dos Açores	3 (3,1)
Região Autónoma da Madeira	1 (1,0)
<b>Atividade da Instituição</b>	
Académico	7 (7,3)
Saúde humana	61 (63,6)
Saúde animal	5 (5,2)
Saúde ambiental	3 (3,1)
Defesa	3 (3,1)
Indústria	2 (2,1)
Pesquisa e investigação	15 (15,6)
<b>Profissão</b>	
Técnico de laboratório	55 (57,3)
Supervisor de laboratório	13 (13,5)
Gestor de médio e alto nível	5 (5,2)
Estudante	17 (17,7)
Outros	6 (6,3)
<b>Nível de Educação</b>	
Bacharelato	18 (18,8)
Licenciatura	3 (3,1)
Mestrado	39 (40,6)
Doutoramento	36 (37,5)
<b>Experiência Profissional</b>	
0 anos	8 (8,3)
<10 anos	17 (17,7)
10 a 20 anos	28 (29,2)
21 a 30 anos	21 (21,9)
31 a 40 anos	19 (19,8)
>40 anos	3 (3,1)
<b>Total</b>	<b>96 (100,0)</b>

\*A Nomenclatura das Unidades Territoriais para Fins Estatísticos (NUTS) é desenvolvida pelo Eurostat e é utilizada tanto em Portugal como em toda a União Europeia para fins estatísticos.

A avaliação da cultura de biossegurança e bioproteção foi estruturada em quatro domínios: Sistemas de Gestão, Comportamento de Liderança e do Pessoal, Princípios para Orientar Decisões e Comportamentos e Crenças, Opiniões e Atitudes, com base no instrumento *Culture Assessment Survey for Biorisk Management*.

Os resultados obtidos encontram-se disponíveis em formato de tabela suplementar (Tabelas 1S-4S) no seguinte link:

[https://docs.google.com/spreadsheets/d/1udZQyVEj27x7UYRDeWieCu-GHoN\\_EsDV/edit?usp=sharing&ouid=116434341296103375583&rtpof=true&sd=true](https://docs.google.com/spreadsheets/d/1udZQyVEj27x7UYRDeWieCu-GHoN_EsDV/edit?usp=sharing&ouid=116434341296103375583&rtpof=true&sd=true)

No domínio “Sistemas de gestão”, foi obtido um valor de 62,1%, indicando que os elementos estruturais e organizacionais associados à implementação de políticas, procedimentos e mecanismos de gestão se encontram globalmente estabelecidos (Tabela 1s; Figura 31). O domínio “Comportamento de liderança e do pessoal” apresentou um valor de 66,5%, revelando níveis adequados de cumprimento das práticas de biossegurança e de envolvimento da liderança e dos trabalhadores nas rotinas de segurança (Tabela 2s; Figura 31). O domínio “Princípios para orientar decisões e comportamentos” registou 74,7%, refletindo a adoção consistente de princípios que orientam a atuação dos profissionais no contexto das práticas laboratoriais (Tabela 3s; Figura 31). Finalmente, o domínio “Crenças, opiniões e atitudes” registou 74,2%, demonstrando que a perceção de risco, as atitudes preventivas e a valorização das medidas de biossegurança se encontram adequadamente integradas entre os profissionais avaliados (Tabela 4s; Figura 31).

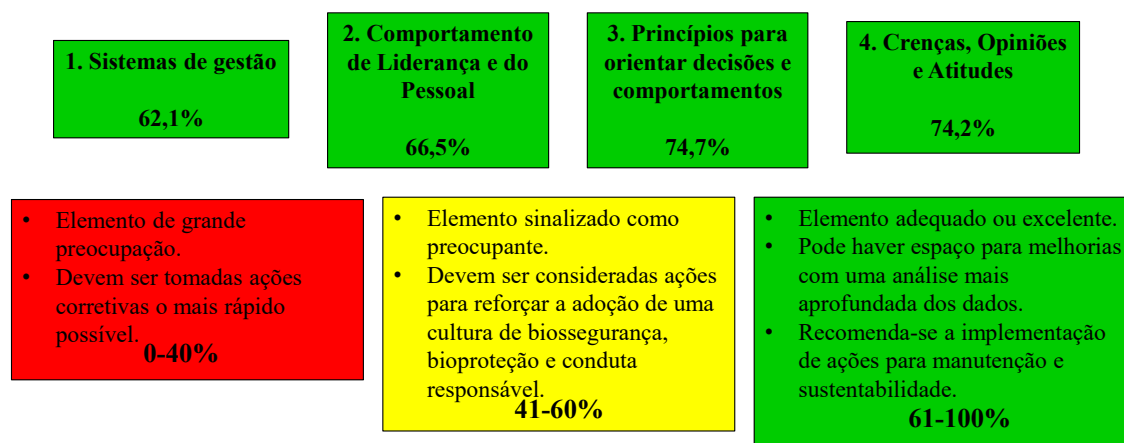


Figura 31. Resultados gerais obtidos nos quatro domínios analisados.

As respostas obtidas foram também analisadas por grupo profissional: técnicos de laboratório, supervisores, gestores de médio e alto nível, estudantes e outros profissionais. Os resultados obtidos encontram-se disponíveis em formato de tabela suplementar (Tabelas 5S-8S) no seguinte link:

[https://docs.google.com/spreadsheets/d/1udZQyVEj27x7UYRDeWieCu-GHoN\\_EsDV/edit?usp=sharing&ouid=116434341296103375583&rtpof=true&sd=true](https://docs.google.com/spreadsheets/d/1udZQyVEj27x7UYRDeWieCu-GHoN_EsDV/edit?usp=sharing&ouid=116434341296103375583&rtpof=true&sd=true)

Os resultados apresentaram variações moderadas entre grupos, refletindo diferentes níveis de envolvimento e responsabilidade nas práticas de gestão do risco biológico.

De forma geral, no domínio “Sistemas de gestão” observou-se uma percepção positiva do funcionamento dos sistemas de gestão relacionados com a biossegurança, com pontuações médias entre 3,0 e 3,8 (escala de 1 a 5) (Figura 32).

Os gestores de médio e alto nível apresentaram as médias mais elevadas (3,8), seguidos pelos supervisores de laboratório (3,4), enquanto os estudantes registaram valores mais baixos (2,7).

Os itens mais bem avaliados corresponderam à existência de formação contínua em biossegurança e bioproteção (pergunta 1.14), procedimentos de descontaminação e gestão de resíduos (pergunta 1.19) e medidas de segurança da informação (pergunta 1.15). Por outro lado, a análise sistemática de risco-benefício na investigação do duplo uso (pergunta 1.3) e a realização regular de exercícios de emergência (pergunta 1.6) apresentaram valores inferiores, sugerindo oportunidades de melhoria.

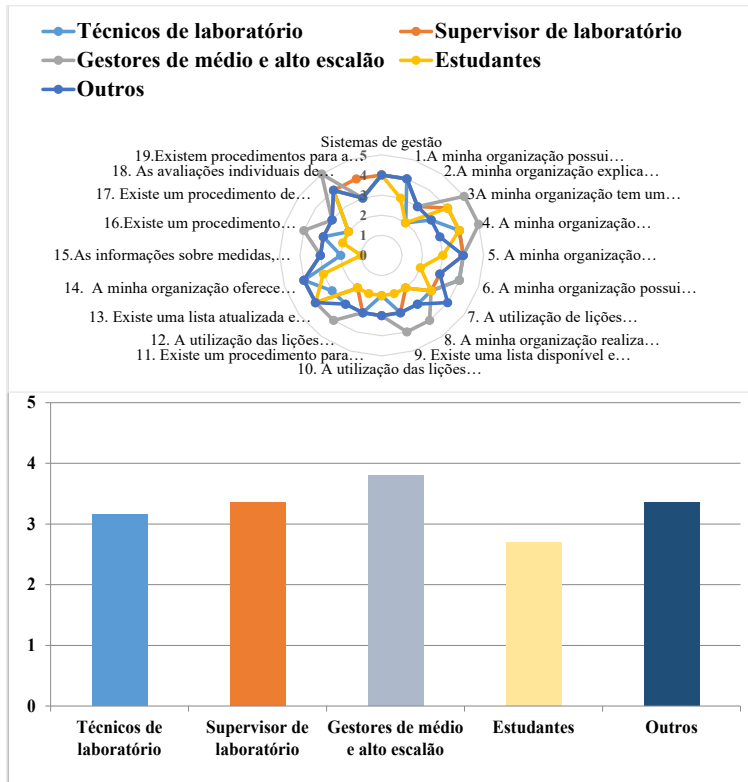


Figura 32. Distribuição das respostas por grupo profissional no domínio “Sistemas de gestão”.

No domínio “Comportamento de liderança e do pessoal”, as pontuações médias variaram entre 3,1 e 4,2, com destaque para os gestores, que registaram os valores mais elevados (4,2), e para os estudantes, que obtiveram as médias mais baixas (3,1) (Figura 33).

Os resultados indicam que os líderes comunicam regularmente sobre riscos biológicos (perguntas 2.1 e 2.2) e reforçam boas práticas laboratoriais (pergunta 2.3).

A maioria reconheceu a existência de mecanismos de comunicação interna (pergunta 18) e incentivos a comportamentos seguros (pergunta 2.20).

Contudo, as respostas relativas à participação ativa dos colaboradores nos processos de decisão e avaliação de risco (perguntas 2.10 e 2.14) apresentaram maior variabilidade.

De modo geral, verificou-se uma perceção positiva da liderança como promotora da cultura de segurança, associada a um ambiente de comunicação acessível e colaborativo.

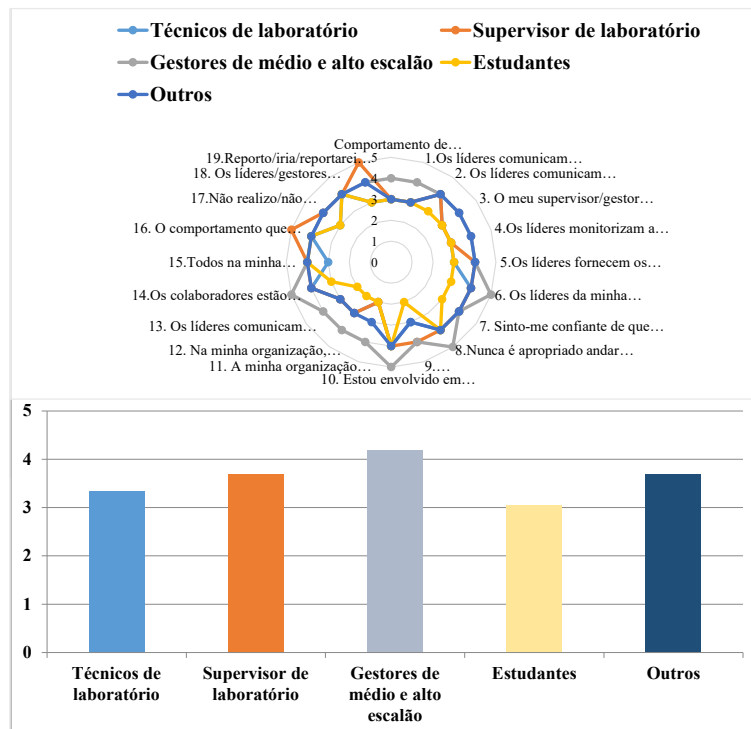


Figura 33. Distribuição das respostas por grupo profissional no domínio “Comportamento de liderança e do pessoal”.

Os resultados do domínio “Princípios para orientar decisões e comportamentos” revelaram as pontuações médias mais elevadas do questionário, situando-se entre 3,7 e 4,1 (Figura 34).

Todos os grupos profissionais demonstraram concordância quanto à existência de códigos de conduta ética e profissional (itens 3.2 e 3.14) e à responsabilidade individual pela biossegurança e bioproteção (pergunta 3.7).

Os supervisores e gestores destacaram-se com médias próximas de 4,0–4,1, evidenciando maior integração dos princípios éticos e de responsabilidade social na prática laboratorial. Os estudantes apresentaram médias ligeiramente inferiores (3,7), refletindo menor exposição à aplicação prática desses princípios.

As questões relacionadas com a transparência pública (pergunta 3.6) e a prevenção do uso indevido da investigação científica (pergunta 3.20) apresentaram valores intermédios, sinalizando reconhecimento, embora com menor consistência entre grupos.

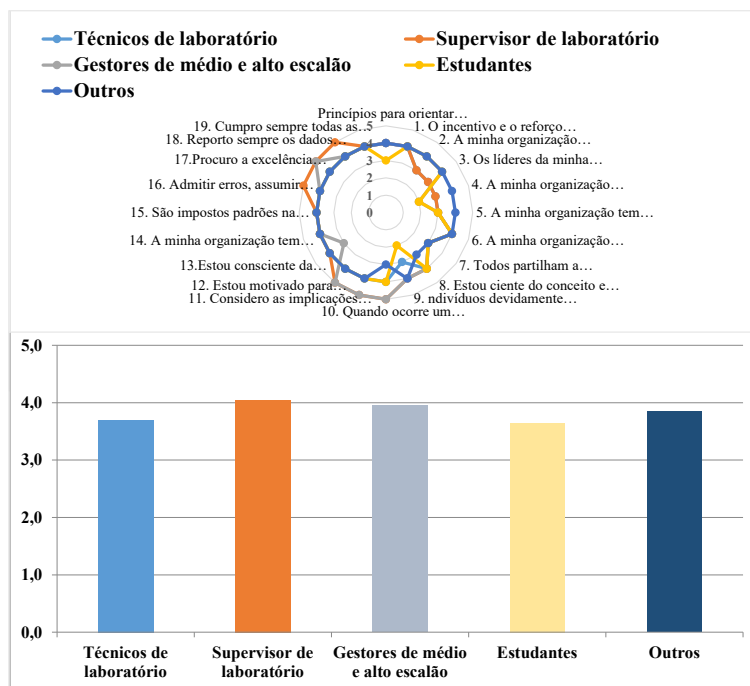


Figura 34. Distribuição das respostas por grupo profissional no domínio “Princípios para orientar decisões e comportamentos”.

O domínio “Crenças, opiniões e atitudes” apresentou valores médios entre 3,6 e 4,1, correspondendo a uma perceção globalmente positiva (Figura 35).

Os gestores de médio e alto nível registaram as médias mais elevadas (4,2), seguidos dos supervisores de laboratório (3,8), enquanto os estudantes apresentaram pontuações ligeiramente inferiores (3,7).

Os itens melhor avaliados incluíram o trabalho em equipa e cooperação (pergunta 4.7), o orgulho profissional (pergunta 4.6), a formação e uso adequado de EPI (perguntas 4.17 e 4.18) e a ética científica associada ao princípio de não causar dano (pergunta 4.19).

Por outro lado, os valores mais baixos foram observados na formação para identificação de comportamentos de risco (pergunta 4.4), na resposta imediata a vulnerabilidades (pergunta 4.5) e na consciencialização ética e legal da investigação (pergunta 4.10).

Os resultados indicam que os participantes reconhecem amplamente a importância da ética, da transparência e da responsabilidade individual, consolidando uma base sólida de valores compatível com uma cultura de biossegurança madura.

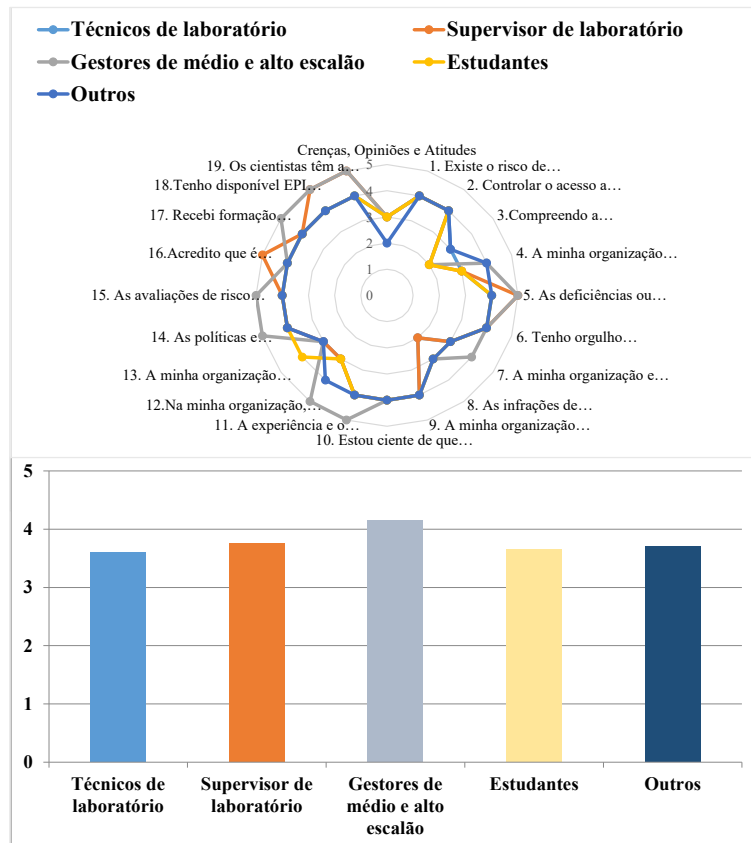


Figura 35. Distribuição das respostas por grupo profissional no domínio "Crenças, opiniões e atitudes".

A avaliação da implementação dos sistemas de gestão de risco biológico nos laboratórios BSL-3 em Portugal foi realizada através do "European Checklist for Laboratory Biorisk Management in Handling of High Consequence Risk Group 3 and 4 Agents (ECL-Biorisk)", tendo sido obtidas respostas de oito laboratórios nacionais. Este questionário é constituído por 15 secções, a primeira dedicada à recolha de dados dos participantes e as restantes focadas na avaliação detalhada das infraestruturas, procedimentos, sistemas de gestão e práticas operacionais relacionadas com a contenção e mitigação do risco biológico.

A maioria dos participantes era do sexo feminino (n=7; 87,5%) e integrava instituições públicas (n=6; 75,0%). As áreas de atividade mais representadas foram a saúde humana e a investigação (n=3; 37,5%), seguidas dos setores da defesa e saúde animal (n=1; 12,5% cada) (Tabela 11).

Relativamente à função profissional, três participantes (n=3; 37,5%) eram responsáveis pela biossegurança, três desempenhavam funções como supervisores de laboratório (n=3; 37,5%), um gestor (n=1; 12,5%) e um técnico de laboratório (n=1; 12,5%) (Tabela 14).

No que diz respeito à formação académica, cinco participantes possuíam Doutoramento (n=5; 62,5%), dois Licenciatura (n=2; 25,0%) e um Mestrado (n=1; 12,5%). Quanto à experiência profissional, dois participantes tinham entre 10 e 20 anos de (n=2; 25,0%), cinco entre 21 e 30 anos (n=5; 62,5%), e um tinha mais de 40 anos de experiência (n=1; 12,5%) (Tabela 11).

Tabela 11. Dados demográficos dos participantes que responderam ao questionário da avaliação da implementação dos sistemas de gestão de risco biológico nos laboratórios BSL-3.

<b>Dados demográficos</b>	<b>Número de participantes (%)</b>
<b>Sexo</b>	
Masculino	1 (12,5)
Feminino	7 (87,5)
<b>Tipo de Instituição</b>	
Pública	6 (75,0)
Privada	2 (25,0)
<b>Atividade da Instituição</b>	
Saúde humana	3 (37,5)
Investigação	3 (37,5)
Defesa	1 (12,5)
Saúde animal	1 (12,5)
<b>Região de Portugal</b>	
Área Metropolitana de Lisboa	5 (62,5)
Região do Norte	2 (25,0)
Região do Algarve	1 (12,5)
<b>Profissão</b>	
Responsável pela biossegurança	3 (37,5)
Supervisor de laboratório	3 (37,5)
Gestor de médio e alto nível	1 (12,5)
Técnico de laboratório	1 (12,5)

<b>Nível de Educação</b>	
Licenciatura	2 (25)
Mestrado	1 (12,5)
Doutoramento	5 (62,5)
<b>Experiência Profissional</b>	
10 a 20 anos	2 (25)
21 a 30 anos	4 (50,0)
31 a 40 anos	1 (12,5)
>40 anos	1 (12,5)
<b>Total</b>	<b>8 (100,0)</b>

Os resultados obtidos para as seções 2 a 15 encontram-se disponíveis em formato de tabela suplementar (Tabelas 9S-25S) no seguinte link: <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1GR5WAp5VY8NOr4fKTC9eXy4Es-Z15bea/edit?usp=sharing&oid=116434341296103375583&rtpof=true&sd=true>

Na seção 2, verificaram-se níveis de conformidade intermédios nos aspetos relacionados com a separação física da contenção (2.1, 2.2, 2.6–2.8, 2.12, 2.16), sugerindo pequenas variações estruturais entre os laboratórios. As principais fragilidades identificadas concentraram-se nos mecanismos de controlo e interligação de portas, com cinco instituições (n=5; 62,5%) a reportar sistemas de *interlock* ou registo eletrónico de acessos (2.9–2.10) (Tabela 9s e Figura 36).

Na seção relativa às Camaras de segurança biológica (CSB) (Tabela 10S e Figura 36), observou-se uma elevada conformidade entre os laboratórios BSL-3 avaliados. Todos os participantes referiram realizar testes anuais de certificação *in situ* das CSB de classe I, II e III, em conformidade com a norma EN-12469:2000(3.1; n=8; 100,0%). Foi igualmente confirmada por todos a verificação da integridade dos filtros HEPA (3.4; n=8; 100,0%). Por outro lado, observou-se menor frequência na existência de sistemas de *interlock* entre ventiladores de alimentação e exaustão (3.2; n=2; 25,0%) e na instalação de proteção contra refluxo nas condutas de ar (3.6; n=1; 12,5%).

Os alarmes de deteção de falhas nas CSB foram reportados por seis laboratórios (3.3; n=6; 75,0%), enquanto apenas dois indicaram verificar a integridade dos invólucros dos filtros HEPA (3.5; n=2).

A avaliação do sistema de ventilação e fluxo de ar revelou uma conformidade globalmente elevada entre os laboratórios BSL-3 analisados (Tabela 11s e Figura 36).

A maioria dos laboratórios referiu o fornecimento de 100,0% de ar exterior (4.1; n=7; 87,5%) e fluxo de ar direcional para o interior (4.2; n=8; 100,0%), assegurando a manutenção da pressão negativa nas áreas de contenção.

Foram ainda reportados dispositivos de monitorização da pressão diferencial (4.3; n=7; 87,5%) e barreiras de contenção com filtros HEPA (4.4; n=7; 87,5%).

Metade das instituições dispõe de alarmes visuais ou sonoros para falhas do sistema de ventilação (4.5; n=4; 50,0%), enquanto sete laboratórios indicaram possuir sistemas de fornecimento e exaustão independentes com filtros HEPA (4.7–4.8; n=7; 87,5%).

A dupla filtração HEPA em série foi referida por cinco laboratórios (4.10; n=5; 62,5%), e a selagem hermética das condutas fora do perímetro foi confirmada em seis (4.16; n=6; 75,0%) (Tabela 11s e Figura 36).

Alguns parâmetros técnicos, como a localização de sensores e dispositivos de controlo de caudal, foram assinalados como desconhecidos pela totalidade dos participantes (4.17; n=8; 100,0% “Não sei”).

Tendo em conta a secção 5, que diz respeito à integridade estrutural e aos acabamentos de superfície e mobiliário dos laboratórios, observaram-se níveis globalmente elevados de conformidade (Tabela 12s e Figura 36).

Confirmou-se a integridade das superfícies de contenção e os testes de decaimento de pressão (5.1; n=5; 62,5%; 5.2; n=5; 62,5%); a impermeabilidade de portas, bancadas e superfícies de trabalho (5.3; n=7; 87,5%); superfícies resistentes a riscos, químicos e calor (5.4; n=8; 100,0%) e continuidade da vedação pavimento/parede (5.5; n=8; 100,0%).

Reportaram-se bancadas sem costuras abertas (5.6; n=6; 75,0%); bordos e cantos arredondados em bancadas/armários (5.7; n=6; 75,0%); gavetas com fechos de segurança (5.8; n=7; 87,5%) e revestimentos interiores resistentes a gases e produtos químicos (5.9; n=6; 75,0%)

Na secção 6, referente ao perímetro de contenção, observou-se uma elevada conformidade entre os laboratórios BSL-3 avaliados (Tabela 13s e Figura 36).

A presença de autoclaves com porta dupla e barreira integrada na contenção foi confirmada por sete laboratório (6.1; n=7; 87,5%); a existência de autoclaves equipados com portas interligadas e alarmes visuais ou sonoros foi igualmente reportada por sete instituições (6.2; n=7; 87,5%).

Seis laboratórios indicaram tecnologias alternativas para materiais não passíveis de esterilização por autoclave, como incineração ou tratamento químico (6.3; n=6; 75,0%).

A selagem das penetrações na barreira de contenção foi confirmada em todos os casos (6.4; n=8; 100,0%); janelas na barreira seladas e conformes ao nível de segurança exigido foram referidas por sete laboratórios (6.5; n=7; 87,5%); e janelas de observação integradas por todos (6.6; n=8; 100,0%).

Na secção 7, relativa ao funcionamento de chuveiros de descontaminação e serviços laboratoriais, observaram-se níveis variáveis de conformidade entre os laboratórios BSL-3 avaliados (Tabela 14s e Figura 36).

A maioria (7,1; n=7; 87,5%,) referiu que os lavatórios para lavagem das mãos com capacidade de “mãos livres” estão localizados junto à saída final do laboratório. Em 62,5% (7.2; n=5) dos casos, esses lavatórios são igualmente fornecidos para uso no interior das áreas de contenção.

Metade dos laboratórios (7.4; n=4; 50,0%,) indicou possuir linhas de drenagem e tubagens separadas, e 37,5% (7.5; n=3) relataram sistemas de drenagem inclinados para unidades de esterilização de efluentes.

As instalações de lava-olhos e chuveiro de emergência foram reportadas por 87,5% (7.6–7.7; n=7) dos laboratórios.

A presença de armadilhas de drenagem com profundidade adequada foi assinalada por 37,5% (7.8; n=3), enquanto todas as águas residuais tratadas quimicamente ou termicamente foram referidas por 87,5% (7.9; n=7).

Todos os laboratórios (7.10; n=8; 100,0%) indicaram ausência de esgotos abertos, exceto os estritamente necessários.

O fornecimento de energia independente foi confirmado por 75,0% (7.11; n=6), e equipamentos elétricos testados e certificados como seguros foram reportados por 87,5% (7.13; n=7).

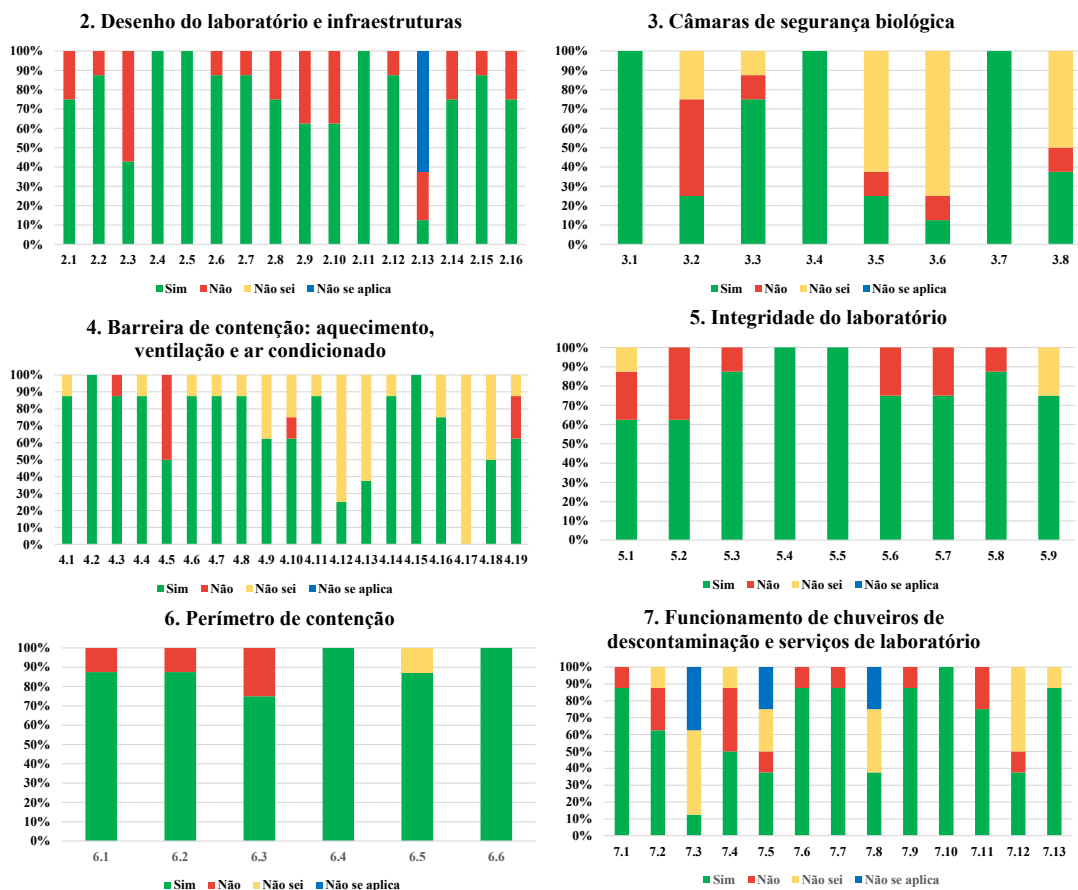


Figura 36. Resultados obtidos relativos às secções analisadas: desenho do laboratório e infraestruturas; câmaras de segurança biológica; barreira de contenção: aquecimento, ventilação e ar condicionado; integridade do laboratório; perímetro de contenção e funcionamento de chuveiros de descontaminação e serviços de laboratório.

Relativamente aos planos de resposta a emergências, observou-se uma ampla variação nas medidas implementadas pelos laboratórios BSL-3 avaliados (Tabela 15s e Figura 37). A maioria (8.1; n=7; 87,5%) reportou fornecer equipamento de proteção respiratória validado para uso em operações de emergência e possuir iluminação de emergência alimentada por bateria (8.2). Todos os laboratórios (8.3-8.4; n=8; 100,0%) confirmaram a existência de sistemas de comunicação entre a área de contenção e o exterior e o apoio de energia de reserva para sistemas críticos, como ventilação e CSB. Os disjuntores localizados fora da contenção foram confirmados por todos os laboratórios (8.5; n=8; 100,0%), enquanto 87,5% (8.6–8.7; n=7) indicaram armazenamento seguro para líquidos inflamáveis e cilindros de gás. Também todos (8.8; n=8; 100,0%) referiram possuir sistemas de transferência eletrónica de dados e documentação descontaminada antes da saída do laboratório. Metade (8.9; n=4; 50,0%) declarou ter monitorização por circuito fechado de TV e 75,0% (8.10; n=6) reportaram sistemas de registo de entrada e saída de pessoal.

A possibilidade de descontaminação por gás ou vapor foi referida por 75,0% (8.11; n=6). A formação e treino da equipa em primeiros socorros e cenários de emergência foi mencionada por 50,0% (8.12; n=4), e o exercício de emergência anual também foi assinalado por 50,0% (8.13; n=4).

Setenta e cinco por cento dos laboratórios relataram planos de evacuação (8.14; n=6) e procedimentos de fumigação (8.15; n=6), enquanto apenas 12,5% (8.16; n=1) indicaram receber inspeções ou informações de agências externas.

A avaliação de ameaças e atualização de práticas de segurança foi indicada em 62,5% (8.17; n=5) dos casos e 87,5% (8.18; n=7) reportaram programas de formação em risco biológico e biossegurança.

A realização de exercícios ou simulacros de emergência apresentou resultados variáveis: entre 37,5% e 62,5% dos laboratórios a indicaram que os realizavam para falhas de infraestrutura, incidentes pessoais, avarias de equipamentos, eventos naturais e ameaças intencionais (8.19.1–8.19.6).

Por fim, 62,5% (8.20; n=5) referiram planos de contingência para múltiplos eventos adversos, 75,0% (8.21; n=7) afirmaram ministrar formação em primeiros socorros e 37,5% (8.22; n=3) indicaram possuir sistemas de tratamento de efluentes líquidos. Quanto ao processo de incineração, 87,5% (8.23.2; n=7) relataram realizar esta etapa fora das instalações.

Na secção 9, foram avaliadas as práticas relacionadas com a verificação, manutenção e certificação dos sistemas laboratoriais (Tabela 16s e Figura 37).

A verificação do funcionamento dos dispositivos de prevenção de refluxo no abastecimento de água foi indicada por um laboratório (9.1; n=1; 12,5%). A prevenção de refluxo para outros serviços foi confirmada por dois laboratórios (9.2; n=2; 25,0%).

Os sistemas de chuveiros de emergência foram testados para garantir operação e alarmes em três laboratórios (9.3; n=3; 37,5%). A testagem de sistemas de energia de reserva e UPS foi referida por cinco laboratórios (9.4; n=5; 62,5%).

As luzes de emergência são verificadas regularmente em quatro laboratórios (9.5; n=4; 50,0%), e o funcionamento das portas interligadas foi avaliado em cinco (9.6; n=5; 62,5%).

A verificação dos sistemas de segurança, como controlo de acesso e circuito fechado de TV, foi relatada por quatro laboratórios (9.7; n=4; 50,0%), e a testagem de sistemas de comunicação e transferência eletrónica de dados foi observada em sete (9.8; n=7; 87,5%).

A verificação da operação de sistemas de descontaminação (autoclaves, câmaras, etc.) foi confirmada por seis laboratórios (9.9; n=6; 75,0%).

Os sistemas de fumigação e tratamento de efluentes líquidos foram verificados em dois laboratórios (9.10; n=2; 25,0%).

Todos os laboratórios reportaram possuir estratégia de descontaminação de equipamentos e superfícies de trabalho (9.11; n=8; 100,0%), e quase todos indicaram procedimentos de descontaminação após derrames ou salpicos (9.12; n=7; 87,5%).

A descontaminação de equipamentos antes da remoção para manutenção ou transporte foi confirmada por todos os laboratórios (9.13; n=8; 100,0%). Da mesma forma, sete laboratórios indicaram descontaminação diária de culturas, stocks e resíduos regulamentados (9.14; n=7; 87,5%) e descontaminação de resíduos potencialmente contaminados antes da eliminação (9.15; n=7; 87,5%).

A notificação e avaliação de incidentes com exposição a materiais infecciosos foi reportada por sete laboratórios (9.16; n=7; 87,5%). A disponibilidade de procedimentos de descontaminação do laboratório e instrumentos foi igualmente referida por sete (9.17; n=7; 87,5%).

A inspeção de autoclaves e vasos de pressão ocorre em seis laboratórios (9.18; n=6; 75,0%), e todos possuem organização adequada para recolha e eliminação de lixo doméstico (9.19; n=8; 100,0%).

A metodologia validada para descontaminação de ambientes foi mencionada por seis laboratórios (9.20; n=6; 75,0%), enquanto a utilização de sistemas validados para tratamento de efluentes líquidos foi identificada em três (9.21; n=3; 37,5%).

A incineração eficaz de resíduos hospitalares e carcaças de animais foi confirmada por seis laboratórios (9.22; n=6; 75,0%), e sete reportaram possuir procedimentos validados para inativação de amostras e transferência segura de material (9.23; n=7; 87,5%).

Na secção 10, analisaram-se os procedimentos relacionados com o comissionamento, teste e eventual desativação das instalações laboratoriais (Tabela 17s e Figura 37).

A maioria dos laboratórios reportou possuir conjunto completo de desenhos e especificações de utilização (10.1; n=6; 75,0%), e planos e testes de sistemas integrados (10.2; n=6; 75,0%).

Foi também referido por sete laboratórios que existe lista completa e perfis de teste dos equipamentos (10.3; n=7; 87,5%) e testes e validação de componentes estruturais (10.4; n=6; 75,0%).

A verificação da integridade estrutural das instalações segundo critérios regulamentares foi igualmente confirmada por seis laboratórios (10.5; n=6; 75,0%).

A notificação de certificação às autoridades nacionais foi referida por três laboratórios (10.6; n=3; 37,5%), enquanto quatro (n=4; 50,0%) indicaram não realizar este procedimento.

Por fim, apenas dois laboratórios reportaram que as medidas para o descomissionamento e descontaminação da instalação são acordadas com as autoridades nacionais (10.7; n=2; 25,0%).

A secção 11 avaliou o uso e a disponibilidade de equipamento de proteção individual nos laboratórios BSL-3 (Tabela 18S e Figura 37). Metade dos laboratórios relatou o uso de roupa de proteção completa como batas, aventais, fato-macaco e calçado de laboratório (11.1; n=4; 50,0%), enquanto a totalidade afirmou disponibilizar vestuário completo de proteção resistente a fluidos, incluindo aventais impermeáveis e protetores de calçado (11.2; n=8; 100,0%). Todos os laboratórios indicaram o uso de luvas descartáveis e práticas de trabalho com luvas duplas, assegurando a substituição entre áreas “sujas” e “limpas” (11.3; n=8; 100,0%). Apenas dois laboratórios declararam utilizar máscaras de proteção respiratória com pressão positiva alimentadas por HEPA ou FFP3 (11.4; n=2; 25,0%). O uso de óculos de segurança, viseiras e proteção ocular para manipulações de risco foi referido por todos os laboratórios (11.5; n=8; 100,0%).

Seis laboratórios confirmaram o uso de dispositivos de contenção física, como copos de segurança e rotores selados (11.6; n=6; 75,0%). O uso de luvas resistentes ao calor em áreas de descarga de autoclaves foi mencionado por seis laboratórios (11.7; n=6; 75,0%). Sete laboratórios indicaram possuir armazenamento adequado para equipamento de proteção respiratória e peças de substituição (11.8; n=7; 87,5%). Por fim, a existência de fatos de proteção completos para a equipa de emergência, com filtro HEPA e resistência a produtos químicos, foi reportada pela maioria (11.9; n=7; 87,5%).

A secção 12 avaliou aspetos relacionados com o recrutamento, qualificação e formação dos profissionais que trabalham em laboratórios BSL-3 (Tabela 19s e Figura 37). Cinco laboratórios indicaram manter histórico de emprego atualizado (12.1; n=5; 62,5%), enquanto três afirmaram realizar verificações de segurança (12.2; n=3; 37,5%). Todos os laboratórios confirmaram que os trabalhadores possuem conhecimentos básicos adequados (12.3; n=8; 100,0%). Sete laboratórios declararam que existe um perfil de competência técnica definido (12.4; n=7; 87,5%).

A monitorização geral da saúde é efetuada em seis laboratórios (12.5; n=6; 75,0%), e igual número referiu possuir planos de adaptação profissional implementados (12.6; n=5; 62,5%). O estado de competência e necessidades documentadas foi confirmado também por seis (12.7; n=6; 75,0%). A formação reconhecida em biossegurança é realizada em sete laboratórios (12.8; n=7; 87,5%), o mesmo número que indicou competência reconhecida em biossegurança (12.9; n=7; 87,5%). Todos os participantes afirmaram demonstrar capacidade para executar tarefas com e sem supervisão (12.10; n=8; 100,0%). Os programas de monitorização de saúde são adequados em seis laboratórios (12.12; n=6; 75,0%), igual número apresentou estado vacinal atualizado (12.13; n=6; 75,0%) e indicou possuir capacidades de resposta a emergências (12.14; n=6; 75,0%).

Seis laboratórios apresentaram programas de formação e desenvolvimento reconhecidos por organismos profissionais (12.15; n=6; 75,0%), e cinco referiram incluir formação específica sobre resposta a emergências e acidentes laboratoriais (12.16; n=5; 62,5%). Sete laboratórios indicaram integrar formação sobre acesso a laboratórios e práticas operacionais seguras (12.17; n=7; 87,5%), e todos confirmaram abordar treino sobre a utilização e verificação adequada de equipamentos laboratoriais (12.18; n=8; 100,0%). De igual forma, sete laboratórios reportaram incluir conteúdos sobre práticas de risco e técnicas microbiológicas (12.19; n=7; 87,5%), avaliação de risco (12.20; n=7; 87,5%) e estrutura regulatória aplicável à biossegurança (12.21; n=7; 87,5%).

Por fim, sete laboratórios apresentaram registos de aprendizagem e avaliação de competências para melhoria contínua (12.22; n=7; 87,5%), enquanto seis confirmaram a existência de mecanismos de avaliação e monitorização de programas de formação (12.23; n=6; 75,0%).

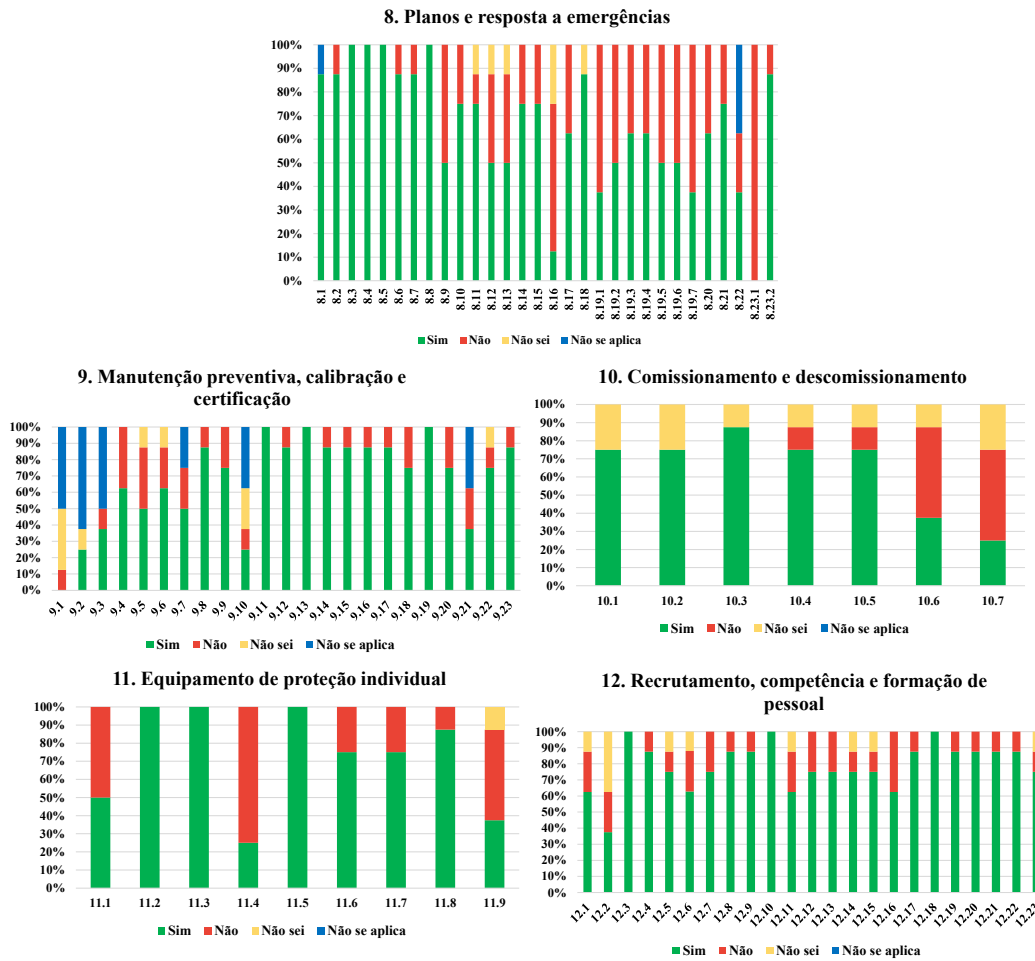


Figura 37. Resultados obtidos relativos às secções analisadas: planos e resposta a emergências; manutenção preventiva, calibração e certificação; comissionamento e descomissionamento; equipamento de proteção individual e recrutamento, competência e formação de pessoal.

A secção 13 avalia a implementação de práticas laboratoriais específicas relacionadas com a segurança operacional e a biossegurança, incluindo boas práticas microbiológicas e laboratoriais, o manuseamento de materiais infecciosos, de objetos cortantes e de cilindros de gás comprimido. O objetivo foi verificar a conformidade dos laboratórios com os requisitos técnicos e de segurança aplicáveis a estas atividades.

Verificou-se uma elevada conformidade com as boas práticas laboratoriais (Tabela 20S e Figura 38), sendo que todos os laboratórios cumprem procedimentos básicos como a proibição de comer, beber ou aplicar cosméticos (13.1; n=8; 100,0%) e o uso de pipetagem mecânica (13.2; n=8; 100,0%). Foram também reportadas práticas consistentes de limpeza e desinfeção das superfícies de trabalho (13.3; n=8; 100,0%) e planos de limpeza e proteção da pele (13.5; n=7; 87,5%). Contudo, nem todos dispõem de vestiários separados (13.9; n=2; 25,0%).

Todos os laboratórios indicaram realizar a manipulação de material infeccioso (Tabela 21s e Figura 38) em CSB (13.13; n=8; 100,0%) e o transporte seguro de agentes patogênicos (13.14; n=8; 100,0%). A maioria referiu possuir áreas seguras para armazenamento e procedimentos validados de descontaminação (13.15-13.17; n=6-7; 75,0-87,5%), embora alguns não apresentem políticas totalmente uniformes quanto ao uso de materiais autoclaváveis (13.16; n=6; 75,0%).

As políticas para o manuseamento seguro de objetos cortantes (Tabela 22S e Figura 38) estão implementadas em todos os laboratórios (13.19; n=8; 100,0%), mas apenas metade utiliza dispositivos com fecho de segurança (13.20; n=4; 50,0%), o que indica espaço para melhoria neste aspeto específico. Os procedimentos com cilindros de gás comprimido (Tabela 23s e Figura 36) revelaram menor conformidade, com a maioria dos participantes a indicar desconhecimento relativamente aos procedimentos de segurança (13.22-13.30; “Não sei” ≥ 75,0%). Apenas um laboratório (n=1; 12,5%) referiu cumprir integralmente práticas de identificação, inspeção e fixação dos cilindros, sugerindo fragilidades significativas nesta área.

A secção 14 avalia a implementação de medidas de bioprotecção nos laboratórios (Tabela 24S e Figura 38), abrangendo a segurança física e operacional, o controlo de acessos, a fiabilidade do pessoal, a rastreabilidade dos agentes biológicos e os procedimentos associados ao transporte e eliminação de materiais potencialmente perigosos.

Os resultados obtidos permitem identificar o grau de conformidade das instituições com os requisitos de bioprotecção e estão organizados de acordo com os principais domínios avaliados. Seis laboratórios indicaram possuir medidas de segurança física implementadas (14.1; n=6; 75,0%) e sete confirmaram a existência de segurança do perímetro das instalações (14.2; n=7; 87,5%). A segurança do agente biológico foi referida por seis instituições (14.3; n=6; 75,0%), e a segurança da informação por oito (14.4; n=8; 100,0%). Todos os laboratórios asseguraram a segurança no transporte dentro das instalações (14.5; n=8; 100,0%) e fora delas (14.6; n=8; 100,0%).

Em relação à integridade física das infraestruturas, cinco laboratórios afirmaram realizar revisões ou testes periódicos (14.7; n=5; 62,5%). No que se refere ao pessoal, três instituições relataram a verificação de antecedentes sociais e criminais (14.8; n=3; 37,5%) e igual número indicou a existência de requisitos regulares de autorização de segurança (14.9; n=3; 37,5%).

A identificação com fotografia para funcionários e visitantes foi confirmada por apenas duas instituições (14.10; n=2; 25,0%), embora a maioria possua políticas definidas sobre

a visita de pessoal (14.11; n=7; 87,5%). O controlo de acessos e a autorização são práticas implementadas em todos os laboratórios (14.12–14.15; n=8; 100,0%). Seis instituições reportaram ter programas de formação específicos em bioproteção (14.16; n=6; 75,0%) e igual número indicou a existência de responsáveis designados por agentes patogénicos (14.17; n=6; 75,0%). A maioria referiu possuir sistemas de rastreio e inventário de agentes patogénicos (14.18; n=5; 62,5%) e processos de eliminação ou inativação de culturas (14.19; n=7; 87,5%). O controlo de *stocks* e a identificação de responsáveis pelos agentes patogénicos também estão implementados em seis e sete laboratórios, respetivamente (14.20–14.21; n=6-7; 75,0-87,5%).

Relativamente ao transporte e envio de substâncias infecciosas, seis instituições indicaram possuir remetentes certificados (14.24; n=6; 75,0%), e cinco confirmaram a formação do pessoal de acordo com normas nacionais e internacionais (14.25; n=5; 62,5%). Finalmente, todos os laboratórios mantêm registos de entrada e saída de materiais (14.28; n=8; 100,0%).

A secção 15 analisa a existência e aplicação de documentação essencial para a biossegurança e bioproteção laboratorial (Tabela 25S e Figura 38), incluindo procedimentos operacionais padrão, manuais, planos de emergência, registos e protocolos de segurança. Sete laboratórios reportaram possuir Procedimentos Operacionais Padrão (SOPs) para práticas de trabalho e manuseamento de material infeccioso (15.1; n=7; 87,5%), avaliações de risco (15.2; n=7; 87,5%) e manuais de biossegurança e bioproteção (15.3; n=7; 87,5%). Seis instituições confirmaram a existência de planos de evacuação do laboratório (15.4; n=6; 75,0%), enquanto quatro indicaram possuir planos de segurança formalizados (15.5; n=4; 50,0%). Todos os laboratórios referiram dispor de manuais de instruções (15.6; n=8; 100,0%) e sete declararam manter registos de formação para todos os funcionários (15.7; n=7; 87,5%). Cinco laboratórios relataram possuir protocolos de comissionamento e descomissionamento (15.8; n=5; 62,5%), três confirmaram relatórios e certificados de inspeção externa (15.9; n=3; 37,5%) e sete asseguraram o registo de incidentes, investigações e ações corretivas (15.10; n=7; 87,5%).

Relativamente à resposta a emergências médicas e à gestão de incidentes com agentes patogénicos de alta consequência, cinco instituições indicaram possuir planos específicos (15.11; n=5; 62,5%). Quatro laboratórios reportaram dispor de sistemas de gestão da qualidade documentados (15.12; n=4; 50,0%), e cinco confirmaram manter registos de *stocks* e conformidade de armazenamento (15.13; n=5; 62,5%).

O mesmo número de instituições referiu possuir protocolos para transporte nacional e transfronteiriço de agentes patogénicos (13.14; n=5; 62,5%) e planos de emergência para falhas de infraestruturas ou incidentes de segurança e biossegurança (13.15; n=5; 62,5%).

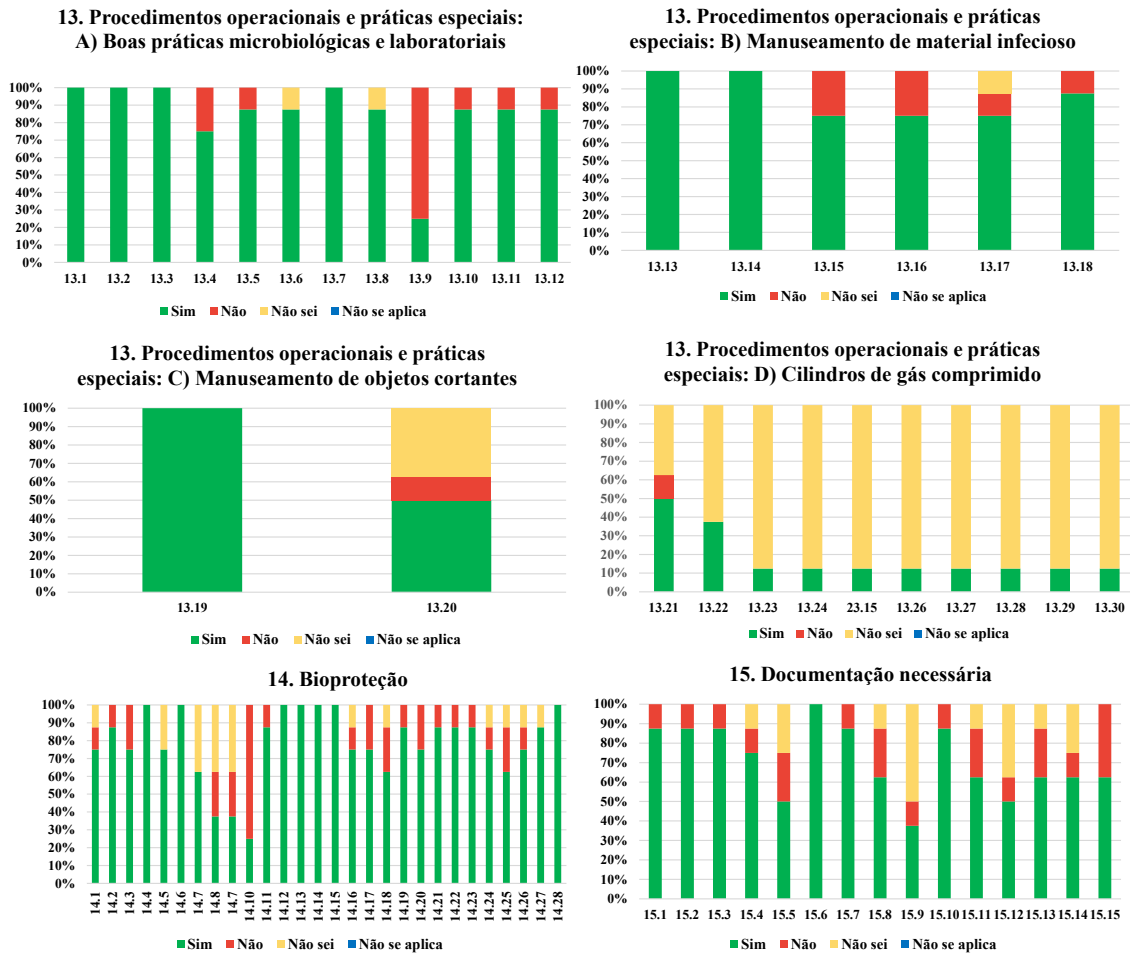


Figura 38. Resultados obtidos relativos às secções analisadas: Procedimentos operacionais e práticas especiais: A) Boas práticas microbiológicas e laboratoriais; Procedimentos operacionais e práticas especiais: B) Manuseamento de material infeccioso; Procedimentos operacionais e práticas especiais: C) Manuseamento de objetos cortantes; Procedimentos operacionais e práticas especiais: D) Cilindros de gás comprimido; Bioproteção e documentação necessária.

De forma geral, observaram-se valores de conformidade elevados na maioria dos parâmetros avaliados ( $\geq 75,0\%$ ). As pontuações mais altas corresponderam aos itens relativos ao controlo de acessos, sinalização de risco biológico, certificação das câmaras de segurança biológica (CSB) e separação de áreas administrativas, todos com 100,0% de respostas positivas.

Os sistemas de ventilação e filtragem HEPA, a integridade de superfícies e selagens, e a barreira de contenção apresentaram igualmente valores elevados de conformidade ( $\geq 87,5\%$ ).

Verificaram-se resultados intermédios (75,0–87,5%) em componentes estruturais e de apoio, como selagem de condutas externas, eficiência de autoclaves e sistemas de alarme. Alguns parâmetros técnicos, nomeadamente os relacionados com cilindros de gás comprimido, tratamento de efluentes líquidos e planos de emergência específicos, registaram valores inferiores a 75,0%.

A Tabela 12 apresenta os principais pontos com valores mais elevados e mais reduzidos de conformidade observados nos diferentes domínios avaliados.

Tabela 12. Síntese dos resultados obtidos da avaliação da implementação de gestão de risco biológico nos laboratórios BSL-3 em Portugal.

<b>Domínio avaliado</b>	<b>Pontos fortes identificados</b>	<b>Fragilidades identificadas</b>
<b>Design e infraestruturas</b>	Contenção estrutural adequada e áreas administrativas separadas.	Controlo de acessos nem sempre consistente.
<b>Câmaras de segurança biológica</b>	Disponibilidade e manutenção regular asseguradas.	Registos e monitorização com desempenho variável.
<b>Sistema AVAC e barreiras secundárias</b>	Pressão negativa e HEPA implementadas.	Desconhecimento técnico sobre requisitos específicos em alguns laboratórios.
<b>Integridade do laboratório</b>	Superfícies duráveis e de fácil descontaminação.	Selagem e validação com periodicidade variável.
<b>Perímetro de contenção</b>	Barreiras físicas adequadas e penetrações seladas; Presença de autoclaves com porta dupla e barreira integrada.	Redundância e controlo de transição nem sempre verificados. Registo automático e ensaios de eficiência nem sempre implementados.
<b>Chuveiros e serviços</b>	Sistemas presentes em parte dos laboratórios.	Cobertura heterogénea e ausência em alguns laboratórios.
<b>Planos de emergência</b>	Existência parcial de planos formais e formação associada.	Lacunas na resposta a incidentes e realização de simulacros.
<b>Manutenção e certificação</b>	Equipamentos críticos sujeitos a manutenção e certificação regulares.	Auditoria e registos de revisão não uniformes
<b>Comissionamento / descomissionamento</b>	Procedimentos de comissionamento reconhecidos e documentados.	Processos de descomissionamento pouco documentados.

<b>Domínio avaliado</b>	<b>Pontos fortes identificados</b>	<b>Fragilidades identificadas</b>
<b>Equipamento de proteção individual</b>	Disponibilidade de EPI essencial e treino de utilização.	Variabilidade na proteção respiratória e no registo de formação.
<b>Formação e competências</b>	Programas de formação reconhecidos e conteúdos abrangentes.	Formação específica em emergência e acidentes laboratoriais menos frequente.
<b>Procedimentos laboratoriais</b>	Boas práticas microbiológicas e manuseamento seguro de material infeccioso.	Gestão de cilindros de gás comprimido com conformidade inferior.
<b>Bioproteção</b>	Controlo de acessos e segurança da informação documentados.	Domínio mais frágil: inventário e rastreabilidade de agentes, vigilância e proteção da informação.
<b>Documentação</b>	Procedimentos operacionais padrão e manuais de biossegurança disponíveis.	Revisão periódica e auditorias de documentação com frequência variável.



## **Capítulo IV: Discussão e Conclusão**

O primeiro caso confirmado do surto de mpox em 2022 foi notificado no Reino Unido a 6 de maio de 2022, num doente com história recente de viagem à Nigéria. Em 17 de maio de 2022, Portugal foi o segundo país a confirmar casos de mpox (European Centre for Disease Prevention and Control, 2022; Perez et al., 2022). Estudos posteriores revelaram que o vírus circulou silenciosamente em território nacional antes da notificação oficial, o que pode justificar o aumento abrupto dos casos iniciais (Cordeiro et al., 2024). Um modelo matemático sugere que o vírus terá circulado 50 dias antes de ser detetado (Cordeiro et al., 2025a).

O terceiro surto de mpox registado em Portugal entre 2024 e 2025 apresentou características epidemiológicas distintas das observadas no surto global de 2022–2023, refletindo uma fase de circulação mais limitada do vírus. A baixa taxa de positividade (14,1%) entre os casos suspeitos, bem como a ausência de picos acentuados de casos confirmados, mesmo perante um aumento das notificações motivado pelos alertas internacionais, sugerem um cenário epidemiológico controlado, caracterizado por introduções esporádicas de MPXV com transmissão local restrita. A distribuição demográfica manteve o padrão anteriormente descrito, com predominância marcada de casos no sexo masculino e nos grupos etários jovens adultos, reforçando a continuidade das redes de transmissão identificadas em surtos anteriores.

Do ponto de vista laboratorial, a elevada sensibilidade do exsudado de lesão e do exsudado anal para deteção de MPXV confirma observações anteriores e suporta o seu uso como amostras preferenciais para diagnóstico molecular (Cordeiro et al., 2024). Os valores mais baixos de Ct observados nestas amostras, compatíveis com cargas virais superiores, reforçam a importância da colheita adequada, particularmente em fases iniciais da infeção. Já o exsudado orofaríngeo demonstrou menor sensibilidade, o que poderá refletir menor carga viral local ou maior variabilidade temporal na sua positividade. No entanto, o exsudado orofaríngeo revelou-se uma alternativa válida, especialmente em casos sem lesões visíveis, tendo permitido o diagnóstico em cerca de 5% dos casos no primeiro surto (Cordeiro et al., 2024). A presença de MPXV na orofaringe tem sido consistentemente documentada, sugerindo o seu potencial como via de transmissão, especialmente por contato oral direto (Cordeiro et al., 2024; León et al., 2022; Heskin et al., 2022).

A análise genómica revelou a circulação exclusiva do clade IIb em Portugal. A identificação de múltiplas sublinhagens pertencentes ao clade IIb confirma que o surto nacional resultou de várias introduções independentes, refletindo a diversidade viral em circulação internacional. A predominância da sublinhagem F.4, presente maioritariamente em amostras colhidas em 2025, indica persistência desta variante ao longo do período estudado. A deteção de um caso atípico da sublinhagem A.2.1, invulgar na Europa, reforça a relevância da vigilância genómica contínua, uma vez que evidencia a circulação internacional de linhagens menos comuns que podem ser epidemiologicamente relevantes (Pascali et al, 2025). O laboratório de referência português (UREB/INSA) mantém a vigilância ativa da mpox, incluindo a caracterização genómica do MPXV de todos os casos positivos. A deteção recente do primeiro caso pertencente ao clade Ib demonstra a capacidade operacional do laboratório e a importância da vigilância genómica contínua para a deteção atempada de introduções virais e para o apoio à resposta das autoridades de saúde.

A avaliação do potencial de diagnóstico incorreto entre mpox e varicela demonstrou que 24,6% das amostras negativas para MPXV correspondiam, afinal, a infeções por VZV. Este resultado evidencia a sobreposição clínica entre ambas as doenças e confirma que a varicela constituiu um diagnóstico alternativo frequente nos casos inicialmente suspeitos de mpox. A variação temporal da positividade para VZV, com aumento nos meses finais de 2022, sugere que a circulação sazonal de VZV pode ter contribuído para o acréscimo de casos com apresentações clínicas semelhantes a mpox, sobretudo em contextos de elevada perceção de risco e procura acrescida de testagem. Estes resultados realçam a importância da confirmação laboratorial sistemática, especialmente em períodos de maior atividade clínica ou quando várias infeções exantemáticas circulam simultaneamente.

A análise serológica complementou a caracterização imunológica dos casos. Entre os doentes com infeção confirmada por PCR, pouco mais de metade (54,6%) apresentou títulos de IgG acima do *cut-off*, refletindo a variabilidade da resposta humoral decorrente de fatores como tempo desde a infeção, severidade clínica e eventual vacinação prévia contra a varíola. A predominância de títulos elevados no grupo etário dos  $\geq 60$  anos é coerente com a imunidade adquirida através da vacinação prévia contra o vírus da varíola, conferindo memória imunológica cruzada capaz de potenciar a resposta aos OPXV.

O gradiente crescente da mediana de IgG com a idade, visualizado e estatisticamente significativo apenas entre os 50–59 e  $\geq 60$  anos, é compatível com este padrão. Importa considerar que os indivíduos com  $\geq 60$  anos poderão ter recebido um número superior de

doses da vacina contra a varíola durante a infância e adolescência, uma vez que, até à década de 1960, eram frequentes campanhas de vacinação e revacinação, fator que pode ter contribuído para níveis mais elevados de imunidade cruzada a OPXV. Em contraste, os indivíduos nascidos na década de 1970 já não foram sistematicamente vacinados, dado que os programas de vacinação contra a varíola foram progressivamente descontinuados nesse período. Assim, muitos não foram vacinados ou receberam apenas uma dose, o que poderá justificar a ausência, ou menor intensidade, de imunidade cruzada observada neste grupo etário (World Health Organization, 2010). Ainda assim, o número reduzido de amostras nestes grupos limita a robustez destas observações, sendo necessária a análise de um conjunto mais alargado de amostras para confirmar este padrão de forma conclusiva.

A relação entre os títulos de IgG e os dias após o início dos sintomas revelou grande variabilidade entre os casos confirmados, sobretudo nas primeiras semanas, sugerindo respostas humorais individualmente heterogêneas, enquanto os casos PCR-negativos mantiveram valores consistentemente baixos. No entanto, a ausência de uma segunda colheita de soro, idealmente realizada cerca de 21 dias após a primeira, limitou a avaliação dinâmica da resposta humoral ao longo do decurso da doença, impedindo uma caracterização mais completa da evolução dos anticorpos. A maioria dos soros foram colhidos ao mesmo tempo que as outras amostras para diagnóstico de mpox, ou seja, no início dos sintomas.

Diversos estudos demonstraram que a vacinação histórica contra a varíola continua a influenciar de forma significativa a imunidade face ao MPXV. Estudos de coorte realizados em África, evidenciaram que indivíduos não vacinados apresentavam um risco entre 2,7 e 9,6 vezes superior de desenvolver mpox, estimando-se que a vacina conferia uma proteção de aproximadamente 85%. Paralelamente, estudos de seguimento de longa duração confirmam que a imunidade humoral induzida em indivíduos vacinados antes de 1980 se mantém detetável durante várias décadas, incluindo anticorpos com capacidade neutralizante “*in vitro*” contra OPXV (Wu, J., & Zhang, X, 2025). Um estudo recente realizado no Brasil, utilizando o mesmo ensaio de ELISA aplicado no presente trabalho, avaliou voluntários saudáveis com histórico de vacinação confirmado e demonstrou um padrão concordante com os nossos resultados, observando concentrações significativamente mais elevadas de IgG anti-MPXV nos indivíduos com  $\geq 60$  anos (Dos Santos et al., 2024).

Outros estudos destacam igualmente o papel das pessoas que vivem com HIV nos surtos recentes de mpox, representando entre 28% e 51% dos casos notificados. Os indivíduos HIV positivos nascidos antes da suspensão da vacinação contra a varíola apresentam frequentemente anticorpos contra antígenos de OPXV, refletindo imunidade vacinal prévia, enquanto nas coortes mais jovens estes anticorpos são raros. Embora os níveis de anticorpos induzidos pela vacinação possam ser semelhantes em indivíduos HIV positivos e negativos, a imunossupressão associada ao vírus, aliada à ausência de vacinação nas gerações pós-1980, contribui para uma maior vulnerabilidade e para a possibilidade de evolução clínica mais grave da infeção por MPXV (Wu, J., & Zhang, X., 2025).

Importa salientar que, nos surtos mais recentes, os casos de mpox ocorreram predominantemente em homens jovens sexualmente ativos, nomeadamente HSH, que foram também os principais alvos da vacinação. Em Portugal, desde o início da vacinação (16 de julho de 2022) até 31 de maio de 2025, foram vacinadas 12 163 pessoas. E das 21 800 inoculações administradas, 20 381 (93,5%) ocorreram em contexto de pré-exposição, o que reforça a necessidade de considerar estratégias adicionais dirigidas a populações mais jovens que não beneficiaram da imunidade conferida pelos programas históricos de vacinação contra a varíola (Direção-Geral da Saúde, 2025).

O questionário *Culture of Biosafety, Biosecurity and Responsible Conduct in the Life Sciences* foi desenvolvido no âmbito de um trabalho internacional destinado a conceptualizar e medir a cultura de biossegurança e bioproteção em ambientes laboratoriais. A sua construção resultou de uma revisão sistemática da literatura, de consultas a especialistas em biossegurança, bioética e gestão de risco, e de vários ciclos de validação por peritos. O grupo de trabalho identificou inicialmente os principais elementos que influenciam comportamentos seguros nos laboratórios, agrupando-os em quatro domínios centrais: sistemas de gestão, comportamento de liderança e do pessoal, princípios orientadores e atitudes/valores individuais (Perkins et al., 2019).

Com base nesse enquadramento conceptual, foram selecionados indicadores e formuladas perguntas específicas destinadas a captar perceções, práticas e crenças relacionadas com biossegurança, bioproteção e conduta responsável. O objetivo final foi criar uma ferramenta simples, padronizada e comparável entre instituições, capaz de complementar auditorias técnicas e de fornecer informação sobre aspetos comportamentais e culturais que influenciam a gestão do risco biológico (Perkins et al., 2019).

Os estudos que aplicaram este questionário mostraram que a cultura de biossegurança é influenciada tanto por fatores técnicos como por aspetos comportamentais e organizacionais. Alguns concluíram que, apesar da escassez de métricas padronizadas, estes instrumentos permitem identificar fragilidades não detetáveis por auditorias tradicionais, como lacunas na comunicação, na formação e nos instrumentos para reportar (Perkins et al., 2019). Resultados semelhantes foram também observados noutra estudo, onde foram identificadas perceções positivas gerais, mas falhas persistentes em formação contínua, procedimentos de emergência e comunicação institucional (Dao et al., 2022). Em conjunto, estes estudos demonstram que questionários estruturados constituem ferramentas valiosas para mapear a cultura de biossegurança e bioproteção e orientar intervenções que reforcem práticas seguras nos laboratórios.

A avaliação da cultura de biossegurança, bioproteção e conduta responsável permitiu integrar a dimensão comportamental e estrutural dos laboratórios portugueses. As respostas dos profissionais e estudantes das ciências da vida revelaram uma cultura globalmente positiva, em todos os domínios avaliados, com pontuações médias superiores a 60%, e com destaque para os domínios relacionados com ética, responsabilidade e princípios orientadores. No entanto, foram identificadas fragilidades nos sistemas de gestão, nomeadamente na realização de simulacros de emergência, na comunicação bidirecional e na existência de mecanismos estruturados para reportar comportamentos de risco. Estas lacunas são particularmente relevantes em ambientes laboratoriais que lidam com agentes emergentes, onde o comportamento humano é um determinante crítico para a prevenção de incidentes/acidentes.

Ao analisar a influência da experiência profissional e da posição hierárquica, observou-se que os gestores e supervisores de laboratório apresentaram as pontuações médias mais elevadas, seguidos dos técnicos de laboratório, enquanto os estudantes registaram valores mais baixos em quase todos os domínios. Esta tendência sugere que a experiência acumulada e o envolvimento direto na gestão do risco biológico contribuem positivamente para uma perceção mais consistente e consciente da biossegurança e bioproteção.

Apesar do número relativamente reduzido de participantes (n=96), foi possível identificar tendências claras que refletem a cultura de biossegurança, bioproteção e conduta responsável, atualmente presente nos laboratórios em Portugal.

A utilização do questionário *European Checklist for Laboratory Biorisk Management in Handling of High Consequence Risk Group 3 and 4 Agents* (ECL) constitui uma

ferramenta fundamental para a avaliação estruturada dos sistemas de gestão de risco biológico em laboratórios de contenção elevada. Desenvolvido no âmbito de ações conjuntas europeias, o ECL resultou da colaboração direta entre dezenas de laboratórios BSL-3 e BSL-4 de referência europeus, refletindo um consenso internacional sobre práticas essenciais para a segurança biológica e bioproteção. A sua aplicação permite uniformizar critérios, harmonizar procedimentos e estabelecer um ponto de referência comum entre laboratórios que manipulam agentes de elevado impacto em saúde pública. Um estudo europeu envolvendo mais de 30 laboratórios de contenção elevada demonstrou que o ECL é particularmente eficaz para identificar fragilidades dificilmente detetáveis através de auditorias convencionais, como a ausência de exercícios de emergência, insuficiências na comunicação interna e externa ou lacunas em planos de desativação e descomissionamento de instalações (Appelt et al., 2020). A possibilidade de comparar resultados entre laboratórios e países torna esta ferramenta especialmente valiosa para monitorizar a preparação nacional e regional, e orientar prioridades de melhoria e investimento.

No contexto nacional, a utilização de instrumentos standardizados como o ECL é essencial para garantir que os laboratórios BSL-3 se encontram alinhados com as práticas europeias e internacionais. Mesmo quando aplicado a um número limitado de unidades laboratoriais, este instrumento permite obter uma visão robusta da maturidade dos sistemas de biossegurança, facilitando a identificação de áreas críticas e promovendo a melhoria contínua. Assim, a integração do ECL em avaliações regulares representa um passo central para reforçar a preparação do país face a agentes emergentes e para consolidar uma cultura de biossegurança sustentável e harmonizada com os padrões europeus.

Nos laboratórios BSL-3 nacionais, verificaram-se níveis de conformidade elevados nos aspetos estruturais essenciais, contenção física, ventilação, pressão negativa, integridade das CSB e certificação anual, refletindo alinhamento com as normas europeias aplicáveis. Contudo, observaram-se fragilidades na redundância de sistemas de ventilação, na uniformização de alarmes para falhas críticas e na realização de exercícios regulares de emergência. A discrepância entre o elevado nível de qualificação dos profissionais e a ausência sistemática de simulacros ou de documentação harmonizada sugere que, embora tecnicamente adequadas, estas infraestruturas beneficiariam de reforço organizacional e formativo para consolidar uma cultura de segurança mais robusta.

Apesar do número limitado de respostas (n=8), estas incluem os principais laboratórios de referência nacionais em saúde humana, saúde animal e defesa, proporcionando uma visão representativa da maturidade dos sistemas de biossegurança e evidenciando a preparação existente no país.

Apesar da amplitude das metodologias utilizadas, este estudo apresenta limitações que devem ser consideradas. A análise serológica foi condicionada pelo número reduzido de amostras em alguns grupos etários e pela ausência de uma segunda colheita de soro, que teria permitido caracterizar a evolução temporal da resposta humoral. A falta de dados sobre o historial vacinal contra a varíola e o estado imunológico relativamente ao HIV limitou igualmente a interpretação dos títulos de IgG. Acresce que não foram realizados testes de neutralização, considerados o *gold-standard* para avaliar a atividade funcional e capacidade neutralizante dos anticorpos. Assim, os resultados serológicos apresentados baseiam-se exclusivamente na quantificação de IgG, não permitindo extrapolar diretamente a competência neutralizante ou o nível de proteção imunológica efetiva conferida pela resposta humoral.

Relativamente aos questionários, embora tenham permitido identificar tendências, o número de participantes não permite extrapolações para toda a comunidade científica. O inquérito dirigido aos laboratórios BSL-3, apesar de incluir as principais unidades de referência, teve também dimensão limitada.

Este estudo permitiu caracterizar de forma integrada o terceiro surto de mpox em Portugal, evidenciando transmissão local restrita, múltiplas introduções virais e perfis demográficos consistentes com surtos anteriores. Do ponto de vista laboratorial, confirmou-se a elevada sensibilidade das amostras de lesão e anal e a utilidade da vigilância genómica para deteção de linhagens emergentes. A análise serológica revelou a presença de anticorpos IgG anti-MPXV nos doentes avaliados, evidenciando uma imunidade cruzada particularmente robusta nos indivíduos  $\geq 60$  anos, enquanto as coortes mais jovens apresentaram níveis mais baixos, refletindo uma maior suscetibilidade relativa. A avaliação da cultura de biossegurança revelou uma base globalmente sólida, embora persistam fragilidades nos sistemas de gestão e na formação. Este padrão foi também refletido nos laboratórios BSL-3, onde, apesar da elevada conformidade estrutural observada, emergiram necessidades de reforço organizacional e de treino regular, evidenciando que a robustez técnica deve ser acompanhada por práticas sistemáticas de melhoria contínua.

Como perspetivas futuras, será importante aprofundar a resposta imunitária ao MPXV através de estudos longitudinais, incluindo testes de neutralização e recolha sistemática de dados vacinais e imunológicos. No domínio da biossegurança, recomenda-se alargar a aplicação dos questionários comportamentais e da *checklist* ECL, visando harmonizar práticas, reforçar sistemas de gestão e aumentar a resiliência nacional face a agentes biológicos emergentes.

Em conjunto, os resultados epidemiológicos, laboratoriais, serológicos e de biossegurança apresentados neste estudo fornecem uma visão multifacetada do estado da mpox em Portugal e da capacidade nacional para detetar, caracterizar e responder a agentes emergentes. A articulação entre vigilância molecular, confirmação laboratorial rigorosa, análise serológica e avaliação das práticas de biossegurança e bioproteção constitui uma base sólida para reforçar a preparação face a eventuais novos surtos. O fortalecimento contínuo destas capacidades é fundamental para garantir que o país permanece devidamente preparado para futuras emergências biológicas, incluindo potenciais ameaças de bioterrorismo, assegurando uma resposta coordenada e eficaz e consolidando a resiliência dos sistemas laboratoriais e de saúde pública.

## Bibliografia

Africa Centers for Disease Control and Prevention. (2024, March 29). *Weekly epidemic intelligence report – 29 March 2024*. Africa CDC. <https://africacdc.org/download/africa-cdc-weekly-event-based-surveillance-report-march-2024/>

Antunes, F., Cordeiro, R., & Virgolino, A. (2022). Monkeypox: From A Neglected Tropical Disease to a Public Health Threat. *Infectious Disease Reports*, *14*(5), 772-783. <https://doi.org/10.3390/idr14050079>

Appelt, S., Jacob, D., Rohleder, A.-M., Bråve, A., Szekely Björndal, Å., Di Caro, A., & Grunow, R., on behalf of the Joint Action EMERGE laboratory network. (2020). Assessment of biorisk management systems in high containment laboratories, 18 countries in Europe, 2016 and 2017. *Eurosurveillance*, *25*(36), 2000089. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.36.2000089>

Beer, E. M., & Rao, V. B. (2019). *A systematic review of the epidemiology of human monkeypox outbreaks and implications for outbreak strategy*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *13*(10), e0007791. <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007791>

Borges, V., Duque, M. P., Martins, J. V., Vasconcelos, P., Ferreira, R., Sobral, D., Pelerito, A., de Carvalho, I. L., Nuncio, M. S., Borrego, M. J., Roemer, C., Neher, R. A., O'Driscoll, M., Rocha, R., Lopo, S., Neves, R., Palminha, P., Coelho, L., Nunes, A., Isidro, J., ... Gomes, J. P. (2023). Viral genetic clustering and transmission dynamics of the 2022 mpox outbreak in Portugal. *Nature medicine*, *29*(10), 2509–2517. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02542-x>

Borges, V., Pinheiro, M., Pechirra, P., Guiomar, R., & Gomes, J. P. (2018). INSaFLU: An automated open web-based bioinformatics suite “from-reads” for influenza whole-genome-sequencing-based surveillance. *Genome Medicine*, *10*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0555-0>

Breman, J. G., & Henderson, D. A. (2002). Diagnosis and management of smallpox. *The New England journal of medicine*, *346*(17), 1300–1308. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020025>

Brizee, S., van Passel, M. W. J., van den Berg, L. M., Feakes, D., Izar, A., Lin, K. T. B., Podin, Y., Yunus, Z., & Bleijs, D. A. (2019). Development of a Biosecurity Checklist for Laboratory Assessment and Monitoring. *Applied biosafety : journal of the American Biological Safety Association*, 24(2), 83–89. <https://doi.org/10.1177/1535676019838077>

Cabanillas, B., Murdaca, G., Guemari, A., Torres, M. J., Azkur, A. K., Aksoy, E., Vitte, J., Fernández-Santamaria, R., Karavelia, A., Castagnoli, R., Valdelvira, R., Orsi, A., Ogliastro, M., Massaro, E., Yücel, E. Ö., Novak, N., Agache, I., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2024). Monkeypox 2024 outbreak: Fifty essential questions and answers. *Allergy*, 79(12), 3285–3309. <https://doi.org/10.1111/all.16374>

Campe, H., Zimmermann, P., Glos, K., Bayer, M., Bergemann, H., Dreweck, C., Graf, P., Weber, B. K., Meyer, H., Büttner, M., Busch, U., & Sing, A. (2009). Cowpox virus transmission from pet rats to humans, Germany. *Emerging infectious diseases*, 15(5), 777–780. <https://doi.org/10.3201/eid1505.090159>

Centers for Disease Control and Prevention. (2025). *Mpox Vaccination*. <https://www.cdc.gov/mpox/vaccines/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (2024a). *Preventing Mpox*. <https://www.cdc.gov/mpox/prevention/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (2024b). *Signs and symptoms of Mpox*. <https://www.cdc.gov/monkeypox/signs-symptoms/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (2006, February 28). *Bioterrorism overview*. U.S. Department of Health & Human Services. [https://preparecenter.org/wp-content/uploads/2021/04/www.bt\\_cdc.gov\\_bioterrorism\\_overview.pdf](https://preparecenter.org/wp-content/uploads/2021/04/www.bt_cdc.gov_bioterrorism_overview.pdf)

Chen, N. F. G., Chaguza, C., Gagne, L., Doucette, M., Smole, S., & Park, D. J. (2023). Development of an amplicon-based sequencing approach in response to the global emergence of mpox. *PLOS Biology*, 21(6), e3002151. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002151>

Christoph, J. H., Martina, L., Micha, L., Hermann, M., Angelika, P., & Emil, C. R. (2010). *Human cowpox virus infection acquired from a circus elephant in Germany*. *International*

*Journal of Infectious Diseases*, 14(3), e338–e340.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.03.005>

Coppens, J., Liesenborghs, L., Vercauteren, K., Van Esbroeck, M., & Van Dijck, C. (2023). No Varicella Zoster Virus Infection among Mpox Cases in Antwerp, Belgium. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 109(6), 1282–1283.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.23-0353>

Cordeiro, R., Francisco, R., Pelerito, A., Lopes de Carvalho, I., & Nuncio, M. S. (2025a). Mpox Surveillance and Laboratory Response in Portugal: Lessons Learned from Three Outbreak Waves (2022-2025). *Infectious disease reports*, 17(4), 86.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40700332/>

Cordeiro, R., Francisco, R., Pelerito, A., Lopes de Carvalho, I., & Nuncio, M. S. (2025b). *Surtos de mpox em Portugal: resposta laboratorial e desafios no controlo da epidemia. Observações – Boletim Epidemiológico do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*, 37(1), 5–11. <https://www.insa.pt>

Cordeiro, R., Conceição Batista, F., Pelerito, A., Lopes de Carvalho, I., Lopo, S., Neves, R., Rocha, R., Palminha, P., Borrego, M. J., Nuncio, M. S., & Gomes, J. P. (2025c). *Undetected Circulation of Monkeypox Virus in Portugal: Evidence for a 50-Day Gap Before First Detection*. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.5292941>

Cordeiro, R., Pelerito, A., de Carvalho, I. L., Lopo, S., Neves, R., Rocha, R., Palminha, P., Verdasca, N., Palhinhas, C., Borrego, M. J., Manita, C., Ferreira, I., Bettencourt, C., Vieira, P., Silva, S., Água-Doce, I., Roque, C., Cordeiro, D., Brondani, G., Santos, J. A., ... Batista, F. D. C. (2024). An Overview of Monkeypox Virus Detection in Different Clinical Samples and Analysis of Temporal Viral Load Dynamics. *Journal of medical virology*, 96(12), e70104. <https://doi.org/10.1002/jmv.70104>

Dao, K., Tarangelo, J. P., Epting, M., Keita, A., Mariko, K., Danskin, K., Iknane, A., & Perkins, D. (2022). Building a culture of biosafety, biosecurity, and responsible conduct in the life sciences: A view from Mali. *GET Journal of Biosecurity and One Health*, 1, 7-19. <https://doi.org/10.36108/GJOB0H/2202.10.0120>

Direção-Geral da Saúde. Centro de emergência de saúde pública. Mpox em Portugal e no mundo – informação mensal de 31 de maio, 2025. <https://www.dgs.pt/ficheiros-de->

[upload-2013/informacao-mensal-de-abril-e-maio-de-2025-sobre-mpox-em-portugal-pdf.aspx](https://www.dgs.pt/upload-2013/informacao-mensal-de-abril-e-maio-de-2025-sobre-mpox-em-portugal-pdf.aspx)

Direção-Geral da Saúde. (2022a, 12 de julho). *Norma n.º 006/2022 de 12/07/2022: Vacinação contra mpox* (atualizada em 21/11/2024). Direção-Geral da Saúde. <https://www.backoffice.dgs.pt/upload/DGSv9/ficheiros/i030064.pdf>

Direção-Geral da Saúde. (2022b). *Orientação n.º 004/2022: Abordagem de casos de infeção humana por vírus Monkeypox (VMPX)* (Atualização de 15/09/2022). Direção-Geral da Saúde <https://www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0042022-de-31052022-pdf.aspx>

European Centre for Disease Prevention and Control. (2022, May 19). *Monkeypox cases reported in UK and Portugal*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/monkeypox-cases-reported-uk-and-portugal>

Dos Santos, I. C. M., Souza, M. S., Fogaça, M. M. C., da Silva Brito, R. D., da Rocha Santos, A., & Amorim, J. H. (2024). *Elderly individuals exhibit elevated levels of anti-Monkeypox virus antibodies compared to adults, youth, and children*. *Journal of Medical Virology*, 96(11), e70083. <https://doi.org/10.1002/jmv.70083>

European Centre for Disease Prevention and Control. (2025). *Threat assessment brief – Detection of autochthonous transmission of monkeypox virus clade Ib in the EU/EEA* (24 October 2025). ECDC. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/mpox-TAB-October-2025.pdf>

Gessain, A., Nakoune, E., & Yazdanpanah, Y. (2022). Monkeypox. *The New England journal of medicine*, 387(19), 1783–1793. <https://doi.org/10.1056/NEJMr2208860>

GraphPad Software. (2025). *Analyze a 2 × 2 contingency table* [Calculadora QuickCalcs]. Recuperado em 7 de abril de 2025, de <https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>

Grosenbach, D. W., Honeychurch, K., Rose, E. A., Chinsangaram, J., Frimm, A., Maiti, B., Lovejoy, C., Meara, I., Long, P., & Hruby, D. E. (2018). Oral Tecovirimat for the Treatment of Smallpox. *The New England journal of medicine*, 379(1), 44–53. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1705688>

Grubaugh, N. D., Gangavarapu, K., Quick, J., Matteson, N. L., De Jesus, J. G., Main, B. J., Tan, A. L., Paul, L. M., Brackney, D. E., Grewal, S., Gurfield, N., Van Rompay, K. K. A., Isern, S., Michael, S. F., Coffey, L. L., Loman, N. J., & Andersen, K. G. (2019). An amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity using PrimalSeq and iVar. *Genome Biology*, 20(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1618-7>

Hadfield, J., Megill, C., Bell, S. M., Huddleston, J., Potter, B., Callender, C., Sagulenko, P., Bedford, T., & Neher, R. A. (2018). Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics* (Oxford, England), 34(23), 4121–4123. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407>

Heskin, J., Belfield, A., Milne, C., Brown, N., Walters, Y., Scott, C., Bracchi, M., Moore, L. S., Mughal, N., Rampling, T., Winston, A., Nelson, M., Duncan, S., Jones, R., Price, D. A., & Mora-Peris, B. (2022). Transmission of monkeypox virus through sexual contact - A novel route of infection. *The Journal of infection*, 85(3), 334–363. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.05.028>

Huang, Y., Mu, L., & Wang, W. (2022). Monkeypox: epidemiology, pathogenesis, treatment and prevention. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 373. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01215-4>

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. (2025). *Área de atuação: Doenças infecciosas – Lab-PTBIONET*. <https://www.insa.min-saude.pt/category/areas-de-atuacao/doencas-infeciosas/lab-ptbionet/>

International Working Group on Strengthening the Culture of Biosafety, Biosecurity, and Responsible Conduct in the Life Sciences. (2020). *Culture of biosafety, biosecurity, and responsible conduct in the life sciences: (Self) assessment framework (Working draft, January 2020)*. [https://absa.org/wp-content/uploads/2020/02/Culture\\_of\\_Biosafety-Biosecurity\\_Self-Assessment\\_Framework.pdf](https://absa.org/wp-content/uploads/2020/02/Culture_of_Biosafety-Biosecurity_Self-Assessment_Framework.pdf)

Kurth, A., Achenbach, J., Miller, L., Mackay, I. M., Pauli, G., & Nitsche, A. (2008). Orthopoxvirus detection in environmental specimens during suspected bioterror attacks: inhibitory influences of common household products. *Applied and environmental microbiology*, 74(1), 32–37. <https://doi.org/10.1128/AEM.01501-07>

Ladnyj, I. D., Ziegler, P., & Kima, E. (1972). A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. *Bulletin of the World Health Organization*, 46(5), 593–597. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4340218/>

León-Figueroa, D. A., Barboza, J. J., Saldaña-Cumpa, H. M., Moreno-Ramos, E., Bonilla-Aldana, D. K., Valladares-Garrido, M. J., Sah, R., & Rodriguez-Morales, A. J. (2022). Detection of Monkeypox Virus according to The Collection Site of Samples from Confirmed Cases: A Systematic Review. *Tropical medicine and infectious disease*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8010004>

Li, C., Xu, D., Duan, Q., Wang, H., Li, Y., Ding, S., Liu, T., Li, R., Kou, Z., & Yin, C. (2025). *Evolutionary epidemiology of the monkeypox virus in Shandong Province during the post-global outbreak era*. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1677051. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1677051>

Li, H., Huang, Q. Z., Zhang, H., Liu, Z. X., Chen, X. H., Ye, L. L., & Luo, Y. (2023). The land-scape of immune response to monkeypox virus. *EBioMedicine*, 87, 104424. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104424>

Liang, C., Qian, J., & Liu, L. (2022). Biological characteristics, biosafety prevention and control strategies for the 2022 multi-country outbreak of monkeypox. *Biosafety and health*, 4(6), 376–385. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2022.11.001>

Lu, J., Xing, H., Wang, C., Tang, M., Wu, C., Ye, F., Yin, L., Yang, Y., Tan, W., & Shen, L. (2023). Mpox (formerly monkeypox): pathogenesis, prevention, and treatment. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 458. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01675-2>

Luciani, L., Lapidus, N., Amroun, A., Falchi, A., Souksakhone, C., Mayxay, M., Dubot-Pères, A., Villarroel, P. M. S., Diarra, I., Koita, O., Gallian, P., & de Lamballerie, X. (2022). Orthopoxvirus Seroprevalence and Infection Susceptibility in France, Bolivia, Laos, and Mali. *Emerging infectious diseases*, 28(12), 2463–2471. <https://doi.org/10.3201/eid2812.221136>

Luna, N., Muñoz, M., Bonilla-Aldana, D. K., Patiño, L. H., Kasminskaya, Y., Paniz-Mondolfi, A., & Ramírez, J. D. (2023). Monkeypox virus (MPXV) genomics: A

mutational and phylogenomic analyses of B.1 lineages. *Travel medicine and infectious disease*, 52, 102551. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2023.102551>

Manju, K., Ranjini, H. K., Raj, S. N., Nayak, S. C., Chouhan, R. S., Prasad, A., Harini, B. P., Prasad, M. N. N., Satish, S., & Baker, S. (2022). *Monkeypox viruses: Resurgence of global threat to mankind*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 16(Suppl. 1), 2989–2999. <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.SPL1.20>

Medical University of South Carolina. (s.d.). *Monkeypox*. MUSC Student Health Services. <https://education.musc.edu/students/student-health-and-well-being-care-center/student-health-services/health-advisories/monkeypox%20>

Mbala, P. K., Huggins, J. W., Riu-Rovira, T., Ahuka, S. M., Mulembakani, P., Rimoin, A. W., Martin, J. W., & Muyembe, J. T. (2017). Maternal and Fetal Outcomes Among Pregnant Women With Human Monkeypox Infection in the Democratic Republic of Congo. *The Journal of infectious diseases*, 216(7), 824–828. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix260>

Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Nitsche, A., Ellerbrok, H., & Pauli, G. (2004). Detection of orthopoxvirus DNA by real-time PCR and identification of variola virus DNA by melting analysis. *Journal of clinical microbiology*, 42(3), 1207–1213. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC356842/pdf/1166.pdf>

Niu, L., Liang, D., Ling, Q., Zhang, J., Li, Z., Zhang, D., Xia, P., Zhu, Z., Lin, J., Shi, A., Ma, J., Yu, P., & Liu, X. (2023). *Insights into monkeypox pathophysiology, global prevalence, clinical manifestation and treatments*. *Frontiers in Immunology*, 14, 1132250. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1132250>

Papukashvili, D., Rcheulishvili, N., Liu, C., Wang, X., He, Y., & Wang, P. G. (2022). Strategy of developing nucleic acid-based universal monkeypox vaccine candidates. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1050309>.

Parnian, R., Heydarifard, F., Mousavi, F. S., Heydarifard, Z., & Zandi, M. (2024). Innate Immune Response to Monkeypox Virus Infection: Mechanisms and Immune Escape. *Journal of innate immunity*, 16(1), 413–424 <https://doi.org/10.1159/000540815>

Pascali, A. M., Ingletto, L., Brandolini, M., Rocchi, E., Tarozzi, M., Turba, M. E., Casadio, R., Gentilini, F., Gatti, G., Dionisi, L., Colosimo, C., Guerra, M., Zannoli, S., Dirani, G., Montanari, M. S., Marzucco, A., Grumiro, L., Rossini, G., Lazzarotto, T., Cricca, M., Castellani, G., Sambri, V., & Scagliarini, A. (2025). *Understanding the evolutionary dynamics of Monkeypox virus through less explored pathways. Scientific Reports*, 15, 25849. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-11855-5>

Perez Duque, M., Ribeiro, S., Martins, J. V., Casaca, P., Leite, P. P., Tavares, M., Mansinho, K., Duque, L. M., Fernandes, C., Cordeiro, R., Borrego, M. J., Pelerito, A., de Carvalho, I. L., Nuncio, S., Manageiro, V., Minetti, C., Machado, J., Haussig, J. M., Croci, R., Spiteri, G., ... Freitas, G. (2022). Ongoing monkeypox virus outbreak, Portugal, 29 April to 23 May 2022. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 27(22), 2200424. <https://doi.org/10.2807/1560->

Perkins, D., Danskin, K., Rowe, A. E., & Livinski, A. A. (2019). The Culture of Biosafety, Biosecurity, and Responsible Conduct in the Life Sciences: A Comprehensive Literature Review. *Applied biosafety : journal of the American Biological Safety Association*, 24(1), 34–45. <https://doi.org/10.1177/1535676018778538>

QUANDHIP. (2015). *Integrated European Checklist for Laboratory Biorisk Management (ECL-Biorisk)*. EMERGE / QUANDHIP. [https://www.emerge.rki.eu/Emerge/EN/Content/Topics/Rules/ECL\\_Biorisk.pdf?\\_blob=publicationFile](https://www.emerge.rki.eu/Emerge/EN/Content/Topics/Rules/ECL_Biorisk.pdf?_blob=publicationFile)

Quick, J. (2020, September 8). *Amplicon clean-up using SPRI beads*. protocols.io. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.7nxhmfj>

Rathjen, N. A., & Shahbodaghi, S. D. (2021). Bioterrorism. *American family physician*, 104(4), 376–385. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34652097/>

Rasizadeh, R., Shamekh, A., Shiri Aghbash, P., & Bannazadeh Baghi, H. (2023). *Comparison of human monkeypox, chickenpox and smallpox: A comprehensive review of*

*pathology and dermatological manifestations*. *Current Medical Research and Opinion*, 39(5), 751–760. <https://doi.org/10.1080/03007995.2023.2200122>

Resnik D. B. (2024). Biosafety, biosecurity, and bioethics. *Monash bioethics review*, 42(1), 137–167. <https://doi.org/10.1007/s40592-024-00204-3>

Sagulenko, P., Puller, V., & Neher, R. A. (2018). TreeTime: Maximum-likelihood phylodynamic analysis. *Virus Evolution*, 4(1), vex042. <https://doi.org/10.1093/ve/vex042>

Santos, J. D., Sobral, D., Pinheiro, M., Isidro, J., Bogaardt, C., Pinto, M., Eusébio, R., Santos, A., Mamede, R., Horton, D. L., Gomes, J. P., TELEVIR Consortium, & Borges, V. (2024). INSaFLU-TELEVIR: an open web-based bioinformatics suite for viral metagenomic detection and routine genomic surveillance. *Genome medicine*, 16(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13073-024-01334-3>

Schuele, L., Masirika, L. M., Udahemuka, J. C., Siangoli, F. B., Mbiribindi, J. B., Ndishimye, P., Aarestrup, F. M., Koopmans, M., Oude Munnink, B. B., Molenkamp, R., GREATLIFE MPOX group, & Collaborators. (2024). Real-time PCR assay to detect the novel Clade Ib monkeypox virus, September 2023 to May 2024. *Eurosurveillance*, 29(32), 2400486. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.32.2400486>

Shchelkunov, S. N., Shcherbakov, D. N., Maksyutov, R. A., & Gavrilova, E. V. (2011). Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *Journal of virological methods*, 175(2), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.002>

Silva, D. C., Moreira-Silva, E. A., Gomes, J.A., Fonseca, F. G., & Correa-Oliveira, R. (2010). Clinical signs, diagnosis, and case reports of Vaccinia virus infections. *The Brazilian journal of infectious diseases*. 14(2), 129–134. <https://doi.org/10.1590/s1413-86702010000200003>

Vaughan, A., Aarons, E., Astbury, J., Balasegaram, S., Beadsworth, M., Beck, C. R., Chand, M., O'Connor, C., Dunning, J., Ghebrehewet, S., Harper, N., Howlett-Shipley, R., Ihekweazu, C., Jacobs, M., Kaindama, L., Katwa, P., Khoo, S., Lamb, L., Mawdsley, S., Morgan, D., ... Wilburn, J. (2018). Two cases of monkeypox imported to the United Kingdom, September 2018. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies*

*transmissibles* = *European communicable disease bulletin*, 23(38), 1800509.  
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.38.1800509>

Viguiet, C., Delobel, P., Lescure, F. X., Bessis, S., Mansuy, J. M., & Martin-Blondel, G. (2025). From neglected to notoriety: a review of Mpox clinical features, virology, epidemiology, treatment and prevention strategies. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 44(11), 2569–2596. <https://doi.org/10.1007/s10096-025-05242-1>

Wilson, K., Garima, Goyal. R., Chopra, H., Chopra. S. & Dhanawat, M. (2025). Overview of Monkeypox Virus. *Scr Med*. <https://doi.org/10.5937/scriptamed56-52565>

World Health Organization. (2024a, November 12). *Diagnostic testing and testing strategies for mpox: Interim guidance*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/B09166?utm>

World Health Organization. (2025f, October). *Global Mpox trends: Geografic spread of clade Ib MPXV*  
[https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx\\_global/\\_w\\_977e49e45f594849967f0f84db31800e/\\_w\\_3672d5bbb93c41cf9cd0e905cd64b74e/\\_w\\_a98ef4be46ea4b889b903bd9b4b11fd5/#sec-clades](https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/_w_977e49e45f594849967f0f84db31800e/_w_3672d5bbb93c41cf9cd0e905cd64b74e/_w_a98ef4be46ea4b889b903bd9b4b11fd5/#sec-clades)

World Health Organization. (2025a, September). *Global Mpox trends: Global Total*  
[https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx\\_global/#overview](https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/#overview)

World Health Organization. (2025e, October). *Global Mpox trends: Global Situation*.  
[https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx\\_global/\\_w\\_977e49e45f594849967f0f84db31800e/\\_w\\_3672d5bbb93c41cf9cd0e905cd64b74e/\\_w\\_a98ef4be46ea4b889b903bd9b4b11fd5/#sec-global](https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/_w_977e49e45f594849967f0f84db31800e/_w_3672d5bbb93c41cf9cd0e905cd64b74e/_w_a98ef4be46ea4b889b903bd9b4b11fd5/#sec-global)

World Health Organization. (2025c, September). *Global Mpox trends: Situation in Africa*.  
[https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx\\_global/#sec-global](https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/#sec-global)

World Health Organization. (2025d, October). *Global Mpox trends: Summary of MPXV clades*. [https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx\\_global/#sec-clades](https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/#sec-clades)

World Health Organization. (2021). *Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2021–2022: Applicable as from 1 January 2021*. World Health Organization. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/339825/9789240019720-eng.pdf?sequence=1>

World Health Organization. (2020a). *Laboratory biosafety manual* (4th ed.). World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011311>

World Health Organization. (2024b). *Mpox: How does Mpox spread?* <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/mpox>

World Health Organization. (2025b). *Mpox (monkeypox) outbreak* <https://www.who.int/europe/emergencies/situations/monkeypox>

World Health Organization. (2010, 1 de maio). *The Smallpox Eradication Programme – SEP (1966-1980)*. WHO. Recuperado de <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-smallpox-eradication-programme---sep-%281966-1980%29>

World Health Organization. (2023, May). *Smallpox* [https://www.who.int/health-topics/smallpox#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/smallpox#tab=tab_1)

World Health Organization. (2022, November 28). *WHO recommends new name for monkeypox disease*. Geneva, Switzerland. Retrieved from <https://www.who.int/news/item/28-11-2022-who-recommends-new-name-for-monkeypox-disease>

World Health Organization. (2020b, July 29). *Zoonoses*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>

Wu, J., & Zhang, X. (2025) Exploring monkeypox virus antibody levels: insights from human immunological research. *Virology* **22**, 175. <https://doi.org/10.1186/s12985-025-02748-0>

Zhou, Y., & Chen, Z. (2023). Mpox: A review of laboratory detection techniques. *Archives of Virology*, *168*, 221. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05848-w>

## **Anexo I**

### **Extração de DNA pelo kit *ANDiS Viral RNA Auto Extraction & Purification***

#### Reagentes:

- kit *ANDiS Viral RNA Auto Extraction & Purification*:
  - Proteinase K
  - Placas pré-preenchidas para 16 testes
  - Strips 8-combi

#### Equipamento e material:

- *ANDIS 350 Automated Nucleic Acid Extraction System* (3DMed)
- Câmara de segurança biológica de classe II
- Vórtex (Grant Bio)
- Micropipetas (Eppendorf)
- Tubos de 1,5 ml com tampa (Eppendorf)

#### Procedimento:

As amostras biológicas foram manipuladas e preparadas de acordo com os procedimentos validados, garantindo condições adequadas de contenção e de manipulação segura. Todos os reagentes foram deixados equilibrar à temperatura ambiente antes da utilização.

Antes de iniciar o procedimento, a placa foi invertida 10–15 vezes para assegurar a homogeneização dos reagentes, removendo-se posteriormente a tampa adesiva. Em seguida, adicionaram-se 20µL de proteinase K a cada poço das colunas 1 (A1–H1) e 7 (A7–H7), seguido de 200µL de amostra previamente homogeneizada no vórtex.

Após esta etapa, a placa e as respetivas tiras foram colocadas no equipamento, na posição indicada pelo fabricante, selecionando-se o programa de extração correspondente (*Viral RNA*).

No final do ciclo de extração, cerca de 100µL do eluído obtido (poços das filas 6 e 12) foram transferidos para microtubos de 1,5 mL devidamente identificados.

## Anexo II

### Quantificação do título de anticorpos IgG pelo kit *Human Anti-MPV IgG ELISA*

#### Reagentes:

- Microplaca de ELISA
- Controlo padrão quantificado
- Anticorpo marcado com HRP
- Substrato TMB
- Tampão de diluição de amostras
- Tampão de diluição de anticorpo
- Solução STOP
- Tampão de lavagem
- Selador de placa
- Cloreto de sódio 0,9%

#### Equipamento e material:

- Equipamento de lavagem automática (ThermoFisher Scientific)
- Estufa a 37°C (EDELSTAHL)
- Leitor de microplacas (ThermoFisher Scientific)
- Câmara de segurança biológica de classe II (Forma Scientific)
- Vórtex (Grant Bio)
- Micropipetas (Eppendorf)
- Tubos de 1,5 ml com tampa (Eppendorf)

#### Procedimento:

O kit foi retirado do frigorífico e deixado à temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos, de forma a equilibrar todos os reagentes antes da sua utilização. Seguidamente, preparou-se a curva padrão utilizando o controlo padrão quantificado e o tampão de diluição. As amostras foram depois diluídas a 1:100 com o tampão de diluição e solução de cloreto de sódio a 0,9%.

O volume de 50µL foi distribuído nos poços da placa, que foram incubados durante 30 minutos a 37°C. Após esta incubação, as placas foram lavadas três vezes com o tampão de lavagem fornecido. De seguida, adicionou-se a solução de trabalho do anticorpo conjugado com HRP e as placas foram novamente incubadas por 30 minutos a 37°C. Concluída esta etapa, as placas foram lavadas cinco vezes e procedeu-se à adição da solução de substrato TMB, iniciando a reação enzimática. As placas foram incubadas durante 10–15 minutos a 37°C, protegidas da luz. A reação foi então interrompida com a solução de paragem do kit, e a absorvância foi imediatamente medida a 450nm.