



2014

número

10

2ª série

Lisboa\_INSA, IP

publicação trimestral \_ outubro - dezembro

ISSN: 2183-8873 (em linha)

# Observações

## Boletim Epidemiológico

### editorial

#### A sequenciação de nova geração e a investigação epidemiológica no INSA

A determinação da sequência do DNA tornou-se um dado indispensável para muitos estudos epidemiológicos, quer de microrganismos patogénicos quer de populações humanas.

Desde 2005, ano em que a empresa Roche Diagnostics iniciou a comercialização do primeiro equipamento de sequenciação de nova geração ("next-generation sequencing"), baseado no método de pirosequenciação, foram lançadas diversas plataformas tecnológicas capazes de sequenciar, num curto espaço de tempo, o genoma completo dos organismos.

A evolução tecnológica na sequenciação de DNA foi verdadeiramente impressionante. Por exemplo, o projeto de sequenciação do genoma humano, iniciado em 1990 por um consórcio internacional e tendo por base os equipamentos de sequenciação capilar, demorou 13 anos a ser concluído e teve um custo estimado de 100 milhões de dólares.

Atualmente, a sequenciação de um genoma humano completo, através de uma plataforma de nova geração, pode ser realizada em poucos dias, num único laboratório, e ter um custo perto de 1000 dólares.

As aplicações da sequenciação de nova geração que poderão ter maior desenvolvimento num futuro próximo são as que estão relacionadas com a saúde humana.

→ continua



Instituto Nacional de Saúde  
Doutor Ricardo Jorge

### neste número

#### Editorial

A sequenciação de nova geração e a investigação epidemiológica no INSA p 01  
*Luis Vieira, Peter Jordan (Departamento de Genética Humana, INSA)*

#### Artigos Breves

##### Doenças Genéticas

1\_ Pesquisa de microdeleções AZF em homens inférteis na população portuguesa p 03  
*Iris Pereira-Caetano, Júlia Silva, Sónia Correia, Maria Graça Pinto, Ricardo Rangel, Ana Aguiar, Joaquim Nunes, Carlos Calhaz, João Gonçalves*

2\_ Variantes genéticas da hormona hepcidina contribuem para aumentar os níveis de ferritina sérica em indivíduos suscetíveis de desenvolverem sobrecarga em ferro p 06  
*Bruno Silva, Lina Pita, Susana Gomes, Pedro Loureiro, João Gonçalves, Paula Faustino*

##### Doenças Não Transmissíveis

3\_ Prevalência de demências na população sob observação da Rede de Médicos-Sentinelas em 2006 p 09  
*Ana Paula Rodrigues, Mafalda de Sousa-Uva, Cristina Galvão, Baltazar Nunes, Carlos Matias Dias*

4\_ Alteração de marcadores inflamatórios, imunidade inata e metabolismo do ferro numa população portuguesa com doença de Behçet p 11  
*Rita Oliveira, Patrícia Napoleão, João Barha, Dina Pereira, Filipe Barcelos, Ana Teixeira, José Vaz Patto, Ana Maria Viegas-Crespo, Luciana Costa*

##### Doenças Infecciosas

5\_ Efetividade da vacina antigripal sazonal na época 2013/2014: resultados do projeto EuroEVA p 15  
*Ausenda Machado, Raquel Guiomar, Verónica Gómez, Pedro Pechira, Patricia Conde, Paula Cristóvão, Ana Carina Maia, Baltazar Nunes*

6\_ Disseminação de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores da carbapenemase KPC-3 p 19  
*Vera Manageiro, Eugénia Ferreira, Deolinda Louro, Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal, Manuela Carica*

7\_ Perfis de resistência de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* 4,5,[12]:- responsáveis por infeção humana, 1998-2013 p 21  
*Leonor Silveira, Adelaide Marques, Patricia Conde, João Santos, Jorge Machado*

8\_ Vigilância laboratorial das infeções por *Neisseria gonorrhoeae* em Portugal, 2004-2013 p 25  
*JC Rodrigues, L Reis, D Cordeiro, I João, M Diniz, A Nunes, C Florindo, V Borges, R Ferreira, M Pinto, M Varela, JP Gomes, MJ Borrego, Rede para a Coleção Nacional de Neisseria gonorrhoeae*

9\_ Doença meningocócica do serogrup B (MenB) em Portugal: uma reflexão sobre estratégias de imunização p 28  
*Maria João Simões, Teresa Fernandes, Paulo Gonçalves, Célia Bettencourt, Cristina Furtado*

##### Saúde Ambiental

10\_ Contaminação microbiológica do ar em lares da 3ª idade na cidade do Porto: Projeto GERIA p 33  
*Livia Aguiar, Ana Mendes, Cristiana Pereira, Maria Paula Neves, João Paulo Teixeira*

##### Alimentação e Nutrição

11\_ Perfil de minerais e elementos vestigiais em néctares e sumos de fruta: uma contribuição para o estudo de dieta total p 37  
*Dina Sardinha, Sandra Gueifão, Inês Coelho, Ana Cláudia Nascimento, Isabel Castanheira*

12\_ Guia orientativo para o estabelecimento de porções para a rotulagem nutricional p 41  
*Roberto Brazão, Sílvia Viegas, M Graça Dias, Luísa Oliveira*

#### Notícia

Novas moléculas identificadas em doença parasitária estão relacionadas com cancro e infertilidade p 44



No âmbito da genética humana, é já hoje possível realizar um diagnóstico mais rápido e informativo através da sequenciação de um painel de genes, associados a uma doença específica ou grupo de doenças, ou do conjunto de todos os genes humanos (exoma).

Na área das doenças infecciosas, os estudos do conteúdo genómico de amostras complexas (metagenómica) podem dar informação sobre a constituição das comunidades de microrganismos que colonizam o corpo humano, como sejam as do trato respiratório ou intestinal.

No âmbito da saúde pública, esta nova técnica possibilita um melhor conhecimento da etiologia das infeções, tendo em vista a adoção de estratégias terapêuticas mais adequadas. Recordamos, a título de exemplo, a identificação em tempo recorde da estirpe *Escherichia coli* O104:H4 responsável pelo surto de intoxicações alimentares na Alemanha em 2011.

As possibilidades das tecnologias de sequenciação de nova geração não estão, no entanto, limitadas à sequenciação de genomas.

Por exemplo, é também possível sequenciar o conjunto de todas as moléculas de RNA de uma célula ou de uma população de células (transcritoma), para determinar a identidade dos genes que estão a ser expressos e quantificar os respetivos transcritos, ou ainda, as regiões do genoma onde se ligam determinadas proteínas, como as histonas ou os fatores de transcrição, permitindo obter um melhor conhecimento dos mecanismos de regulação da expressão génica.

Do ponto de vista epidemiológico, estas aplicações podem esclarecer a função biológica de variantes genéticas associados com a susceptibilidade da população à doença ou com a resposta a tratamentos farmacológicos.

Dadas as múltiplas vantagens das aplicações da sequenciação de nova geração na saúde pública, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) não poderia deixar de acompanhar a evolução tecnológica na sequenciação de DNA.

Assim, o INSA foi a primeira instituição em Portugal a adquirir uma plataforma de sequenciação do principal fabricante mundial (Illumina), a qual está em pleno funcionamento na Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) desde junho de 2013.

Em pouco mais de 1 ano de atividade, foram sequenciados 150 genomas completos de diferentes microrganismos e sequenciadas mais de 300 amostras humanas para identificação de alterações em indivíduos com doenças genéticas.

Estes trabalhos resultaram de colaborações entre a Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) e vários grupos de investigação dos Departamentos de Genética Humana, Doenças Infecciosas e Epidemiologia.

A evolução tecnológica na sequenciação de DNA continua a exibir um ritmo acelerado, pelo que é de esperar, nos próximos anos, o surgimento de novas aplicações na área da saúde, acompanhadas de uma progressiva diminuição dos custos.

A UTI tentará acompanhar o melhor possível estes novos desenvolvimentos, permitindo assim ao INSA manter-se como uma instituição de referência nesta área de investigação epidemiológica.

**Luís Vieira**

Coordenador da Unidade de Tecnologia e Inovação  
Departamento de Genética Humana, INSA

**Peter Jordan**

Investigador do Departamento de Genética Humana, INSA



## Pesquisa de microdeleções AZF em homens inférteis na população portuguesa

Iris Pereira-Caetano<sup>1</sup>, Júlia Silva<sup>1</sup>, Sónia Correia<sup>2</sup>,  
Maria Graça Pinto<sup>2</sup>, Ricardo Rangel<sup>2</sup>, Ana Aguiar<sup>3</sup>,  
Joaquim Nunes<sup>3</sup>, Carlos Calhaz<sup>3</sup>, João Gonçalves<sup>1</sup>

joao.goncalves@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, INSA.

(2) Unidade de Medicina da Reprodução, Maternidade Dr. Alfredo da Costa.

(3) Unidade de Medicina da Reprodução. Departamento de Obstetria, Ginecologia e Medicina da Reprodução, Hospital de Santa Maria.

### Introdução

A infertilidade conjugal, definida como a incapacidade de conceção de um casal ao fim de um ano de relações sexuais desprotegidas, afeta 10 a 15% dos casais em idade reprodutiva, sendo que as causas masculinas constituem 30 a 40% das causas de infertilidade dos casais. Etiologicamente, a infertilidade masculina pode ter origem genética e não genética. De entre as causas genéticas mais frequentes destacam-se as alterações numéricas ou estruturais dos cromossomas, as mutações no gene *CFTR* e as microdeleções do cromossoma Y.

No braço longo do cromossoma Y, em Yq11.2, localizam-se três regiões AZF (*Azoospermia factor*), AZFa, AZFb e AZFc, fundamentais para a fertilidade masculina uma vez que possuem múltiplos genes com expressão testicular implicados nas diferentes etapas da espermatogénese (1,2). As microdeleções do Y podem abranger uma ou mais destas regiões, e dependendo da região AZF deletada ou ausente, a fertilidade pode ser mais ou menos afetada, observando-se diferentes padrões histológicos testiculares, que vão desde o síndrome de só-células-de-sertoli (deleção de AZFa), a paragem de maturação dos gametas durante a meiose (deleção AZFb) e a hipoespermatogénese (deleção de AZFc) (2). Estas microdeleções representam a segunda causa genética mais frequente de falha espermatogénica em homens inférteis a seguir ao síndrome de klinefelter (cariotipo 47,XXY) (3).

O diagnóstico molecular das microdeleções AZF no cromossoma Y é um teste genético recomendado por rotina em homens inférteis que apresentem oligozoospermia grave ( $<5 \times 10^6$  espermatozoides/ml de sêmen ejaculado) ou azoospermia secretora de causa desconhecida (4).

### Objetivos e métodos

O presente trabalho compreende os resultados da pesquisa molecular das microdeleções AZF no cromossoma Y realizada em 865 homens com infertilidade idiopática, 270 com diagnóstico clínico de azoospermia e 595 com oligozoospermia grave ( $<5 \times 10^6$  espermatozoides/ml). Neste estudo, foram excluídos os homens que apresentavam alterações endocrinológicas, varicocele, criptorquidia, orquite, doença sistémica, anomalias cromossómicas autossómicas e anomalias numéricas dos cromossomas sexuais, ou sujeitos a fatores de risco profissionais, e ainda homens cuja informação clínica disponibilizada foi insuficiente para os incluir nos dois grupos referidos. Paralelamente, analisaram-se 300 homens férteis (com pelo menos um descendente) da população portuguesa.

A análise molecular compreendeu a amplificação enzimática múltipla (PCR-Múltipla) de sequências de genes e de *loci* específicos de cada uma das três regiões AZF, bem como do gene *SRY* (gene determinante testicular) localizado no braço curto do Y, em amostras de DNA genómico obtidas de sangue periférico. Na presença de uma microdeleção, foram efetuadas reações de PCR-múltiplas adicionais com marcadores específicos por forma a caracterizar os seus pontos de quebra.

### Resultados

Neste estudo consideraram-se apenas as deleções AZF completas (não foram consideradas as deleções parciais em AZFc). Dos 865 doentes inférteis estudados, em 49 (5,7%) detetaram-se microdeleções AZF. Estas microdeleções foram exclusivas dos homens com azoospermia secretora (27/270, 10,0%) ou com oligozoospermia grave (22/595, 3,7%), não tendo sido detetadas deleções AZF na população masculina fértil.



artigos breves\_ n. 1

Das 27 microdeleções AZF detetadas em homens azoospermicos, 9 (3,3%) eliminam AZFc, 4 (1,5%) AZFb, 1 (0,4%) AZFa, 10 (3,7%) AZFb+c e 3 (1,1%) AZFa+b+c. Os 22 casos de microdeleções em homens com oligozoospermia grave compreendem unicamente AZFc (**Tabela 1**). Assim, os homens com azoospermia apresentaram heterogeneidade na natureza e extensão das microdeleções AZF. Das microdeleções identificadas, a deleção de AZFc é a mais frequente (63%, **Gráfico 1**).

Relativamente a este teste genético, a Unidade de Genética Molecular do Departamento de Genética Humana - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge participou anualmente, desde 2000, nos ensaios experimentais de avaliação externa da qualidade organizados e avaliados pela EMQN (*The European Molecular Genetics Quality Network*), tendo obtido sempre a classificação máxima em todos os parâmetros avaliados (genotigagem, interpretação de resultados, identificação correta dos utentes e a clareza do relatório).

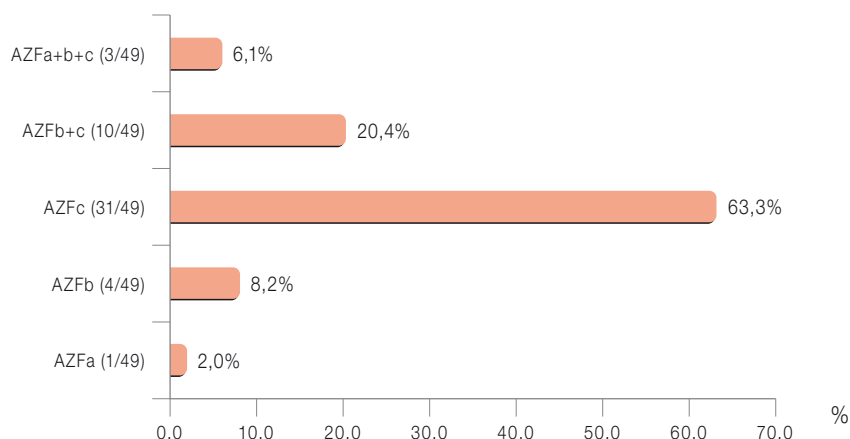
**\_Discussão e conclusões**

As microdeleções na região AZF do cromossoma Y representam um fator genético condicionante da espermatogénese, estando a sua localização associada a fenótipos histológicos testiculares diversos, que originam desde azoospermia secretora a hipoespermatogénese. Assim, a deleção de toda a região AZFa impede a diferenciação das células germinais causando o síndrome de só-células-de-sertoli, as deleções extensas da região AZFb causam a paragem na maturação dos gâmetas (predominantemente em espermatócito primário ou secundário), enquanto as microdeleções AZFc afetam maioritariamente a quantidade de espermatozoides produzidos, e assim a deleção completa desta região está associada a fenótipos histológicos diversos, resultando em gametogénese reduzida (oligozoospermia grave) ou em situações de azoospermia secretora (2). De acordo com os estudos internacionais, as microdeleções AZF são responsáveis por 10 a 15% dos casos de azoospermia secretora (não obstrutiva) e por 3 a 5% dos

**Tabela 1:** Distribuição da frequência das microdeleções AZF identificadas nos dois grupos de homens inférteis.

	Deleção AZF (%)					Total
	AZFc	AZFb	AZFa	AZFb+c	AZFa+b+c	
Azoospermicos	9(3,3%)	4(1,5%)	1(0,4%)	10(3,7%)	3(1,1%)	27(10,0%)
Oligozoospermicos	22(3,7%)	0	0	0	0	22(3,7%)

**Gráfico 1:** Tipo de microdeleção identificada e sua frequência relativa.





artigos breves\_ n. 1

casos de oligozoospermia grave, permanecendo a maioria dos casos com a causa da infertilidade por identificar (3, 5).

A ausência de AZFc é a única compatível com a produção de gâmetas. Na presença de uma deleção AZFc em homens azoospermicos, a probabilidade de detetar espermatozóides por biópsia testicular é de 50 a 60% (4). Assim, mediante aconselhamento genético e reunidas as condições específicas no âmbito da medicina da reprodução, poderá ser proposto a estes homens/casais a fertilização intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), visando proporcionar-lhes descendência.

Os nossos resultados são concordantes e confirmam os dados referidos na bibliografia demonstrando claramente que as microdeleções AZF no cromossoma Y constituem uma causa comum de infertilidade masculina. O seu estudo molecular assume uma grande importância no diagnóstico de infertilidade de um casal uma vez que pode conduzir à identificação da causa da infertilidade no mesmo, bem como confirmar o diagnóstico clínico. A deteção de uma microdeleção AZF permite estabelecer a causa da insuficiência da gametogénese, tem valor prognóstico dado que é possível informar da probabilidade de sucesso na obtenção de espermatozóides para microinjecção intracitoplasmática e desta forma contribuir significativamente para a decisão clínica e tratamento a propor aos casais. Na presença de deleções AZFb, AZFb+c, AZFa, AZFa+b ou AZFa+b+c, não existe indicação para realização de biópsia testicular. O aconselhamento genético é recomendado sempre que seja detetada uma microdeleção AZF, e torna-se particularmente relevante para AZFc uma vez que esta, por ICSI, será obrigatoriamente transmitida à descendência masculina, vindo a afetar provavelmente a sua fertilidade.

A adoção das recomendações internacionais para o diagnóstico molecular das microdeleções AZF no cromossoma Y deve ser uma prática comum dos laboratórios que oferecem este teste genético, bem como a participação anual em ensaios específicos de avaliação externa da qualidade, uma vez que permite a melhoria contínua do seu desempenho (4).

Referências bibliográficas:

- (1) Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. Human Y Chromosome Azoospermia Factors (AZF) Mapped to Different Subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996;5(7):933-43. [LINK](#)
- (2) Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J. Genetic Dissection of the AZF Regions of the Human Y Chromosome: Thriller or Filler for Male (In) fertility?. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:936569. doi: 10.1155/2010/936569. Epub 2010 Jun 30. [LINK](#)
- (3) Hotaling J, Carrell DT. Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology.* 2014;2(3):339-50.
- (4) Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, et al.; European Academy of Andrology; European Molecular Genetics Quality Network. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology.* 2014;2(1):5-19. [LINK](#)
- (5) Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(2):271-85.



## Variantes genéticas da hormona hepcidina contribuem para aumentar os níveis da ferritina sérica em indivíduos suscetíveis de desenvolverem sobrecarga em ferro

Bruno Silva, Lina Pita, Susana Gomes, Pedro Loureiro,  
João Gonçalves, Paula Faustino

paula.faustino@insa-min-saude.pt

Departamento de Genética Humana, INSA.

### \_Introdução

Uma das principais causas da acumulação progressiva e patológica de ferro no organismo tem base genética e é devida a um excesso de absorção, ao nível do duodeno, do ferro proveniente da alimentação e ao aumento da sua libertação pelos macrófagos. Esta patologia, denominada hemocromatose hereditária (HH), está normalmente associada à presença, em homozigotia, da mutação C282Y (c.845G>A) no gene *HFE*. Existem ainda variantes comuns deste gene, como a H63D (c.187C>G), cuja frequência alélica na população portuguesa é de 15 a 20% (1), que também podem ser encontradas em casos de sobrecarga em ferro (2).

A HH é uma doença de baixa penetrância e expressividade variável. Para a grande variabilidade do fenótipo contribuem fatores ambientais (tais como o álcool, a hepatite, etc.) e fatores genéticos, nomeadamente a presença de variantes genéticas em genes relacionados com o metabolismo do ferro. É o caso da hepcidina (codificada pelo gene *HAMP*), uma hormona hepática que desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase do ferro pois, consoante as necessidades do organismo, modula a absorção de ferro pelo intestino assim como a sua libertação pelos macrófagos e células de armazenamento. Os níveis baixos desta hormona são reconhecidos como a principal causa da sobrecarga de ferro observada na HH. Assim, foi sugerido que fatores genéticos que levem à diminuição da expressão do gene *HAMP* poderão contribuir para o agravamento dos fenótipos de sobrecarga em ferro (3,4,5).

### \_Objetivo

Sendo a hepcidina a principal hormona reguladora da homeostase do ferro, pretendeu-se, neste trabalho, investigar se variantes comuns na região regulatória do gene *HAMP* (promotor), podem influenciar os níveis de ferritina sérica nos indivíduos que possuem a variante H63D no gene *HFE*.

### \_Materiais e métodos

**Participantes:** 100 indivíduos com níveis de ferritina sérica (sFt) <300 µg/L e sem alterações no gene *HFE* (Tabela 1, grupo controlo); 91 indivíduos com níveis de sFt <300 µg/L e portadores da variante H63D no gene *HFE* em heterozigotia (HD) ou em homozigotia (DD) (Tabela 1, grupo 1); 218 indivíduos com um perfil de sobrecarga em ferro, em particular com níveis de sFt ≥300 µg/L e portadores da variante H63D no gene *HFE* (HD ou DD) (Tabela 1, grupo 2). De acordo com os critérios clínicos estabelecidos, nenhum indivíduo possuía consumo de álcool em excesso nem infeção pelo vírus da hepatite C. Foi obtido o consentimento informado dos participantes.

**Genotipagem:** a região proximal (1,14 kb) do promotor do gene *HAMP* foi genotipada para todos os 409 indivíduos, por metodologia de PCR convencional seguida de sequenciação automática.

**Análise de dados:** Os dados foram testados para a normalidade e variância. A análise envolvendo os valores de sFt foi efetuada após transformação logarítmica. A análise ANCOVA foi efetuada utilizando a idade e o género como co-variáveis. A significância estatística foi considerada para valores de  $p < 0,05$ .

### \_Resultados

A pesquisa de alterações no promotor do gene *HAMP* levou à identificação de duas variantes, nc.-1010C>T (rs10414846) e nc.-582A>G (rs10421768), que já haviam sido previamente descritas. Dado que nas amostras em estudo estas variantes foram encontradas em associação (desequilíbrio de *linkage*), apresentando preferencialmente as combinações CA e TG no genoma, as análises subsequentes foram tratadas de acordo com estes haplótipos. Foi determinada a frequência destes haplótipos e a sua possível relação com o nível de sFt, na presença ou ausência da variante H63D no gene *HFE* (Tabela 2). Foi observado que a frequência do



**Tabela 1:** ↓ *Parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro nos grupos de indivíduos estudados, divididos de acordo com a presença/ausência da variante H63D no gene HFE e com os diferentes níveis de ferritina sérica.*

Parâmetro	Grupo controlo	Grupo 1		Grupo 2	
	HFE_wt <sup>a</sup> [n=100]	HFE_HD ou DD <sup>b</sup> sFt <sup>c</sup> <300 µg/L [n=91]		HFE_HD ou DD <sup>b</sup> sFt <sup>c</sup> ≥300 µg/L [n=218]	
			<i>p</i> <sup>d</sup>		<i>p</i> <sup>d</sup>
Ferro sérico (µg/dL)	106,4 [100,1; 112,7]	124,1 [114,4; 133,8]	0,003	158,0 [148,8; 167,2]	<0,001
Ferritina sérica (µg/L)	82,2 [67,7; 96,7]	133,6 [114,0; 153,2]	0,001	970,4 [876,6; 1075,8]	<0,001
Saturação da transferrina (%)	30,8 [28,6; 33,1]	39,7 [36,2; 43,2]	<0,001	59,0 [55,9; 62,1]	<0,001

<sup>a</sup> grupo controlo, sem a variante H63D no gene *HFE* e com valores normais dos parâmetros bioquímicos do metabolismo do ferro;

<sup>b</sup> indivíduos com a variante H63D em heterozigotia (HD) ou em homozigotia (DD); <sup>c</sup> ferritina sérica; <sup>d</sup> teste-t [Ft foi testada como log(Ft)];

n = número de indivíduos; valores apresentados como: média [IC 95%]

**Tabela 2:** ↓ *Associação entre os haplótipos do promotor do gene HAMP, a variante H63D e diferentes níveis de ferritina sérica.*

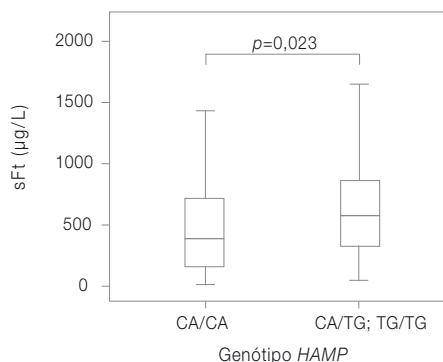
Variantes promotor <i>HAMP</i> c.-1010C>T; c.-582A>G		Grupo controlo	Grupo 1		Grupo 2	
		Frequência (%) [n]	Frequência (%) [n]	<i>p</i> <sup>*</sup>	Frequência (%) [n]	<i>p</i> <sup>*</sup>
Haplótipo	CA	78,5 [157]	78,0 [142]	0,903	69,5 [303]	0,029
	TG	21,5 [43]	22,0 [40]		30,5 [133]	
Genótipo	CA/CA	58,0 [58]	62,6 [57]	<0,001	47,7 [104]	<0,001
	CA/TG	41,0 [41]	30,8 [28]		43,6 [95]	
	TG/TG	1,0 [1]	6,6 [6]		8,7 [19]	

\* teste  $\chi^2$ ; n = número de indivíduos ou alelos

haplótipo TG é significativamente superior ( $p=0,029$ ) no grupo de indivíduos portadores da variante H63D no gene *HFE* e que têm valores de sFt  $\geq 300$  µg/L (30,5%, grupo 2) comparativamente com o grupo controlo (21,5%) e com o grupo de indivíduos portadores da variante H63D com sFt <300 µg/L (22,0%, grupo 1;  $p=0,040$ ).

De modo a confirmar a associação observada, dividimos os 218 indivíduos portadores de H63D em 2 grupos, independentemente do seu nível de sFt. Assim, juntaram-se, por um lado os indivíduos com o genótipo CA/CA em *HAMP* e, por outro lado, os restantes indivíduos com os genótipos CA/TG e TG/TG (**Figura 1**). Observámos que neste segundo grupo de indivíduos os valores de sFt são significativamente superiores ( $p=0,023$ ; ajustado para idade e género).

**Figura 1:** ↓ *Distribuição da ferritina sérica de acordo com os genótipos do promotor do gene HAMP em indivíduos com a variante H63D em HFE.*



As amostras foram testadas para a normalidade e os valores de *p* obtidos por análise ANCOVA ajustada para idade e género.



## \_Discussão

A presença, em homozigotia, da mutação C282Y no gene *HFE* é reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento de HH. O mesmo não se verifica para a variante H63D, cujo significado patológico continua por esclarecer. Neste estudo verificámos que o haplótipo TG no promotor do gene *HAMP* (definido pelas variantes nc.-1010T e nc.-582G) é mais frequente em indivíduos portadores da variante H63D no *HFE* que apresentam valores mais elevados de sFt. Do mesmo modo, a variante nc.-582A>G já tinha sido descrita em associação com fenótipos mais graves de sobrecarga em ferro em doentes com beta-talassémia major (6). Por outro lado, não foi observado nenhum efeito da mesma nos parâmetros periféricos do metabolismo do ferro em indivíduos saudáveis (7). Postulamos, então, que a variante nc.-582A>G no promotor de *HAMP* terá um efeito negligenciável em condições normais de homeostasia do ferro, sendo a sua contribuição apenas relevante em condições fisiopatológicas do metabolismo do ferro onde é necessária uma maior expressão de hepcidina.

## \_Conclusões

Os nossos resultados, juntamente com os obtidos por outros autores (6,7), permitem-nos concluir que as variantes genéticas localizadas no promotor do gene *HAMP*, em nc.-1010 e nc.-582, participam na regulação do metabolismo do ferro manifestando o seu efeito em indivíduos que apresentam concomitantemente outros fatores de risco (ambientais ou genéticos) para o desenvolvimento de sobrecarga em ferro. Deste modo, parece ser relevante a pesquisa destas variantes em *HAMP* no subgrupo de indivíduos que apresentam a variante H63D no gene *HFE* e um fenótipo de sobrecarga em ferro, nomeadamente com níveis de sFt  $\geq 300$   $\mu\text{g/L}$ , de maneira a poder ser compreendida essa manifestação.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana do INSA, pelo apoio técnico. Este estudo foi parcialmente financiado pela FCT: PEst-OE/SAU/UI0009/2011.

Adaptado do artigo publicado em Ann Hematol. 2014 jul 13.

doi: 10.1007/s00277-014-2160-7 [Epub ahead of print]

## Referências bibliográficas:

- (1) Cardoso CS, Oliveira P, Porto G, et al. Comparative study of the two more frequent HFE mutations (C282Y and H63D): significant different allelic frequencies between the North and South of Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2001; 9(11):843-8. [LINK](#)
- (2) Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet.* 1996;13(4): 399-408.
- (3) Merryweather-Clarke AT, Cadet E, Bomford A, et al. Digenic inheritance of mutations in *HAMP* and *HFE* results in different types of haemochromatosis. *Hum Mol Genet.* 2003;12(17):2241-7. [LINK](#)
- (4) Jacolot S, Le Gac G, Scotet V, et al. *HAMP* as a modifier gene that increases the phenotypic expression of the HFE pC282Y homozygous genotype. *Blood.* 2004;103(7):2835-40. [LINK](#)
- (5) Aguilar-Martinez P, Giansily-Blaizot M, Bismuth M, et al. *HAMP* promoter mutation nc.-153C>T in non p.C282Y homozygous patients with iron overload. *Haematologica.* 2010; 95(4):687-8. [LINK](#)
- (6) Andreani M, Radio FC, Testi M, et al. Association of hepcidin promoter c.-582 A>G variant and iron overload in thalassemia major. *Haematologica.* 2009; 94(9):1293-6. [LINK](#)
- (7) Bruno F, Bonalumi S, Camaschella C, et al. The -582A>G variant of the *HAMP* promoter is not associated with high serum ferritin levels in normal subjects. *Haematologica.* 2010; 95(5):849-50. [LINK](#)



## Prevalência de demências na população sob observação da Rede de Médicos-Sentinela em 2006

Ana Paula Rodrigues<sup>1</sup>, Mafalda de Sousa-Uva<sup>1</sup>,  
Cristina Galvão<sup>2</sup>, Baltazar Nunes<sup>1</sup>, Carlos Matias Dias<sup>1</sup>

ana.rodrigues@insa-min-saude.pt

(1) Departamento de Epidemiologia, INSA.

(2) Unidade Local de Saúde do Baixo Alentejo.

### Introdução

As demências são doenças progressivas caracterizadas por alterações da memória e perda de outras funções cognitivas, alterações do comportamento, da personalidade, da capacidade crítica e do funcionamento global.

Em Portugal, os estudos sobre demência são escassos e limitados a áreas geográficas específicas (1, 2), esperando-se que o envelhecimento populacional crescente (3) conduza ao aumento progressivo do número de pessoas com esta doença crónica.

O carácter insidioso destas doenças, com sintomas iniciais quase sobreponíveis aos do envelhecimento natural, dificulta o diagnóstico, exigindo um elevado grau de suspeição e treino para um diagnóstico precoce, havendo pouco conhecimento sobre a prática clínica, no que respeita ao diagnóstico e tratamento destes doentes ao nível dos cuidados de saúde primários.

Este estudo tem como objetivo estimar a prevalência de casos de demência diagnosticada ao nível dos cuidados de saúde primários.

### Metodologia

Desenvolveu-se um estudo transversal para o qual foram convidados todos os médicos inscritos na Rede Médicos-Sentinela em 2006.

Aos médicos participantes foi solicitado o preenchimento de um questionário com informação relativa a cada um dos indivíduos da sua lista de utentes com diagnóstico de demência estabelecido até 28 de fevereiro de 2006.

Calculou-se a taxa de prevalência de demências desagregada por sexo e grupo etário a partir dos 35 anos de idade, usando como denominador a população que resultou do somatório das listas de utentes dos médicos que participaram no estudo.

A análise estatística envolveu, para as variáveis numéricas, o cálculo da média (e respetivo intervalo de confiança a 95%) e mediana; e para as variáveis categóricas o cálculo das frequências relativas e respectivos intervalos de confiança a 95%.

### Resultados

Participaram no estudo 28 médicos (20,1%), totalizando uma população sob observação de 25.365 indivíduos (10,6 % da população sob observação da Rede Médicos-Sentinela em 2006).

A idade média dos doentes com demência foi de 76,8 anos (IC 95: 75,3 a 78,3 anos) e as idades mínima e máxima foram, respetivamente, 41 e 97 anos.

A prevalência de demência acima dos 35 anos de idade foi de 0,7% (IC 95: 0,6 a 0,8%) (Tabela 1), sendo que as demências mais frequentes foram a doença de Alzheimer e a demência de causa vascular (ambas 0,3% ; IC 95: 0,2 a 0,4%).

O grupo etário com 75 e mais anos de idade foi aquele que apresentou uma maior taxa de prevalência de doenças demenciais (3,0%; IC 95: 2,4 a 3,6 %) (Tabela 1).

Foi observada uma prevalência mais elevada no sexo feminino (0,7%; IC 95: 0,6 a 0,9%) (Tabela 1), à exceção da demência vascular que foi mais elevada nos homens a partir dos 65 anos (1,0%; IC 95: 0,7a 1,4%).

Cerca de 76,9% dos doentes com diagnóstico de demência apresentava, à data do diagnóstico, um quadro demencial ligeiro a moderado e o tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico de demência foi de 12,3 meses (IC 95: 7,5 a 17,1 meses), não existindo diferenças estatisticamente significativas entre o tempo do início dos sintomas ao diagnóstico e a severidade do quadro demencial ( $p=0,178$ ).



Tabela 1: **Distribuição do número de casos de demência por sexo e grupo etário, respetiva prevalência na população sob observação da Rede Médicos-Sentinela em 2006.**

Grupo etário	Homens		Mulheres		Total	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
35 – 44 anos	3	*	0	*	3	*
45 – 54 anos	1	*	2	*	3	*
55 – 64 anos	4	*	3	*	7	0,1
65 – 74 anos	25	1,2	26	1,0	51	1,1
≥75 anos	36	2,7	71	3,1	107	3,0
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>0,6</b>	<b>102</b>	<b>0,7</b>	<b>171</b>	<b>0,7</b>

\* número de casos insuficiente para o cálculo de taxas de prevalência.

## Discussão

As prevalências estimadas foram inferiores às encontradas noutros estudos portugueses (1,13 % e 1,23 %) (1-8). Tal poderá estar relacionado com diferentes metodologias usadas, nomeadamente no que respeita: i) à seleção da população deste estudo a partir da população utilizadora dos centros de saúde; ii) e à definição de casos com base no diagnóstico estabelecido.

A prevalência de demência estimada mais elevada no sexo feminino pode dever-se à maior esperança média de vida nas mulheres (9), uma vez que após ajustamento para a idade essa diferença deixa de se observar.

Observa-se um elevado peso das demências de causa vascular, quando comparado com os restantes países europeus (4, 6, 7), o que se julga associado à elevada prevalência de hipertensão arterial na população portuguesa (10, 11).

Apesar das limitações metodológicas referidas, que parecem apontar para uma subestimativa da prevalência de demências e que impossibilitam a generalização dos resultados para a população portuguesa, este trabalho corrobora a existência de um maior número de casos de doença de causa vascular em relação a outros países europeus. Tal sugere a necessidade de serem conduzidos outros estudos para confirmação destes resultados na população portuguesa e avaliação dos possíveis fatores associados a este padrão.

## Referências bibliográficas:

- (1) Nunes B, Silva RD, Cruz VT, et al., Prevalence and pattern of cognitive impairment in rural and urban populations from Northern Portugal. BMC Neurol. 2010;10:42. doi: 10.1186/1471-2377-10-42. [LINK](#)
- (2) Garcia C, Costa C, Guerreiro M, et al. Umbelino J. Estimativa da prevalência da demência da doença de alzheimer em Portugal. Acta Med Port. 1994;7(9):487-91. [LINK](#)
- (3) Hofman A, Rocca WA, Brayne C, et al. The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings. Eurodem Prevalence Research Group. Int J Epidemiol. 1991;20(3):736-48.
- (4) Berr C, Wancata J, Ritchie K. Prevalence of dementia in the elderly in Europe. Eur Neuropsychopharmacol. 2005;15(4):463-71.
- (5) Larson EB, Yaffe K, Langa KM. New insights into the dementia epidemic. N Engl J Med. 2013;369(24):2275-7. [LINK](#)
- (6) Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen, et al. Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. Neurology. 2000;54(11, Suppl 5):S4-9.
- (7) Tola-Arribas MA, Yugueros MI, Garea MJ, et al. Prevalence of dementia and subtypes in Valladolid, northwestern Spain: the DEMINVAL study. PLoS One. 2013;8(10):e77688. [LINK](#)
- (8) Llibre Rodríguez J de J. Aging and dementia: Implications for Cuba's research community, public health and society. MEDICC Rev. 2013;15(4):54-9. [LINK](#)
- (9) Instituto Nacional de Estatística. Esperança média de vida aos 65 anos de idade [Em linha]. Lisboa: INE, 2014. [consult. 11/3/2014] [LINK](#)
- (10) Portuguesa HYPertension and SAIt (PHYSA) Study. [Em Linha] Resultados apresentados no 7º Congresso Português de Hipertensão e Risco Cardiovascular Global, Vilamoura, março 2013. [consult. 11/3/2014] [LINK](#)
- (11) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Médicos-Sentinela : relatório de atividades 2011. Lisboa: INSA, 2014. (Número 25. Um quarto de milhão sob observação). [LINK](#)



## Alteração de marcadores inflamatórios, imunidade inata e metabolismo do ferro numa população portuguesa com doença de Behçet

Rita Oliveira<sup>1</sup>, Patricia Napoleão<sup>2</sup>, João Banha<sup>1</sup>, Dina Pereira<sup>3</sup>,  
Filipe Barcelos<sup>4</sup>, Ana Teixeira<sup>4</sup>, José Vaz Patto<sup>4</sup>,  
Ana Maria Viegas-Crespo<sup>5</sup>, Luciana Costa<sup>1,6</sup>

luciana.costa@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA.

(2) Instituto de Medicina Molecular. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa.

(3) Hospital Vila Franca de Xira.

(4) Instituto Português de Reumatologia.

(5) Centro de Estudos do Ambiente e do Mar. Departamento de Biologia. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

(6) Centro para a Biodiversidade, Genómica Integrativa e Funcional. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

### Introdução

A Doença de Behçet (DB) é uma doença inflamatória crónica rara de carácter multisistémico. As manifestações clínicas mais comuns na DB são as úlceras orais e genitais recorrentes, a uveíte e as lesões cutâneas (1). O diagnóstico desta doença continua a ser baseado em critérios clínicos (2) não obstante a investigação realizada para encontrar um teste específico laboratorial adequado. Atualmente, a etiologia da DB permanece ainda por esclarecer. A hipótese mais aceite quanto à sua patogénese baseia-se na existência de uma resposta inflamatória iniciada por um agente infeccioso num hospedeiro geneticamente suscetível (3). Vários autores têm defendido um modelo "auto-inflamatório" para explicar a imunopatogénese da DB (4,5). Em particular, tem-se assistido a um acumular de evidência que sustenta o envolvimento do stress oxidativo e a participação de metais de transição nos processos de disfunção endotelial e alterações na resposta imunitária que estão na base das lesões tecidulares observadas nesta doença (6-8).

A ceruloplasmina (Cp) é uma proteína de cobre com um papel fundamental no metabolismo do ferro (Fe) que participa na resposta de fase aguda e contribui para o balanço oxidante/antioxidante sistémico. Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que as células mononucleares do sangue periférico expressam constitutivamente

as duas isoformas de Cp (segregada e membranar), sugerindo uma ligação estreita entre imunidade, inflamação e "biologia oxidativa" (9,10). Curiosamente, estudos anteriores mostraram que a Cp circulante está aumentada na DB (11,12) muito embora o papel Cp associada aos leucócitos não tenha sido investigada nesta doença, para além dos nossos próprios estudos preliminares (13).

### Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi a investigação de novos aspetos relacionados com a interação entre a resposta inflamatória, a homeostase do Fe e o balanço pró/antioxidante na DB de forma a esclarecer o seu papel na fisiopatologia desta doença. Em particular, propusemo-nos medir a expressão da Cp membranar nas subpopulações leucocitárias mais representativas no sangue periférico de doentes com DB e respetivos controlos. Adicionalmente, pretendeu-se fazer uma caracterização clínica e laboratorial (hematológica, bioquímica e imunológica) destes dois grupos, nomeadamente com o enfoque na medição dos marcadores do metabolismo do ferro e da inflamação.

### Metodologia

Para este estudo foram selecionados 25 indivíduos clinicamente diagnosticados com DB de acordo com as normas internacionais do ISGBD (2), e classificados de acordo com a sintomatologia, gravidade e início da doença. Paralelamente, foram selecionados 24 indivíduos dadores de sangue saudáveis, constituindo estes o grupo controlo. Todos os voluntários participantes deram o seu consentimento informado e realizaram um inquérito confidencial. Um resumo dos dados clínicos e demográficos está representado na *Tabela 1*.

A caracterização hematológica das amostras colhidas foi feita através da realização de um hemograma completo. A medição sérica dos marcadores bioquímicos do metabolismo do Fe [Fe sérico, transferrina (Tf) e capacidade total de fixação do Fe (CTFF)] foi realizada através de testes colorimétricos enzimáticos, enquanto a quantificação da ferritina (Ft) foi efetuada através de um ensaio imunométrico. Por outro lado, a avaliação do *status* inflamatório sistémico foi realizada através da quantificação da Cp e da proteína C reativa (PCR) por nefelometria, ao passo que a beta2-microglobulina ( $\beta_2$ -m) foi medida



artigos breves\_ n. 4

**Tabela 1:** ↓ *Resumo dos dados clínicos e demográficos da população participante no estudo.*

Dados clínicos e demográficos	Controlos (n=24)	Doentes com DB (n=25)
Género (f/m)	11/13	16/9
Idade (anos)	38 ± 9	42 ± 10
<b>Severidade da doença</b>		
Ligeira	-	11
Moderada	-	7
Severa	-	7
<b>Início da doença</b>		
Precoce (≤25 anos), (n)	-	9
Tardio (>25 anos), (n)	-	16
<b>Sintomatologia</b>		
Uveíte (n)	-	10
Artrite (n)	-	10
Tromboflebite (n)	-	5

através de um ensaio imunoenzimático. Adicionalmente, a determinação quantitativa da concentração de mieloperoxidase (MPO) no soro baseou-se na técnica de ELISA, utilizando um *kit* comercial. Finalmente, o estudo da expressão da Cp nas várias subpopulações leucocitárias fez-se através da técnica de citometria de fluxo.

## Resultados

Os resultados laboratoriais obtidos encontram-se sumarizados na **Tabela 2**.

A análise comparativa dos marcadores inflamatórios séricos mostrou um aumento significativo de todas as proteínas inflamatórias (Cp, CRP e  $\beta_2m$ ) em doentes com DB comparativamente aos indivíduos saudáveis.

Um aumento significativo da concentração sérica da MPO foi também encontrado no grupo dos doentes em comparação com os controlos.

Por outro lado, a análise dos dados hematológicos mostrou um aumento significativo do número total de glóbulos brancos e de neutrófilos do sangue periférico dos indivíduos com DB comparativamente aos indivíduos saudáveis.

Os resultados da medição da expressão da Cp à superfície dos leucócitos mostraram que os granulócitos, comparativamente aos linfócitos e aos monócitos, são a subpopulação celular com maior expressão desta proteína nos dois grupos em estudo. Em particular, encontrou-se um aumento significativo da Cp membranar expressa pelos monócitos do sangue periférico dos doentes em comparação com os controlos.

Finalmente, a medição sérica dos vários marcadores do metabolismo do Fe mostrou um aumento significativo na Tf e CTFF nos doentes com DB. Não se encontraram diferenças significativas nas concentrações séricas de Fe e Ft quando se fez a comparação entre os dois grupos em estudo.

**Tabela 2:** ↓ *Resumo de parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos medidos em indivíduos saudáveis (n=24) e doentes com DB (n=25).*

Marcadores sistémicos	Controlos (n=24)	Doentes com DB (n=25)
<b>Inflamação</b>		
CRP (mg/dl)	0.20 (0.10-0.30)	0.45 <sup>a</sup> (0.19-0.74)
Cp (mg/dl)	30 (25-36)	39 <sup>a</sup> (32-50)
$\beta_2m$ ( $\mu$ g/l)	938(866-1038)	1145 <sup>a</sup> (1040-1447)
Leucócitos totais ( $\times 10^6$ /ml)	6.2(5.4-7.1)	7.5 <sup>a</sup> (6.1-9.1)
Neutrófilos ( $\times 10^6$ /ml)	3.6(3.1-4.3)	4.6 <sup>a</sup> (3.8-5.9)
Linfócitos ( $\times 10^6$ /ml)	1.8(1.6-2.1)	1.7(1.5-2.5)
Monócitos ( $\times 10^6$ /ml)	0.40(0.35-0.50)	0.50(0.40-0.65)
MPO (ng/ml)	0.88(0.55-1.5)	1.5 <sup>a</sup> (0.95-2.1)
<b>Metabolismo do Ferro</b>		
Fe ( $\mu$ g/dL)	105(85-119)	103(73-129)
Ft (mg/dl)	67(30-114)	81(24-149)
Tf (mg/dl)	253(226-273)	305 <sup>a</sup> (270-330)
CTFF (mg/dl)	316(283-341)	381 <sup>a</sup> (336-413)
GRCp	363 (318-409)	401 (317-409)
PBLcP	63 (48-79)	68 (53-83)
MNCp	103 (87-119)	123 (109-137)

Os resultados estão apresentados como média (1º quartil-3º quartil); <sup>a</sup>p<0,05 vs controlos; CRP- proteína C reativa; Cp- ceruloplasmina;  $\beta_2m$ -  $\beta_2$ -microglobulina; MPO- mieloperoxidase; Fe- ferro; Ft- ferritina; Tf- transferrina; CTFF- capacidade total de fixação do Fe; GRCp- expressão de Cp à superfície dos granulócitos de sangue periférico; PBLcP- expressão de Cp à superfície de linfócitos de sangue periférico; MNCp- expressão de Cp à superfície de monócitos de sangue periférico.

## \_Discussão

Para além da evidência de que a DB pode estar fortemente associada a uma componente genética (14), vários estudos mostram que a inflamação tem um papel determinante na fisiopatologia desta doença. De fato, os resultados obtidos no presente estudo confirmam esta hipótese visto que todos os marcadores inflamatórios séricos medidos mostraram-se significativamente aumentados nos doentes comparativamente aos controlos.

Por outro lado, tem sido anteriormente reportada a existência de várias alterações leucocitárias na DB (15-17). As nossas observações também reforçam esta noção, visto ter sido encontrado um aumento significativo do número total de leucócitos circulantes em indivíduos com DB. Esse resultado deveu-se essencialmente ao aumento do número de neutrófilos, o que parece corroborar o aumento significativo da concentração sérica de MPO observada nestes doentes. Efetivamente, estudos anteriores mostram que os neutrófilos estão hiperativados na DB (18-19) e, nestas condições segregam quantidades consideráveis de MPO (20) que contribuem para a lesão tecidual observada nesta doença.

O balanço pró/antioxidante sistémico está fortemente ligado à capacidade de impedir reações de formação de radicais livres mediadas por metais de transição. Neste contexto, proteínas de ligação/oxidação de Fe são consideradas como os mais importantes antioxidantes existentes no plasma (21). Neste trabalho, para além do aumento significativo da Cp sérica encontrado nos doentes com DB, observou-se também um aumento significativo da Tf (e da CTFF), sugerindo o envolvimento destas proteínas em mecanismos de proteção contra uma potencial lesão oxidativa.

Muito embora a Cp seja normalmente considerada como uma proteína sérica de síntese maioritariamente hepática, foi anteriormente por nós demonstrado que as células imunes são capazes de sintetizar ambas isoformas (9,10). Os resultados aqui obtidos mostraram que os granulócitos constituem a subpopulação leucocitária com maior expressão de Cp à sua superfície. Adicionalmente, observou-se um aumento significativo do número de neutrófilos nos doentes com DB o que indica que estas células poderão contribuir para o aumento da isoforma solúvel medida em circulação.

Por outro lado, o aumento da expressão da Cp membranar nos monócitos de doentes com DB sugere um potencial papel alternativo desta proteína na defesa contra potenciais agentes infecciosos. Efetivamente, tanto o papel desta isoforma facilitando o exporte de Fe celular, como a reconhecida atividade bactericida (22) e pró-oxidante (23) da isoforma em circulação, apoiam não só este pressuposto como também constituem um suporte adicional para a proposta do envolvimento da infeção na etiologia da DB.

## \_Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho mostram pela primeira vez a existência de alterações significativas da expressão de ambas as isoformas da Cp na DB, muito especialmente no que respeita ao aumento da Cp membranar à superfície dos monócitos do sangue periférico. É assim reforçada a importância da relação funcional entre a inflamação, a imunidade inata e o metabolismo do Fe na DB, sugerindo a implicação de novas vias metabólicas na patogénese desta doença que poderão ser cruciais para o desenho de novos alvos terapêuticos e/ou identificação de novos biomarcadores de diagnóstico.

### Referências bibliográficas:

- (1) Verity DH, Wallace GR, Vaughan RW, et al. Behçet's disease: from Hippocrates to the third millennium. *Br J Ophthalmol*. 2003;87(9):1175-83. [LINK](#)
- (2) International Study Group for Behçet's Disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. *Lancet*. 1990; 335 (8697):1078-80.
- (3) Kalayciyan A1, Zouboulis C. An update on Behçet's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007;21(1):1-10.
- (4) Yazici H, Fresko I. Behçet's disease and other autoinflammatory conditions: what's in a name? *Clin Exp Rheumatol*. 2005;23(4 Suppl 38):S1-2.
- (5) Direskeneli H. Autoimmunity vs autoinflammation in Behçet's disease: do we oversimplify a complex disorder? *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45(12):1461-5. [LINK](#)
- (6) Köse K, Doğan P, Aşçıoğlu M, et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in plasma of patients with Behçet's disease. *Tohoku J Exp Med*. 1995;176(4):239-48. [LINK](#)
- (7) Isik A, Koca SS, Ustundag B, et al. Decreased total antioxidant response and increased oxidative stress in Behçet's disease. *Tohoku J Exp Med*. 2007 Jun;212(2):133-41. [LINK](#)
- (8) Doğan P, Tanrikulu G, Soyuer U, et al. Oxidative enzymes of polymorphonuclear leucocytes and plasma fibrinogen, ceruloplasmin, and copper levels in Behçet's disease. *Clin Biochem*. 1994;27(5):413-8.
- (9) Banha J, Marques L, Oliveira R, et al. Ceruloplasmin expression by human peripheral blood lymphocytes: a new link between immunity and iron metabolism. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(3):483-92. Epub 2007 Oct 22.
- (10) Marques L, Auriac A, Willemetz A, Banha J, Silva B, Canonne-Hergaux F, Costa L. Immune cells and hepatocytes express glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin at their cell surface. *Blood Cells Mol Dis*. 2012;48(2):110-20. Epub 2011 Dec 16.
- (11) Doğan P, Tanrikulu G, Soyuer U, et al. Oxidative enzymes of polymorphonuclear leucocytes and plasma fibrinogen, ceruloplasmin, and copper levels in Behçet's disease. *Clin Biochem*. 1994;27(5):413-8.



artigos breves\_ n. 4

- (12) Taysi S, Kocer I, Memisogullari R, et al. Serum oxidant/antioxidant status in patients with Behçet's disease. *Ann Clin Lab Sci.* 2002;32(4):377-82.
- (13) Oliveira R, Banha J, Martins F, et al. Lymphocyte ceruloplasmin and Behçet's disease. *Acta Reumatol Port.* 2006;31(4):323-9. [LINK](#)
- (14) Gül A, Inanç M, Ocal L, et al. Familial aggregation of Behçet's disease in Turkey. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(8):622-5. [LINK](#)
- (15) Niwa Y, Miyake S, Sakane T, et al. Auto-oxidative damage in Behçet's disease-endothelial cell damage following the elevated oxygen radicals generated by stimulated neutrophils. *Clin Exp Immunol.* 1982;49(1):247-55. [LINK](#)
- (16) Niwa Y, Mizushima Y. Neutrophil-potentiating factors released from stimulated lymphocytes; special reference to the increase in neutrophil-potentiating factors from streptococcus-stimulated lymphocytes of patients with Behçet's disease. *Clin Exp Immunol.* 1990;79(3):353-60. [LINK](#)
- (17) Pronai L, Ichikawa Y, Nakazawa H, et al. Enhanced superoxide generation and the decreased superoxide scavenging activity of peripheral blood leukocytes in Behçet's disease-effects of colchicine. *Clin Exp Rheumatol.* 1991;9(3):227-33.
- (18) Eksioğlu-Demiralp E, Direskeneli H, Kibaroglu A, et al. Neutrophil activation in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol.* 2001;19(5 Suppl 24):S19-24.
- (19) Orem A, Efe H, Değer O, et al. Relationship between lipid peroxidation and disease activity in patients with Behçet's disease. *J Dermatol Sci.* 1997;16(1):11-6.
- (20) Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 1989;320(6):365-76.
- (21) Gutteridge JM, Quinlan GJ. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1156(2):144-50.
- (22) Klebanoff SJ. Bactericidal effect of Fe<sup>2+</sup>, ceruloplasmin, and phosphate. *Arch Biochem Biophys.* 1992;295(2):302-8.



## Efetividade da vacina antigripal sazonal na época 2013/2014: resultados do Projeto EuroEVA

Ausenda Machado<sup>1</sup>, Raquel Guiomar<sup>2</sup>, Verónica Gómez<sup>3</sup>,  
Pedro Pechirra<sup>2</sup>, Patricia Conde<sup>2</sup>, Paula Cristóvão<sup>2</sup>,  
Ana Carina Maia<sup>2</sup>, Baltazar Nunes<sup>1</sup>

ausenda.machado@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Epidemiologia, INSA.

(2) Laboratório Nacional de Referência para a Gripe. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(3) Departamento de Genética Humana, INSA.

### Introdução

O projeto EuroEVA (Efetividade da Vacina da Gripe na Europa) (1), componente portuguesa do estudo europeu multicêntrico I-MOVE (*Monitoring vaccine effectiveness during influenza seasons and pandemics in Europe*) (2, 3), pretende obter estimativas da efetividade da vacina sazonal e pandémica durante e após a época de gripe. Desde a época de 2008-2009, Portugal, juntamente com outros países europeus, tem vindo a implementar um protocolo comum, utilizando um desenho de estudo caso-controlo, onde casos de síndrome gripal (SG) confirmados laboratorialmente para vírus influenza, são comparados com um grupo controlo, constituído por pacientes que têm SG mas são confirmados laboratorialmente negativos para influenza. Os resultados apresentados referem-se à época 2013/2014 e destinam-se a obter a estimativa da efetividade da vacina antigripal sazonal para indivíduos de todas as idades e nos com 60 e mais anos.

### Objetivo

O estudo EuroEVA tem como objetivo estimar a efetividade da vacina antigripal sazonal na população geral e nos indivíduos com 60 ou mais anos de idade.

### Materiais e métodos

Foi utilizado um delineamento caso-controlo, onde doentes com síndrome gripa, cujo resultado laboratorial foi positivo para a gripe (SG+) são comparados com controlos, casos SG com resultado laboratorial negativo para gripe (SG-). Os doentes de SG são selecionados de entre aqueles com sinais e sintomas de SG, critério EU (4) numa consulta com um médico de família (MF).

Foram incluídos no estudo todos os SG com 60 ou mais anos, e apenas 2 SG por semana de utentes com menos do que 60 anos (cada MF tem um dia da semana para recrutar SG, selecionando no dia estabelecido os 2 primeiros casos que acorram à sua consulta).

A informação relevante incluindo sociodemográfica, características clínicas do SG, estado vacinal e potenciais fatores de confundimento (história tabágica, presença de doenças crónicas, estado funcional, nível educacional, número de consultas de MF nos últimos 12 meses) foi obtida através de um questionário. Foram considerados como vacinados os casos SG que receberam uma dose da vacina trivalente 2013-14, pelo menos 14 dias antes do início dos sintomas.

Para a caracterização da amostra, efetuou-se a análise estatística descritiva univariada e bivariada, sendo apresentadas as frequências relativas, em forma de percentagem, para cada nível das variáveis de desagregação. As características dos casos e controlos foram comparadas utilizando Testes de Qui-Quadrado, Teste exato de Fisher, Testes t ou Testes de Mann-Whitney dependendo da variável em análise, da dimensão da amostra e da verificação dos pressupostos dos testes. A efetividade da vacina (EV) foi estimada através de  $EV=1-OR$  sendo OR o *odd ratio* de estar vacinado nos casos vs controlos.

### Resultados

Nesta época 2013/2014, aceitaram participar no projeto EuroEVA, 49 médicos de família, dos quais 23 reportaram casos de SG, correspondendo a uma taxa de participação de 47% (Figura 1). Durante o período de estudo, da semana 50/2012 à semana 14/2013, foram selecionados 143 indivíduos com SG (Gráfico 1).

Após exclusão de 25 casos, por não cumprirem com os critérios de inclusão, foram incluídos na análise 125 indivíduos com SG (77 Casos e 48 Controlos). De entre os Casos, 49 (62%) eram do tipo A(H1N1)pdm09 e 28 (38%) do tipo A(H3).

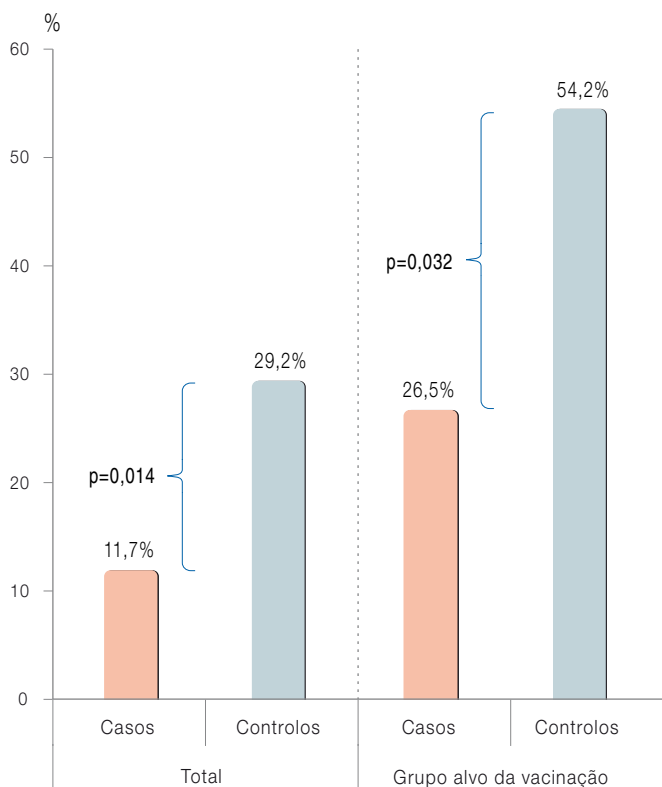
A cobertura da vacina (CV) nos controlos foi de 29,2% e estatisticamente diferente da CV nos casos Influenza (11,7%). Resultados semelhantes foram obtidos no grupo alvo da vacinação, sendo a CV dos controlos (54,2%) mais elevada que a correspondente cobertura nos casos influenza (CV casos=26,5%) (Gráfico 2).





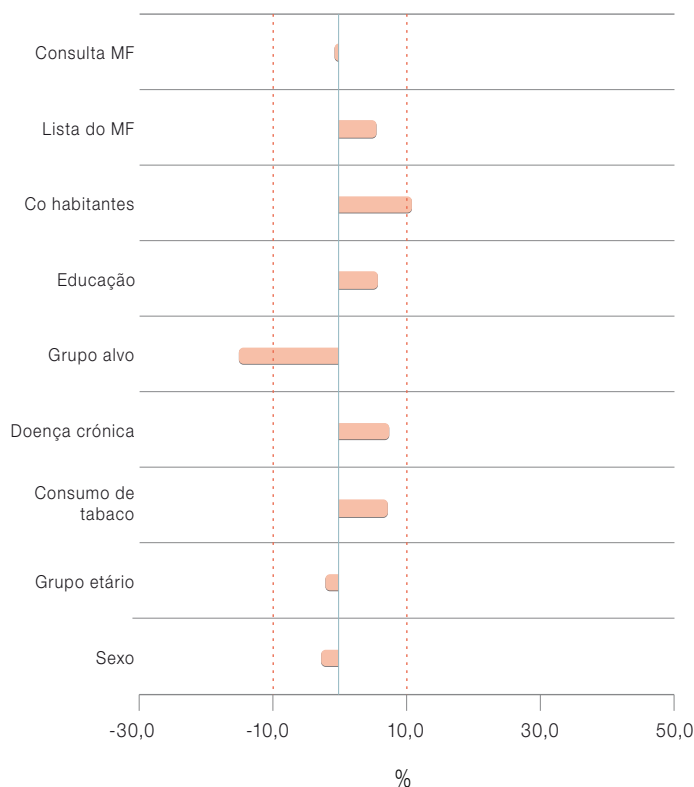
artigos breves\_ n. 5

Gráfico 2: Cobertura da vacina sazonal antigripal nos casos Influenza, na população geral e no grupo alvo da vacinação.



p - comparação da cobertura da vacina entre casos e controlos

Gráfico 3: Percentagem de alteração do OR bruto da vacina sazonal antigripal.



Para obter estimativas da EV ajustadas, procedeu-se à análise dos potenciais fatores de confundimento que alteravam em pelo menos 10% o OR da vacina sazonal antigripal 2013-14. Os resultados desta análise encontra-se no Gráfico 3, e de acordo com a mesma os fatores que mais contribuem para alterar o OR bruto foram pertencer ao grupo alvo da vacinação (-15%) e o número de coabitantes (11%).

A estimativa ajustada, para efeito de confundimento, da efetividade da vacina (EV) foi de 50,2% considerando toda a amostra. No grupo alvo da vacinação, a EV ajustada aumenta para 63,9%. Ambas estimativas não tinham significado estatístico (Tabela 1).

Tabela 1: Efetividade da vacina antigripal sazonal 2013-14 contra casos Influenza (estimativa bruta e ajustada), total e no grupo alvo da vacinação.

População	Bruta			Ajustada		
	n	EV	IC95%	n	EV	IC95%
Todos	125	67,9	10,3 a 88,8	125	50,2	-59,5 a 84,5
Grupo alvo da vacinação	58	69,5	-5,2 a 91,3	58	63,9	-41 a 90,8



## **\_Conclusão**

Nesta época, deu-se um início tardio do EuroEVA, na semana 50/2013, tendo-se recrutado um número de MF inferior comparativamente à época anterior (49 vs 69 em 2012/13). Esta diminuição teve repercussões na dimensão da amostra, tendo a mesma reduzido em 63% (de 392 em 2012-13 para 145 em 2013-14).

Ainda assim, foi possível estimar a EV sazonal ajustada, situando-se nesta época em aproximadamente 50% (total da amostra) e 64% no grupo alvo da vacina. O valor estimado no EuroEVA é superior ao estimado num estudo em Espanha, que obteve uma EV contra gripe de 35% (95% IC: -9 a 62) (total da amostra) (5).

Esta informação foi incluída no estudo multicêntrico I-MOVE de modo a obter estimativas da EV sazonal a nível europeu.

A reduzida dimensão da amostra inviabiliza análises adicionais, nomeadamente, por tipo de vírus em circulação.

### **Referências bibliográficas:**

- (1) Nunes B, Machado A, Pechirra P, et al. Efectividade da vacina antigripal na época 2010-2011 em Portugal: resultados do projeto EuroEVA. Rev Port Med Geral Fam. 2012;28(4):271-84. [LINK](#)
- (2) I-MOVE. Influenza - Monitoring Vaccine Effectiveness [Em linha]. [consult. 14/11/2014] [LINK](#)
- (3) Valenciano M, Ciancio B. I-MOVE: a European network to measure the effectiveness of influenza vaccines. Euro Surveill. 2012;17(39):pii=20281. [LINK](#)
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza case definitions [Em linha]. [consult. 14/11/2014] [LINK](#)
- (5) Jimenez-Jorge S, Pozo F, de Mateo S, et al, on behalf of the Spanish Influenza Sentinel Surveillance System (SISS). Influenza vaccine effectiveness in Spain 2013/14: subtype-specific early estimates using the cycEVA study. Euro Surveill. 2014; 19(9):pii=20727. [LINK](#)



## Disseminação de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemase KPC-3

Vera Manageiro, Eugénia Ferreira, Deolinda Louro,  
Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal (ARSIP),  
Manuela Caniça

manuela.canica@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções  
Associadas aos Cuidados de Saúde, Departamento de Doenças Infecciosas. INSA.

### Introdução

A emergência e rápida disseminação de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases constitui um problema crescente, com consequências importantes no tratamento e controle de infeção, nomeadamente em Portugal. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os mecanismos de resistência envolvidos na suscetibilidade diminuída aos carbapenemos em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae*.

### Material e métodos

Foram estudados 61 isolados de *Enterobacteriaceae* (26 *Klebsiella* spp., 15 *Escherichia coli*, 9 *Enterobacter* spp, 6 *Morganella morganii*, 4 *Proteus mirabilis* e 1 *Serratia marcescens*), enviados ao Laboratório Nacional de Referência da Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) provenientes de hospitais portugueses, no âmbito do programa *Antimicrobial Resistance Surveillance Program in Portugal* (ARSIP), de vigilância laboratorial da suscetibilidade aos antibióticos.

A maioria das amostras foi isolada a partir da urina de doentes ( $\geq 65$  anos) do sexo masculino, em 4 regiões distintas de Portugal.

A caracterização da suscetibilidade aos antibióticos foi efetuada pelo método de difusão em disco, e pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), segundo as normas da SFM/2012 (<http://www.sfm-microbiologie.org/>) e do EUCAST/2012 ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)), respetivamente.

Os isolados que apresentavam suscetibilidade diminuída ao imipenemo, meropenemo e/ou ertapenemo, e sinergia destes carbapenemos com o ácido borónico (e/ou ácido clavulânico), foram considerados putativos produtores de carbapenemases de classe A.

As técnicas de PCR e sequenciação foram utilizadas para detetar e identificar os genes que codificam  $\beta$ -lactamases, assim como para o estudo do respetivo ambiente genético.

A transferência dos genes *bla*<sub>KPC-3</sub> para um sistema isogénico, foi efetuado por conjugação e eletroporação, a identificação dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos por *PCR-Based Replicon Typing* e o estudo da diversidade genética dos isolados de *K. pneumoniae* por *Multilocus Sequence Typing*, ([www.pasteur.fr/mlst/Kpneumoniae.html](http://www.pasteur.fr/mlst/Kpneumoniae.html)).

### Resultados e discussão

Dos 61 isolados estudados, 20 foram considerados putativos produtores de carbapenemases de Classe A. No entanto, confirmou-se esta produção em 6 isolados (5 *Klebsiella pneumoniae* e 1 *Enterobacter cloacae*), os quais apresentavam um fenótipo de multirresistência (resistência a pelo menos três classes de antibióticos estruturalmente não relacionadas) e suscetibilidade apenas à colistina (**Tabela 1**).

A caracterização genotípica confirmou o fenótipo, pois identificou a sequência correspondente ao gene que codifica a carbapenemase KPC-3, em co-expressão com  $\beta$ -lactamases parentais (TEM-1, SHV-1, SHV-14, SHV-146, OXA-30), conferem resistência aos inibidores (SHV-26) e de espectro alargado (CTX-M-15) (**Tabela 1**).

A montante do gene *bla*<sub>KPC-3</sub> foi identificado o transposão Tn4401 (variante d) com uma deleção de 68 nucleótidos, na zona do promotor (**Figura 1**); esta variante, até à data, foi apenas descrita nos Estados Unidos da América e no Canadá, associada a uma elevada resistência aos carbapenemos.

Foram identificados plasmídeos inseridos em diferentes grupos de incompatibilidade, dos quais apenas o IncFrepB foi transferido horizontalmente com o gene *bla*<sub>KPC-3</sub> (**Tabela 1**).

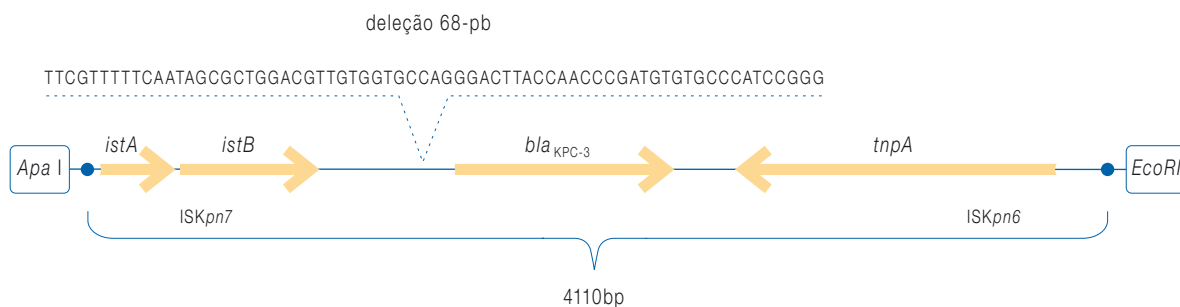


Tabela 1: Características dos isolados produtores de KPC-3.

Isolado	Hospital	Suscetibilidade <sup>a</sup>	MLST <sup>b</sup>	PBRT <sup>c</sup>	β-lactamases identificadas
<i>K. pneumoniae</i> INSRA10302	C	B, C, A, S, T	ST14	NT	KPC-3 + TEM-1 + SHV-1 + SHV-1
<i>E. cloacae</i> INSRA11054	A	B, C, A, S, T, Q	-	NT	KPC-3
<i>K. pneumoniae</i> INSRA12031	A	B, C, A, S, T, Q, F	ST34	IncFrepB, IncFIIIs	KPC-3 + TEM-1 + SHV-26
<i>K. pneumoniae</i> INSRA12267	D	B, C, A, S, T, Q	ST960	IncFrepB, IncFIIIs	KPC-3 + TEM-1 + SHV-164 <sup>d</sup>
<i>E. coli</i> DH5α-KPC-3 (p12267) <sup>e</sup>	-	B, C, A, S	-	IncFrepB	KPC-3 + TEM-1
<i>K. pneumoniae</i> INSRA13165	B	B, C, A, S, T, Q	ST416	IncFrepB, IncFIIIs	KPC-3 + TEM-1 + SHV-14 + OXA-30 + CTX-M-15
<i>K. pneumoniae</i> INSRA14159	A	B, C, A, S, Q	ST59	IncFrepB, IncP	KPC-3 + TEM-1
<i>E. coli</i> K12 C600-KPC-3 (p14159) <sup>f</sup>	-	B, C, A, S	-	IncFrepB	KPC-3 + TEM-1

<sup>a</sup> Perfil de suscetibilidade diminuída aos seguintes antibióticos: B (amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ticarcilina, piperacilina, piperacilina/tazobactame, cefalotina, cefuroxima, cefoxitina, cefixima, cefpodoxima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, e/ou aztreonam); C (imipenemo, meropenemo e/ou ertapenemo); A (canamicina, gentamicina e/ou ampicacina); S (co-trimoxazol), T (tigeciclina); Q (ácido nalidixico, norfloxacina, pefloxacina e/ou ciprofloxacina); F (fosfomicina); <sup>b</sup> MLST, *Multilocus Sequence Typing*; <sup>c</sup> PBRT, *PCR-Based Replicon Typing*; <sup>d</sup> β-lactamase parental, aqui descrita pela primeira vez (*accession number* HE981194); <sup>e</sup> Transformante do isolado clínico *K. pneumoniae* INSRA12267; <sup>f</sup> Transconjugante do isolado clínico *K. pneumoniae* INSRA14159; NT, não tipável.

Figura 1: Representação do transposão Tn4401 (variante d) contendo o gene *bla*<sub>KPC-3</sub>.



Verificou-se ainda que os isolados de *K. pneumoniae* pertenciam a diferentes sequências tipo (Tabela 1), como o ST14, que tem também sido descrito associado a isolados de *K. pneumoniae* produtores da metalo-β-lactamase NDM, o ST146, associado a um clone epidémico produtor da cefalosporinase DHA-1, e o ST960, identificado pela primeira vez neste estudo.

Em conclusão, o presente estudo sugere a disseminação do gene *bla*<sub>KPC-3</sub> entre isolados com elevada diversidade genética, embora fosse encontrado localizado num elemento genético móvel idêntico, o Tn4401d, e este fosse veiculado por um único tipo de plasmídeo (IncFrepB).

## Perfis de resistência de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* 4,5,[12]:i:- responsáveis por infeção humana, 1998-2013

Leonor Silveira, Adelaide Marques, Patrícia Conde,  
João Santos, Jorge Machado

jorge.machado@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

### Introdução

A resistência a antimicrobianos é um problema de saúde pública emergente na União Europeia (UE), principalmente nos países do sul da Europa (Gráfico 1) (1, 2) e resulta sobretudo da prescrição desajustada e do uso indiscriminado e inadequado de antibióticos (2).

É preocupante constatar que Portugal se encontra entre os países da Europa que mais consome antibióticos, tanto a nível do tratamento clínico (Gráfico 1) como da produção animal. Este problema requer atenção e tomada de medidas redobradas, tendo em conta o impacto da globalização e dos fenómenos migratórios.

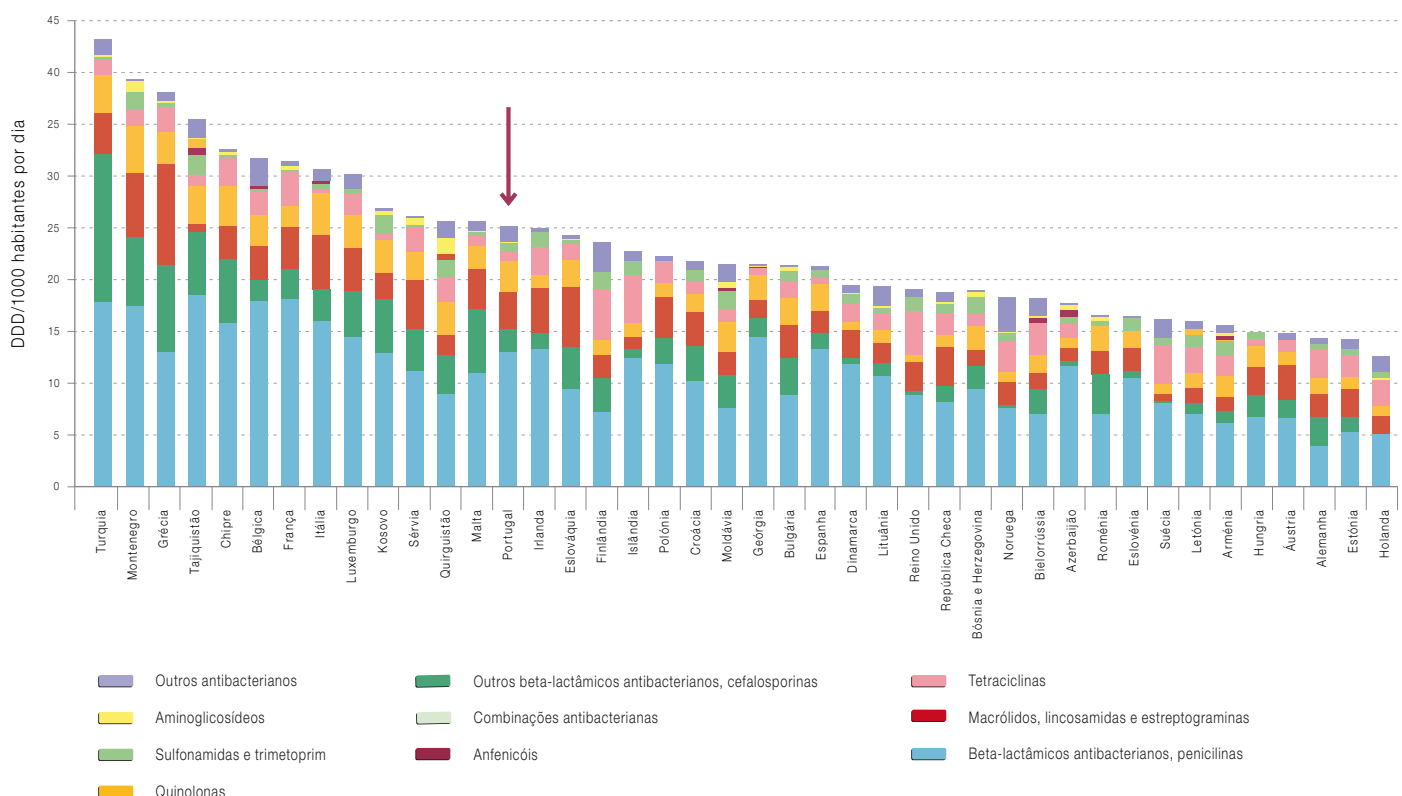
### Objetivo

Neste artigo é feita a análise retrospectiva dos perfis de resistência a antibióticos dos serotipos mais comuns em Portugal (5), *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. 4,[5],12:i:-*, estudados no Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre 1998 e 2013.

### Métodos

Durante o período em estudo foram realizados no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA, testes de suscetibilidade a antimicrobianos (TSAs) a 1739 estirpes de *Salmonella enterica*

Gráfico 1: Consumo de antibióticos em 2011, expresso em Dose Diária Definida por 1000 habitantes por dia, em 12 países europeus e Kosovo comparado com 29 países ESAC-Net. Adaptado de Versporten et al. (2)





artigos breves\_ n. 7

responsáveis por casos humanos de infeção: 152 estirpes de *Salmonella* 4,[5],12:i:-, 1075 estirpes de *Salmonella* Typhimurium e 512 estirpes de *Salmonella* Enteritidis.

Os TSAs foram realizados pelo método de difusão em disco segundo as diretrizes da EUCAST (6). Foram estudados os seguintes antibióticos: ampicilina (Amp/A), amoxicilina/ácido clavulâmico (Amc), cefalotina (Kf), cefuroxima (Cxm), cefotaxima (Ctx), sulfametoxazol/trimetoprim (Stx/Su), estreptomicina (S), tetraciclina (Te/T), gentamicina (Cn), kanamicina (K), ácido nalidíxico (Na), cloranfenicol (C), norfloxacin (Nor) e ciprofloxacina (Cip), sendo utilizada, como controlo de qualidade, a estirpe de *Escherichia coli* ATCC 25922.

**\_Resultados**

De um total de 1739 estirpes analisadas, a percentagem global de resistência a Kf, Cxm, Ctx, Stx, Cn, K, Cip e Nor foi baixa, en-

contrando-se atualmente, na maioria dos casos, abaixo de 5% (Tabela 1). É também possível verificar que, à exceção de alguns casos pontuais, a percentagem de resistências tem vindo a diminuir ao longo dos anos.

De acordo com a Tabela 1, os serotipos *S. Typhimurium* e *S. 4,[5],12:i:-*, considerados clonais, possuem perfis de resistência semelhantes, apresentando maioritariamente resistência a ampicilina, estreptomicina e tetraciclina (>70%). Ao contrário de *S. 4,[5],12:i:-*, *S. Typhimurium* apresenta percentagens elevadas de resistência a cloranfenicol, variando entre 40 e 88%. Por outro lado, *S. 4,[5],12:i:-* não apresenta resistência a ciprofloxacina nem a norfloxacin, em oposição a *S. Typhimurium*. Entre 2000 e 2002, verificou-se um aumento percentual de resistência a diversos antibióticos das estirpes de *S. Typhimurium*, coincidente com o aumento de fagotipos altamente resistentes DT104 e U302.

Tabela 1: Percentagem de resistência por antibiótico e ano de isolamento das 1739 estirpes de *Salmonella enterica* (Enteritidis, Typhimurium e 4,[5],12:i:-), 1998-2013.

Serotipo	Período	Nº estirpes	% de resistência													
			Amp	Amc	Kf	Cxm	Ctx	Stx	S	Cn	K	Te	C	Na	Cip	Nor
S. Enteritidis	1998-1999	194	36,1	24,2	28,9	17,0	14,4	9,8	64,4	3,6	5,2	39,2	9,8	30,9	2,6	-
	2000-2002	251	40,6	13,5	25,1	12,7	7,2	19,1	21,1	16,7	10,8	45,4	23,1	62,2	9,6	-
	2012-2013	67	38,8	6,0	3,0	0,0	0,0	1,5	14,9	0,0	0,0	16,4	3,0	52,2	0,0	0,0
S. Typhimurium	1998-1999	72	91,7	62,5	23,6	20,8	1,4	34,7	94,4	13,9	20,8	90,3	87,5	23,6	4,2	-
	2000-2002	88	95,5	83,0	85,2	83,0	76,1	79,5	65,9	68,2	21,6	97,7	81,8	88,6	45,5	-
	2003-2005	329	72,9	32,2	42,2	43,8	9,1	23,7	90,9	46,2	27,4	90,3	38,9	19,5	12,2	7,0
	2006-2008	301	78,4	21,6	17,9	14,0	1,3	21,9	65,1	14,3	10,3	84,7	40,9	12,0	1,0	2,0
	2009-2011	221	82,8	23,5	4,5	0,9	0,5	10,4	93,2	1,8	5,4	86,4	48,4	7,7	0,5	0,0
S. 4,[5],12:i:-	2010-2011	55	85,5	36,4	9,1	1,8	1,8	10,9	92,7	7,3	0,0	83,6	14,5	5,5	0,0	0,0
	2012-2013	97	84,5	18,6	2,1	1,0	1,0	6,2	81,4	5,2	3,1	85,6	8,2	3,1	0,0	0,0



artigos breves\_ n. 7

Em relação a *S. Enteritidis*, entre 1998 e 1999, a maior parte das estirpes apresentou resistência a estreptomicina (64,4%). No período subsequente, entre 2000 e 2002, 62,2% das estirpes deste serotipo apresentava resistência a ácido nalidíxico. Mais recentemente, entre 2012 e 2013, 52,2% das estirpes *S. Enteritidis* apresentou também resistência a este antibiótico.

Nos últimos anos (2012-2013), e apesar de terem sido identificados 20 isolados dos três serotipos em estudo sensíveis a todos os antibióticos (8,8%; 20/228), grande parte das estirpes apresentaram resistência a mais do que três antibióticos (55,3%; 126/228) (**Tabela 2**). Saliente-se que 21 isolados apresentaram resistência a cinco ou mais antibióticos (9,2%), e que uma destas estirpes, de serotipo *S. Typhimurium*, apresentou resistência a nove antibióticos (Amp, Kf, Cxm, S, Cn, Te, Na, Cip e Nor) e ainda suscetibilidade diminuída a cefotaxima.

**Tabela 2:** Número de resistências das estirpes de *Salmonella enterica* (*Enteritidis*, *Typhimurium* e 4,[5],12:i:-), 2012-2013.

Nº de resistências	Nº de isolados	Percentagem (%)
0	20	8,8
1	57	25,0
2	25	11,0
3	59	25,9
4	46	20,2
5 ou mais	21	9,2
<b>Total</b>	<b>228</b>	<b>100</b>

Relativamente aos perfis de resistência de cada serotipo, o perfil com maior expressão em *S. 4,[5],12:i:-* foi AST (resistência a ampicilina, estreptomicina e tetraciclina), identificado em 56,7% (55/97) dos isolados entre 2012 e 2013 (**Tabela 3**). Este perfil foi também identificado em 20,3% (13/64) das estirpes de *S. Typhimurium*. Contudo, o perfil de resistência mais observado neste serotipo foi ACST (resistência a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina) em 42,2% (27/64) dos isolados. Quanto a *S. Enteritidis*, os perfis de resistência mais frequentes foram a ácido nalidíxico (53,8%) ou a ampicilina (17,5%) (**Tabela 3**).

**Tabela 3:** Perfis de resistência mais comuns das estirpes de *Salmonella enterica* (*Enteritidis*, *Typhimurium* e 4,[5],12:i:-), 2012-2013.

Serotipo	Perfil de resistência mais frequente	Nº de isolados	Percentagem (%)
<i>S. 4,[5],12:i:-</i>	AST	55	56,7
	ACST	27	42,2
	AST	13	20,3
<i>S. Enteritidis</i>	N	43	53,8
	A	14	17,5

### Discussão e conclusão

Apesar de se verificar uma aparente diminuição das resistências a antibióticos nas estirpes clínicas de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. 4,[5],12:i:-*, continuam a existir valores elevados de resistência a ampicilina, tetraciclina e estreptomicina. Estes antibióticos têm sido utilizados na produção animal como fatores de crescimento, podendo inferir-se que seja esta uma das causas do aparecimento de estirpes resistentes em humanos (7).

Embora as infeções por *Salmonella* spp. sejam na sua grande maioria autolimitadas, podem dar origem a infeções sistémicas bastante graves, tornando-se necessária a utilização de antibióticos como as fluoroquinolonas e as cefalosporinas de terceira geração. O aumento da resistência de estirpes de *Salmonella enterica* a estes grupos de antibióticos tem-se verificado em todo mundo, realidade que compromete a efetividade dos tratamentos de infeções invasivas (8). Apesar da resistência, encontrada neste estudo, ser pouco frequente para estes antibióticos (<1%), a mesma não deverá ser negligenciada. De facto, observou-se que duas estirpes com resistência a cefuroxima (cefalosporina de 2ª geração) apresentaram suscetibilidade reduzida a cefotaxima (cefalosporina de 3ª geração), sendo inclusivamente uma delas, resistente a nove antibióticos, nomeadamente às cefalosporinas (1ª e 2ª geração) e quinolonas.

Neste estudo, os perfis de resistência mais comuns foram i) o perfil ACST em *S. Typhimurium*; ii) o perfil AST em *S. 4,[5],12:i:-*; iii) e em *S. Enteritidis* a resistência a ácido nalidíxico, à semelhança do que tem sido observado na Europa (3, 4).



Em conclusão, e apesar das limitações do estudo, o facto de se encontrarem os mesmos perfis de multirresistência por toda Europa alerta para o impacto desta problemática globalizada, que exige concertação de esforços no sentido de preservar a efetividade dos tratamentos de infeções bacterianas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

## Referências bibliográficas:

- (1) European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2013: reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013. [LINK](#)
- (2) Versporten A, Bolokhovets G, Ghazaryan L, et al.; WHO/Europe-ESAC Project Group. Antibiotic use in eastern Europe: a cross-national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(5):381-7.
- (3) Centers for Disease Control and Prevention. National antimicrobial resistance monitoring system for Enteric Bacteria (NARMS): human isolates final report, 2012. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services/CDC, 2014. [LINK](#)
- (4) Hopkins KL, Kirchner M, Guerra B, et al. Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill.* 2010 Jun 3;15(22):19580. [LINK](#)
- (5) Silveira L, Marques A, Machado J. Infeções por *Salmonella enterica* no período entre 2000-2012. *Boletim epidemiológico Observações.* 2013; 2(N especial1):14-6. [LINK](#)
- (6) Antimicrobial Susceptibility Testing: EUCAST Disk Diffusion Method (Version 3.0, April 2013). Växjö: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing/European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2013. [LINK](#)
- (7) Antunes P, Machado J, Peixe L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(2):297-304. [LINK](#)
- (8) Burke L, Hopkins KL, Meunier D, et al. Resistance to third-generation cephalosporins in human non-typhoidal *Salmonella enterica* isolates from England and Wales, 2010-12. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(4):977-81. Epub 2013 Nov 27.



## Vigilância laboratorial das infeções por *Neisseria gonorrhoeae* em Portugal, 2004-2013

João Carlos Rodrigues<sup>1</sup>, Lúcia Reis<sup>1</sup>, Dora Cordeiro<sup>1</sup>, Inês João<sup>1</sup>, Margarida Diniz<sup>1</sup>, Alexandra Nunes<sup>1</sup>, Carlos Florindo<sup>1</sup>, Vítor Borges<sup>1</sup>, Rita Ferreira<sup>1</sup>, Miguel Pinto<sup>1</sup>, Mínia Varela<sup>1</sup>, João Paulo Gomes<sup>1</sup>, Maria José Borrego<sup>1</sup>, Rede para a Coleção Nacional de *Neisseria gonorrhoeae*

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

(1) Departamento Doenças Infecciosas, INSA.

### Introdução

*Neisseria gonorrhoeae*, uma bactéria que infeta exclusivamente o Homem, transmite-se por contacto sexual e é responsável pela gonorreia, que se caracteriza por uretrite, cervicite, faringite ou proctite. A infeção gonocócica na mulher pode progredir até às trompas de Falópio e causar salpingite e infertilidade tubária. Em ambos os sexos a infeção pode disseminar-se pelo organismo causando artrite, meningite ou endocardite. *N. gonorrhoeae* pode igualmente ser transmitida ao recém-nascido no momento do parto causando infeção perinatal. Acrescente-se que a existência de infeções assintomáticas favorece a transmissão da infeção gonocócica (1).

Em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou em 106 milhões o número mundial de casos de gonorreia na população adulta (2) e o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) determinou *N. gonorrhoeae* como sendo a segunda causa bacteriana mais notificada de infeção sexualmente transmissível (IST) na Europa, a seguir à infeção por *Chlamydia trachomatis*. Neste continente, o número de casos de *N. gonorrhoeae* aumentou 62% desde 2008. Em 2012 foram notificados 47.387 casos de gonorreia em 29 países da União Europeia e da EEA, com uma taxa de incidência global de 15.3/100.000 habitantes (3). Portugal tem uma das taxas mais baixas a nível europeu ( $\leq 1.5/100.000$  habitantes), provavelmente devido às características intrínsecas da notificação passiva dos sistemas de vigilância que favorecem a subnotificação de casos (3).

Para além de constituir uma infeção frequente, *N. gonorrhoeae* evidencia uma extraordinária capacidade de desenvolver resistências a múltiplas classes de antibióticos (4), tornando essenciais a vigilância contínua e a monitorização laboratorial da resistência aos antimicrobianos. De facto, a emergência de estirpes de *N. gonorrhoeae* com suscetibilidade diminuída e com resistência às cefalosporinas (que constituem a última linha de tratamento), a elevada prevalência de estirpes resistentes à penicilina e à tetraciclina e, mais recentemente, também às quinolonas e aos macrólidos, constituem uma ameaça para a saúde pública, levando a OMS a considerar que a gonorreia pode tornar-se uma doença incurável, à luz das opções terapêuticas atuais (2).

Em 2004, o Laboratório Nacional de Referência das Infeções Sexualmente Transmissíveis (LNR\_IST) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) deu início a um processo de coleção de estirpes de *N. gonorrhoeae* assente nas estirpes isoladas pelo próprio INSA e também por um número limitado de laboratórios. Em 2010, o INSA formalizou a criação de uma Rede Nacional de Laboratórios com o intuito de alargar a coleção de estirpes de *N. gonorrhoeae* isoladas em Portugal, para: 1) monitorizar as resistências aos antibióticos e rapidamente identificar surtos de resistência; 2) determinar os tipos bacterianos circulantes; 3) reconhecer eventuais cadeias de transmissão; e, 4) reunir dados sobre as infeções por *N. gonorrhoeae* existentes no nosso país que contribuam para a rede europeia de vigilância laboratorial de *N. gonorrhoeae* promovida pelo ECDC.

### Objetivo

Com a finalidade de evidenciar as vantagens da existência de uma rede de laboratórios para constituir uma coleção nacional de estirpes de *N. gonorrhoeae*, este artigo tem como objetivo apresentar os resultados da determinação do fenótipo de resistência à ceftriaxona, cefixima, espectinomicina e ciprofloxacina e da identificação dos principais tipos moleculares das estirpes colecionadas em Portugal de 2004 a 2013.

## \_Material e métodos

O LNR\_IST do INSA recebe as estirpes de *N. gonorrhoeae*, atualmente isoladas em 45 laboratórios públicos ou privados, que voluntariamente participam na Rede Nacional de Laboratórios para a coleção de estirpes de *N. gonorrhoeae* distribuídos por Portugal Continental. As estirpes de *N. gonorrhoeae* enviadas para o INSA são acompanhadas de um código de identificação e de informação sobre o local anatómico de infeção, o género, a idade e o concelho de residência da pessoa infetada.

O Laboratório de Microbiologia da Unidade Laboratorial Integrada do Departamento de Doenças Infeciosas do INSA determina a produção de beta-lactamases e, pelo método E-teste, estuda a suscetibilidade das estirpes de *N. gonorrhoeae* a vários antibióticos, entre os quais a ceftriaxona, a cefixima, a espectinomicina e a ciprofloxacina. Os resultados do perfil de resistência para estes quatro antibióticos são comunicados aos respetivos laboratórios de origem.

O LNR\_IST do INSA determina o tipo NG-MAST (5) de todas as estirpes de *N. gonorrhoeae* para conhecimento dos tipos bacterianos circulantes e subsequente reconhecimento de eventuais cadeias de transmissão. O método tem elevado poder discriminatório pois baseia-se em dois dos genes mais variáveis de *N. gonorrhoeae*, *por* e *tbpB*; dada a rapidez com que a bactéria é capaz de variar a sequência destes dois genes, o método NG-MAST possibilita identificar grupos de indivíduos infetados por um mesmo tipo bacteriano, relacionados entre si num curto espaço de tempo. No NG-MAST, as sequências *por* e *tbpB* obtidas para cada estirpe são comparadas com os alelos existentes na aplicação NG-MAST; cada tipo bacteriano (ST) corresponde a uma combinação única dum alelo *por* com um alelo *tbpB*.

## \_Resultados

Entre 2004 e 2013 foram recebidas no INSA 707 estirpes de *N. gonorrhoeae* (271, de 2004 a 2009; 436 de 2010 a 2013). Cinquenta e seis (7,9%) do total de estirpes revelaram ser produtoras de beta-lactamases e 290 (41,0%) revelaram resistência à ciprofloxacina. Durante o período em análise, não foram registados quaisquer casos de resistência à espectinomicina, cefixima ou ceftriaxona (antibiótico atualmente recomendado para o tratamento da gonorreia) (6). No conjunto das 707 estirpes, sete e dez estirpes revelaram suscetibilidade diminuída às cefixima e ceftriaxona, respetivamente.

Foram identificados mais de 250 tipos NG-MAST, sendo os mais frequentes os tipos bacterianos ST1407 (63 estirpes), ST2 (33 estirpes), ST225 (30 estirpes) e ST2992 (27 estirpes); 79% dos ST (197/250) foram detetados apenas uma ou duas vezes. Todas as 30 estirpes ST225 e 90,5% (57/63) das estirpes ST1407 foram resistentes à ciprofloxacina.

## \_Discussão

A implementação da Rede Nacional de Laboratórios para a coleção de estirpes de *N. gonorrhoeae* tem permitido aumentar o número de laboratórios participantes, bem como a diversidade geográfica ao longo do país. É de realçar que ao longo dos anos aumentou o número de estirpes enviadas ao INSA: 17 em 2004 // 72 em 2010 // 146 em 2013; por outro lado, e, se até 2009, 91% (246/271) das estirpes eram isoladas de pessoas residentes em Lisboa, a partir de 2010 esta situação apenas se verificou em 37% (162/436) dos casos, sendo os restantes 63% (274/436) diagnosticados noutras regiões do país. Contudo, esta variação não permite qualquer extrapolação sobre a distribuição geográfica de estirpes de *N. gonorrhoeae* a nível nacional, provavelmente refletindo apenas o impacto da localização dos laboratórios participantes na mesma.

Contrariamente ao observado noutros países (7), e por motivos ainda desconhecidos, a coleção portuguesa de estirpes de *N. gonorrhoeae* não inclui estirpes resistentes à ceftriaxona e são escassas as estirpes com suscetibilidade diminuída.

A capacidade de transformação genética de *N. gonorrhoeae*, que tem facilitado a aquisição de variados mecanismos de resistência (4) justifica, igualmente, a elevada variabilidade genética entre estirpes da bactéria. A utilidade do sistema NG-MAST em termos de reconhecimento de cadeias de transmissão, apesar de demonstrada, é discutível dado que nem todas as infeções são confirmadas laboratorialmente e dadas as limitações da aplicação informática NG-MAST, que atribui números sucessivos às novas sequências genéticas de dois genes muito variáveis, *por* e *tbpB*, (5) sem uma análise cuidada da similaridade relativamente a sequências já existentes no sistema. No entanto, o sistema NG-MAST tem revelado que algumas estirpes são mais frequentes que outras, como é o caso da ST1407, referida como a mais frequente em vários estudos europeus (7,8,9,10) sempre associada a resistências a um ou mais antibióticos.



## Conclusão

Este artigo evidencia a importância das redes laboratoriais na vigilância epidemiológica de várias infeções, nomeadamente da infeção por *N. gonorrhoeae*, contribuindo assim, para um melhor conhecimento sobre a epidemiologia molecular da infeção e sobre os fenótipos de resistência aos antibióticos circulantes em Portugal.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo e à Rede para a Coleção Nacional de *Neisseria gonorrhoeae* pelo seu contributo para o desenvolvimento e implementação da rede, e pelas estirpes e dados enviados; Dra. Filipa Alegria (Aqualab); Dra. Noélia Piteira (BioLabor); Dra. Eulália Carvalho (Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, EPE); Dr. Agostinho Lira (Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho); Dr. José Manuel Amorim, Dra. Sofia Botelho Moniz e Dr. Rui Campinha (Botelho Moniz Análises Clínicas); Dra. Inês Stilwell (Cintramédica); Dra. Ana Cristina Gonçalves (Edarfa); Dra. Marília Faisca (Gnóstica); Dra. Graça Ribeiro (Hospitais da Universidade de Coimbra); Dra. Florbela Pereira e Dra. Idalina Rocha (Hospital da Cruz Vermelha Portuguesa); Dra. Margarida Feijó Pinto e Dra. Teresa Pina (Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE); Dra. Maria Alberta Faustino (Hospital de Braga); Dra. Maria Dolores Pinheiro e Dra. Manuela Ribeiro (Hospital de São João, EPE); Dra. Jesuína Duarte (Centro Hospitalar de Setúbal - Hospital de São Bernardo, EPE); Dra. Joana Selada (Hospital de Cascais Dr. José de Almeida); Dr. Rodrigo Gusmão (Hospital do Espírito Santo, EPE); Dra. Filomena Martins, Dra. Mariana Pessanha e Professora Teresa Marques (Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, EPE); Dra. Luísa Sancho e Dra. Teresa Sardenha (Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca, EPE); Dr. José Diogo (Hospital Garcia de Orta, EPE); Dra. Ana Paula Castro e Dra. Helena Ramos (Centro Hospitalar do Porto, EPE); Dra. Ana Paula Mota (Centro Hospitalar do Alto Ave – Hospital Senhora da Oliveira, SA); Dra. Teresa Paramês e Dra. Conceição Brito Palma (Imunolab - Centro de Diagnóstico Imunológico, SA); Dra. Luísa Cavaleiro, Helena Rocha e Dra. Anabela Santos Silva (Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira, INSA IP); Dra. Maria Menezes (Labdiagnóstica-Patologistas Clínicos Associados, Lda.); Dra. Ana Jacinta Piedade (Beatriz Godinho Análises Clínicas); Dra. Raquel Poças (LabMED Center); Dra. Alexandra Pereira (Bernardina Sancho Laboratório de Análises Clínicas); Dra. Joana Santos Pinto (David Santos Pinto Laboratório de Análises Clínicas); Dra. Anabela Ramalheiro, Dra. Gizela Santos e Dra. Ana Catarina Guerreiro (Laboratório Dr. J. Leitão Santos Análises Clínicas); Dra. Filomena Lencastre (Laboratório Virgílio M. Roldão, Lda.); Dra. Mónica Cardoso (Noémia Igreja, Lda. Análises Clínicas); Dra. Susana Sá e Dra. Alexandra Gomes (Unilabs); Dr. José Luís Viana (Laboratório de Análises Clínicas NOVA-ERA LUZ, Lda.); Dra. Alda Campos e Dra. Elvira Malta (Laboratórios Aeminium); Dr. Nuno Coelho

(Laboratórios de Análises Clínicas Dra. Luísa Frazão); Dra. Manuela Azevedo, Dr. Eugénio Corrêa, Dra. Vitória Rodrigues, Dra. Patrícia Pereira, Dr. Paulo Paixão e Dra. Cátia Piedade (Labco); Dra. Graça Trigueiro (Grupo Joaquim Chaves) e Dra. Mariana Garcez e Dra. Maritza Pereira (Euromedic).

## Referências bibliográficas:

- (1) Mayor MT, Roett MA, Uduhiri KA. Diagnosis and Management of Gonococcal Infections. *Am Fam Physician*. 2012;86(10):931-8. [LINK](#)
- (2) World Health Organization. Department of Reproductive Health and Research. Global Action Plan to Control the Spread and Impact of Antimicrobial Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: WHO, 2012. [LINK](#)
- (3) European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually Transmitted Infections in Europe 2012. Stockholm: ECDC, 2014. (Surveillance Report). [LINK](#)
- (4) Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol*. 2012;7(12):1401-22. [LINK](#)
- (5) Imperial College London. Department of Infectious Disease Epidemiology. The NG-MAST databases and website [Em linha]. [consult. 27/9/2014] [LINK](#)
- (6) Unemo M ; European STI Guidelines Editorial Board. The '2012 European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults' recommends dual antimicrobial therapy. *Euro Surveill*. 2012;17(47). pii: 20323. [LINK](#)
- (7) Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, et al. Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistant clone. *Euro Surveill*. 2013;18(3). pii: 20358. [LINK](#)
- (8) Carannante A, Renna G, Dal Conte I, et al. Changing Antimicrobial Resistance Profiles among *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in Italy, 2003 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(10):5871-6.
- (9) Horn NN, Kresken M, Körber-Irrgang B, et al ; Working Party Antimicrobial Resistance of the Paul Ehrlich Society for Chemotherapy. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Germany. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(5-6):586-91.
- (10) Jeverica S, Golparian D, Matičič M, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Slovenia, 2006-12: rise and fall of the multidrug-resistant NG-MAST genogroup 1407 clone? *J Antimicrob Chemother*. 2014 ;69(6):1517-25.



## Doença meningocócica do serogrupo B (MenB) em Portugal: uma reflexão sobre estratégias de imunização

Maria João Simões<sup>1</sup>, Teresa Fernandes<sup>2</sup>, Paulo Gonçalves<sup>1</sup>,  
Célia Bettencourt<sup>1</sup>, Cristina Furtado<sup>1</sup>

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

(1) Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Direção de Serviços de Prevenção da Doença e Promoção da Saúde, Direção-Geral da Saúde.

### Introdução e objectivo

A doença invasiva meningocócica (DIM) é endémica no mundo inteiro e constitui um problema de saúde pública devido à sua elevada morbidade (incidência, gravidade e sequelas), principalmente em crianças menores de dois anos de idade (1). Após comercialização da vacina conjugada contra meningococos do serogrupo C (MenC) no início da década de 2000, seguida de introdução nos Programas Nacionais de Vacinação (PNV) e campanhas de vacinação em crianças e adolescentes, e ainda da introdução no mercado de vacinas conjugadas tetravalentes (A, C, W135 e Y), para aplicação em viajantes e em países onde há risco de DIM dos serogrupos W135 e Y, as estirpes de meningococos do serogrupo B tornaram-se as principais responsáveis por casos de DIM nos países industrializados, nomeadamente em Portugal (1-3). O controlo de surtos causados por estirpes clonais de meningococos do serogrupo B tem sido possível com a utilização de vacinas preparadas com base nas vesículas de membrana externa das estirpes epidémicas. Dos constituintes da membrana externa, a proteína PorA é a mais fortemente imunogénica. Contudo, esta proteína não é um alvo adequado para a produção de vacinas universais para a DIM por serogrupo B, devido à reconhecida variabilidade das suas sequências aminoácídicas e consequente perda de eficácia da vacina face a estirpes heterólogas do mesmo serogrupo (4).

A primeira vacina conjugada licenciada, competente para conferir proteção alargada contra infeções por meningococos do serogrupo B, é a vacina 4CMenB (Bexsero®), dirigida a quatro componentes da membrana externa bacteriana (5). Num estudo multicêntrico desenvolvido em cinco países europeus (Reino Unido, França, Ale-

manha, Itália e Noruega), em que foi aplicada a técnica de MATS (*Meningococcal Antigen Typing System*), concluiu-se que 78% das estirpes invasivas circulantes naqueles países eram cobertas por esta vacina (5). Esta proporção é mais elevada quando é avaliado o título de anticorpos bactericidas circulantes 30 dias após imunização, possivelmente resultante de um efeito sinérgico na produção de anticorpos contra múltiplos antigénios (6). A utilização da vacina MenB foi autorizada pela Comissão Europeia em janeiro de 2013 e a sua comercialização no mercado privado em Portugal teve início em abril de 2014. A Agência Europeia do Medicamento (EMA) aprovou a utilização da vacina em crianças a partir de dois meses de idade, com administração de doses intervaladas de um ou dois meses (7).

Este trabalho tem por objetivo caracterizar a distribuição de casos de DIM por meningococos do serogrupo B ocorridos na população portuguesa com menos de um ano de idade entre 2003 e 2012, e refletir sobre a utilização da 4CMenB em Portugal.

### Material e métodos

Foram analisados todos os casos de DIM (possíveis, prováveis e confirmados) ocorridos num período de dez anos, entre 2003 e 2012. Utilizou-se como fonte de dados a Base de dados Nacional de Doença Invasiva Meningocócica (DIM), gerida pela Direção-Geral da Saúde (DGS), resultante do Programa Nacional de Vigilância Epidemiológica Integrada da Doença Meningocócica (8) que reúne os dados recolhidos pela DGS e pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). A definição de "caso de DIM" seguiu os critérios estabelecidos pela Comissão Europeia em 2002 e atualizados em 2008 (9). Para o cálculo da incidência de DIM utilizou-se como denominador a população média anual disponibilizada pelo Instituto Nacional de Estatística (INE). Para a descrição das características dos casos de DIM por serogrupo e grupo etário recorreu-se ao cálculo das frequências absolutas e relativas por ano do início de sintomas.

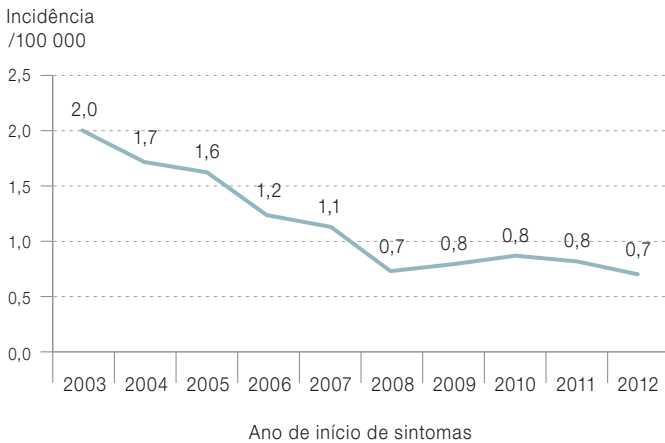
### Resultados

Nos 10 anos de vigência do Programa Nacional de Vigilância Epidemiológica Integrada da DIM registaram-se um total de 1216 casos de DIM, dos quais 967 (79,5%) foram classificados como casos confirmados e 249 (20,5%) como possíveis ou prováveis. Ao longo do período em análise, a incidência da DIM decresceu de 2,0 por 100 000 habitantes em 2003 para 0,7 por 100 000 habitantes em



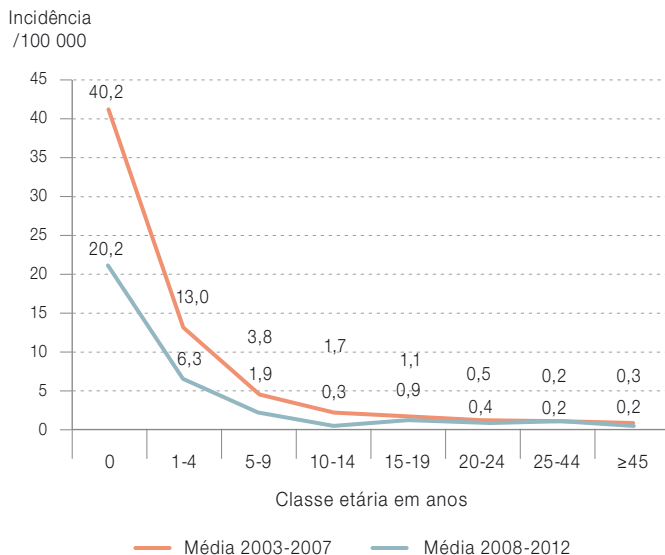
artigos breves\_ n. 9

**Gráfico 1:** Taxa de incidência global (/100 000 habitantes) da doença meningocócica entre 2003 e 2012 em Portugal.



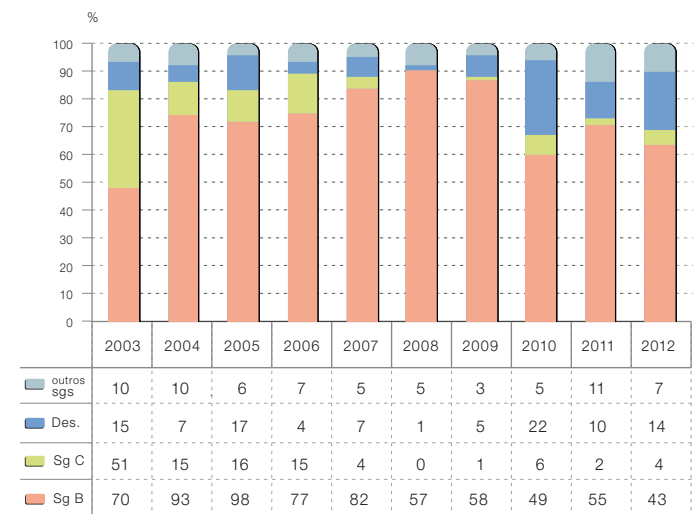
A taxa de incidência de DIM por todos os serogrupos foi sempre mais elevada nos menores de 1 ano de idade, diminuindo gradualmente até ao 10-14 anos de idade (Gráfico 2). A incidência da doença diminuiu ao longo deste período de tempo em todos os grupos etários mas com maior evidência nos menores de 5 anos de idade. Nos últimos 5 anos a incidência média anual nos menores de 1 ano de idade foi de 20,2 casos/100 000 habitantes, diminuindo para 6,3/100 000 habitantes no grupo etário 1-4 anos e para 1,9/100.000 habitantes no grupo etário 5-9 anos. A média anual da incidência foi inferior a 1/100 000 habitantes nos restantes grupos etários (Gráfico 2).

**Gráfico 2:** Média anual da taxa de incidência (/100 000 habitantes) dos casos de DIM por grupo etário em Portugal, 2003-2007 e 2008-2012.



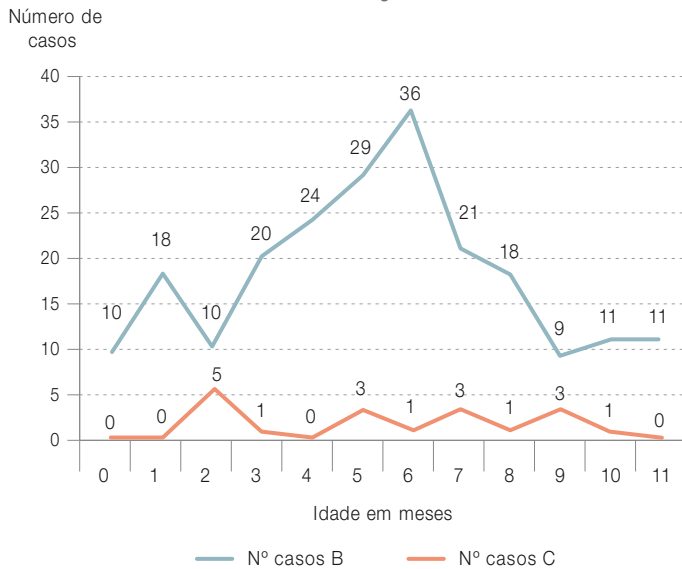
A DIM por serogrupo C tornou-se rara (0 a 6 casos por ano) a partir de 2007. Verificou-se um gradual decréscimo da doença por serogrupo B, cuja proporção variou entre cerca de 49% e 92% dos casos confirmados anualmente (Gráfico 3).

**Gráfico 3:** Proporção e número de casos confirmados de DIM por serogrupo e ano de início de sintomas em Portugal, 2003-2012.



No Gráfico 4 verifica-se que, contrariamente ao que acontece com o número de casos de DIM por meningococos do serogrupo C, cuja distribuição dos casos por mês de idade é uniforme ao longo do primeiro ano de vida (0-5 casos por mês de idade), o número de casos por meningococos B é crescente desde o nascimento até atingir um pico máximo (36 casos) aos seis meses de idade, a partir do qual começa a decrescer de forma continuada. Dos casos de DIM por meningococos do serogrupo B que ocorreram em crianças menores de um ano, 67,7% (147/217) ocorreu até aos seis meses de idade e 37,8% (82/217) até aos quatro meses de idade.

**Gráfico 4:** Distribuição do número de casos acumulados de DIM por meningococos dos serogrupos B e C no primeiro ano de vida em Portugal, 2003-2012.



## Discussão

A diminuição da incidência da DIM em Portugal durante os últimos 10 anos ficou a dever-se, principalmente, à utilização da vacina conjugada contra meningococos do serogrupo C, comercializada em 2001 e introduzida no PNV em 2006, acompanhada de uma campanha de vacinação de crianças e adolescentes até aos 18 anos de idade. Observou-se também, neste período, por razões ainda não explicadas, uma diminuição gradual da incidência da DIM por serogrupo B em Portugal como noutros países europeus (relatórios do *European Centre for Disease Prevention and Control* - ECDC, disponíveis em [http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EU\\_IBD/Pages/index.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EU_IBD/Pages/index.aspx)). No entanto a morbidade da DIM por serogrupo B permanece elevada. Os padrões de incidência global e por grupo etário da DIM por meningococos serogrupo B são semelhantes em Portugal e nos restantes países europeus notificadores para a rede europeia do projeto EU-IBIS - *European Invasive Bacterial Infections Surveillance Network* (dados publicados no site PubMLST - *Public databases for molecular typing and microbial genome diversity*, disponível em <http://pubmlst.org/neisseria/>) e para o ECDC.

A distribuição do número total de casos de DIM por meningococos do serogrupo B, em Portugal, no primeiro ano de vida tem um perfil característico, com um pico ao sexto mês de idade, à semelhança do observado noutros países (10). Não se atribuindo a esta distribuição de casos de DIM qualquer variação demográfica da população alvo, este facto será certamente importante na escolha do esquema de vacinação mais adequado. Dados da literatura indicam que com um esquema de vacinação aos 2, 4 e 6 meses de idade, em co-administração com as vacinas do PNV, é alcançado um nível protetor de anticorpos bactericidas séricos ao sétimo mês de vida. O decréscimo observado do nível de anticorpos implica um reforço aos 12 meses de idade (11). Com um esquema de vacinação “acelerado”, aos 2, 3 e 4 meses de idade, atinge-se um nível de imunidade protetora aos cinco meses de idade, mas verifica-se um decréscimo mais acentuado do nível sérico de anticorpos bactericidas até ao reforço aos 12 meses de idade (12). Esta informação, analisada num cenário hipotético que exclua fatores externos que afetam a dinâmica de transmissão de meningococos e aplicando para Portugal a proporção de 78% das estirpes invasivas em circulação serem cobertas pela vacina (estudo MATS, não realizado em Portugal) (5), sugere que a vacinação de todas as crianças com um esquema de três doses intervaladas de dois meses (2-4-6 meses, com proteção adquirida aos 7 meses de idade) poderia diminuir em cerca de 25,2% o número médio anual de casos de DIM por serogrupo B no grupo etário inferior a 12 meses. Por outro lado, a utilização do esquema de três doses aos 2-3-4 meses, conferindo proteção a partir dos 5 meses de idade, poderia diminuir em cerca de 48,5% o número anual de casos de DIM por serogrupo B no mesmo grupo etário. Este segundo cenário está, de certa forma, concordante com as recomendações da Comissão de Vacinação e Imunização do Reino Unido (JCVI), de um esquema vacinal de duas doses (2-4 meses com reforço aos 12 meses de idade) com o objetivo de conferir proteção aos 5 meses de idade (14).

Em relação ao que tem sido questionado sobre a imunidade de grupo, e de acordo com os dados disponíveis até à data, a capacidade da vacina 4CMenB conferir imunidade de grupo é desconhecida (15). Na ausência de imunidade de grupo, a vacina não impede a infeção e colonização da nasofaringe de indivíduos vacinados, apenas impede a doença invasiva. Neste contexto,



## artigos breves\_ n. 9

ao contrário dos indivíduos que tiveram a doença, os indivíduos vacinados podem constituir veículos de transmissão da doença aos não vacinados, mesmo sendo portadores assintomáticos. A experiência com o uso de vacinas polisacarídicas (não indutoras de imunidade de grupo) para meningococos do serogrupo C em campanhas de vacinação na década de 1990, mostrou que quando a cobertura vacinal é elevada, surgem efeitos indiretos não desejáveis: o risco de doença invasiva em indivíduos não vacinados é duas vezes superior (16). A utilização da vacina 4CMenB na população mais vulnerável à doença invasiva, as crianças menores de um ano, constitui uma medida profilática sem os efeitos indiretos indesejáveis referidos anteriormente, uma vez que a taxa de portadores assintomáticos neste grupo etário é quase nula (17).

### Conclusões

Segundo o Resumo das Características do Medicamento (RCM) (13), a vacina 4CMenB pode ser utilizada a partir dos dois meses de idade, com esquemas de vacinação que dependem da idade à data da primeira inoculação. A lactentes com dois meses de idade é recomendado um esquema de três doses de vacina, intervaladas de pelo menos um mês, com um reforço aos 12-15 meses de idade (7). Neste estudo, o padrão de incidência de DIM por meningococos do serogrupo B em crianças portuguesas menores de 12 meses indicia que pode existir benefício na utilização de um esquema de vacinação acelerado (2-3-4 meses de idade), com proteção mais precocemente adquirida, possibilitando a redução do pico máximo de casos incidentes de DIM aos 6 meses de idade observado no nosso país nos últimos dez anos. Contudo, é importante não descurar que o título de anticorpos bactericidas decresce mais rapidamente do que no regime com um intervalo de dois meses entre doses. De facto, tratando-se de uma vacina tetravalente, e não sendo uniforme o decréscimo do título de anticorpos relativamente aos quatro alvos da vacina, desconhece-se ainda a real frequência de lactentes vacinados que ficarão suscetíveis à doença antes da dose de reforço. Igualmente, desconhece-se a cinética de anticorpos bactericidas após o reforço da vacina, independentemente da idade em que este é administrado.

A informação atualmente disponível sobre a única vacina conjugada licenciada para meningococos do serogrupo B, a vacina 4CMenB, não é ainda suficiente para fundamentar eventual política de vacinação em Portugal, uma vez que não são ainda conhecidos: a concordância dos antígenos da vacina com as estirpes invasivas em circulação em Portugal responsáveis por DIM por serogrupo B, o efeito de imunidade de grupo conferido pela vacina e a duração da imunidade após vacinação. Assim, a vigilância da DIM em Portugal assume particular importância, nomeadamente no que respeita à monitorização dos génotipos invasivos e sua concordância com a vacina 4CMenB e à avaliação da cinética de anticorpos bactericidas circulantes (protetores) após vacinação, acompanhada de estudos de portadores com caracterização de génotipos de colonização.

Neste contexto ainda de incertezas, este artigo é apenas uma reflexão sobre esquemas de vacinação que se podem adequar à população portuguesa face às características epidemiológicas da DIM no país.

### Agradecimentos

Agradece-se à rede de laboratórios que integra a Vigilância Laboratorial da Doença Meningocócica (VigLab-Doença Meningocócica) a sua participação no Sistema de Vigilância.

### Referências bibliográficas:

- (1) Sadarangani M, Pollard AJ. Serogroup B meningococcal vaccines-an unfinished story. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(2):112-24.
- (2) EU-IBIS - European Invasive Bacterial Infections Surveillance Network. Invasive Neisseria meningitidis in Europe 2006. London: Health Protection Agency, 2007. [LINK](#)
- (3) European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of invasive bacterial diseases in Europe, 2011. Stockholm: ECDC, 2013. [LINK](#)
- (4) Holst J, Martin D, Arnold R, et al. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from Neisseria meningitidis. *Vaccine.* 2009;27(Suppl 2):B3-12.
- (5) Vogel U, Taha MK, Vazquez JA, et al. Predicted strain coverage of a meningococcal multicomponent vaccine (4CMenB) in Europe: a qualitative and quantitative assessment. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13(5):416-25.
- (6) Frosi G, Biolchi A, Lo Sapio M, et al. Bactericidal antibody against a representative epidemiological meningococcal serogroup B panel confirms that MATS underestimates 4CMenB vaccine strain coverage. *Vaccine.* 2013;31(43):4968-74. [LINK](#)
- (7) European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use. Meningococcal group B Vaccine (rDNA, component, adsorbed): assessment report. London: EMA, 2012. [LINK](#)
- (8) Circular Normativa nº 13/DEP de 05/09/2002. Direção-Geral da Saúde. Vigilância epidemiológica integrada da doença meningocócica. [LINK](#)



artigos breves\_ n. 9

- (9) Decisão da Comissão 2002/253/CE, de 19 de março de 2002. JOCE L86/44-62, de 03/04/2002. Estabelece definições de casos para a notificação de doenças transmissíveis à rede comunitária ao abrigo da Decisão nº 2119/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. [LINK](#) Alterada pela Decisão da Comissão 2008/426/CE, de 28 de abril de 2008. JOCE L159/46-90, de 18/06/2008. [LINK](#)
- (10) Mary Ramsay. Current epidemiology of meningococcal disease in the UK and Europe [Em linha]. London: HPA Centre for Infections, 2011. Oral communication [consult.6/9/2014] [LINK](#)
- (11) Vesikari T, Esposito S, Prymula R, et al.; EU Meningococcal B Infant Vaccine Study group. Immunogenicity and safety of an investigational multicomponent, recombinant, meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) administered concomitantly with routine infant and child vaccinations: results of two randomised trials. Lancet. 2013 Mar 9;381(9869):825-35.
- (12) Gossger N, Snape MD, Yu LM, et al.; European MenB Vaccine Study Group. Immunogenicity and tolerability of recombinant serogroup B meningococcal vaccine administered with or without routine infant vaccinations according to different immunization schedules: a randomized controlled trial. JAMA. 2012;307(6):573-82.
- (13) Agência Europeia de Medicamentos. Bexsero - Vacina contra o meningococo do grupo B (rDNA, componente adsorvido): resumo das características do Medicamento. London: EMA, 2012. (atualiz. 07/08/2014) [LINK](#)
- (14) JCVI position statement on use of Bexsero® meningococcal B vaccine in the UK (march 2014). UK: Joint Committee on Vaccination and Immunisation, 2014. [LINK](#)
- (15) Snape MD, Pollard AJ. The beginning of the end for serogroup B meningococcus? Lancet. 2013;381(9869):785-7.
- (16) Álvarez Y, Caicoya M, García R, et al. A system dynamics model for analysing population risk in case of a voluntary vaccination program against meningococcal meningitis. System Dynamics conference 1998. [LINK](#)
- (17) Christensen H, May M, Bowen L, et al. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis. 2010;10(12):853-61. Review. Erratum in: Lancet Infect Dis. 2011;11(8):584.



## Contaminação microbiológica do ar em lares da 3ª idade na cidade do Porto: Projeto GERIA

Lívia Aguiar, Ana Mendes, Cristiana Pereira, Maria Paula Neves, João Paulo Teixeira

[livia.aguiar@insa.min-saude.pt](mailto:livia.aguiar@insa.min-saude.pt)

Unidade do Ar e Saúde Ocupacional. Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

### Introdução

Por todo o Mundo, as organizações de saúde têm demonstrado uma elevada preocupação relativamente aos mecanismos para lidar com uma população cada vez mais envelhecida (1). Esta tendência explica o aumento da procura de serviços de cuidados de saúde de longa duração (2), tais como os lares de 3ª idade (3). Portugal é o 8º país mais envelhecido do mundo e o 6º a nível europeu, com 23% da população com mais de 60 anos de idade. Em Portugal, o número de lares de 3ª idade aumentou 49% entre 1998 e 2010 (4).

Estima-se que os idosos passem cerca de 19-20h/dia no interior dos lares onde residem. Os agentes microbiológicos encontrados no interior dos lares de 3ª idade podem produzir efeitos adversos na saúde e, devido ao facto desta população suscetível passar grande parte do seu tempo em ambiente interior, torna-se de extrema importância avaliar a sua exposição a estes agentes.

Os contaminantes microbiológicos do ar são basicamente constituídos por bactérias, fungos e vírus e a sua distribuição pode variar de acordo com diversos fatores. As bactérias existentes no ar interior são potenciais agentes causadores de várias doenças infecciosas, e as suas propriedades estão relacionados com o desenvolvimento e agravamento de doenças respiratórias crónicas, incluindo a asma (5). Estudos recentes têm reportado uma relação entre a exposição a fungos e o aparecimento de doenças alérgicas, irritações e infeções (6).

Este artigo apresenta uma parte dos resultados obtidos através do projeto GERIA ([www.geria.webnode.com](http://www.geria.webnode.com)), no qual se procedeu à

avaliação e caracterização dos agentes microbiológicos no ar interior de 22 lares de 3ª idade localizados na cidade do Porto. Os principais objetivos do estudo foram: i) determinar a concentração de bactérias totais e fungos no ar interior dos lares de 3ª idade e comparar com as condições de referência estabelecidas na legislação portuguesa vigente; ii) examinar a variabilidade destes parâmetros entre os diferentes espaços existentes nos lares de 3ª idade; e iii) identificar as principais espécies de fungos encontradas nas áreas avaliadas.

### Material e métodos

De um total de 58 lares localizados na área urbana do Porto, 38% (n = 22) concordaram em participar no presente estudo. Nos lares estudados procedeu-se à monitorização dos agentes microbiológicos no ar interior, através da contagem de fungos e bactérias totais, assim como da identificação dos fungos presentes no ar interior. Esta monitorização decorreu entre novembro de 2011 e agosto de 2013, compreendendo dois períodos do ano: verão e inverno. As avaliações foram efetuadas em diferentes áreas: sala de convívio, sala de refeição, gabinete médico e quartos, incluindo os quartos onde se encontravam idosos acamados. No total, foram avaliadas 141 áreas. Foram também efetuadas amostragens do ar exterior para comparação com as concentrações obtidas no interior. O amostrador foi colocado a uma altura entre 0,6 a 1,5 metros acima do nível do pavimento, à altura da zona respiratória dos ocupantes e o mais próximo possível do centro da área a avaliar.

A amostragem dos parâmetros microbiológicos foi efetuada com base no método NIOSH 0800:1998 (7) e na EN 13098:2000 (8), utilizando um amostrador microbiológico de ar (Merck, MAS-100), com um fluxo de ar de 100L/min, e dois meios de cultura: Tryptic Soy Agar (TSA) para bactérias totais e Malt Extract Agar (MEA) para fungos. O volume de ar recolhido foi de 250 Litros, tanto no interior como no exterior, e foram efetuadas amostragens em duplicado, com um branco de campo por meio de cultura e por dia de amostragem. Na quantificação de fungos, as amostras foram incubadas a 25°C, durante 3 dias, e para as bactérias totais a incubação teve a duração de 2 dias a 37°C, seguindo-se a contagem a olho nu, tendo por base as orientações estabelecidas na ISO 4833:2013 (9) e EN 13098:2000 (8). Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colónias por metro cúbico



artigos breves\_ n. 10

de ar (UFC/m<sup>3</sup>) e as concentrações obtidas de bactérias totais e fungos foram comparados com a legislação portuguesa em vigor, recentemente revista. A identificação de fungos foi baseada nas características fenotípicas das colónias e seguiu os procedimentos de micologia padronizados.

**\_Resultados e discussão**

Os 22 lares estudados encontram-se localizados na área urbana da cidade do Porto, sendo que a maioria (n = 17) se situa em áreas de intenso tráfego automóvel. Nos lares avaliados vivem 716 idosos, sendo a ocupação variável entre 7 a 136 ocupantes por edifício. A legislação portuguesa relativa aos parâmetros da qualidade do ar interior (QAI), incluindo os parâmetros microbiológicos, sofreu recentemente uma atualização através da Portaria n.º 353-A/2013 de 4 de dezembro de 2013, a qual modificou o valor de referência para bactérias e fungos de um valor fixo de 500 UFC/m<sup>3</sup>, para as seguintes condições de referência: i) para as bactérias totais, o valor no interior não pode exceder o valor de concentração encontrado no exterior acrescido de 350 UFC/m<sup>3</sup>; ii) para os fungos, o valor obtido no interior não pode exceder a concentração deste agente no exterior. As concentrações médias, dos parâmetros microbiológicos avaliados, nos lares de 3ª idade estudados encontram-se dentro das condições de referência estabelecidas na atual legislação, com exceção da concentração dos fungos no período de inverno (*Tabela 1*).

Na *Tabela 2* apresentam-se os resultados obtidos para as concentrações médias de bactérias totais e fungos, nas duas estações, por tipologia de área avaliada. As concentrações de bactérias totais encontram-se dentro dos valores recomendados na legislação portuguesa, contudo, as concentrações de fungos obtidas no interior, no período de inverno, são superiores às concentrações médias obtidas no exterior (208 UFC/m<sup>3</sup>), para todas as áreas avaliadas, com exceção da área de gabinete médico. Bactérias totais e fungos apresentam valores mais elevados na área com maior taxa de ocupação: sala de refeição, em ambas as estações.

Relativamente à identificação de fungos (*Gráfico 1*), no verão a espécie predominante identificada em 17 dos 22 lares de 3ª idade estudados foi *Cladosporium* sp. No inverno, *Penicillium* sp. foi a espécie predominante identificada em 13 lares, enquanto *Cladosporium* sp. foi identificada como predominante nos restantes 8 lares de 3ª idade. Não obstante, através da comparação da identificação de fungos efetuada tanto no ar interior como no ar exterior, concluiu-se que as espécies de fungos no interior são as mesmas identificadas no exterior: *Cladosporium* sp. na sua maioria, e *Penicillium* sp. Tanto *Cladosporium* sp. como *Penicillium* sp. são espécies consideradas comuns no ar ambiente interior e exterior (10). Algumas das espécies de *Aspergillus* identificadas nos lares de 3ª idade estudados poderão ser potencialmente toxigenicas: As-

**Tabela 1:** Concentração média de bactérias totais e fungos no interior e exterior dos lares de 3ª idade, por estação do ano.

	n	Concentração no Interior	n	Concentração no Exterior	Valor de Referência <sup>a</sup>	
		Média [Mín-Máx] UFC/m <sup>3</sup>		Média [Mín-Máx] UFC/m <sup>3</sup>		
Bactérias	VERÃO	137	329 [6 – 2282]	22	162 [24 – 616]	Interior < Exterior + 350 UFC/m <sup>3</sup>
	INVERNO	133	258 [14 – 996]	22	89 [8 – 368]	
Fungos	VERÃO	132	305 [6 – 2224]	22	531 [20 – 3454]	Interior < Exterior
	INVERNO	130	260 [18 – 2812]	22	208 [62 – 676]	

<sup>a</sup> Portaria n.º 353-A/2013 de 4 de dezembro.

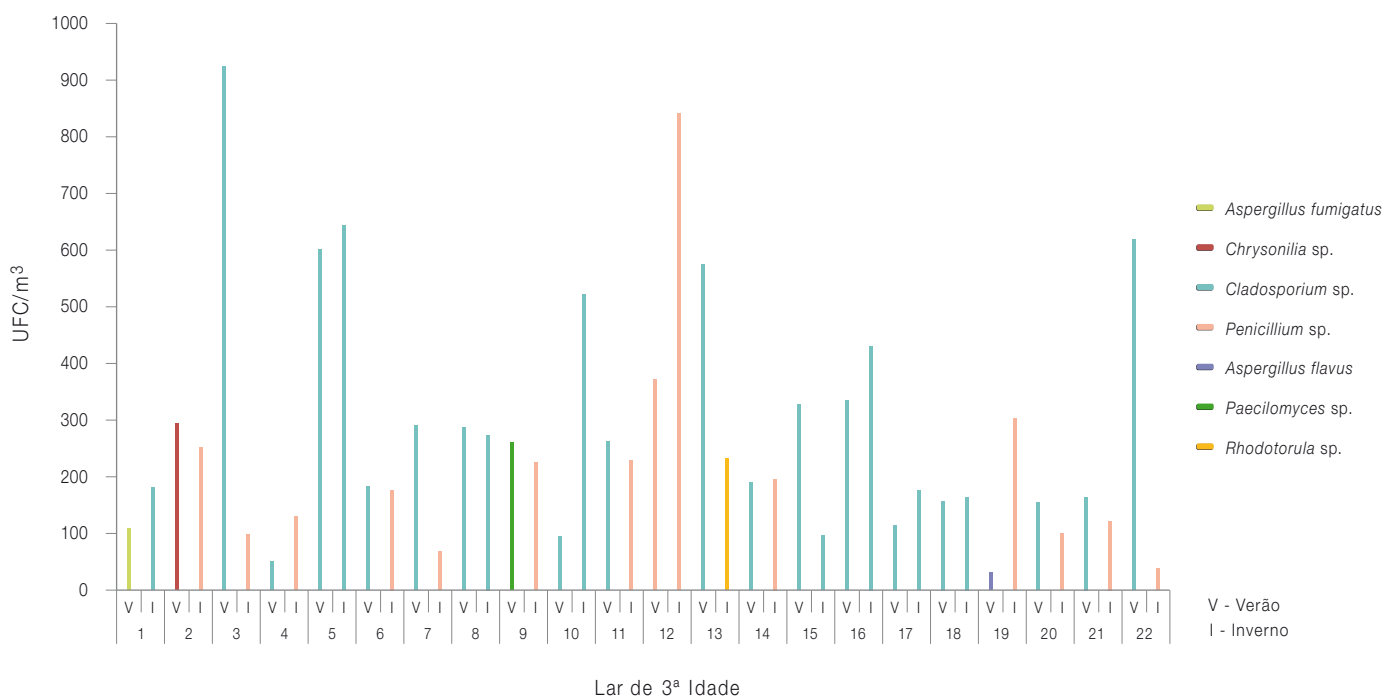
n – número de pontos avaliados.



Tabela 2: ▾ Concentração média de bactérias totais e fungos por tipologia de área estudada e estação do ano.

		Média [Mín-Máx] UFC/m <sup>3</sup>					
		Sala refeição	Sala convívio	Quartos	Quartos idosos acamados	Gabinete médico	Exterior
Bactérias	VERÃO	427 [92 – 1414]	411 [36 – 2282]	252 [6 – 1386]	269 [58 – 1052]	342 [84 – 650]	162 [24 – 616]
	INVERNO	298 [14 – 996]	293 [44 – 838]	210 [20 – 630]	262 [40 – 618]	343 [30 – 820]	89 [8 – 368]
Fungos	VERÃO	412 [8 – 2224]	269 [38 – 1010]	290 [6 – 1128]	251 [34 – 640]	387 [36 – 824]	531 [20 – 3454]
	INVERNO	366 [38 – 2812]	259 [26 – 784]	241 [18 – 1218]	218 [18 – 502]	171 [80 – 284]	208 [62 – 676]

Gráfico 1: ▾ Espécies de fungos predominantemente identificadas, por lar de 3ª idade e por estação do ano.



*Aspergillus flavus* poderá afetar doentes com o sistema imunitário comprometido; *Aspergillus niger* possui propriedades toxigenicas. Se forem inalados em grande quantidade, os seus esporos poderão induzir aspergilose (11). *Aspergillus flavus* foi apenas identificada no verão e *Aspergillus niger* no inverno. No entanto, a espécie *Aspergillus fumigatus*, que pode ser despoletadora de

aspergilose (micose invasiva dos pulmões que poderá ser problemática em presença de indivíduos imunocomprometidos), foi encontrada em 4 lares de 3ª idade, tanto no inverno como no verão, além de ter sido a espécie prevalente identificada na maioria das áreas avaliadas de um lar de 3ª idade, no período de verão. Contudo, as concentrações encontradas nestes locais para a espécie

*Aspergillus fumigatus* são inferiores ao valor da condição específica estabelecida na legislação portuguesa (10), que refere que as concentrações de cada espécie toxigenica encontrada num determinado local não podem ser superior a 12 UFC/m<sup>3</sup>. Além disso, em 3 dos 4 lares a referida espécie foi identificada igualmente no ar exterior, podendo assim ser provável que a sua proveniência tenha origem no exterior. Importa ainda referir que nos lares onde se verificou a predominância de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Chrysonilia* sp., *Paecilomyces* sp. e *Rhodotorula* sp., como sugestão de estudos futuros deverá ser investigada a existência de fontes de contaminação específicas.

### \_Conclusão

Da análise dos resultados obtidos verifica-se de acordo com a legislação portuguesa vigente recentemente revista, apenas as concentrações de fungos no período de inverno não cumprem com as condições de referência estabelecidas. No entanto, é de referir que as concentrações máximas de bactérias totais registaram valores elevados, em ambas as estações. Importa também referir que, apesar das concentrações dos agentes microbiológicos nas áreas dos lares de 3ª idade avaliados serem consideravelmente aceitáveis à luz da legislação portuguesa, este facto não assegura que o risco para esta população em estudo, que passa a maior parte do dia, ou até dias consecutivos, no interior destas áreas, não esteja presente. Especialmente porque esta população estudada na sua maioria possui o sistema imunitário debilitado e consequentemente uma maior predisposição para o desenvolvimento de doenças, ao nível do sistema respiratório. Neste sentido é fundamental que os diretores dos lares e respetivos profissionais de saúde que neles colaboram efetuem uma vigilância constante da saúde dos idosos e estejam atentos às eventuais deteriorações das instalações, uma vez que os lares de 3ª idade são, na sua maioria, edifícios antigos e adaptados, propícios a infiltrações de água, com consequente aumento da presença de microrganismos cultiváveis no ar interior.

Apesar dos fungos predominantemente identificados serem *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp., espécies consideradas comuns no ar interior, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger* foram também identificadas, sendo estas potencialmente capazes de produzir micotoxinas que provocam vários efeitos adversos para a saúde.

Para uma melhoria da QAI no que diz respeito aos agentes microbiológicos, o controlo da humidade relativa no interior é essencial, de forma a eliminar/diminuir toda a humidade e bolores existentes nas paredes, tetos e superfícies. O número de ocupantes e os seus hábitos são também aspetos importantes para a proliferação de microrganismos. A ventilação é outro fator crucial, uma vez que possui a capacidade de diluir e remover os poluentes originados no edifício, através da captação e distribuição de ar novo para o interior de um edifício ou de uma área. Não obstante, os sistemas de ventilação requerem um bom programa de manutenção de forma a que a taxa de renovação de ar necessária seja conseguida e mantida. Uma medida efetiva e acessível que melhora a QAI, passa pela abertura de portas e janelas, quando as áreas se encontram vazias, potenciando a renovação do ar.

### \_Financiamento

Este projeto é financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FTC) PTDC/SAU-SAP/116563/2010 e SFRH/BD/72399/2010 e pelo Programa Operacional Fatores de Competitividade (COMPETE) do Quadro de Referência Estratégico Nacional para Portugal 2007-2013.

### Referências bibliográficas:

- (1) Caley M, Sidhu K. Estimating the future healthcare costs of an aging population in the UK: expansion of morbidity and the need for preventative care. *J Public Health (Oxf)*. 2011;33(1):117-22. [LINK](#)
- (2) Damiani G, Colosimo SC, Sicuro L, et al. An ecological study on the relationship between supply of beds in long-term care institutions in Italy and potential care needs for the elderly. *BMC Health Serv Res*. 2009;9:174. doi: 10.1186/1472-6963-9-174. [LINK](#)
- (3) Kembel SW, Jones E, Kline J, et al. Architectural design influences the diversity and structure of the built environment microbiome. *ISME J*. 2012;6(8):1469-79. [LINK](#)
- (4) Almeida-Silva M, Wolterbeek HT, Almeida SM. Elderly exposure to indoor air pollutants. *Atmospheric Environment*. 2014; 85: 54-63.
- (5) Hospodsky D, Qian J, Nazaroff WW, et al. Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria. *PLoS One*. 2012;7(4):e34867. doi: 10.1371/journal.pone.0034867. [LINK](#)
- (6) Chao HJ, Schwartz J, Milton DK, et al. Populations and determinants of airborne fungi in large office buildings. *Environ Health Perspect*. 2002;110(8):777-82. [LINK](#)
- (7) National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). Bioaerosol Sampling (Indoor Air) 0800: Culturable organisms bacteria, fungi, thermophilic actinomycetes. In NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). 4th Edition, 1994. [LINK](#)
- (8) European Standards EN 13098:2000 - Workplace atmosphere. Guidelines for measurement of airborne micro-organisms and endotoxin.
- (9) International Organization for Standardization. ISO 4833:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30°C.
- (10) Portaria n.º 353-A/2013 de 4 de dezembro - Regulamento de desempenho energético dos edifícios de comércio e serviços (RECS) requisitos de ventilação e qualidade do ar interior. DR 1.ª série, n.º 235:6644-(2)-(9). [LINK](#)
- (11) Tang JW. The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J R Soc Interface*. 2009;6(Suppl 6):S737-46. [LINK](#)



## Perfil de minerais e elementos vestigiais em néctares e sumos de fruta: uma contribuição para o estudo de dieta total

Dina Sardinha<sup>1</sup>, Sandra Gueifão<sup>2</sup>, Inês Coelho<sup>2</sup>  
Ana Cláudia Nascimento<sup>2</sup>, Isabel Castanheira<sup>2</sup>

isabel.castanheira@insa.min-saude.pt

(1) Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.

(2) Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

### Introdução

Os estudos de dieta total (TDS) complementam os estudos de monitorização e vigilância na avaliação do aporte nutricional e na ingestão de contaminantes. Os TDS têm um impacto muito relevante em saúde pública, em virtude de promoverem e evidenciarem junto da opinião pública e também dos legisladores a presença de contaminantes nos alimentos como consumidos (1, 2).

É neste sentido que relatórios da *European Food Safety Authority* (EFSA) recomendam metodologias de amostragem e procedimentos analíticos que evidenciem resultados fiáveis e reprodutíveis. Estas recomendações surgem pela necessidade de comparar resultados analíticos nacionais obtidos em anos diferentes e também quando é necessário relacionar os dados nacionais, entre países a nível europeu ou mesmo mundial. Estas análises críticas comparativas são feitas tanto na análise de ocorrência e caracterização, como nos estudos de ponderação sobre o risco e benefício associado ao consumo de cada bebida ou de cada alimento, bem como nos estudos de avaliação de risco.

Os estudos de dieta total, com resultados fiáveis, são orientados por metodologias de amostragem e seleção de alimentos representativos do consumo e da forma como estes são consumidos no país em questão.

Os sumos de fruta em garrafa e em lata são, depois da água, o grupo de bebidas mais consumido em Portugal, tendo o seu consumo aumentado exponencialmente nos últimos vinte anos. Esta tendência é semelhante à que ocorre nos restantes países da União Europeia.

Em virtude deste aumento, os sumos de fruta passaram a constituir um grupo específico na lista de alimentos a analisar nos estudos de dieta total.

### Objetivo

Este trabalho tem como objetivo analisar o perfil de nutrientes e contaminantes inorgânicos, existentes em sumos e néctares consumidos em Portugal. São aplicadas metodologias de amostragem e de análise balizadas nos procedimentos já desenvolvidos no projeto europeu "Total Diet Studies Exposure" (3).

### Materiais e métodos

Foram analisadas 26 amostras de sumos e néctares consumidos em Portugal e representativos do mercado nacional. As amostras, adquiridas em maio de 2014 na região de Lisboa, foram recolhidas aleatoriamente em supermercados de implementação nacional.

O perfil de minerais habitualmente em maior concentração – Cálcio, Ferro, Fósforo, Magnésio, Potássio e Sódio – foi determinado por espectrometria de emissão atômica acoplada com plasma indutivo (ICP-OES). O grupo dos elementos em concentrações vestigiais – que compreende alguns nutrientes – Cobre, Manganês, Cobalto, Selénio e Zinco – e os contaminantes vulgarmente designados por metais pesados – Arsénio, Cádmio, Crómio e Chumbo – foram analisados por espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplada (ICP-MS) (4). A pesquisa de arsénio inorgânico foi efetuada pela técnica hifenada de HPLC-ICP-MS.

A análise dos 19 elementos foi precedida por uma digestão por micro-ondas, em vaso fechado, em meio ácido, por forma a destruir a matéria orgânica presente nas amostras. Os resultados foram obtidos em condições de garantia da qualidade, estando os ensaios para os elementos acreditados pela Norma NP EN ISO/IEC 17025 (5). No que respeita à identificação das espécies as amostras foram diluídas e filtradas antes de serem introduzidas no sistema HPLC-ICP-MS. Por forma a garantir que não ocorreu interconversão entre espécies durante o ensaio, foram adicionados às amostras volumes individuais de soluções padrão de arsenobetaina (AsB),

artigos breves\_ n. 11

dimetilarsénico (DMA), arsenito (As III) e de arseniato (As V). Nos ensaios de especiação o valor da recuperação de cada uma das espécies de arsénio foi utilizado como critério de aceitação da qualidade analítica, destes ensaios.

Cada unidade recolhida foi analisada em triplicado e os resultados expressos em mg.100 mL<sup>-1</sup> de bebida ou µg.L<sup>-1</sup> de bebida tratando-se de análise por ICP-OES ou por ICP-MS e HPLC-ICP-MS, respetivamente.

### Resultados

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia analítica harmonizada com os procedimentos europeus de determinação e quantificação de metais e metalóides e das espécies de arsénio em sumos e néctares.

Na **Tabela 1** são apresentados alguns dos resultados obtidos para os elementos vestigiais. No grupo dos contaminantes o Cádmio é o que ocorre em menor quantidade, visto todos os valores estarem abaixo do Limite de Quantificação (LQ). Relativamente ao Chumbo apenas o sumo de uva apresenta este elemento numa concentração elevada enquanto todos os outros estão abaixo do LQ. O Crómio foi o metal pesado encontrado em maior quantidade.

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, pois para o Chumbo os valores estão entre 3 – 29 µg de elemento /L de sumo ou néctar, o Cádmio entre 0.5 – 8 µg de elemento /L de sumo ou néctar e para Arsénio entre 5 – 89 µg de elemento /L de sumo ou néctar (6).

Em alguns sumos analisados foi encontrado arsénio acima do limite de quantificação. A subsequente análise de especiação destas amostras revelou que o arsénio inorgânico, na forma de arsenito (As III) e arseniato (As V), é predominante, conforme se mostra nos cromatogramas apresentados nos **Gráficos 1 e 2**.

No **Gráfico 3** são apresentados alguns dos resultados obtidos para os minerais. Verifica-se que nos sumos em análise o fósforo é o mineral em maior quantidade. O sumo de uva apresenta-se como o mais pobre nos 4 minerais estudados.

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura, pois para o Cálcio os valores encontram-se entre 1.3 e 18.8 mg/100 mL, para o Magnésio entre 0.1 e 24.7 mg/100 mL, para o Sódio entre 0.4 e 31.9 e para o Potássio entre 0.2 e 201 mg/100 mL (7).

**Tabela 1:** Resultados obtidos na determinação de elementos traço por ICP-MS expressos em µg de elemento /L de sumo ou néctar (n=3; cv ≤ 10 %).

	Cr		Mn		Co		Cu		Zn		As		Cd		Pb	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Sumo laranja	15	1,5	379	9	3,5	0,2	403	6,7	235	24	3,5	0,1	<2	n.a.	<4	n.a.
Sumo de Uva	22	1,9	964	19	23,6	0,8	19	0,8	394	5	2,8	0,2	<2	n.a.	13,0	0,5
Sumo de Maça	7,5	0,7	289	2	19,2	1,2	79	0,2	96	2	2,8	0,2	<2	n.a.	<4	n.a.
Sumo de Pera	15	0,9	376	11	11,4	0,7	514	3,7	750	36	2,0	0,1	<2	n.a.	<4	n.a.
Sumo multifrutos	30	1,5	439	11	2,9	0,1	359	5,7	435	9	2,3	0,1	<2	n.a.	<4	n.a.
Sumo de Ananas	40	2,3	13800	5	5,0	0,2	592	41	882	9	<2	n.a.	<2	n.a.	<4	n.a.
Néctar manga laranja	7,1	0,4	141	3	<2	n.a.	149	4,7	134	3	<2	n.a.	<2	n.a.	<4	n.a.
Néctar laranja	10	0,6	197	15	<2	n.a.	202	17	117	2	<2	n.a.	<2	n.a.	<4	n.a.
Néctar maracujá	n.d.		170	11	2,8	0,3	188	8,4	406	13	<2	n.a.	<2	n.a.	<4	n.a.
Néctar Pêssego	17	0,8	206	4	<2	n.a.	295	7,3	234	3	<2	n.a.	<2	n.a.	<4	n.a.

DP- desvio padrão; n.d. - não determinado; n.a. - não aplicável

artigos breves\_ n. 11

Gráfico 1: Perfil cromatográfico de um padrão de  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  das espécies químicas arsenobetaina (AsB), As (III), dimetilarsénico (DMA) e As (V).

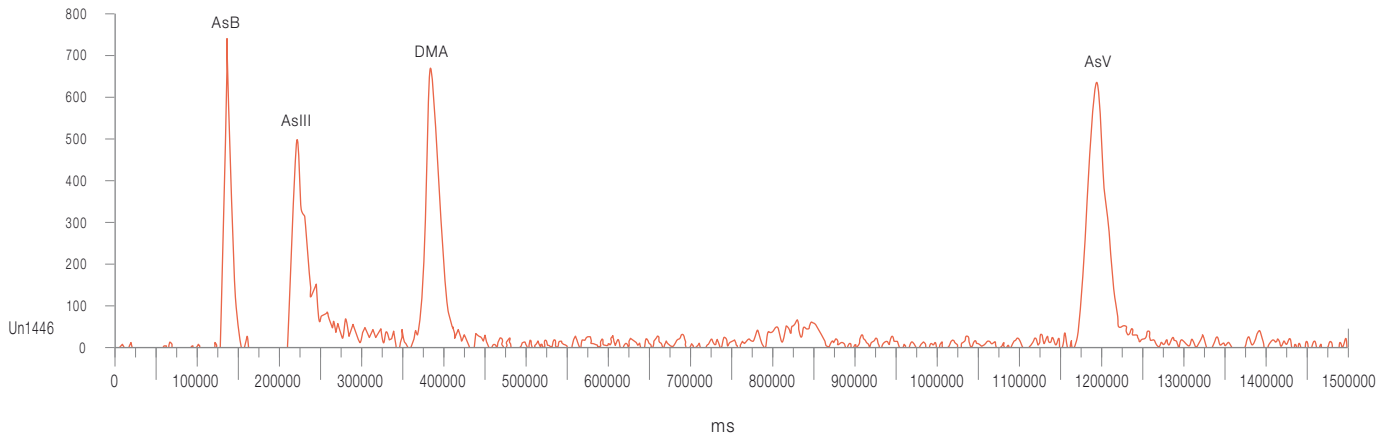


Gráfico 2: Perfil cromatográfico das espécies de arsénio identificadas nas amostras de sumos e néctares, em estudo.

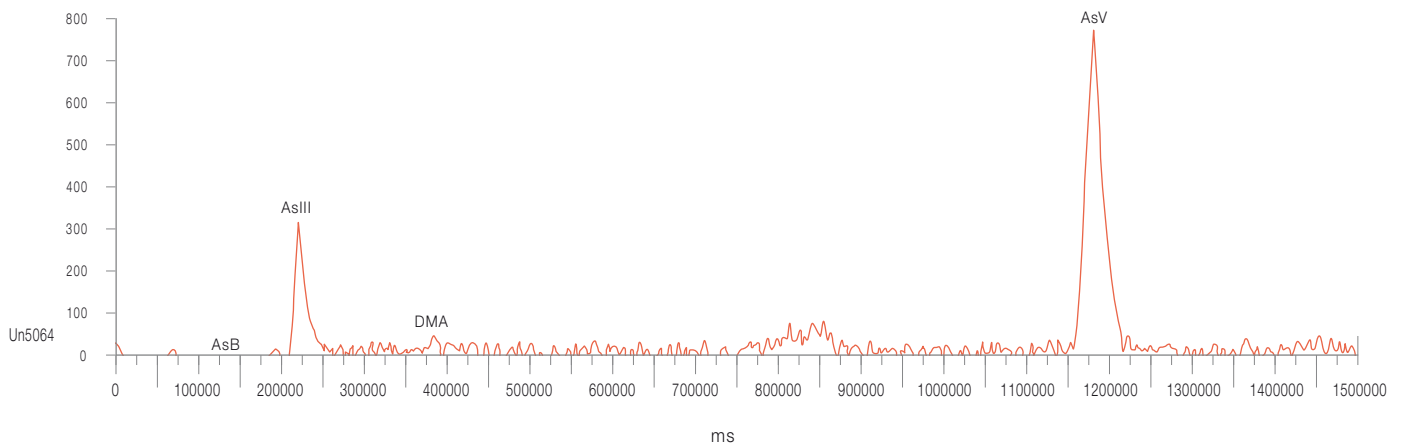
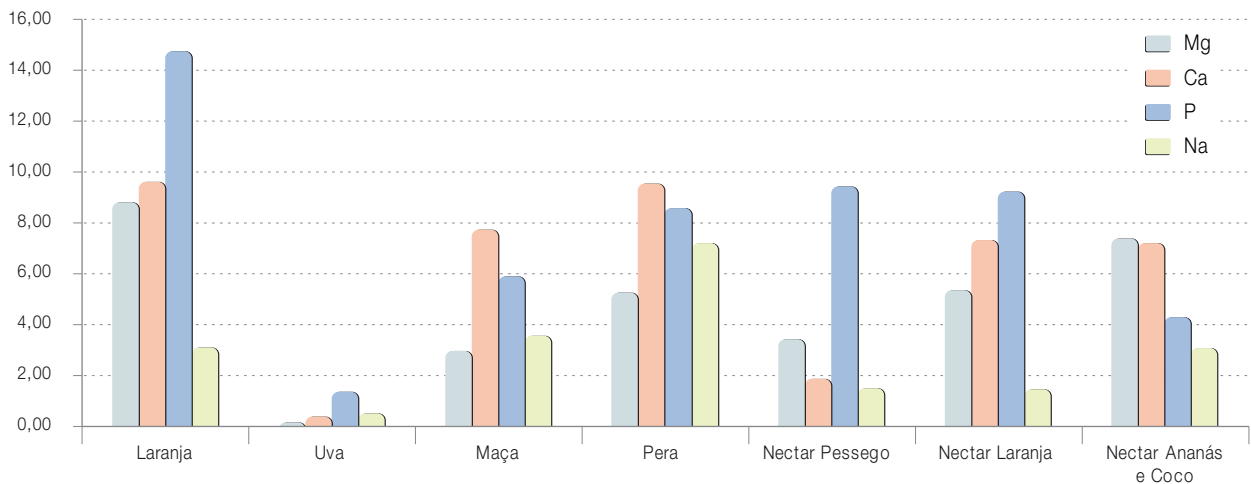


Gráfico 3: Teores de minerais prioritários, analisados por ICP-OES, expressos em mg de elemento /100 mL de sumo ou néctar (n=3; cv ≤ 10 %).





## Discussão e conclusões

A experiência obtida neste trabalho permitirá ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) realizar vigilância e monitorização de contaminantes inorgânicos e das espécies de arsénio com técnicas analíticas que permitem quantificar e detectar estes contaminantes muito abaixo dos limites de deteção atualmente legislados para água de consumo.

Estas metodologias vão permitir obter, futuramente, análises de tendência e de risco de exposição acumulada a contaminantes inorgânicos. As avaliações de risco serão estimadas por cálculos iterativos através da combinação entre os dados de consumo e os valores analíticos, utilizando para os valores analíticos inferiores ao limite de quantificação as duas hipóteses recomendadas pelas metodologias TDS (3): 1) todos os valores iguais ao Limite de Quantificação; 2) todos os valores iguais a zero.

Os resultados de caracterização e ocorrência sugerem que os sumos e néctares podem ser uma fonte de minerais na alimentação diária. No grupo de sumos apresentados os metais e metalóides de toxicidade conhecida encontram-se em valores inferiores aos limites máximos legislados para água destinada ao consumo humano. Porém, não existindo legislação europeia para o arsénio em sumos, a presença deste metaloide e da suas espécies mais tóxicas deve ser objeto de um estudo mais exaustivo que vá permitir esclarecer as origens destas espécies.

Os resultados obtidos, por serem fundamentados em metodologias de amostragem e de análise robustas, são um contributo credível para as decisões dos reguladores e avaliadores de risco nacionais assim como para a Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos, para a Comissão Europeia e para a Organização Mundial de Saúde.

## Referências bibliográficas:

- (1) Welcome to Total Diet Study Exposure/TDS-Exposure [Em linha]. [consult. 1/9/2014]. [LINK](#)
- (2) INSA participa em Projeto Europeu de harmonização de estudos da dieta total (TDS) [Em linha]. [consult. 1/9/2014]. [LINK](#)
- (3) Joint guidance of EFSA, FAO and WHO. Towards a harmonised Total Diet Study approach: a guidance document. EFSA Journal 2011;9(11):2450 [66 pp.]. [LINK](#)
- (4) British Standards Institution. BS EN 15765:2009 – Foodstuffs. Determination of trace elements. Determination of tin by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) after pressure digestion
- (5) Instituto Português da Qualidade. NP EN ISO/IEC 17025 – Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. Lisboa: IPQ, 2005.
- (6) Millour S, Noël L, Kadar A, et al. Pb, Hg, Cd, As, Sb and Al levels in foodstuffs from the 2nd French total diet study. Food Chem. 2011;126(4):1787-99.
- (7) Chekri R, Noël L, Millour S, et al. Calcium, magnesium, sodium and potassium levels in foodstuffs from the second French Total Diet Study. J Food Compos Anal. 2012;25:97-107.



## Guia orientativo para o estabelecimento de porções para a rotulagem nutricional

Roberto Brazão, Sílvia Viegas, M. Graça Dias, Luísa Oliveira

roberto.brazao@insa.min-saude.pt

Unidade de Observação e Vigilância. Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

### Introdução

A obrigatoriedade de apresentação da informação nutricional é um passo importante no que diz respeito à disponibilização de informação mais completa e adequada aos consumidores sobre os géneros alimentícios que consomem.

Neste sentido, a definição da informação nutricional por porção constitui mais um instrumento de grande importância na promoção e proteção da saúde pública.

No entanto, a comparação e escolha por parte do consumidor entre produtos alimentares semelhantes é por vezes difícil, dado que são utilizadas diversas metodologias e critérios para expressar a porção de alimento, para a qual é definido o valor nutricional.

### Objetivos

Contribuir para que a expressão da informação nutricional por porção, disponibilizada voluntariamente nos rótulos dos géneros alimentícios, seja facilmente compreensível, consistente e o mais uniformizada possível, por forma a permitir aos consumidores fazerem escolhas mais conscientes e uma utilização segura dos mesmos. Especificamente: a) criar metodologias uniformizadas para a definição de porção e b) definir porção por grupos de alimentos/alimentos.

### Material e métodos

Este trabalho foi realizado no âmbito do Grupo de Trabalho Porções (GTP), do Programa PortFIR - Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar (1).

O GTP, com 42 membros da Indústria, Distribuição, Universidades e Institutos Públicos, desenvolveu, entre abril de 2013 e julho de 2014, um guia onde são definidas um conjunto de orientações com vista a uniformizar a indicação da porção como unidade para a apresentação voluntária da informação nutricional nos rótulos dos géneros alimentícios.

Para tal definiram-se porções para alguns produtos/categorias de produtos em estudo, com base em: dados de Estados-Membros, dados de representantes/associações europeias dos mais diversos setores da indústria alimentar e dados bibliográficos, bem como, informações fornecidas pelos próprios membros do GTP, que resultam do trabalho e experiência adquirida nos seus setores de atividade.

### Resultados e discussão

Foi publicado, em julho de 2014, o *Guia Orientativo para o Estabelecimento de Porções para a Rotulagem Nutricional* (2), onde são apresentadas as porções para determinados grupos de alimentos.

Previamente à definição das referidas porções dos alimentos foi necessário definir alguns termos, princípios e pressupostos, nomeadamente:

1. Porção – quantidade média de alimento ou bebida que é expectável de ser consumida por um indivíduo (adulto médio) de uma só vez, ou seja, em uma única ocasião de consumo.

Unidade de consumo – unidade/quantidade de produto que é expectável ser consumida individualmente (adulto médio).

Medida caseira – peso ou volume correspondente a um utensílio comumente utilizado pelo consumidor para medir os alimentos.

2. Na expressão/uniformização da informação nutricional por porção tem-se por base a dose de referência para um adulto médio (8400kJ/2000kcal);

3. A classificação dos géneros alimentícios em Grupos de Alimentos baseou-se no sistema de classificação e descrição FoodEx2, da *European Food Safety Authority* (EFSA) (3) (Figura 1). Foram efetuadas alterações ao referido sistema, onde se incluí a eliminação de determinados géneros alimentícios, por se ter considerado que tinham uma expressão muito reduzida ou quase inexistente em Portugal.

Figura 1:  EFSA - Resumo do Sistema de Classificação e Descrição de Alimentos – FoodEx2.

Sistema de Classificação e Descrição de Alimentos – FoodEx2	
Grupos de Alimentos	
1. Cereais e produtos à base de cereais	11. Gorduras e óleos animais e vegetais
2. Produtos hortícolas e derivados	12. Sumos e néctares de fruta e vegetais
3. Raízes ou tubérculos amiláceos e produtos derivados, plantas sacarinas	13. Água e outras bebidas à base de água
4. Leguminosas, frutos de casca rija, sementes oleaginosas e especiarias	14. Café, cacau, chá e infusões
5. Fruta e produtos da fruta	15. Bebidas alcoólicas
6. Carne e produtos cárneos	16. Produtos alimentares para população jovem
7. Peixe, produtos da pesca, anfíbios, répteis e invertebrados	17. Produtos para dietas não padronizadas, substitutos e suplementos alimentares ou agentes fortificantes
8. Leite e produtos lácteos	18. Pratos compostos
9. Ovos e ovoprodutos	19. Temperos, molhos e condimentos
10. Açúcar, confeitaria e sobremesas doces à base de água (excluindo os edulcorantes intensivos)	20. Aditivos, aromatizantes e auxiliares tecnológicos para panificação

4. A porção deve ser estabelecida tendo por base 3 categorias principais de produtos:

Categoria 1 – géneros alimentícios pré-embalados em embalagens individuais que é expectável serem consumidos por um indivíduo de uma só vez, ou seja, em uma única ocasião de consumo - porção individual (única) = unidade de consumo.

Categoria 2 – géneros alimentícios pré-embalados em embalagens contendo porções múltiplas ou várias unidades, sendo cada porção e/ou unidade de consumo perfeitamente reconhecida - porção pode ser = ou ≠ unidade de consumo.

Categoria 3 – géneros alimentícios pré-embalados em embalagens contendo porções múltiplas (outras situações) - porção ≠ unidade de consumo.

5. De modo a garantir a aplicação uniforme da declaração nutricional por porção é importante que:

i) Para os géneros alimentícios da Categoria 1 a porção correspondente seja a embalagem inteira, mesmo que o seu peso/volume seja maior do que a porção de referência para o produto em causa.

ii) Para os géneros alimentícios da Categoria 2 a porção deve ser, sempre que “admissível”, igual à unidade de consumo individual. Caso não cumpra com esse requisito, então deve ser

adotada a expressão por porção estabelecida da mesma forma que para os géneros alimentícios da Categoria 3.

iii) Para os géneros alimentícios da Categoria 3 a porção deve ser definida por peso ou volume correspondente ao consumo típico/adequado do respetivo produto.

Por decisão do GTP, não foram definidas porções para alguns alimentos, nomeadamente: as especiarias e ervas aromáticas, o açúcar - por estes não serem consumidos como tal, o que torna impossível identificar o seu principal uso, variando muito as correspondentes porções; e a batata processada - devido à enorme diferença existente entre as subcategorias, o que dificultou chegar a acordo sobre uma porção. Nestes casos foi proposto que se considerasse a informação nutricional apenas por 100 g de produto.

De igual modo, não foram definidas porções para os seguintes grupos de alimentos: “Aditivos, aromatizantes e auxiliares tecnológicos para panificação”; “Produtos para dietas não padronizadas, substitutos e suplementos alimentares ou agentes fortificantes”; “Produtos alimentares para população jovem”, “Pratos compostos”; por existir legislação específica ou, no caso dos “Pratos compostos”, devido à enorme diversidade.



## **\_Conclusões**

A publicação do *Guia Orientativo para o Estabelecimento de Porções para a Rotulagem Nutricional*, contribui para a uniformização da expressão da informação nutricional por porção, matéria que ao longo do tempo tem sido geradora de discussões e onde não existia, até ao momento, um consenso e/ou “um padrão” comum no seu estabelecimento.

A informação nutricional por porção constitui um veículo facilitador da compreensão da rotulagem nutricional pelos consumidores e é um meio eficaz para proporcionar uma base uniforme de comparação entre géneros alimentícios do mesmo tipo, podendo orientar os consumidores a fazer escolhas alimentares mais informadas bem como a realizar um consumo mais adequado e salutar.

As informações contidas no Guia servirão de suporte principalmente ao setor da produção alimentar, mas também à distribuição, saúde e investigação/ensino, sendo que todos os valores apresentados são meramente orientativos, ou seja não têm um carácter obrigatório para os agentes envolvidos; no entanto são estabelecidos, sempre que possível, com base em padrões de consumo nacionais.

## **Referências bibliográficas:**

- (1) Grupo de Trabalho Porções. Programa PortFIR - Plataforma Portuguesa de Informação Alimentar [Em linha]. [consult. 18/9/2014]. [LINK](#)
- (2) Guia orientativo para o estabelecimento de porções para a rotulagem nutricional [Em linha]. Lisboa: Instituto Nacional de saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014. [LINK](#)
- (3) European Food Safety Authority. Food classification and description system FoodEx 2 [Em linha]. [consult. 18/9/2014]. [LINK](#)



notícia\_

## Novas moléculas identificadas em doença parasitária estão relacionadas com cancro e infertilidade

Uma equipa de investigação do Departamento de Promoção da Saúde e Doenças Não Transmissíveis do INSA, no Porto em colaboração com cientistas americanos e angolanos, descobriram moléculas do metabolismo dos estrógenos na urina de doentes com schistosomose que podem agora vir a ser usados para prever o risco de complicações desta doença. Porque é que isto é importante? Porque a schistosomose é uma doença parasitária que infeta 243 milhões de pessoas em todo o mundo matando por ano cerca de 200 mil (dados da OMS). No terceiro mundo, a seguir à malária, é já a doença com maior impacto.

Agravando o problema, esta doença tem como complicações secundárias cancro da bexiga e infertilidade, isto em países onde não só os cuidados médicos são pouco acessíveis, mas onde também o papel das mulheres continua centrado na sua capacidade de ter filhos, os cuidados ginecológicos simplesmente não existem e a discussão dos problemas femininos é ainda tabu.

Esta equipa, que contou com a colaboração do Prof. Mário Sousa (ICBAS) e do Prof. Alberto Barros (FMUP) ambos especialistas na área da infertilidade, descobriu agora que o risco destes problemas secundários é sinalizado pela presença de moléculas na urina, provenientes do metabolismo de estrogénios (catecóis e quinonas). Esta descoberta, se confirmada, abre a porta à possibilidade de se poder usar um simples teste de urina para prever quais os doentes com maior risco de desenvolverem cancro da bexiga e infertilidade de forma a encaminha-los para cuidados médicos urgentes. Isto significaria gastos mínimos para máximos resultados o que em países pobres são sempre boas notícias.

Santos J, Gouveia MJ, Vale N, *et al.* Urinary Estrogen Metabolites and Self-Reported Infertility in Women Infected with *Schistosoma haematobium*. PLoS One. 2014 May 21;9(5):e96774. doi: 10.1371/journal.pone.0096774. <http://hdl.handle.net/10400.18/2309>

Mónica Botelho

[monica.botelho@insa.min-saude.pt](mailto:monica.botelho@insa.min-saude.pt)

Departamento Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA.

ficha técnica\_

**\_Título:** Boletim Epidemiológico Observações

**\_Periodicidade:** Trimestral

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

**\_Numeração:** 2ª série

Volume 3, número 10  
Outubro-dezembro 2014

**\_Diretor**

Fernando de Almeida, Presidente do INSA

**\_Editores**

Carlos Matias Dias, Departamento de Epidemiologia  
Elvira Silvestre, Biblioteca da Saúde

**\_Conselho Editorial Científico**

Carlos Matias Dias, Departamento de Epidemiologia  
Cláudia Niza, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis  
Manuela Cano, Departamento de Saúde Ambiental  
Jorge Machado, Departamento de Doenças Infeciosas  
Manuela Caniça, Conselho Científico do INSA  
Peter Jordan, Departamento de Genética Humana  
Silvia Viegas, Departamento de Alimentação e Nutrição

**\_Revisão científica**

Cristina Furtado, Jorge Machado, Doenças Infeciosas | Manuela Cano, Saúde Ambiental | Maria Antónia Calhau, Alimentação e Nutrição | Peter Jordan, Genética Humana | Teresa Contreiras, Cláudia Niza, Doenças Não Transmissíveis

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

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

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2014.

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

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

Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge  
Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa, Portugal

Tel.: (+351) 217 519 200

Fax: (+351) 217 529 400

E-mail: [info@insa.min-saude.pt](mailto:info@insa.min-saude.pt)

[www.insa.pt](http://www.insa.pt)