



# Observações

## Boletim Epidemiológico

### sumário\_

#### \_Editorial

**Doenças transmitidas por vectores em Portugal** p03  
*Vector-borne diseases in Portugal*

*Maria João Alves, Investigadora e responsável do REVIVE*

#### \_Artigos breves

##### \_Doenças infecciosas

**1\_ REVIVE 2023 e riscos para a saúde pública em Portugal: vigilância de carraças e agentes patogénicos transmitidos a humanos** p04

*REVIVE 2023 and risks to public health in Portugal: surveillance of ticks and pathogens transmitted to humans*

*Isabel Lopes de Carvalho, Rita de Sousa, Teresa Luz, Paulo Parreira, Maria Salomé Gomes, Patrícia Soares, Líbia Zé-Zé, Hugo Costa Osório, Maria João Alves, Ana Sofia Santos; Equipa REVIVE, Maria Sofia Núncio*

**2\_ Caracterização genómica de *Salmonella* Newport: identificação de clusters genéticos, janeiro 1991-maio 2024** p10  
*Genomic characterization of Salmonella Newport: identification of genetic clusters, January 1991-May 2024*

*Raquel Caeiro, Alexandra Tomás, Ana Margarida Henriques, Angela Pista, Leonor Silveira*

**3\_ Aumento de casos de *Salmonella* Typhimurium em 2024: caracterização fenotípica e genotípica dos isolados** p16  
*Increase in Salmonella Typhimurium cases in 2024: phenotypic and genotypic characterization of isolates*

*Alexandra Tomás, Ana Margarida Henriques, Raquel Caeiro, Angela Pista, Leonor Silveira*

**4\_ Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Salmonella* Typhi e Paratyphi em Portugal, entre janeiro de 1994 e maio de 2024** p21

*Phenotypic and genotypic characterization of Salmonella Typhi and Paratyphi isolates in Portugal, between January 1994 and May 2024*

*Ana Margarida Henriques, Raquel Caeiro, Alexandra Tomás, Leonor Silveira, Angela Pista*

**5\_ Vigilância epidemiológica de infeções respiratórias: um estudo-piloto da adaptação Programa Nacional de Vigilância da Gripe e outros Vírus Respiratórios na rápida deteção de surtos de origem animal** p29

*Epidemiological Surveillance of Respiratory Infections: a pilot study of the adaptation of the National Surveillance Program for Influenza and other Respiratory Viruses in the rapid detection of zoonotic outbreaks*

*Verónica Gómez, Raquel Guiomar, Ausenda Machado, Ana Paula Rodrigues*

##### \_Doenças genéticas

**6\_ Mucopolissacaridose em população pediátrica: resultados de uma abordagem de precoce no âmbito do projeto FIND** p33  
*Mucopolysaccharidosis in the pediatric population: results of an early diagnosis approach in the scope of the FIND project*

*Paulo Gaspar, Raquel Neiva, Lisbeth Silva, Luísa Diogo, Ana Cristina Ferreira, Ana M Miranda, Diana Antunes, Pedro Louro, Sara Ribeiro, Sara Oliveira, Paula Garcia, Esmeralda Rodrigues, Teresa Campos, Carmen Silva, Patricia Janeiro, Sérgio Sousa, Altina Lopes, Célia Nogueira, Cristina Pereira, Sandra Alves, Elisa Leão Teles, Laura Vilarinho*

##### \_Saúde Ambiental

**7\_ Lagos ornamentais como reservatórios de microrganismos resistentes a antimicrobianos** p39  
*Ornamental lakes as potential reservoirs for microorganisms resistant to antimicrobial agents*

*João Rodrigues, Rui Matias, Luísa Jordão*





# Observações

## Boletim Epidemiológico

### \_Alimentação e Nutrição

- 8\_ Associação entre os fatores socioeconómicos da família, o excesso de peso e a perceção do consumo de refrigerantes, snacks doces e salgados de crianças em idade escolar durante a pandemia da COVID-19** p46

*Association between family socioeconomic factors, overweight and perceived consumption of soft drinks, sweet and savoury snacks among schoolchildren during the COVID-19 pandemic*

*Inês Figueira, Ana Rito*

- 9\_ Monitorização da composição nutricional de bebidas (refrigerantes e leites aromatizados) disponíveis no mercado português em 2024: a redução de açúcar e a presença de edulcorantes?** p55

*Monitoring the nutritional composition of drinks (soft drinks and flavored milks) available on the Portuguese market in 2024: the reduction in sugar and the presence in sweeteners?*

*Andreia Lopes, Paulo Fernandes, Roberto Brazão, M. Graça Dias*

- 10\_ Monitorização da ingestão de aditivos alimentares: ferramentas de avaliação do consumo e da ingestão** p60

*Monitoring the intake of food additives: consumption and intake assessment tools*

*Inês Nunes, Elsa Vasco*

editorial\_

## Doenças transmitidas por vectores em Portugal

### Vector-borne diseases in Portugal

As doenças transmitidas por vectores (DTV) representam uma ameaça global significativa. Segundo a Organização Mundial de Saúde, as DTV representam 17% de todas as doenças infecciosas, causando mais de 700 000 mortes por ano em todo o Mundo.

Enquanto que nos trópicos e subtropicais os mosquitos encontram-se entre os vectores responsáveis por patologias com milhares de casos de infeção por ano, como por exemplo a malária, febre amarela, dengue entre outras, na Europa são os ixodídeos os vetores que apresentam maior relevo.

Na Europa, a DTV mais prevalente é a Encefalite Transmitida por Carraças (na sigla em inglês TBE, *Tick-borne Encephalitis*). O vírus da TBE é um flavivírus transmitido por carraças do género *Ixodes*, sobretudo *Ixodes ricinus*, e provoca anualmente cerca de 3000 infeções confirmadas.

Em Portugal, apesar do vector estar presente, nunca foram notificados casos autóctones de TBE nem identificadas carraças positivas para este vírus em pesquisas sistemáticas realizadas desde 1987 pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

No nosso país são, sem dúvida, importantes e de notificação obrigatória, a Febre Escarlatina ou Febre da Carraça, transmitida pela carraça comum do cão - *Rhipicephalus sanguineus*, a DTV com maior casuística, e a Borreliose de Lyme, transmitida pela carraça também vectora de TBE - *Ixodes ricinus*. Raras, e também de notificação obrigatória, são a tularémia e a Febre Hemorrágica Crimeia-Congo.

A vigilância de vectores é essencial para conhecer as espécies presentes, a sua distribuição e abundância, bem como para esclarecer o seu papel na transmissão de agentes de doença.

No âmbito do programa REVIVE (Rede de Vigilância de Vectores) é realizada a vigilância de carraças, a nível nacional, desde 2011. As carraças podem ser recolhidas na fase de vida livre ou parasitária em vários estádios. As carraças recolhidas a parasitar seres humanos são as mais importantes em termos de saúde pública, uma vez que a sua tendência antropofílica se traduz num maior potencial para a transmissão de agentes infecciosos.

No artigo publicado neste número do Boletim – *REVIVE 2023 e riscos para a saúde pública em Portugal: vigilância de carraças e agentes patogénicos transmitidos a humanos* – evidenciam-se os resultados e a importância desta vigilância.

A vigilância sistemática da atividade de artrópodes hematófagos permite a obtenção de conhecimento sobre a diversidade de espécies e abundância, o que é indispensável para se adotarem medidas de controlo das populações de vetores de importantes agentes patogénicos.

Por último, é importante o conhecimento de que a maior parte das DTV são preveníveis com a adoção de medidas de proteção individual, de planos/estratégias de educação para saúde e de mobilização da comunidade.

A informação da vigilância nacional e a resposta atempada por parte das autoridades de saúde pública podem mitigar as doenças transmitidas por carraças em Portugal.

### Maria João Alves

Investigadora e responsável do REVIVE  
Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas  
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

## \_REVIVE 2023 e riscos para a saúde pública em Portugal: vigilância de carraças e agentes patogénicos transmitidos a humanos

*REVIVE 2023 and risks to public health in Portugal: surveillance of ticks and pathogens transmitted to humans*

Isabel Lopes de Carvalho<sup>1</sup>, Rita de Sousa<sup>1</sup>, Teresa Luz<sup>1</sup>, Paulo Parreira<sup>1</sup>, Maria Salomé Gomes<sup>1</sup>, Patrícia Soares<sup>1</sup>, Líbia Zé-Zé<sup>1</sup>, Hugo Costa Osório<sup>1</sup>, Maria João Alves<sup>1</sup>, Ana Sofia Santos<sup>1</sup>; Equipa REVIVE<sup>2</sup>, Maria Sofia Núncio<sup>1</sup>

isabel.carvalho@insa.min-saude.pt

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

(2) Administrações Regionais de Saúde do Alentejo, Algarve, Lisboa e Vale do Tejo, Centro, Norte e Direção Regional de Saúde da Madeira

### \_Resumo

As carraças são um dos vetores mais importantes de agentes patogénicos para o Homem, com impacto crescente em saúde pública em todo o mundo. Os agentes infecciosos transmitidos por carraças incluem vírus, como o vírus da encefalite transmitida por carraças e da febre hemorrágica Crimeia-Congo, bactérias, tais como os agentes etiológicos da borreliose de Lyme, febre escaro nodular, outras rickettsioses e anaplasmose humana e parasitas protozoários que causam a babesiose. As doenças associadas a carraças estão a emergir e reemergir sendo um dos principais fatores, identificado particularmente no hemisfério norte, o alargamento da distribuição geográfica destes artrópodes que funcionam como vetores. Em Portugal, a vigilância das carraças e dos agentes infecciosos transmitidos é assegurada pela Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE). Neste artigo apresentam-se, de forma resumida, os resultados das carraças colhidas em humanos e dos agentes etiológicos detetados durante o ano de 2023. Nos 430 ixodídeos colhidos em humanos não foram identificadas espécies exóticas. A pesquisa de borrelia, rickettsia e CCHV por métodos moleculares foi efetuada em todos os espécimes de carraça colhidos e identificados, tendo sido observada respetivamente a prevalência anual de 6,7%, 32,8% e 0%. O REVIVE-carraças contribui para o conhecimento da fauna de ixodídeos de Portugal e do seu papel de vetor, representando a componente entomológica indispensável à avaliação do risco de transmissão de doenças potencialmente graves dos programas de vigilância epidemiológica.

### \_Abstract

Ticks are one of the most important vectors of pathogenic agents to humans, with a growing impact on public health worldwide. The infectious agents transmitted by ticks include viruses, such as the tick-borne encephalitis virus and the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, bacteria, such as the causative agents of Lyme borreliosis, Mediterranean spotted fever, other rickettsioses, and human anaplasmosis, and protozoan parasites that cause babesiosis. Tick-borne diseases are emerging and re-emerging, with one of the main factors, particularly identified in the northern hemisphere, being the expansion of the geographical distribution of these arthropod vectors. In Portugal, tick surveillance and monitoring of the infectious agents they transmit are ensured by the Vector Surveillance Network (REVIVE). This article briefly presents the results of ticks collected from humans and the etiological agents detected during the year 2023. No

exotic species were identified among the 430 ticks collected from humans. The analysis for *Borrelia*, *Rickettsia*, and CCHV using molecular methods was carried out on all collected and identified tick specimens, with an annual prevalence of 6.7%, 32.8%, and 0%, respectively. REVIVE-ticks contribute to the knowledge of the ixodid fauna of Portugal and their role as vectors, representing the essential entomological component for assessing the risk of transmission of potentially serious diseases in epidemiological surveillance programs.

### \_Introdução

As carraças, ou ixodídeos (termo taxonómico utilizado por pertencerem à Ordem Ixodida que inclui duas famílias, Ixodidae e Argasidae) são aracnídeos, geralmente de 3 a 5 mm de comprimento. Simultaneamente com os ácaros constituem a subclasse Acari. As carraças são parasitas externos que se alimentam do sangue (hematófagos estritos) de mamíferos, aves, répteis e anfíbios. O seu ciclo de vida depende de fazerem refeições de sangue em organismos vertebrados para se conseguirem manter enquanto parasitas. Estes artrópodes existem há milhões de anos e encontram-se amplamente distribuídos em todo o mundo, especialmente em climas quentes e húmidos. As carraças podem acidentalmente parasitar humanos e, se estiverem infetadas, transmitir agentes infecciosos enquanto efetuam a sua refeição sanguínea (1). As carraças são vetores de vários agentes zoonóticos causadores de doenças no Homem e nos animais com impacto significativo para a saúde e para a economia a nível mundial (2).

Em Portugal, conhecem-se 22 espécies de carraças da família Ixodidae e as doenças mais frequentes causadas por agentes transmitidos por estas são a febre escarar nodular (FEN) e a borreliose de Lyme (BL). A FEN é endémica em Portugal (3) e caracteriza-se clinicamente como uma doença exantemática, com um processo de vasculite generalizado. As manifestações clínicas da FEN caracterizam-se em geral pela tríade clássica de escara de inoculação, febre e, entre o terceiro e quinto dia de evolução da doença, o aparecimento de um exantema maculopapular generalizada, envolvendo as palmas e plantas dos pés. A taxa de incidência desta doença em Portugal é uma das mais altas quando comparada com outros países da bacia do Mediterrâneo. Apesar da maioria dos casos apresentarem evolução benigna, registam-se casos graves e letais. A par da FEN é de salientar a existência de outras rickettsioses já descritas em doentes portugueses causadas pela infeção por *R. sibirica mongolitimonae* (4), *R. slovaca*, *R. raoultii* e *R. monacensis* (5).

No que diz respeito à BL, é uma doença multissistémica que pode afetar vários tecidos ou órgãos. Trata-se de uma doença evolutiva que na fase inicial caracteriza-se pelo aparecimento de uma lesão na pele, designada como eritema migratório. Nas fases seguintes outros órgãos podem ser afetados e causar lesões ao nível articular (artrite de Lyme), neurológico (neuroborreliose) ou dermatológico (acrodermatite crónica atroficante). Atualmente encontram-se descritas mais de 21 genoespécies do complexo *B. burgdorferi* s.l. em todo o mundo, sendo que em Portugal já foram detetadas seis. A mais prevalente é sem dúvida *B. lusitaniae* isolada pela primeira vez em 1992 no Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (CEVDI/INSA), a partir de *I. ricinus* colhidos em Águas de Moura (6). Alguns estudos demonstraram que esta espécie é patogénica para o Homem (7,8).

A febre hemorrágica Crimeia-Congo (CCHF) é uma zoonose causada por um vírus pertencente ao género *Orthonairovirus*. O vírus da CCHF é transmitido por picada de carraças (sobretudo do género *Hyalomma*) ou por contato com sangue

ou tecidos de animais ou pacientes infetados. Têm sido cada vez mais descritos casos esporádicos de CCHF, alguns associados a surtos hospitalares. A infeção pelo CCHFV é assintomática em animais infetados, mas pode evoluir para doença grave em humanos, com taxas de letalidade elevadas de até 50% observadas em alguns surtos (9). O período de incubação é tipicamente de três a sete dias, dependendo da via de infeção, e caracteriza-se por início súbito de febre, mialgias e cefaleias, que podem evoluir para um quadro hemorrágico grave (10).

Em Portugal foram apenas identificados dois casos positivos, autóctones, por serologia para CCHFV em 1985 em Cuba, no Alentejo (11). No entanto, a ampla distribuição e abundância dos vetores, a presença de hospedeiros, o clima e ecologia favoráveis têm levado à emergência de CCHF (12). Em Espanha, foram identificados pela primeira vez *Hyalomma lusitanicum* e *H. marginatum* infetados em 2010, próximo da fronteira com Portugal. Desde aí, entre 2016 e 2022, foram confirmados 10 casos humanos (destes, quatro letais e um classificado como infeção nosocomial) (12).

A emergência ou reemergência da CCHF representa uma séria ameaça à saúde pública uma vez que é altamente contagiosa e potencialmente letal, tem o potencial de causar infeção nosocomial, e é difícil de prevenir, tratar e controlar, sendo, assim, essencial a vigilância da presença do vírus no vetor. A deteção de carraças infetadas com o vírus da CCHF em Espanha, perto da fronteira portuguesa, levou à inclusão do rastreio deste vírus no programa de vigilância REVIVE desde 2016. Em agosto de 2024 foi confirmado laboratorialmente o primeiro caso fatal de febre hemorrágica Crimeia-Congo em Portugal (dados não publicados).

## \_Objetivo

O objetivo deste estudo consistiu em identificar as espécies de carraças que parasitam o Homem e os agentes infecciosos associados, para determinação das espécies que estão presentes em Portugal e que pode levar à ocorrência de surtos de doença na população humana.

## \_Material e métodos

A vigilância de carraças está ativa ao longo do ano, na fase de vida livre (sobre a vegetação) e na sua fase parasitária (sobre o hospedeiro). Neste estudo, a colheita e remoção de carraças foi realizada no Homem, com o auxílio de pinças ou manualmente. O registo da colheita foi submetido eletronicamente, através da plataforma REDCap, pelos técnicos das cinco Administrações Regionais de Saúde e da Direção Regional de Saúde da Madeira. As carraças foram enviadas ao CEVDI/INSA por correio, ou entregues em mão, acondicionadas em tripla embalagem de acordo com o recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o transporte de produtos biológicos.

Os exemplares foram identificados com base em caracteres morfológicos, utilizando chaves taxonómicas ou por análise molecular (nos exemplares de imaturos ou danificados) e separados de acordo com a espécie, género, data e local de colheita. Depois de identificada a espécie e estágio, cada carraça foi processada individualmente para a extração do DNA ou RNA (no caso do CCHFV). A pesquisa de DNA específico de *Rickettsia* e *Borrelia* foi realizada pela técnica de PCR convencional e/ou PCR em tempo real. As amostras positivas foram depois sequenciadas para confirmação e identificação da espécie do agente. A pesquisa do CCHFV foi realizada pela técnica de RT-PCR em tempo real.

## \_Resultados

Durante o ano de 2023, foram removidas de humanos 430 carraças, número muito superior ao registado em 2022, em que só foram removidas 243 carraças (1,13). As carraças foram identificadas como pertencentes a dez espécies, nomeadamente, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma lusitanicum*, *H. marginatum*, *Ixodes ricinus*, *I. ventalloi*, *Rhipicephalus bursa*, *R. pusillus* e *R. sanguineus*. Todas estas espécies já tinham sido assinaladas a parasitar o Homem em Portugal. De sublinhar que na ilha da Madeira, só foram removidos e identificados exemplares da espécie *I. ricinus*. As cinco espécies encontradas com maior frequência no Continente

a parasitar humanos foram *I. ricinus* (n=207, 48,1%), seguida por *R. sanguineus* (n=133, 30,9%), *H. marginatum* (n=38, 8,8%), *D. marginatum* (n=31, 7,2%) e *H. lusitanicum* (n=12, 2,7%). As restantes cinco espécies foram encontradas de forma ocasional, com menos de 1% de prevalência.

O período em que as carraças estão ativas constitui um risco acrescido de contacto com o Homem e, por consequência, para a transmissão de agentes infecciosos. Apesar de ser claro que o esforço de captura não é homogéneo durante todo o ano, os dados colhidos demonstram que duas das espécies de carraças consideradas mais importantes em termos de transmissão de agentes patogénicos em Portugal, *I. ricinus* e *R. sanguineus* estão ativas praticamente durante o ano inteiro. Em contrapartida o género *Hyalomma* demonstra ter um período de atividade mais reduzido, estando ativo sobretudo durante os meses de verão, o que está de acordo com a sua biologia - preferência por habitats quentes e secos (gráfico 1).

No que se refere à pesquisa de agentes infecciosos, nos 15 exemplares do género *Hyalomma* que chegaram vivos ao laboratório (nove *H. lusitanicum* e seis *H. marginatum*) foram negativos para CCHFV.

No caso da pesquisa de *Borrelia*, no total foram detetadas 29 carraças positivas. Em 13 *I. ricinus* foi possível identificar a presença de três espécies de borrelías patogénicas para o Homem, *B. afzelii* (n=1, 3,4%), *B. garinii* (n=1, 3,4%) e *B. lusitaniae* (n=12, 41,3%). Em 16 (55,1%) carraças de várias espécies (*D. marginatum*, *H. lusitanicum*, *H. marginatum*, *I. ricinus* e *R. sanguineus*) não foi possível identificar especificamente a genospecie presente, pelo que ficaram identificados apenas como *Borrelia* spp.

No que diz respeito à pesquisa de *Rickettsia*, registaram-se 141 amostras positivas em cinco espécies de carraças. *I. ricinus* foi a espécie com maior número de exemplares positivos (n=75), seguida de *R. sanguineus* (n=38), *H. marginatum* (n=17), *D. marginatus* (n=10) e *I. ventalloi* (n=1). No total, foram detetadas seis espécies de rickettsias, *R. aeschlimanii* (n=17, 12%), *R. helvetica* (n=29, 20,5%), *R. massiliae* (n=38, 26%), *R. monacensis* (n=47, 33,3%),

artigos breves\_ n. 1

*R. raoultii* (n=4, 3%) e *R. slovacica* (n=6, 4,2%). As espécies de rickettsias detetadas apresentam uma associação à espécie de carraças infetadas (tabela 1) e três delas já foram associadas a casos de doença em Portugal: *R. monacensis* e *R. raoultii* sem denominação de doença e *R. slovacica*, agente responsável de TIBOLA. Neste estudo foram ainda identificadas 14 carraças co-infetadas, nomeadamente, 13 *I. ricinus* e um exemplar de *R. sanguineus*. Nos exemplares de *I. ricinus*, as coinfeções detetadas foram *Borrelia* spp.

e *R. monacensis* (n=3), *B. lusitaniae* e *R. monacensis* (n=6), *B. lusitaniae* e *R. helvetica* (n=1) e *Borrelia* spp. e *R. helvetica* (n=3). Estas coinfeções devem-se à espécie de carraça ser um vetor competente para borrelíias e rickettsias simultaneamente. No exemplar de *R. sanguineus*, foi detetada uma coinfeção com *Borrelia* spp. e *R. massiliae*. Todas estas coinfeções já foram detetadas em anos anteriores e o seu impacto na transmissão ao Homem continua por esclarecer.

Gráfico 1: Atividade mensal das espécies de carraças no âmbito do REVIVE em 2023.

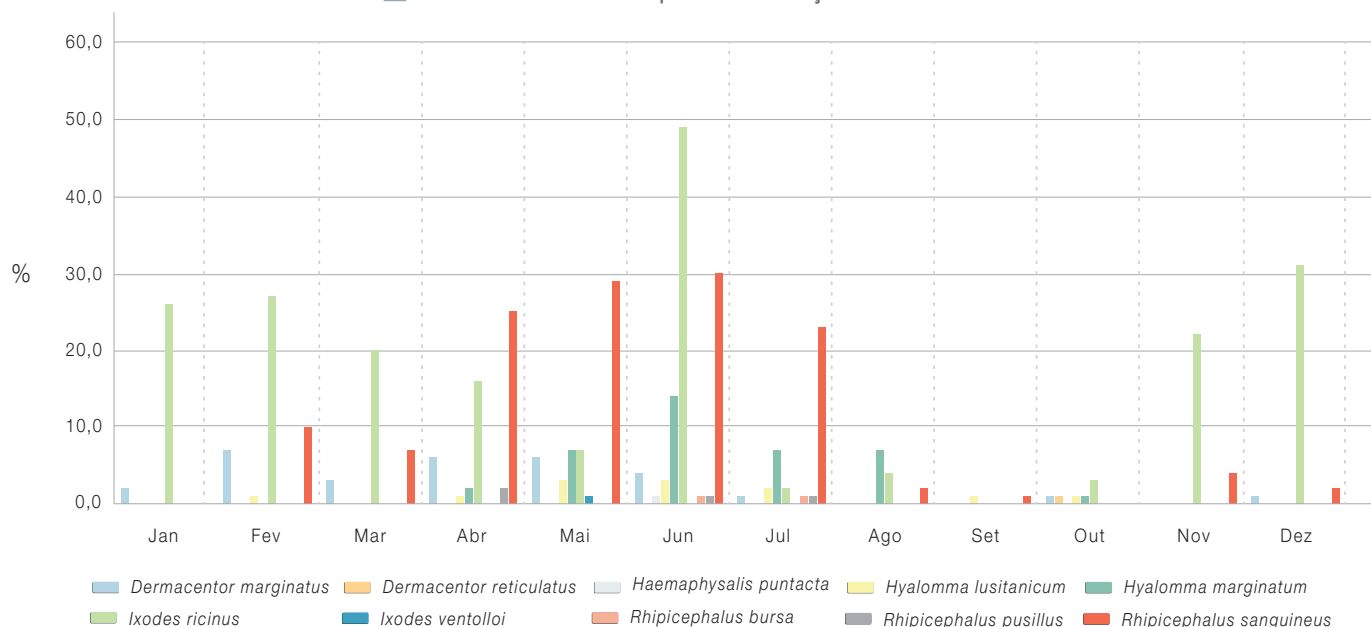


Tabela 1: Espécies de Rickettsia e Borrelia detetadas em ixodídeos colhidos no Homem.

Agentes infecciosos identificados	Espécie de Ixodídeo	Número de positivos
<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	<i>H. marginatum</i>	17
<i>R. helvetica</i>	<i>I. ricinus</i> ; <i>I. ventolloi</i>	29
<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i>	38
<i>R. monacensis</i>	<i>I. ricinus</i>	47
<i>R. raoultii</i>	<i>D. marginatus</i>	4
<i>R. slovacica</i>	<i>D. marginatus</i>	6
<b>Total Rickettsia</b>		<b>141</b>
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>I. ricinus</i>	1
<i>Borrelia garinii</i>	<i>I. ricinus</i>	1
<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	11
<i>Borrelia</i> spp.	<i>D. marginatus</i> ; <i>H. lusitanicum</i> ; <i>H. marginatum</i> ; <i>I. ricinus</i> ; <i>R. sanguineus</i>	16
<b>Total Borrelia</b>		<b>29</b>

## \_Discussão e conclusões

O ano de 2023 correspondeu ao 13º ano do programa REVIVE-carrças. Nestes 13 anos, o número de concelhos onde têm sido realizadas colheitas aumentou de 55 para 169. O número de ixodídeos removidos do Homem e enviados para o laboratório também tem aumentado. Em 2023 foi possível identificar 430 carrças em humanos, todas analisadas para a presença de *Rickettsia* e *Borrelia*. A pesquisa do CCHFV foi feita em 15 exemplares de *Hyalomma* que chegaram vivos ao laboratório, sem que tenha sido detetada a sua presença.

Os géneros de carrças considerados como uma ameaça para a saúde pública, *Hyalomma*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*, dadas as suas capacidades e competências como vetores de agentes patogénicos para o Homem são, como tal, alvo principal do programa REVIVE-Carrças. Espécies destes géneros foram capturadas no Homem, *Hyalomma* sp. sobretudo nos meses de verão e *Ixodes* e *Rhipicephalus* praticamente em todos os meses do ano, confirmando a necessidade de manter o programa ativo durante todo o ano e em todo o território.

Durante muitos anos a FEN foi considerada uma doença sazonal, uma vez que o *R. sanguineus* estava ativo sobretudo nos meses de primavera-verão. Da mesma forma, *I. ricinus* era capturado sobretudo nos meses mais frios, durante o outono e inverno. Os dados do REVIVE indicam que atualmente o padrão de atividade destas duas espécies poderá estar alterado, provavelmente devido a fatores como as alterações climáticas, a ação humana e diferentes modos de exploração agropecuária, à semelhança do que acontece em outros países europeus.

A pesquisa de agentes nos ixodídeos comprovam a infeção com várias espécies de borrélias e rickettsias patogénicas para o Homem. No caso das borrélias, todas as espécies encontradas são agentes etiológicos de uma só doença, a borreliose de Lyme. No caso das rickettsias foram encontradas três espécies de rickettsias patogénicas, mas que não estão envolvidas na etiologia da FEN. Estes resultados estão de acordo com dados prévios que demonstram que,

para além da FEN, existem em Portugal outras rickettsioses associadas a doença no Homem, mas cuja sintomatologia e eco-epidemiologia são completamente diferentes, o que obriga a uma atenção específica por parte dos profissionais de saúde competentes para o seu diagnóstico clínico e confirmação laboratorial (12).

Em 16 exemplares de carrças foi possível detetar a presença de *Borrelia*, mas foi impossível identificar molecularmente a espécie em causa. Este facto pode ser devido à diminuta quantidade de borrélias presentes nas amostras e/ou à presença de uma nova espécie de borrélia, pelo que serão necessários estudos adicionais para esclarecer a situação.

Em Portugal, a doença transmitida por carrças com maior impacto é a FEN, apesar de em 2023 não ter sido detetada a presença de *R. conorii* nos exemplares enviados para o laboratório, continua a ser fundamental a sua monitorização e deteção atempada. Os resultados obtidos confirmam que no nosso País as rickettsioses são as doenças mais frequentes, seguida pela borreliose de Lyme, no que diz respeito aos agentes infecciosos associados a carrças incluídos neste estudo e que atualmente constituem a maior ameaça para a saúde pública em Portugal.

A deteção de mais de um agente infeccioso na mesma carrça levanta questões sobre a possível co-transmissão destes agentes aos seres humanos ou aos animais e as suas consequências para a saúde humana e animal.

Os resultados apresentados realçam o papel que o programa REVIVE-carrças tem na monitorização dos agentes patogénicos que circulam nos ixodídeos e que podem causar doença no Homem, bem como, a importância de identificar atempadamente e sinalizar as áreas geográficas onde se encontram vetores infetados.

Referências bibliográficas:

- (1) Núncio MS, Santos AS, Luz T, et al. REVIVE 2022 Ixodídeos. IN: Relatório REVIVE 2022 - Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Lisboa: INSA, 2023, pp. 33-55. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/8611>
- (2) Alkishi AA, Peterson AT, Samy AM. Climate change influences on the potential geographic distribution of the disease vector tick *Ixodes ricinus*. *PLoS One*. 2017 Dec 5;12(12):e0189092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189092>
- (3) de Sousa R, Nóbrega SD, Bacellar F, et al. Mediterranean spotted fever in Portugal: risk factors for fatal outcome in 105 hospitalized patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Jun;990:285-94. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07378.x>
- (4) de Sousa R, Barata C, Vitorino L, et al. *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. *Emerg Infect Dis*. 2006 Jul;12(7):1103-8. <https://doi.org/10.3201/eid1207.051494>
- (5) de Sousa R, Dos Santos ML, Cruz C, et al. Rare Case of Rickettsiosis Caused by *Rickettsia monacensis*, Portugal, 2021. *Emerg Infect Dis*. 2022 May;28(5):1068-1071. <https://doi.org/10.3201/eid2805.211836>
- (6) Núncio MS, Péter O, Alves MJ, et al. Isolamento e caracterização de borrélias de *Ixodes ricinus* L. em Portugal. *Rev Port Doenç Infec*. 1992;16(3):175-79.
- (7) Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, et al. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):1316-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1316-1318.2004>
- (8) de Carvalho IL, Fonseca JE, Marques JG, et al. Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection. *Clin Rheumatol*. 2008 Dec;27(12):1587-91. <https://doi.org/10.1007/s10067-008-1012-z>
- (9) European Centre for Disease Prevention and Control. Cases of Crimean-Congo haemorrhagic fever infected in the EU/EEA, 2013-present [online]. [consult. 19/09/2024]. <https://www.ecdc.europa.eu/en/crimean-congo-haemorrhagic-fever/surveillance/cases-eu-since-2013>
- (10) Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, et al. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Dec;10(12):1040-55. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01022.x>
- (11) Filipe AR, Calisher CH, Lazuick J. Antibodies to Congo-Crimean haemorrhagic fever, Dhori, Thogoto and Bhanja viruses in southern Portugal. *Acta Virol*. 1985 Jul;29(4):324-28.
- (12) Lorenzo Juanes HM, Carbonell C, Sendra BF, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Spain, 2013-2021. *Emerg Infect Dis*. 2023 Feb;29(2):252-259. <https://doi.org/10.3201/eid2902.220677>
- (13) Lopes de Carvalho I, de Sousa R, Luz T, et al. REVIVE 2023 Ixodídeos. IN: Relatório REVIVE 2023 - Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Lisboa: INSA, 2024, pp. 35-56. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/9172>

## Caracterização genómica de *Salmonella* Newport: identificação de clusters genéticos, janeiro 1991-maio 2024

Genomic characterization of *Salmonella* Newport: identification of genetic clusters, January 1991-May 2024

Raquel Caeiro, Alexandra Tomás, Ana Margarida Henriques, Angela Pista, Leonor Silveira

leonor.silveira@insa.min-saude.pt; angela.pista@insa.min-saude.pt

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

### \_Resumo

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport (S. Newport) é um serotipo pouco frequente na União Europeia. No entanto, devido à sua associação com alguns surtos de origem alimentar, a sua importância não deve ser negligenciada. Em Portugal, os dados sobre a infeção por S. Newport são escassos.

Este estudo teve como principais objetivos caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados clínicos de S. Newport entre 1991 e maio de 2024, e identificar possíveis clusters genéticos.

Após serotipagem, 98 isolados foram submetidos a testes de suscetibilidade aos antibióticos e sequenciação total do genoma.

Apesar da maioria dos isolados estudados (96,9%) terem sido suscetíveis aos antibióticos testados, em 2024 foi identificado um isolado multirresistente, que, entre outros, continha o gene *bla<sub>DHA-1</sub>*. A análise *core genome multilocus sequence typing* (Enterobase cgMLST V2 + HierCC V1), considerando um *threshold* de cinco diferenças alélicas, permitiu identificar oito clusters distintos, dois dos quais de maiores dimensões: o Cluster 1, com 32 isolados de 2019, e o Cluster 2, com quatro isolados de 2022 e 18 de 2023.

Embora S. Newport seja um serotipo pouco frequente em Portugal e não apresentar, na maioria dos casos, resistências aos antibióticos, é essencial manter uma vigilância laboratorial contínua, que permita de forma atempada implementar medidas de prevenção e controlo eficazes.

### \_Abstract

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport (S. Newport) is a relatively uncommon serotype within the European Union. Nevertheless, due to the relevance of some related outbreaks, its significance should not be underestimated. In Portugal, data on S. Newport infection is scarce.

The objectives of this study were to characterise clinical isolates of S. Newport received between January 1991 and May 2024, and to identify potential genetic clusters.

Following serotyping, 98 isolates were subjected to antibiotic susceptibility testing and whole genome sequencing.

Most of the isolates (96.9%) were susceptible to the tested antibiotics. However, a multidrug-resistant isolate was identified in 2024, which contained the *bla<sub>DHA-1</sub>* gene, among others. The core genome multilocus sequence typing analysis (Enterobase cgMLST V2 + HierCC V1), with a threshold of five allelic differences, enabled the identification of eight clusters, two of them considered as major clusters: Cluster 1, comprising

32 isolates from 2019, and Cluster 2 including four isolates from 2022 and 18 from 2023.

Although S. Newport is an uncommon serotype in Portugal and most of the isolates do not exhibit antibiotic resistance, it is essential to maintain a continuous laboratory surveillance programme in order to implement effective prevention and control measures.

### \_Introdução

Salmonelose é a segunda zoonose mais frequente a nível europeu, estando *Salmonella* spp. associada a numerosos surtos de origem alimentar (1). De acordo com os dados mais recentes, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Newport (S. Newport) foi o quinto serotipo mais notificado na União Europeia em 2022 (1,1%; 522/47122) (1).

Conforme evidenciado por diversos estudos, os surtos de infeção por S. Newport têm sido associados ao consumo de queijo de leite cru, fruta, vegetais e marisco cozinhado e congelado, entre outros (2-5).

Apesar dos casos de infeção humana por este serotipo não serem frequentes, o aumento do número de isolados resistentes e multirresistentes aos antibióticos, nomeadamente aos antibióticos considerados de importância crítica (6), constituem um problema de saúde pública a nível mundial (7). Neste contexto, a vigilância laboratorial adquire um papel fundamental na identificação precoce de surtos e isolados multirresistentes.

Em Portugal, os dados disponíveis na literatura sobre a infeção por S. Newport são escassos.

## \_Objetivo

Este trabalho teve como principais objetivos caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados clínicos de *S. Newport*, recebidos no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 1991 e maio de 2024, e identificar possíveis *clusters* genéticos.

## \_Materiais e métodos

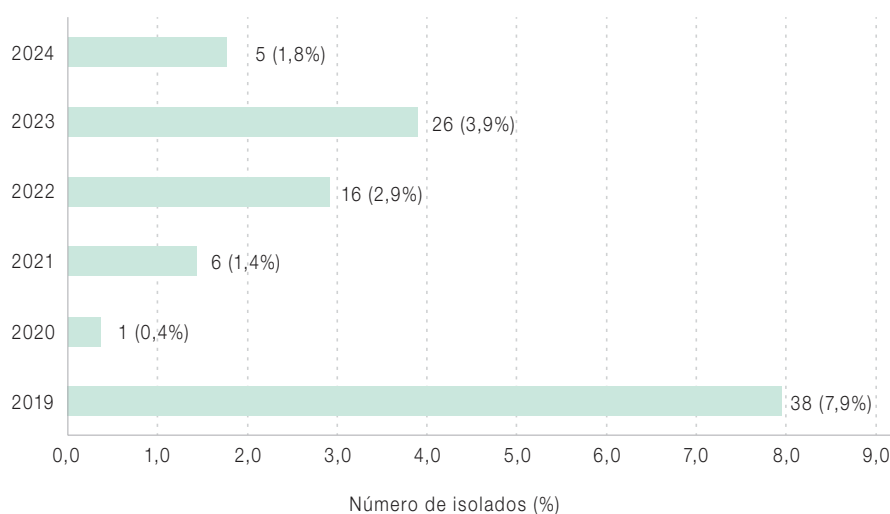
Foram considerados todos os isolados de *Salmonella* spp. recebidos no INSA entre janeiro de 1991 e maio de 2024 e serotipados como *S. Newport*, com base no esquema de *Kauffman-White-Le Minor* (8). A determinação do perfil fenotípico de resistência aos antibióticos foi realizada pelo método de difusão em disco, de acordo com as recomendações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* (9), para um painel de 18 antibióticos: ácido nalidíxico (NAL), 30 µg; amicacina (AKN), 30 µg; amoxicilina+ácido clavulânico (AMC), 30 µg; ampicilina (AMP), 10 µg; azitromicina (AZM), 15 µg; cefepime (FEP), 30 µg; cefotaxima (COX), 5 µg; cefoxitina (FOX), 30 µg; ceftazidima (CAZ), 10 µg, ceftriaxona (CRO), 30 µg; cloranfenicol (CHL), 30 µg; gentamicina (GMN), 10 µg; meropenemo (MEM), 10

µg; pefloxacina (PEF), 5 µg; trimetoprim+sulfametoxazol (SXT), 25 µg; tetraciclina (TET), 30 µg; tigeciclina (TGC), 15 µg; e trimetoprim (TMP), 5 µg. Os isolados foram sujeitos a sequenciação total do genoma (WGS), com recurso à tecnologia Illumina, e a análise genómica foi realizada nas plataformas *Enterobase* (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) e *Center for Genomic Epidemiology* (<https://www.genomicepidemiology.org/services/>).

## \_Resultados

No período em estudo, foram identificados no INSA 128 isolados de *S. Newport*, tendo sido analisados para este trabalho 98 isolados. Destes, 92 pertenciam ao período entre 2019 e maio de 2024 e seis ao período entre 1991 e 2018 (apenas foram recuperados 6 isolados de um total de 36 recebidos neste período) (1991, n=1; 1996, n=1; 1997, n=2; 2005, n=1; 2018, n=1). A distribuição temporal dos casos de salmonelose por *S. Newport* entre 2019-2024 (n=92), encontra-se representada no **gráfico 1**. Como é possível constatar, a distribuição não foi uniforme, tendo havido um maior número de isolados em 2019 (7,9%, 38/478) e 2023 (3,9%, 26/668).

Gráfico 1: ↴ Distribuição temporal dos 92 isolados clínicos de *S. Newport*, recebidos entre janeiro de 2019 e maio de 2024.



A percentagem foi calculada em função do número total de isolados de *Salmonella* recebidos no INSA em cada ano.

Relativamente aos testes de suscetibilidade aos antibióticos (TSA) realizados, 96,9% (95/98) dos isolados de *S. Newport* foram totalmente suscetíveis. No **gráfico 2** estão representados os perfis de resistência identificados (3,1%; 3/98). A resistência à ampicilina foi observada num isolado de 1991 e a resistência à tetraciclina num isolado de 2023, enquanto o perfil de multirresistência (AMP, AMC, TET, FOX, CZD, COX, FEP, SXT) foi identificado num isolado de 2024. Os genes preditivos da resistência fenotípica estão descritos no **gráfico 2B**.

Com o objetivo de avaliar a proximidade genética dos 98 isolados em estudo, recorreu-se a uma análise de *core genome multilocus sequence typing* (*Enterobase cgMLST V2 + HierCC V1*), considerando um *threshold* de cinco diferenças alélicas (HC5). Foram identificados oito *clusters* distintos, dois dos quais de maiores dimensões (*Cluster 1* e *Cluster 2*), como se observa na **figura 1**. O *Cluster 1* integra 32 isolados de 2019 (32,7%; 32/98), enquanto o *Cluster 2* inclui 22 isolados de dois anos diferentes, 2022 (n=4) e 2023 (n=18). Todos os isolados pertencem à sequência tipo (ST) 118.

Considerando-se o HC5 associado ao *Cluster 1* (198011) e ao *Cluster 2* (338382), procedeu-se a uma nova análise de cgMLST, incluindo apenas os isolados destes HC5 disponíveis na plataforma *Enterobase*, de forma a verificar se os *clusters* integravam isolados internacionais. Relativamente ao *Cluster 1*, identificou-se um isolado proveniente de França e um isolado proveniente do Reino Unido (**figura 2**). O círculo de maiores dimensões engloba 11 dos 32 isolados de Portugal e um isolado de França, geneticamente iguais. Os restantes isolados apresentam 1-5 diferenças alélicas entre si.

No que se refere ao *Cluster 2*, foram integrados três isolados internacionais: um de França, um do Reino Unido e o terceiro dos Estados Unidos (**figura 3**). O círculo de maiores dimensões engloba 14 dos 22 isolados de Portugal, o isolado de França e o do Reino Unido, com 0 diferenças alélicas, enquanto os restantes isolados apresentam 1-5 diferenças alélicas entre si.

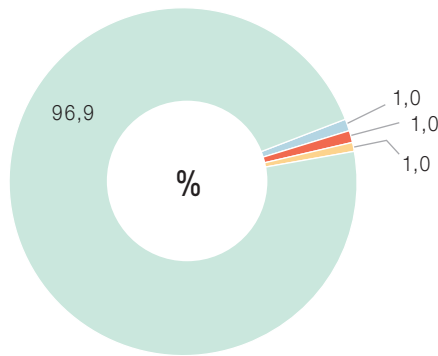
## \_Discussão

Apesar de *S. Newport* ser considerado um serotipo menos frequente na Europa (1), comparativamente a *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Typhimurium* monofásica, tem sido documentada a sua associação a uma diversidade de surtos ligados ao consumo de alimentos contaminados (2,4,5,10). Em Portugal, o número de isolados de *S. Newport* recebidos no INSA entre janeiro de 1991 a maio de 2024, foi também reduzido (1,1%; 134/12461). No entanto, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do número de isolados de *S. Newport* em 2019, o que indiciou a possibilidade de existirem *clusters* genéticos.

A análise fenotípica dos isolados, revelou que 96,9% eram suscetíveis aos antibióticos testados. Este resultado era expectável, uma vez que *S. Newport* está maioritariamente associada a baixas percentagens de resistência aos antibióticos (11). Dos três isolados resistentes (3,1%; 3/98), dois evidenciaram apenas a uma classe de antibióticos, um às penicilinas (ampicilina) e outra à tetraciclina, suportado pela presença dos genes *bla<sub>OXA-1</sub>* e *bla<sub>TEM-1B</sub>*, e *tet(A)*, respetivamente. O outro isolado apresentou um perfil de multirresistência à ampicilina, amoxicilina, cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima, tetraciclina, pefloxacina e trimetoprim+sulfametoxazol, conferido pela presença dos genes *bla<sub>DHA-1</sub>*, *tet(A)*, *qnrB4*, *sul1*, *sul2* e *dfrA12*, respetivamente. Apesar de ter sido identificado num único isolado, de 2024, importa destacar a importância deste último perfil, uma vez que a ocorrência simultânea de genes de resistência aos antibióticos da classe das (fluoro)quinolonas e do gene *bla<sub>DHA-1</sub>*, que codifica uma  $\beta$ -lactamase de espectro alargado (ESBL), é preocupante, dado que as cefalosporinas de 3ª geração e as (fluoro)quinolonas são recomendadas para o tratamento de infeções graves (1,6,11).

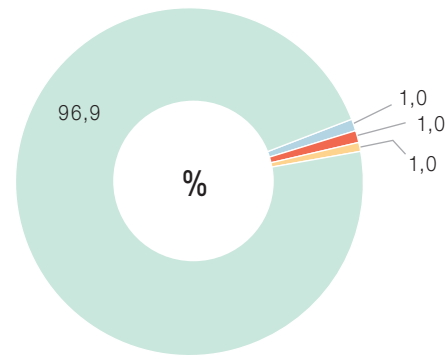
Gráfico 2: Distribuição dos perfis fenotípicos observados nos 98 isolados de *S. Newport* em análise (A) e dos genes de resistência identificados por WGS em quatro isolados (B), no período em estudo.

a) Perfil fenotípico de isolados de *S. Newport* (n=98)



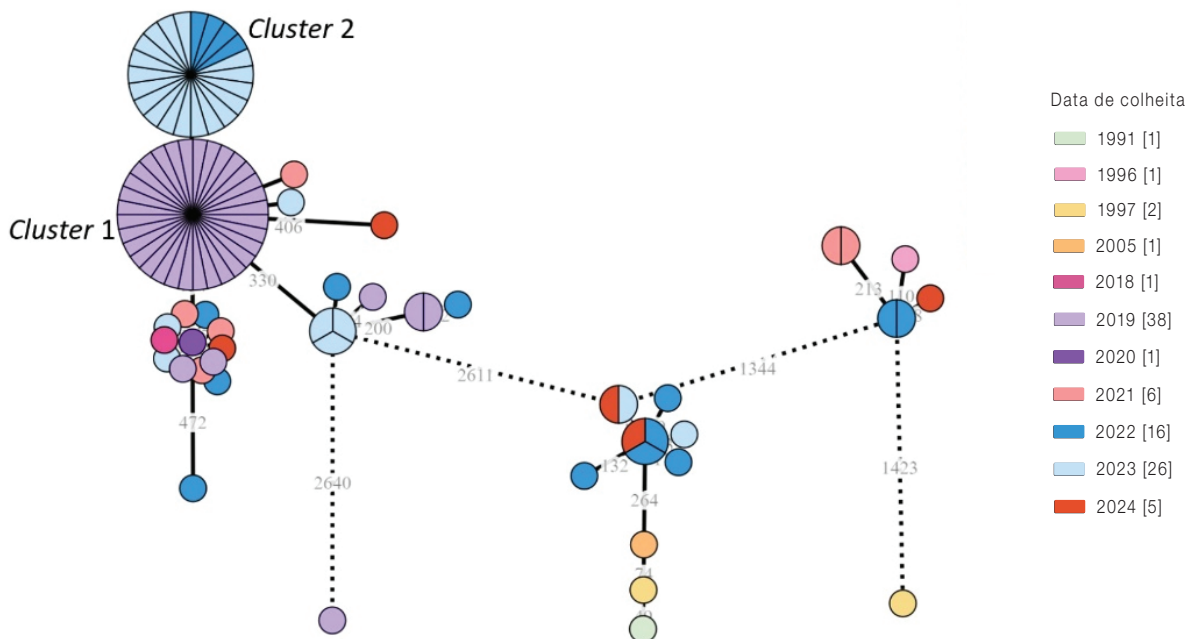
- Sem resistências (n=95)
- AMP (n=1)
- TET (n=1)
- AMP,AMC,TET,FOX,CZD,COX,PEF,SXT (n=1)

b) Genes de resistência de isolados de *S. Newport* (n=98)



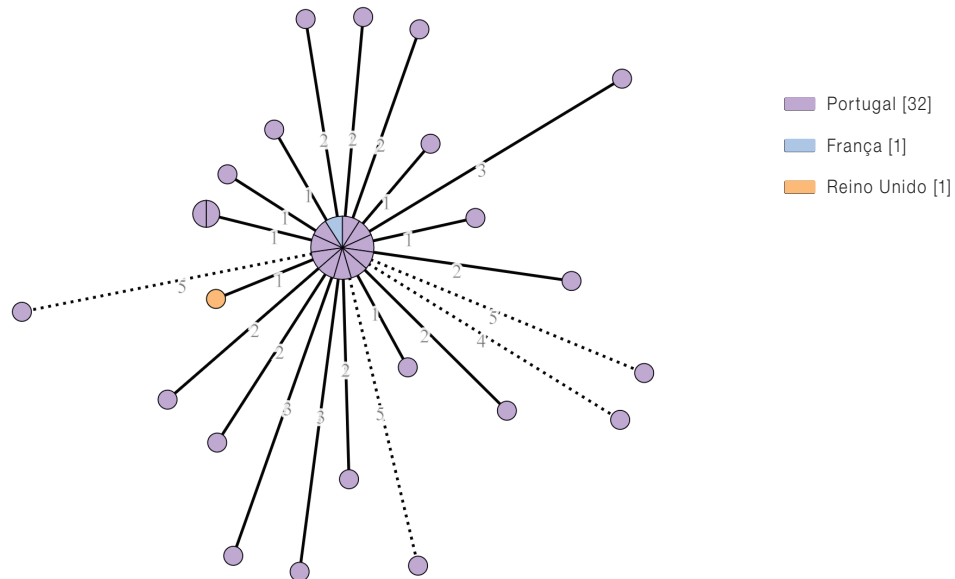
- Sem genes (n=95)
- bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, sul1 (n=1)
- tet(A) (n=1)
- aph(6)-Id, aadA2, aph(3')-Ia, aph(3')-Ib, blaDHA-1, qnrB4, sul1, sul2, tet(A), dfrA12 (n=1)

Figura 1: Análise filogenética (*minimum spanning tree*) de *S. Newport*, baseada no cgMLST dos 98 isolados e utilizando o esquema cgMLST V1 + HierCC V1 com 3002 loci, disponível na plataforma *Enterobase*.



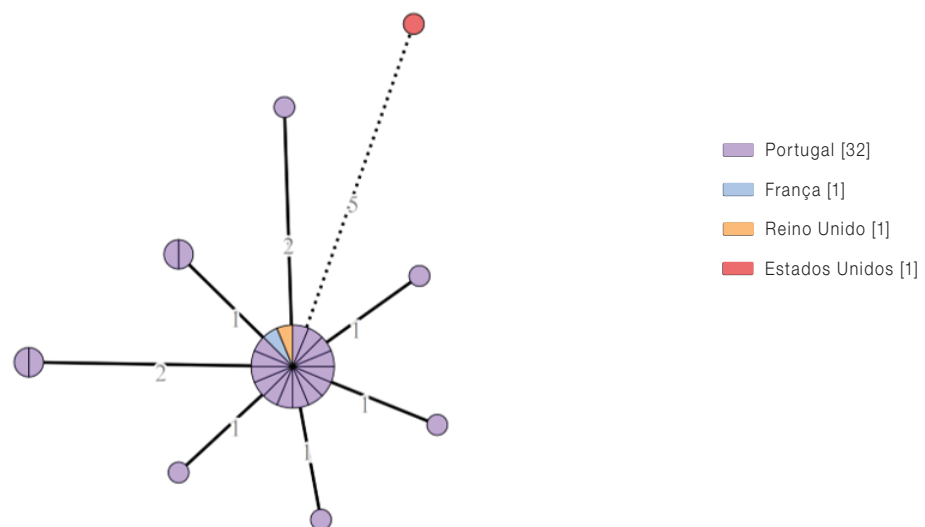
Os números apresentados nos ramos representam as diferenças alélicas entre os isolados. Os *clusters* são formados com  $\leq 5$  diferenças alélicas entre os isolados. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados. As linhas contínuas são proporcionais à distância entre os isolados, enquanto as linhas a tracejado são indicativas de ausência de proporcionalidade na distância entre os isolados, tendo sido efetuada uma redução para distâncias superiores a 1000.

Figura 2: ↓ Análise filogenética (*minimum spanning tree*) baseada no cgMLST de todos os isolados do HC5 198011 disponíveis na plataforma *Enterobase*, utilizando o esquema cgMLST V1 + HierCC V1 com 3002 *loci*.



Os números apresentados nos ramos representam as diferenças alélicas entre os isolados. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados. As linhas contínuas são proporcionais à distância entre os isolados, enquanto as linhas a tracejado são indicativas de ausência de proporcionalidade na distância entre os isolados, tendo sido efetuada uma redução para distâncias superiores a 3.

Figura 3: ↓ Análise filogenética (*minimum spanning tree*) baseada no cgMLST de todos os isolados do HC5 338382 disponíveis na plataforma *Enterobase*, utilizando o esquema cgMLST V1 + HierCC V1 com 3002 *loci*.



Os números apresentados nos ramos representam as diferenças alélicas entre os isolados. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados. As linhas contínuas são proporcionais à distância entre os isolados, enquanto as linhas a tracejado são indicativas de ausência de proporcionalidade na distância entre os isolados, tendo sido efetuada uma redução para distâncias superiores a 3.

Através da análise de cgMLST foi possível identificar vários *clusters* genéticos, nomeadamente dois grandes *clusters*, que também integravam isolados internacionais.

Nos últimos anos, a sequenciação genómica tem desempenhado um papel fundamental na vigilância laboratorial, permitindo identificar precocemente *clusters* genéticos e servindo de base à investigação epidemiológica (12).

### Conclusão

Apesar de a maioria dos isolados de *S. Newport* identificados em Portugal não serem resistentes aos antibióticos, a importância deste serotipo para a saúde pública não deve ser negligenciada, devido à sua potencial ligação a surtos, quer nacionais quer internacionais, de acordo com o evidenciado pela análise genómica realizada no presente estudo.

Destaca-se ainda a existência de estirpes de *S. Newport* produtoras de  $\beta$ -lactamase de espetro alargado em Portugal, o que reforça a necessidade de uma vigilância laboratorial contínua, que permita a monitorização destes isolados e a deteção precoce de surtos.

### Agradecimentos:

Os autores agradecem a colaboração de todos os Serviços de Patologia Clínica e Laboratórios de Análises Clínicas que enviaram isolados ao INSA, no âmbito da vigilância epidemiológica. Agradecem igualmente à Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA, pela realização da sequenciação genómica.

### Referências bibliográficas:

- (1) European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA J.* 2023 Dec 12;21(12):e8442. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- (2) Robinson E, Travanut M, Fabre L, et al. Outbreak of Salmonella Newport associated with internationally distributed raw goats' milk cheese, France, 2018. *Epidemiol Infect.* 2020 May 4;148:e180. <https://doi.org/10.1017/S0950268820000904>
- (3) Byrne L, Fisher I, Peters T, et al. A multi-country outbreak of Salmonella Newport gastroenteritis in Europe associated with watermelon from Brazil, confirmed by whole genome sequencing: October 2011 to January 2012. *Euro Surveill.* 2014 Aug 7;19(31):6-13. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.31.20866>
- (4) Bayer C, Bernard H, Prager R, et al. An outbreak of Salmonella Newport associated with mung bean sprouts in Germany and the Netherlands, October to November 2011. *Euro Surveill.* 2014 Jan 9;19(1):20665. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.1.20665>. Erratum in: *Euro Surveill.* 2013;19(2):pii/20676.
- (5) Jansson Mörk M, Karamehmedovic N, Hansen A, et al. Outbreak of Salmonella Newport linked to imported frozen cooked crayfish in dill brine, Sweden, July to November 2019. *Euro Surveill.* 2022 Jun;27(22):2100918. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.22.2100918>
- (6) World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine, 6th rev. Geneva: WHO, 2019. <https://iris.who.int/handle/10665/312266>
- (7) Pan H, Paudyal N, Li X, et al. Multiple Food-Animal-Borne Route in Transmission of Antibiotic-Resistant Salmonella Newport to Humans. *Front Microbiol.* 2018 Jan 23;9:23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00023>
- (8) Grimont PAD, Weill F-X ; WHO collaborating center for reference and research on Salmonella (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars*. 9th ed. Paris: Institute Pasteur, 2007. [https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng\\_0.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf)
- (9) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Disk Diffusion Test Methodology [online]. [consult. 25/06/2024]. [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology)
- (10) Osimani A, Aquilanti L, Clementi F. Salmonellosis associated with mass catering: a survey of European Union cases over a 15-year period. *Epidemiol Infect.* 2016 Oct;144(14):3000-3012. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001540>
- (11) Centers for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS): Human Isolates Final Report, 2015 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services- CDC, 2018. [https://stacks.cdc.gov/view/cdc/152381/cdc\\_152381\\_DS1.pdf](https://stacks.cdc.gov/view/cdc/152381/cdc_152381_DS1.pdf)
- (12) European Centre for Disease Prevention and Control. Expert opinion on whole genome sequencing for public health surveillance. Stockholm: ECDC, 2016. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/whole-genome-sequencing-for-public-health-surveillance.pdf>

## Aumento de casos de *Salmonella* Typhimurium em 2024: caracterização fenotípica e genotípica dos isolados

Increase in *Salmonella* Typhimurium cases in 2024: phenotypic and genotypic characterization of isolates

Alexandra Tomás, Ana Margarida Henriques, Raquel Caeiro, Angela Pista, Leonor Silveira

leonor.silveira@insa.min-saude.pt; angela.pista@insa.min-saude.pt

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

### \_Resumo

Salmonelose é a segunda zoonose mais frequente a nível mundial. É causada por *Salmonella enterica*, sendo *S. Typhimurium* um dos serotipos mais reportados na União Europeia. Um dos maiores riscos para a saúde pública é a presença de *Salmonella* spp. em alimentos, e consequente associação a surtos que podem atingir uma dimensão transfronteiriça.

Este estudo teve como principal objetivo caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados de *Salmonella* Typhimurium recebidos no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, na sequência do aumento considerável de isolados deste serotipo observado entre abril e maio de 2024.

Foram estudados 83 isolados, dos quais 64 integravam o mesmo cluster genético (77,1%), Cluster 1, identificado por *core genome multilocus sequence typing* (Enterobase cgMLST V2 + HierCC V1). Todos os isolados pertenciam à sequência tipo 19. Foi identificada a presença dos genes de resistência *bla<sub>CARB-2</sub>*, *sul1*, *aadA2*, *aac(6')-Iaa*, *tet(G)* e *floR* em 67 isolados, perfil concordante com o fenótipo encontrado, AMP-AMC-TET-CHL. A análise de cgMLST permitiu ainda identificar quatro isolados europeus que integravam o Cluster 1.

### \_Abstract

Salmonellosis is the second most frequent zoonosis worldwide. It is caused by *Salmonella enterica*, with *S. Typhimurium* being one of the most reported serotypes in the European Union. One of the major public health risks is the presence of *Salmonella* spp. in food, leading to outbreaks that can reach cross-border dimensions.

The main goal of this study was to characterise, phenotypically and genotypically, the *Salmonella* Typhimurium isolates received at the National Reference Laboratory for Gastrointestinal Infections of the National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, due to the considerable increase observed between April and May 2024.

In this work, 83 isolates were studied, of which 64 (77.1%) belonged to the same cluster, Cluster 1, identified by *core genome multilocus sequence typing* (Enterobase cgMLST V2 + HierCC V1). All isolates belonged to sequence type 19. The resistance genes *bla<sub>CARB-2</sub>*, *sul1*, *aadA2*, *aac(6')-Iaa*, *tet(G)* and *floR* were identified in 67 isolates, concordant with the phenotype detected, AMP-AMC-TET-CHL. Subsequent cgMLST analysis identified four isolates from other European countries that were also included in Cluster 1.

### \_Introdução

*Salmonella* spp. é um bacilo Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae* (1). O género *Salmonella* compreende mais de 2600 serotipos, de acordo com o esquema de *Kauffman-White-Le Minor*, e agrupa duas espécies diferentes, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (1). Integrando o grupo de *Salmonella* não tifóide/paratifóide, *S. Typhimurium* é o segundo serotipo mais reportado na União Europeia, com uma percentagem de 11,4% (2).

Salmonelose, tipicamente caracterizada pelo aparecimento de sintomas gastrointestinais, é considerada a segunda zoonose mais frequente a nível mundial (2). É frequentemente associada a surtos de origem alimentar, podendo ser transmitida pelo consumo de alimentos contaminados, como carne de aves, laticínios, ovos, frutas e vegetais, entre outros (3). Adicionalmente, a existência de isolados resistentes a várias classes de antibióticos representa um grave problema para a saúde pública (3). Em Portugal, as resistências à ampicilina (31,3%), sulfametoxazol (52,1%), tetraciclina (27,1%) e à classe das fluoroquinolonas (27,1%) são as mais frequentes nas infeções por *S. Typhimurium*, podendo a percentagem de isolados multirresistentes atingir os 31,3% (4).

A vigilância epidemiológica laboratorial é uma componente essencial para a sinalização precoce de surtos, permitindo a adoção de medidas de prevenção e de controlo pelas autoridades competentes, de forma a minimizar o risco para a saúde pública.

## \_Objetivos

Este estudo tem como objetivo caracterizar fenotípica e genotipicamente isolados de *Salmonella* spp. recebidos no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), e serotipados como *S. Typhimurium*, entre janeiro e maio de 2024.

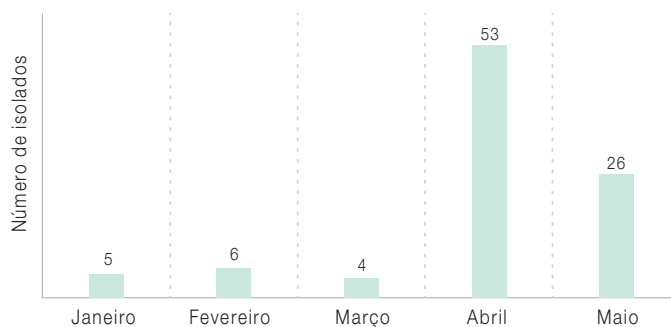
## \_Material e métodos

De um total de 285 isolados recebidos no INSA entre janeiro e maio de 2024, foram selecionados todos os isolados pertencentes ao serotipo *Typhimurium*. A serotipagem foi realizada com base no esquema de *Kauffman-White-Le Minor* (5) e a determinação do perfil de resistências aos antibióticos pelo método de difusão em disco, de acordo com as recomendações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (6). Foi testado um painel de 18 antibióticos: ácido nalidíxico (NAL, 30 µg), amicacina (AKN, 30 µg), amoxicilina+ácido clavulânico (AMC, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), azitromicina (AZM, 15 µg), cefepime (FEP, 30 µg), cefotaxima (COX, 5 µg), cefoxitina (FOX, 30 µg), ceftazidima (CAZ, 10 µg), ceftriaxona (CRO, 30 µg), cloranfenicol (CHL, 30 µg), gentamicina (GMN, 10 µg), meropenemo (MEM, 10 µg), pefloxacina (PEF, 5 µg), trimetoprim+ sulfametoxazol (SXT, 25 µg), tetraciclina (TET, 30 µg), tigeciclina (TGC, 15 µg) e trimetoprim (TMP, 5 µg). Os isolados foram submetidos a sequenciação total do genoma (WGS), utilizando a tecnologia Illumina. A análise genómica foi realizada com recurso às plataformas *Enterobase* (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) e *Center for Genomic Epidemiology* (<https://www.genomicepidemiology.org/services/>).

## \_Resultado

Dos 285 isolados de *Salmonella enterica* recebidos no INSA entre janeiro e maio de 2024, 29,1% (83/285) foram serotipados como *S. Typhimurium*, um número 4,2 vezes superior ao total de isolados de *S. Typhimurium* serotipados no ano de 2023 (6,9%; 46/668). De acordo com o gráfico 1, o maior número de isolados de *S. Typhimurium* foi observado no mês de abril (63,9%; n=53/83), sendo a maioria proveniente de duas regiões do país (Lisboa e Vale do Tejo e Alentejo).

Gráfico 1: Distribuição do número de isolados de *S. Typhimurium* serotipados no INSA, entre janeiro e maio de 2024.

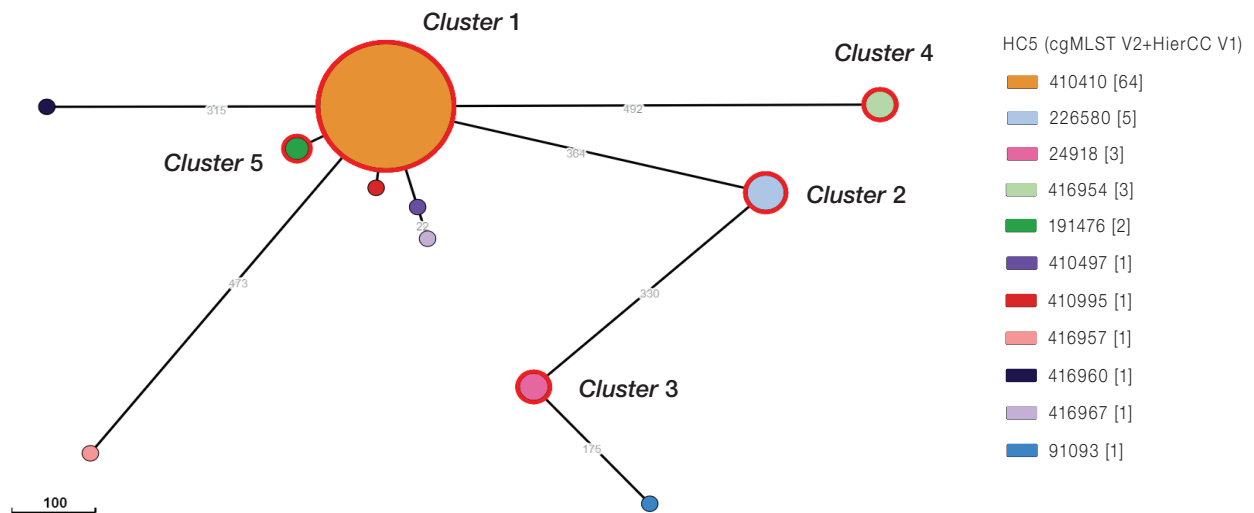


Relativamente aos testes de suscetibilidade aos antibióticos (TSA), 80,7% (67/83) dos isolados de *S. Typhimurium* apresentavam o mesmo perfil de resistência a antibióticos, AMP-AMC-TET-CHL. Nos restantes 16 isolados, 8,4% (7/83) eram suscetíveis, 6,0% (5/83) apresentavam o perfil de resistência AMP-TET-TMP-SXT e 1,2% (1/83), cada, os perfis AMP-AMC-TET-NAL-CHL-PEF, AMP-TMP-SXT, NAL-PEF e PEF.

Com o objetivo de avaliar a proximidade genética dos 83 isolados de *S. Typhimurium* sequenciados, recorreu-se a uma análise de *core genome multilocus sequence typing* (*Enterobase* cgMLST V2 + HierCC V1) considerando-se um *threshold* de cinco diferenças alélicas (HC5), tendo sido identificados cinco *clusters* genéticos.

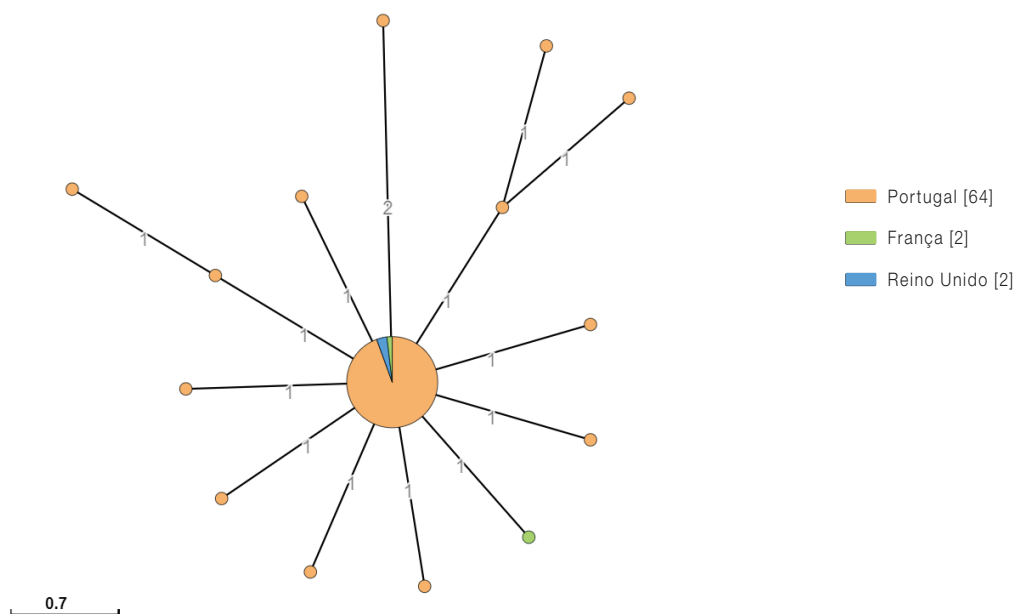
O *Cluster* 1 integra 77,1% (64/83) dos isolados sequenciados, com 0-2 diferenças alélicas, todos pertencentes à sequência tipo (ST) 19 (figura 1). Todos os isolados do *Cluster* 1, apresentam o perfil de resistência AMP-AMC-TET-CHL, tendo sido identificada a presença dos genes *bla<sub>CARB-2</sub>*, *floR*, e *tet(G)*, preditivos deste fenótipo, e ainda a presença dos genes *aac(6<sup>I</sup>)-Iaa* (críptico em *Salmonella* spp.), *aadA2* (estreptomicina) e *sul1* (sulfametoxazol). Este perfil de resistência a antibióticos foi igualmente observado em três outros isolados que não integram o *Cluster* 1.

Figura 1: Análise filogenética (*minimum spanning tree*) de *S. Typhimurium*, baseada no cgMLST de 83 isolados, utilizando o esquema cgMLST V1 + HierCC V1 com 3002 *loci*, disponível na plataforma *Enterobase*.



Os números apresentados nos ramos representam as diferenças alélicas entre os isolados.  
Os *clusters* são formados com  $\leq 5$  diferenças alélicas entre os isolados.  
O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados.

Figura 2: Análise filogenética (*minimum spanning tree*) baseada no cgMLST de todos os isolados do HC5 410410 disponíveis na plataforma *Enterobase*, utilizando o esquema cgMLST V1 + HierCC V1 com 3002 *loci*.



Os números apresentados nos ramos representam as diferenças alélicas entre os isolados.  
O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados.

artigos breves\_ n. 3

Para além do *Cluster 1*, foram identificados quatro *clusters* adicionais, embora de menores dimensões: o *Cluster 2*, que integra cinco isolados, com o perfil de resistência AMP-TET-TMP-SXT; os *Clusters 3 e 4*, com três isolados cada, suscetíveis aos antibióticos testados; e o *Cluster 5*, com dois isolados resistentes a, respetivamente, NAL-PEF e PEF. Os restantes seis isolados não integram nenhum *Cluster*.

Uma vez identificado o *Cluster 1*, pertencente ao HC5 410410, procedeu-se a uma nova análise de cgMLST, desta vez incluindo todos os isolados deste HC5 disponíveis na plataforma *Enterobase*, de forma a verificar se o *Cluster 1* integrava isolados internacionais (figura 2). Esta análise levou à identificação de quatro isolados europeus, dois isolados de França e dois isolados do Reino Unido, todos de 2024. O círculo de maiores dimensões engloba 51 isolados de Portugal, um de França e dois do Reino Unido, que apresentam zero diferenças alélicas entre si. Os restantes 13 isolados, apresentam cinco ou menos diferenças alélicas entre si.

### \_Discussão

*S. Typhimurium* é o segundo serotipo mais notificado a nível europeu (7), sendo, em Portugal o terceiro serotipo mais comum, depois de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* monofásica. Em abril de 2024, foi observado um aumento no número de isolados serotipados como *S. Typhimurium*, comparativamente ao ano de 2023. Simultaneamente, constatou-se que a maioria destes isolados estavam circunscritos a duas regiões de Portugal. Todos estes factos, indiciavam a possível existência de um *cluster* genético. De facto, 77,1% (64/83) dos isolados de *S. Typhimurium* recebidos de janeiro a maio de 2024, integraram o mesmo *cluster* genético, *Cluster 1* (HC5 410410). Este *cluster* integrou ainda quatro isolados europeus, dois de França e dois do Reino Unido. Todos os isolados do *Cluster 1* pertenciam ao ST19, ST do serotipo *Typhimurium* mais frequente a nível mundial (8). Estes dados reforçam a importância da vigilância laboratorial contínua e o seu papel na identificação de surtos, sendo cada vez mais comum a vigilância genómica o ponto de partida de investigação epidemiológica de surtos (9).

Adicionalmente, todos os isolados pertencentes ao *Cluster 1* apresentavam o mesmo perfil de resistência aos antibióticos (AMP-AMC-TET-CHL), perfil pouco comum em Portugal (dados não apresentados). Contudo, a resistência aos antibióticos ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol são das mais frequentes em *S. Typhimurium* a nível europeu (32,1%, 26,8%, 14,5% respetivamente) (4). As resistências fenotípicas foram suportadas a nível genómico pela presença dos genes *bla<sub>CARB-2</sub>* (ampicilina e amoxicilina), *tet(G)* (tetraciclina) e *floR* (cloranfenicol). Adicionalmente, foram identificados os genes *sul1*, preditivo de resistência à classe das sulfonamidas, e *aadA2*, preditivo de resistência à estreptomicina. O perfil de resistência ACSSUT (ampicilina-cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina) é o perfil mais comum a nível europeu (4). A deteção simultânea destes genes foi associada a estirpes multirresistentes e virulentas de ST19 na Europa, Ásia e Estados Unidos da América (10). Importa ressaltar que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (11), alguns destes antibióticos estão classificados como antibióticos de importância crítica para a saúde humana.

### \_Conclusão

Este estudo destaca a importância da vigilância contínua e da caracterização detalhada de isolados de *Salmonella* para melhor compreender a dinâmica de surtos e a disseminação de estirpes multirresistentes.

A identificação precoce de *clusters* e a compreensão dos perfis de resistência são cruciais para implementar medidas de controlo efetivas e, assim, prevenir a disseminação de infeções.

#### Agradecimentos:

Os autores agradecem a colaboração de todos os Serviços de Patologia Clínica e Laboratórios de Análises Clínicas que enviaram isolados ao INSA, no âmbito da vigilância epidemiológica. Agradecem igualmente à Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA, pela realização da sequenciação genómica.

#### Referências bibliográficas:

- (1) Jajere SM. A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet World*. 2019;12(4):504-21. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
- (2) European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA J*. 2022 Dec 13;20(12):e07666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- (3) Eng S-K, Pusparajah P, Mutalib, N-S, et al. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*;8(3):284-93. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- (4) European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2021-2022. *EFSA J*. 2024 Feb 28;22(2):e8583. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8583>
- (5) Grimont PAD, Weill F-X ; WHO collaborating center for reference and research on Salmonella (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars*. 9th ed. Paris: Institute Pasteur, 2007. [https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng\\_0.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf)
- (6) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Disk Diffusion Test Methodology [online]. [consult. 25/06/2024]. [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology)
- (7) Silveira L, Pista A, Machado Jorge. Caracterização fenotípica de isolados de Salmonella enterica recebidos no INSA entre 2014 e 2017. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2018;7(22):49-51. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5592>
- (8) Gómez-Baltazar A, Vázquez-Marrufo G, Astiazaran-García H, et al. Comparative virulence of the worldwide ST19 and emergent ST213 genotypes of Salmonella enterica serotype Typhimurium strains isolated from food. *Microbes Infect*. 2023 Jan-Feb;25(1-2):105019. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.105019>
- (9) European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority ; Van Walle I, Guerra B, Borges V, et al. EFSA and ECDC technical report on the collection and analysis of whole genome sequencing data from food-borne pathogens and other relevant microorganisms isolated from human, animal, food, feed and food/feed environmental samples in the joint ECDC-EFSA molecular typing database. *EFSA supporting publication*. 2019;16(5):EN-1337. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1337>
- (10) Monte DFM, Sellera FP, Lopes R, et al. Class 1 integron-borne cassettes harboring blaCARB-2 gene in multidrug-resistant and virulent Salmonella Typhimurium ST19 strains recovered from clinical human stool samples, United States. *PLoS One*. 2020 Oct 30;15(10):e0240978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240978>. Erratum in: *PLoS One*. 2021 Mar 29;16(3):e0249536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249536>
- (11) World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine: Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. 6th rev. Geneva: WHO, 2019. <https://iris.who.int/handle/10665/312266>

## Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Salmonella* Typhi e Paratyphi em Portugal, entre janeiro de 1994 e maio de 2024

*Phenotypic and genotypic characterization of Salmonella Typhi and Paratyphi isolates in Portugal, between January 1994 and May 2024*

Ana Margarida Henriques, Raquel Caeiro, Alexandra Tomás, Leonor Silveira, Angela Pista

angela.pista@insa.min-saude.pt; leonor.silveira@insa.min-saude.pt

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

### Resumo

Os serotipos Typhi e Paratyphi causam infeções sistémicas graves, sendo crucial a administração de antibioterapia adequada. No entanto, o aumento crescente da taxa de multirresistência aos antibióticos, especialmente no caso de *Salmonella* Typhi, dificulta a escolha dos antibióticos a administrar. Em Portugal, os casos de febre tifoide e paratifoide são raros.

Com este estudo pretendeu-se identificar e caracterizar os perfis de resistência aos antibióticos de isolados de *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A, B e C, entre janeiro de 1994 e maio de 2024, e avaliar a sua proximidade genética.

Após confirmação do serotipo, 86 isolados foram submetidos a testes de suscetibilidade aos antibióticos e sequenciação total do genoma. Neste estudo, 60,5% dos isolados foram resistentes a pelo menos um antibiótico, dos quais 15,4% eram multirresistentes. Entre 1994-2016 todos os isolados foram suscetíveis, mas a partir de 2017 foi possível observar uma tendência crescente na resistência aos antibióticos, especialmente para *S. Typhi*. A resistência à pefloxacina foi a mais frequente, seguida da resistência ao ácido nalidíxico, ampicilina, trimetoprim, sulfametoxazol e cloranfenicol. Dos diversos genes de resistência identificados, destaca-se a presença do gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>* num isolado de *Salmonella* Typhi de 2020, resistente a antibióticos de importância crítica.

Foram identificados 11 pequenos *clusters*. Apesar dos serotipos tifoídeos e paratifoídeos não serem endémicos em Portugal, é essencial manter uma vigilância laboratorial contínua, de forma a caracterizar os isolados circulantes em Portugal e detetar potenciais surtos.

### Abstract

*Typhi and Paratyphi serovars are responsible for severe systemic infections that require appropriate antimicrobial therapy. However, the increasing rate of multidrug resistance, particularly in Salmonella Typhi, complicates therapeutics. In Portugal, typhoid and paratyphoid fever cases are rare.*

*This study aimed to identify and to characterize the antibiotic resistance profiles of Salmonella Typhi and Salmonella Paratyphi A, B, and C isolates from 1994 to May 2024, and to assess their genetic proximity.*

*After serotyping confirmation, 86 isolates underwent antimicrobial susceptibility testing and Whole Genome Sequencing.*

*In this study, 60.5% of the isolates were resistant to at least one antibiotic, of which 15.4% were multidrug-resistant. Between 1994 and 2016, all isolates were susceptible, but an increasing trend in antibiotic resistance*

*was observed after 2017, particularly in S. Typhi. Resistance to pefloxacin was most frequent, followed by nalidixic acid, ampicillin, trimethoprim, sulphamethoxazole, and chloramphenicol. Among the resistance genes identified, bla<sub>CTX-M-15</sub> gene was found in a S. Typhi isolate from 2020, resistant to critically important antibiotics. Eleven small clusters were identified. Although typhoid and paratyphoid serotypes are not endemic in Portugal, continuous laboratory surveillance is essential to characterize circulating isolates and to detect potential outbreaks.*

### Introdução

Anualmente, a febre tifoide e a paratifoide são responsáveis por cerca de 130 a 160 mil mortes a nível mundial e são causadas por *Salmonella* Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B e Paratyphi C (1-6). A febre entérica é transmitida pela via fecal-oral, através da contaminação de água ou alimentos, ou por contacto direto pessoa a pessoa, especialmente em países endémicos, tais como países do sudeste asiático e África subsariana, entre outros (1,2,5,7). Na Europa, os casos de febre tifoide e paratifoide são relativamente raros e estão maioritariamente associados a viagens para países endémicos (1,3,7).

Os serotipos Typhi e Paratyphi, restritos ao hospedeiro humano, causam infeções sistémicas graves, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, sendo crucial a administração de antibioterapia adequada (8,9). Em caso de necessidade de terapêutica empírica, é recomendada, como primeira linha de tratamento, a administração de ciprofloxacina, ceftriaxone ou azitromicina (10). No entanto, o aumento crescente da taxa de multirresistência aos antibióticos, especialmente no caso de *S. Typhi*, limita a escolha dos antibióticos a administrar, sendo recomendada

adaptação relativamente aos padrões de resistência de cada país (5,6,10,11). Apesar de não ser uma doença endémica em Portugal, é importante caracterizar os isolados circulantes no nosso país, não só para detetar precocemente eventuais surtos, mas também para adequar o tratamento, visando minimizar os riscos para a saúde pública (5).

## \_Objetivos

Com este estudo pretendeu-se identificar os perfis de resistência aos antibióticos mais frequentes de isolados de *Salmonella* dos serotipos Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B e Paratyphi C, no período entre janeiro de 1994 e maio de 2024, bem como identificar os seus genes de resistência. Adicionalmente, foi avaliada a proximidade genética das estirpes em estudo.

## \_Materiais e métodos

Para realização deste trabalho, foram analisados isolados de *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* e *C*, recebidos e identificados no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 1994 e maio de 2024. A serotipagem foi realizada de acordo com o esquema de *Kauffman-White-Le Minor* (12). A determinação do perfil fenotípico de resistência aos antibióticos foi realizada pelo método de difusão em disco, de acordo com as recomendações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (13). Foi testado um painel de 18 antibióticos, que incluíam: ampicilina (AMP) (10 µg), amoxicilina+ácido clavulânico (AMC) (30 µg), tetraciclina (TET) (30 µg), cefoxitina (FOX) (30 µg), ceftazidima (CZD) (10 µg), cefepime (FEP) (30 µg), cefotaxima (COX) (5 µg), ceftriaxona (CRO) (30 µg), ácido nalidíxico (NAL) (30 µg), cloranfenicol (CHL) (30 µg), gentamicina (GMN) (10 µg), pefloxacina (PEF) (5 µg), trimetoprim (TMP) (5 µg), sulfametoxazol (SMX) (100 µg), meropenemo (MEM) (10 µg), azitromicina (AZM) (15 µg), tigeciclina (TGC) (15 µg) e amicacina (AKN) (30 µg). Uma estirpe foi considerada multirresistente quando apresentou resistência a três ou mais classes diferentes de antibióticos. Todos os isolados foram sujeitos a sequenciação total

do genoma (WGS), utilizando a tecnologia Illumina, e a análise genómica foi realizada recorrendo às plataformas *Enterobase* (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>), *Center for Genomic Epidemiology* (<https://www.genomicepidemiology.org/services>) e *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (<https://card.mcmaster.ca>).

## \_Resultados

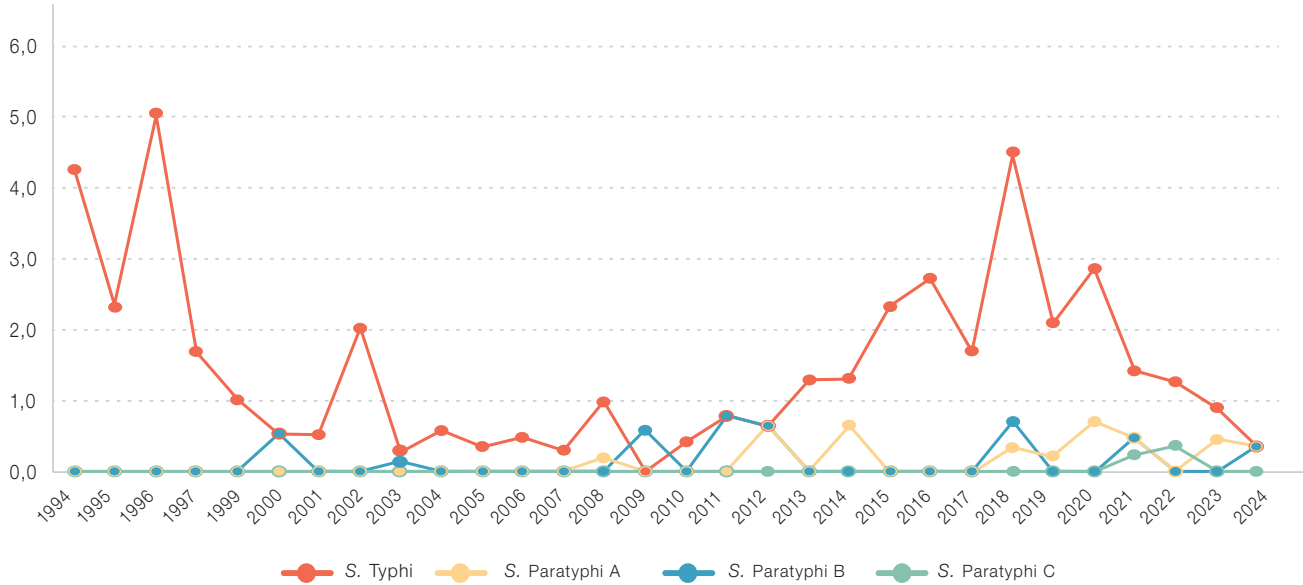
Entre janeiro de 1994 e maio de 2024 foram recebidos no INSA 168 isolados clínicos de *S. Typhi* (n=148), *S. Paratyphi A* (n=10), *B* (n=7) e *C* (n=3). No gráfico 1, é possível observar a distribuição temporal destes isolados.

Tendo em conta que 48,8% dos isolados (82/168) não se conseguiram recuperar para realização de testes de suscetibilidade aos antibióticos e WGS, neste estudo foram considerados 86 isolados: 66 isolados de *S. Typhi*, dez isolados de *S. Paratyphi A*, sete isolados de *S. Paratyphi B* e três isolados de *S. Paratyphi C*.

No total, 60,5% (52/86) dos isolados foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados, o que correspondeu a 60,6% (40/66) dos isolados de *S. Typhi*, 100% (10/10) dos isolados de *S. Paratyphi A* e 28,6% (2/7) dos isolados de *S. Paratyphi B*. Por outro lado, todos os isolados de *S. Paratyphi C* (n=3) apresentaram suscetibilidade aos antibióticos testados (gráfico 2), assim como todos os isolados (n=14) anteriores a 2017.

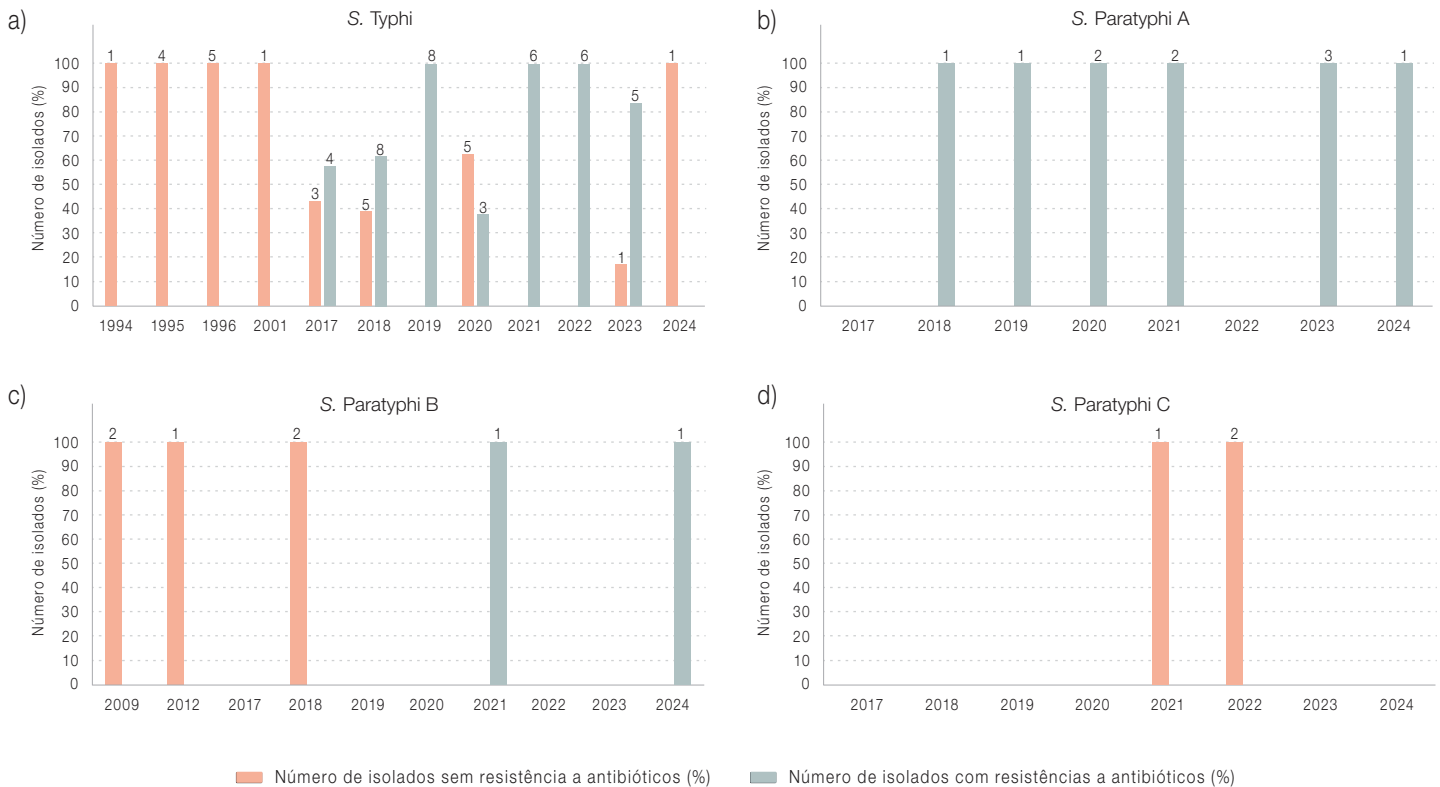
Foram identificados diversos perfis de resistência (gráfico 3), sendo o perfil mais comum a resistência à classe das (fluoro)quinolonas (NAL, PEF), observado em 90,0% (9/10) dos isolados de *S. Paratyphi A*, 31,8% (21/66) de *S. Typhi* e 14,3% (1/7) de *S. Paratyphi B*. A diversidade de perfis foi mais evidente nos isolados de *S. Typhi*. De referir que 15,4% (8/52) dos isolados de *S. Typhi* apresentaram perfil de multirresistência. A resistência à pefloxacina (76,9%; 40/52), ácido nalidíxico (69,2%; 36/52), ampicilina (28,8%; 15/52), trimetoprim (26,9%; 14/52), sulfametoxazol (23,1%; 12/52) e cloranfenicol (17,3%; 9/52), foram as mais frequentes. Todos os isolados foram suscetíveis à amicacina, azitromicina, cefoxitina, gentamicina, meropenemo e tigeciclina (100%; 52/52).

Gráfico 1: Distribuição temporal da percentagem de isolados (%) de *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* e *C* serotipados no INSA entre janeiro de 1994 e maio de 2024.



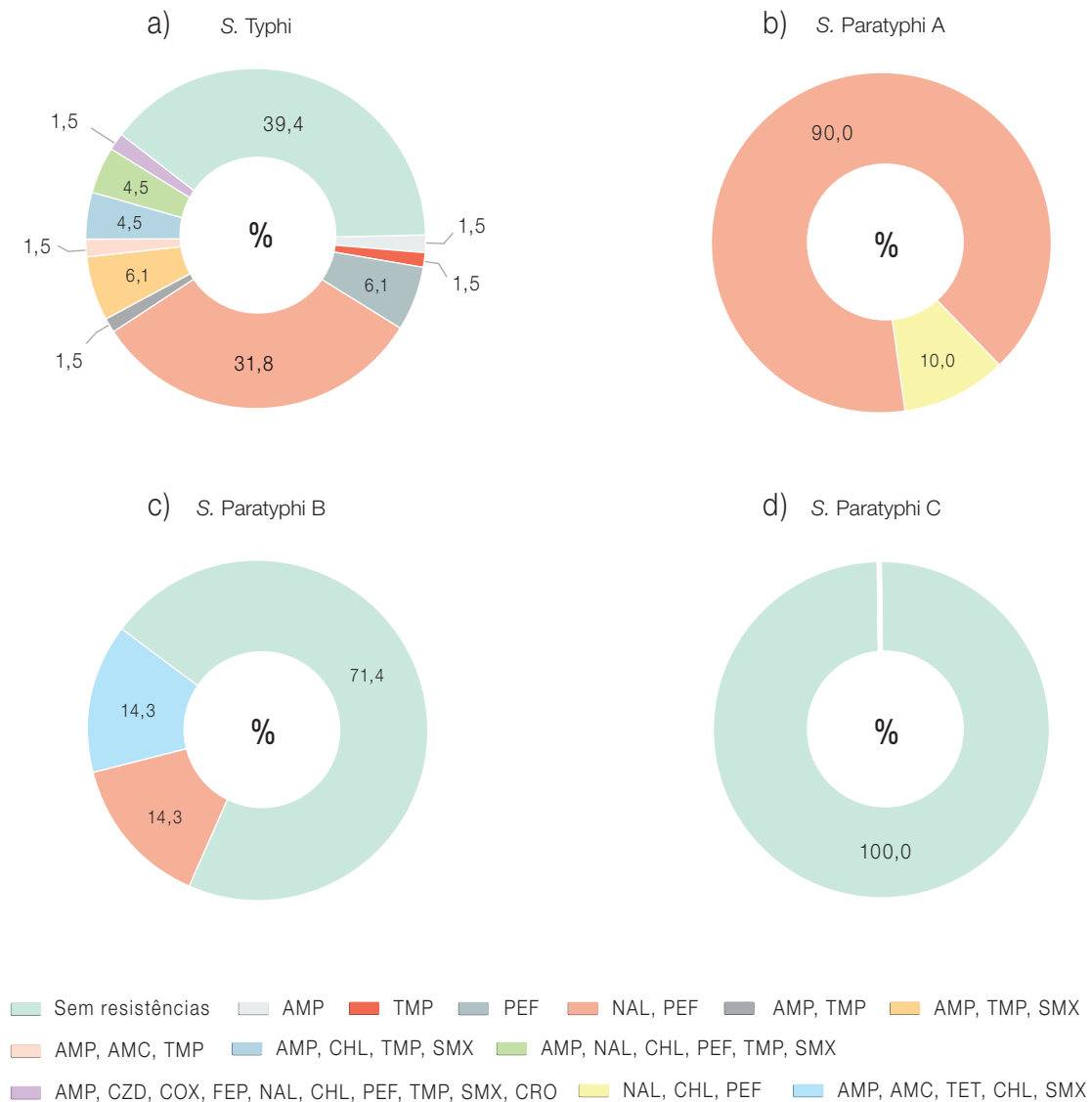
Foram omitidos os anos em que não foram identificados os serotipos em estudo.

Gráfico 2: Distribuição temporal do número de isolados (%) de *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* e *S. Paratyphi C* resistentes e suscetíveis aos 18 antibióticos testados.



Foram omitidos os anos anteriores a 2017 em que não foram recuperados isolados.

Gráfico 3: Distribuição da suscetibilidade e dos perfis de resistência observados nos isolados de *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B* e *S. Paratyphi C*, entre janeiro de 1994 e maio de 2024.



Na **tabela 1** encontram-se descritos os perfis fenotípicos de resistência aos antibióticos testados, bem como os genes de resistência identificados após WGS. Todos os perfis fenotípicos de resistência aos antibióticos foram concordantes com a análise dos genes de resistência. Num isolado multirresistente de *S. Typhi*, de 2020, foi identificado o gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, uma β-lactamase de espectro alargado (ESBL).

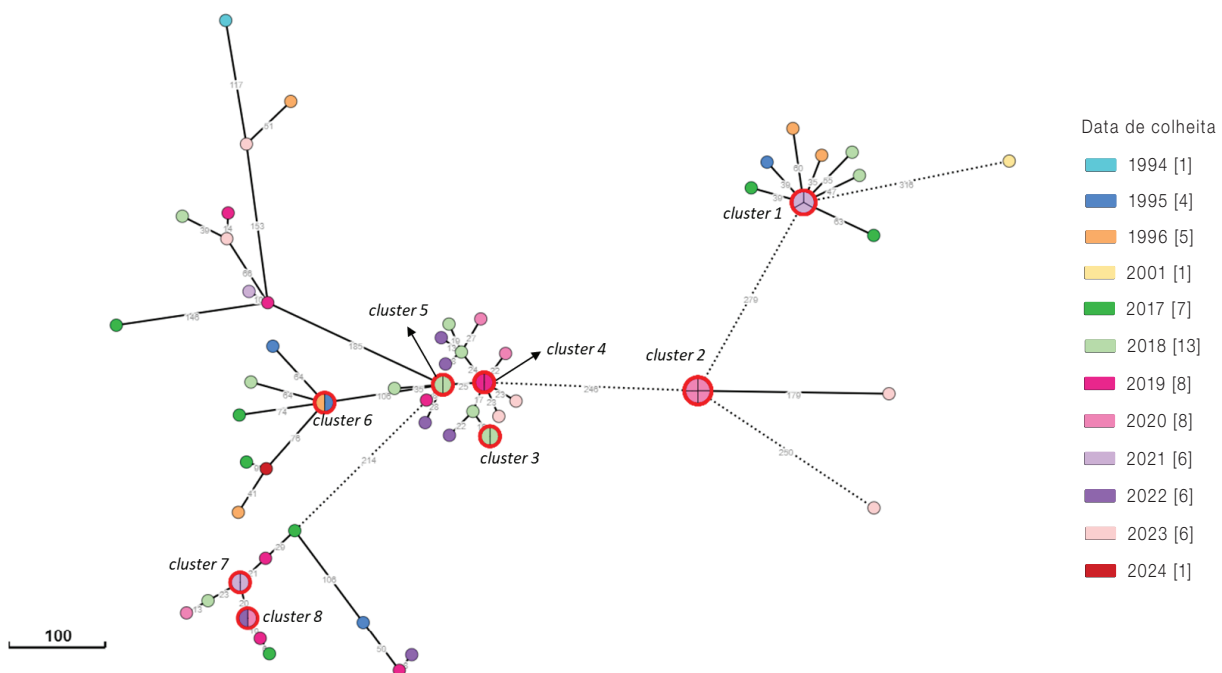
Através da análise de *core genome multilocus sequence typing* (*Enterobase cgMLST V2 + HierCC V1*) dos 86 isolados estudados, recorrendo a um *threshold* de cinco diferenças alélicas (HC5), foi possível identificar oito *clusters* integrando isolados de *S. Typhi* (**figura 1**) e três *clusters* integrando, respetivamente, isolados de *S. Paratyphi A*, *B* e *C* (**figura 2**). Quatro *clusters* (*cluster 6, 8, A e C*) integram isolados de diferentes anos (**figura 1 e 2**).

Tabela 1: Genes de resistência e mutações pontuais associados aos perfis de resistência aos antibióticos observados nos isolados de *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *B* e *C*, entre 1994 e maio de 2024.

Perfil fenotípico de resistência	Genes de resistência	Número de isolados (n=86)
Suscetível		34
Resistente		52
AMP	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>	1
TMP	<i>dfrA7</i>	1
PEF	<i>gyrB</i> (p.S464F)	4
NAL, PEF	<i>gyrA</i> (p.D87N; p.S83F; p.S83Y), <i>parC</i> (p. T57S), <i>qnrB19</i>	31
AMP, TMP	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>dfrA7</i>	1
NAL, PEF, CHL	<i>gyrA</i> (p. S83Y), <i>parC</i> (p. T57S), <i>sdia</i>	1
AMP, SMX, TMP	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>sul1</i> , <i>drfA7</i>	4
AMP, AMC, TMP	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>dfrA7</i>	1
AMP, CHL, SMX, TMP	<i>aph(6)-I<sub>d</sub></i> , <i>aph(3'')-I<sub>b</sub></i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>catA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA7</i>	3
AMP, AMC, CHL, SMX, TET	<i>aadA2</i> , <i>bla</i> <sub>CARB-2</sub> , <i>floR</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(G)</i>	1
AMP, NAL, PEF, CHL, SMX, TMP	<i>aph(6)-I<sub>d</sub></i> , <i>aph(3'')-I<sub>b</sub></i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>gyrA</i> (p. S83F, p. S83Y; p.D87G), <i>parC</i> (p. S80I), <i>catA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA7</i>	3
AMP, COX, CRO, CZD, FEP, NAL, PEF, CHL, SMX, TMP	<i>aph(6)-I<sub>d</sub></i> , <i>aph(3'')-I<sub>b</sub></i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>qnrS1</i> , <i>gyrA</i> (p. S83F), <i>catA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA7</i>	1

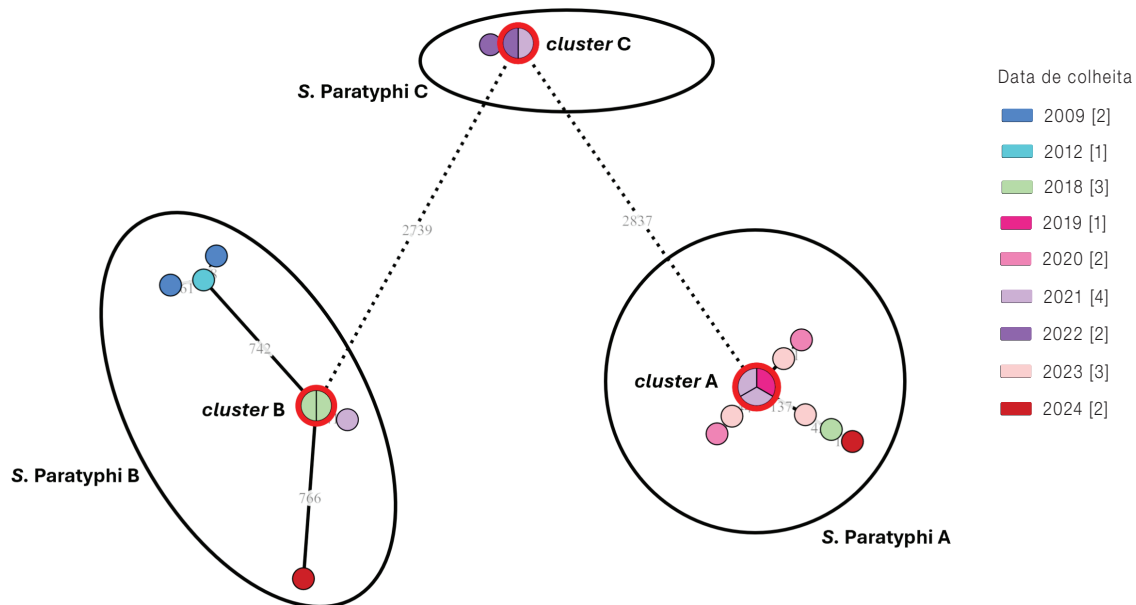
AMC, amoxicilina +ácido clavulânico; AMP, ampicilina; CHL, cloranfenicol; CZD, ceftazidima; COX, cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; FEP, cefepime; NAL, ácido nalidixico; PEF, pefloxacina; SMX, sulfametoxazol; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprim.

Figura 1: Análise filogenética (*minimum spanning tree*) de *S. Typhi*, baseada no cgMLST de 66 isolados, utilizando o esquema cgMLST V1 + HierCC V1 com 3002 loci, disponível na plataforma Enterobase.



Os números apresentados nos ramos representam as diferenças alélicas entre os isolados. Os clusters são formados com  $\leq 5$  diferenças alélicas entre os isolados. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados. As linhas contínuas são proporcionais à distância entre os isolados, enquanto as linhas a tracejado são indicativas de ausência de proporcionalidade na distância entre os isolados, tendo sido efetuada uma redução para distâncias superiores a 200.

Figura 2: Análise filogenética (*minimum spanning tree*) de *S. Paratyphi* A, B e C, baseada no cgMLST de 20 isolados, utilizando o esquema cgMLST V1 + HierCC V1 com 3002 loci, disponível na plataforma *Enterobase*.



Os números apresentados nos ramos representam as diferenças alélicas entre os isolados. Os *clusters* são formados com  $\leq 5$  diferenças alélicas entre os isolados. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de isolados neles integrados. As linhas contínuas são proporcionais à distância entre os isolados, enquanto as linhas a tracejado são indicativas de ausência de proporcionalidade na distância entre os isolados, tendo sido efetuada uma redução para distâncias superiores a 2000.

## \_Discussão

No período entre janeiro de 1994 e maio de 2024 foram analisados 86 isolados clínicos. Destes, 66 foram serotipados como Typhi, dez como Paratyphi A, sete como Paratyphi B e três como Paratyphi C. Segundo o último relatório epidemiológico europeu de febre tifoide e paratifoide, o número de casos reportados de *S. Typhi* ( $n=990$ ; 69%) foi significativamente superior aos de *S. Paratyphi A* ( $n=318$ ; 22%), *S. Paratyphi B* ( $n=91$ ; 6%) e *S. Paratyphi C* ( $n=11$ ; 1%), tal como observado em anos anteriores (4,5). Na ausência de informações epidemiológicas complementares dos pacientes (país de origem, viagens recentes, entre outros) podemos apenas supor que estes casos tenham surgido em contexto familiar ou que tenham ocorrido após viagens a países onde a febre tifoide e paratifoide são endémicas, tal como acontece nos restantes países europeus.

Neste estudo, 60,5% dos isolados foram resistentes a pelo menos um antibiótico e, desses, 15,4% foram multirresistentes. Tal como reportado por outros países, a resistência aos antibióticos foi maior nos serotipos Typhi e Paratyphi A (5,6,11,14-18). Apesar do número reduzido de isolados incluídos neste estudo, foi possível observar uma tendência crescente na resistência aos antibióticos testados, especialmente no caso de *S. Typhi*, sendo que até 2017 todos os isolados analisados foram suscetíveis. Estes dados estão em consonância com os dados internacionais, que têm evidenciado um aumento do número de isolados resistentes e multirresistentes (7,11,16-18).

Globalmente, as resistências mais frequentes foram à pefloxacina (76,9%), ácido nalidíxico (69,2%), ampicilina (28,8%), trimetoprim (26,9%), sulfametoxazol (23,1%) e cloranfenicol (17,3%), tendo o perfil de resistência NAL-PEF

sido o mais observado em *S. Typhi* (31,8%) e *Paratyphi A* (90,0%). A sequenciação total do genoma permitiu identificar os genes de resistência preditivos dos perfis de resistência encontrados, destacando-se a presença dos genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (cefalosporinas), *bla*<sub>TEM-1B</sub> (ampicilina), *catA1* (cloranfenicol), *dfrA7* (trimetoprim), *sul1/sul2* (sulfametoxazol), *qnrB19* e das mutações pontuais em *gyrA*, *gyrB* e *parC* (fluoroquinolonas). A identificação de um isolado de *S. Typhi* de 2020 extensivamente resistente aos antibióticos (XDR), com resistência a ampicilina, cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, (fluoro)quinolonas, cloranfenicol, sulfametoxazole e trimetoprim, e com uma betalactamase de espectro alargado (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>) vem reforçar o conceito de que a escolha dos antibióticos a administrar é cada vez mais um desafio para a prática clínica (5,6,11,13,19). A resistência de *S. Typhi* a cada um destes antibióticos tem sido descrita em vários países ao longo dos anos (20).

A análise de cgMLST identificou oito pequenos *clusters* de *S. Typhi* e três pequenos *clusters* cada um integrando isolados de *S. Paratyphi A*, *B* e *C*. A existência destes *clusters* pressupõe uma provável origem comum dos isolados integrantes de cada *cluster*. No entanto, sem informação epidemiológica complementar, esta observação não passa de uma suposição.

## Conclusão

Apesar de a febre tifóide/paratifóide ser uma doença de declaração obrigatória (DDO) em Portugal (21), a subnotificação de casos é um desafio, transversal aliás a todas as DDO (22,23).

Dada a importância das infeções causadas por serotipos *Typhi* e *Paratyphi*, estas não devem ser negligenciadas, mesmo não sendo endémicas em Portugal. Não só por causarem sintomas graves, levarem frequentemente ao internamento e até morte, que se traduz numa carga económica e de doença elevada, mas também devido ao aumento das resistências aos antibióticos, que constitui um verdadeiro desafio ao tratamento destas doenças.

Assim, não só é essencial a notificação clínica atempada de todos os casos, mas também é importante manter uma vigilância laboratorial contínua, que permita caracterizar os isolados circulantes em Portugal e detetar de forma precoce potenciais surtos, que deverão ser sempre suportados pela investigação epidemiológica conduzida pelas entidades competentes, de maneira a implementar medidas de prevenção e controlo eficazes.

## Agradecimentos:

Os autores agradecem a colaboração de todos os Serviços de Patologia Clínica e Laboratórios de Análises Clínicas que enviaram isolados ao INSA, no âmbito da vigilância epidemiológica. Agradecem igualmente à Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA, pela realização da sequenciação genómica.

## Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Typhoid vaccines: WHO position paper – March 2018. *Weekly Epidemiological Record*. 2018;93( 13):153-72. <https://iris.who.int/handle/10665/272273>
- (2) Institute of Health Metrics and Evaluation. Global Burden of Disease Compare, 2021 [online]. [consult. 27/06/2024]. <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>
- (3) Sanderson KE, Liu S, Tang L, et al. Chapter 71 - Salmonella Typhi and Salmonella Paratyphi A. In: Tang Y-W, Sussman M, Liu D, et al. (eds). *Molecular Medical Microbiology*. 2nd ed. Academic Press, pp. 1275–1306. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-397169-2.00071-8>
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. Typhoid and paratyphoid fever: Annual Epidemiological Report for 2018. Stockholm: ECDC, 2023. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/-typhoid-paratyphoid-fever-annual-epidemiological-report-2018.pdf>
- (5) European Centre for Disease Prevention and Control. Typhoid and paratyphoid fever: Annual Epidemiological Report for 2019. Stockholm: ECDC, 2023. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/-typhoid-paratyphoid-fever-annual-epidemiological-report-2019.pdf>
- (6) GRAM Typhoid Collaborators. Estimating the subnational prevalence of antimicrobial resistant Salmonella enterica serovars Typhi and Paratyphi A infections in 75 endemic countries, 1990-2019: a modelling study. *Lancet Glob Health*. 2024 Mar;12(3):e406-e418. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(23\)00585-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00585-5)
- (7) Hendriksen RS, Leekitcharoenphon P, Lukjancenko O, et al. Genomic signature of multidrug-resistant Salmonella enterica serovar typhi isolates related to a massive outbreak in Zambia between 2010 and 2012. *J Clin Microbiol*. 2015 Jan;53(1):262-72. <https://doi.org/10.1128/JCM.02026-14>
- (8) J Barton A, Hill J, J Blohmke C, J Pollard A. Host restriction, pathogenesis and chronic carriage of typhoidal Salmonella. *FEMS Microbiol Rev*. 2021 Sep 8;45(5):-fuab014. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab014>

## artigos breves\_ n. 4

- (9) Ministério da Saúde. Serviço Nacional de Saúde. Febre tifoide [online]. [consult. 27/06/2024]. <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/febre-tifoide/>
- (10) Moja L, Zanichelli V, Mertz D, et al. WHO's essential medicines and AWaRe: recommendations on first- and second-choice antibiotics for empiric treatment of clinical infections. *Clin Microbiol Infect.* 2024;30(Suppl 2):S1-S51. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2024.02.003>
- (11) Akram J, Khan AS, Khan HA, et al. Extensively Drug-Resistant (XDR) Typhoid: Evolution, Prevention, and Its Management. *Biomed Res Int.* 2020 May 2;2020:6432580. <https://doi.org/10.1155/2020/6432580>
- (12) Grimont PAD, Weill F-X ; WHO collaborating center for reference and research on Salmonella (2007). *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars.* 9th ed. Paris: Institute Pasteur, 2007. [https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng\\_0.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf)
- (13) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Disk Diffusion Test Methodology [online]. [consult. 25/06/2024]. [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology)
- (14) Eng S-K, Pusparajah P, Mutalib, N-S, et al. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*;8(3):284-93. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>
- (15) Nuanmuang N, Leekitcharoenphon P, Njage PMK, et al. An Overview of Antimicrobial Resistance Profiles of Publicly Available Salmonella Genomes with Sufficient Quality and Metadata. *Foodborne Pathog Dis.* 2023 Sep;20(9):405-413. <https://doi.org/10.1089/fpd.2022.0080>
- (16) Pfeifer Y, Matten J, Rabsch W. Salmonella enterica serovar Typhi with CTX-M beta-lactamase, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2009 Sep;15(9):1533-5. <https://doi.org/10.3201/eid1509.090567>
- (17) Britto CD, Wong VK, Dougan G, et al. A systematic review of antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovar Typhi, the etiological agent of typhoid. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Oct 11;12(10):e0006779. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006779>
- (18) WHO Regional Office for the Eastern Mediterranean. Drug resistant Salmonella infections in Pakistan: update. *Weekly Epidemiological Monitor.* 2019;12(34). [https://applications.emro.who.int/docs/epi/2019/Epi\\_Monitor\\_2019\\_12\\_34.pdf?ua=1](https://applications.emro.who.int/docs/epi/2019/Epi_Monitor_2019_12_34.pdf?ua=1)
- (19) World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine: Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. 6th rev. Geneva: WHO, 2019. <https://iris.who.int/handle/10665/312266>
- (20) Walker J, Chaguza C, Grubaugh ND, et al. Assessing the global risk of typhoid outbreaks caused by extensively drug resistant Salmonella Typhi. *Nat Commun.* 2023 Oct 16;14(1):6502. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42353-9>
- (21) Despacho n.º 1150/2021, de 28 de janeiro. DR n.º 19/2021, Série II de 2021-01-28:137-90. Doenças de notificação obrigatória a notificar na plataforma de apoio ao SINAVE (Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica) ou no SI-Vida (Sistema de informação VIH/SIDA). <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/despacho/1150-2021-155575942>
- (22) Eufrásio R, Lopes F. Vigilância epidemiológica um desafio multidisciplinar in Riscos para a saúde em contexto pandémico: reflexões sobre o impacte da COVID-19. *Territorium: Revista Internacional de Riscos.* 2023;30(I). [https://doi.org/10.14195/1647-7723\\_30-1\\_7](https://doi.org/10.14195/1647-7723_30-1_7)
- (23) Puça FM. Auditoria Clínica às Doenças de Notificação Obrigatória. (Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 2017). <https://hdl.handle.net/10216/109147>

## Vigilância epidemiológica de infeções respiratórias: um estudo-piloto da adaptação do Programa Nacional de Vigilância da Gripe e outros Vírus Respiratórios na rápida deteção de surtos de origem animal

*Epidemiological Surveillance of Respiratory Infections: a pilot study of the adaptation of the National Surveillance Program for Influenza and other Respiratory Viruses in the rapid detection of zoonotic outbreaks*

Verónica Gómez<sup>1</sup>, Raquel Guiomar<sup>2</sup>, Ausenda Machado<sup>1</sup>, Ana Paula Rodrigues<sup>1</sup>

veronica.gomez@insa.min-saude.pt

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

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

### \_Resumo

A investigação epidemiológica de surtos de infeções respiratórias graves é determinante para a rápida identificação de ameaças à saúde pública. As infeções respiratórias de origem animal têm sido frequentemente reportadas nos últimos anos, incluindo gripe aviária, suína e mais recentemente em felinos e gado bovino. Após um surto de Influenza A(H5N1) em gatos na Polónia, em 2023, e em aves em Portugal desde novembro de 2021, o Programa Nacional de Vigilância de Gripe e outros Vírus Respiratórios (PNVGVR), no âmbito de uma abordagem integrada *Uma Só Saúde*, incluiu na época de gripe 2023/2024 uma questão sobre o contacto com animais prévio ao início dos sintomas respiratórios, para sensibilizar médicos e outros profissionais de saúde sobre este risco.

O presente trabalho tem como objetivo explorar a exequibilidade da recolha de informação sobre contactos com animais no PNVGVR na deteção de surtos de origem animal.

Os dados indicam que, embora menos de um terço dos indivíduos que relataram contato com animais nos últimos dez dias tenha sido diagnosticado com gripe, esta associação não deve ser ignorada, especialmente em contextos onde foram identificados casos de gripe em animais.

Na época 2024/2025, pretende-se continuar a recolha de dados sobre contactos com animais e e reforçar junto dos clínicos a importância desta informação na vigilância das infeções respiratórias em Portugal, tirando partido do PNVGVR como um instrumento de instrumento de vigilância bem estabelecido.

### \_Abstract

The epidemiological investigation of outbreaks of severe respiratory infections is crucial for the rapid identification of public health threats. Respiratory infections of animal origin have been frequently reported in recent years, including avian influenza, swine influenza and more recently in felines and cattle. Following an outbreak of Influenza A(H5N1) in cats in Poland in 2023 and new cases of avian influenza in Portugal in November 2023, the Programa Nacional de Vigilância de Gripe e outros Vírus Respiratórios (PNVGVR) of Portugal, in a integrated One Health approach effort, included in the 2023/2024 influenza season a question on previous contact with animals before the respiratory symptoms onset to raise awareness among clinicians.

The present work aims to explore the feasibility of collecting information about contacts with animals in the PNVGVR in the detection of outbreaks of animal origin.

Data indicates that although less than a third of individuals who reported contact with animals in the last ten days were diagnosed with influenza, this association should not be ignored, especially in contexts where cases of influenza in animals have been identified. This should encourage research on different types of contact with animals and respiratory infections.

In the 2024/2025 season, we aim to continue collecting data on animal contacts and reinforce with clinicians the importance of gathering this information in the surveillance of respiratory infections in Portugal, taking advantage of the PNVGVR as a well-established surveillance tool.

### \_Introdução

A investigação epidemiológica de surtos de infeções respiratórias graves (1-3) é relevante para a identificação atempada de ameaças emergentes à saúde pública.

As infeções respiratórias de origem animal são de particular importância e têm vindo a ser reportadas desde o início dos anos 2000. As infeções respiratórias associadas ao vírus da gripe aviária de alta patogenicidade do subtipo A (H5N1) foram reportadas nos últimos anos, desde 2020 em aves (2,4) e mamíferos como suínos (5) e mais recentemente em felinos (6) e em gado bovino (7).

O risco para a saúde humana está atualmente limitado ao contacto com animais infetados (aves ou mamíferos) ou com ambientes contaminados. A presença do vírus em áreas urbanas, onde há exposição de animais de estimação a aves infetadas, aumenta este risco para os humanos. É também

importante que as autoridades de saúde pública e veterinárias tenham ferramentas para atempadamente detetar problemas respiratórios ou neurológicos após uma possível exposição a um vírus respiratório, para identificar e tratar os animais, assim como implementar as medidas de controlo necessárias para evitar o contágio de humanos. (2,4).

A investigação de surtos animais baseia-se numa coordenação multidisciplinar entre clínicos, veterinários, virologistas, epidemiologistas e autoridades de saúde para a notificação de casos ou surtos de infeções desconhecidas, orientação do diagnóstico laboratorial e implementação de medidas de controlo e prevenção em saúde pública (8).

A coordenação do Programa Nacional de Vigilância de Gripe e outros Vírus Respiratórios (PNVGVR) (9) e sua atualização, assim como a promoção da formação dos profissionais envolvidos na vigilância que integram as redes-sentinelas e a Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico do Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios, e a análise de dados e análises laboratoriais é da responsabilidade do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), o qual providencia todo o material necessário para a colheita de dados, colheita e transporte das amostras biológicas. O sistema de vigilância da gripe em Portugal é constituído por redes-sentinelas (Rede Médicos-Sentinelas, Rede de Unidades de Saúde Sentinelas, Rede de Serviços de Urgência, Rede de Serviços de Obstetrícia e Rede de Unidades de Cuidados Intensivos) e por uma rede não-sentinelas (Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Infeção pelo Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios), também coordenada pelo INSA, e criada para recolha de dados e amostras respiratórias para proceder ao diagnóstico laboratorial, e caracterização genética e antigénica dos vírus respiratórios identificados, com particular foco nos vírus da gripe, SARS-CoV-2 e vírus sincicial respiratório. A vigilância da gripe e de outros vírus respiratórios é feita durante todo o ano.

Uma Só Saúde ou *One Health* (10,11) é uma abordagem integrada que visa equilibrar e otimizar de forma sustentável a saúde das pessoas, dos animais e dos ecossistemas. Reco-

nhece que a saúde dos seres humanos, dos animais domésticos e selvagens, das plantas e do ambiente em geral estão estreitamente ligadas e são interdependentes. Ao interligar humanos, animais e o ambiente, esta abordagem contempla todo o espectro do controlo de doenças – desde a prevenção até à deteção, preparação da resposta e gestão – e contribui para a segurança da saúde global (12).

Em Portugal, os surtos de gripe aviária, especialmente associados ao subtipo H5N1 têm esporadicamente ocorrido desde 2005/2006 (13). Assim, no seguimento de um surto de Influenza A(H5N1) em gatos na Polónia em 2023 (6) e nos mais recentes casos de gripe aviária detetados em Portugal em novembro de 2023 e agosto de 2024 (13), sob a premissa de uma abordagem integrada de *Uma Só Saúde*, na época 2023/2024, o PNVGVR incluiu no sistema de vigilância da gripe uma nova questão, relativamente ao contacto prévio com animais nos 10 dias anteriores ao início dos sintomas respiratórios, de modo a sensibilizar os médicos e outros profissionais de saúde para este risco.

### **\_Objetivo**

O presente trabalho tem como objetivo explorar a exequibilidade e recolha de informação sobre contactos com animais no Programa Nacional de Vigilância de Gripe e outros Vírus Respiratórios na deteção de surtos de origem animal.

### **\_Material e métodos**

Realizou-se um estudo epidemiológico observacional, descritivo e transversal. Os indivíduos com infeção respiratória aguda (IRA) (1) foram selecionados no âmbito do PNVGVR na época gripal 2023/2024 (entre a semana 39/2023 até a semana 20/2024).

A questão de recolha da informação de contacto com animais foram “*Teve contacto com animais nos últimos 10 dias? Se sim, qual?*”

Foi realizada análise descritiva dos resultados laboratoriais e contactos com animais nos 10 dias anteriores a consulta.

A análise estatística foi realizada com o *software* STATA v. 15.1.

## **\_Resultados**

Durante o período de estudo, foram selecionados 485 indivíduos com IRA sendo que 71,1% (n=345) responderam à questão acerca do contacto com animais nos últimos 10 dias.

Destes, 26,4% (n=91) afirmaram terem tido contacto com animais no período indicado, sendo que 27,5% (n=25) destes indivíduos apresentaram resultado positivo para gripe confirmada laboratorialmente.

Em termos dos contactos por espécie animal, 98,7% dos indivíduos reportaram contacto com mamíferos (cães, gatos e coelhos), sendo que apenas 1 indivíduo reportou contacto com aves.

## **\_Discussão**

A interpretação destes resultados deve ter em conta a reduzida amostra de indivíduos e consequente precisão dos resultados. É de realçar que o objetivo da recolha de dados que aqui se apresenta faz parte do sistema de vigilância da gripe do PNVGVR, não se tratando de um questionário epidemiológico de gripe zoonótica. Assim, outras questões (animais domésticos/gado, profissão ligada à veterinária, estado vacinal dos animais, tipo e frequência de contacto com animais, práticas de higiene, condições de habitabilidade e vírus em circulação) não foram recolhidas.

A taxa de resposta à pergunta sobre o contato com animais foi de 71,1%, o que sugere ser exequível recolher esta informação no contexto de um sistema de vigilância já estabelecido.

Adicionalmente, no âmbito do sistema de vigilância da gripe do PNVGVR em 2023/2024, foi criado um alerta específico no contexto dos cuidados de saúde primários e na rede hospitalar, para que os clínicos se encontrem especialmente atentos a casos de infeção respiratória com contacto prévio com aves e outros animais, nomeadamente em áreas onde foram identificados surtos de gripe aviária.

## **\_Conclusões**

Os dados sugerem que, embora menos de um terço dos indivíduos com gripe diagnosticada laboratorialmente tenha relatado contato com animais, a associação não deve ser ignorada, particularmente em especial em contextos onde tenham sido identificados casos de gripe em animais, devendo ser impulsionadora da investigação da relação entre diferentes tipos de contato com animais e infeções respiratórias.

Na época 2024/2025, pretende-se continuar a recolha de dados no âmbito de contactos animais e reforçar junto dos clínicos que recolhem a informação, a importância desta temática na globalidade da vigilância das infeções respiratórias em Portugal, aproveitando a mais valia do PNVGVR enquanto instrumento de vigilância bem estabelecido.

### **Referências bibliográficas:**

- (1) European Centre for Disease Prevention and Control, WHO Regional Office for Europe. Operational considerations for respiratory virus surveillance in Europe. Stockholm, Copenhagen: ECDC, WHO Europe, 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Operational-considerations-respiratory-virus-surveillance-euro-2022.pdf>
- (2) European Centre for Disease Prevention and Control. Enhanced surveillance of severe avian influenza virus infections in hospital settings in the EU/EEA. Stockholm: ECDC, 2023. <https://doi.org/10.2900/590817>
- (3) U.S. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak and Case Definitions [online]. [consult. 2024/08/01]. [https://www.cdc.gov/urdo/php/surveillance/outbreak-case-definitions.html?CDC\\_AAref\\_Val=https://www.cdc.gov/urdo/outbreak.html](https://www.cdc.gov/urdo/php/surveillance/outbreak-case-definitions.html?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/urdo/outbreak.html)
- (4) Adlhoch C, Baldinelli F. Avian influenza, new aspects of an old threat. Euro Surveill. 2023 May;28(19):2300227. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2023.28.19.2300227>
- (5) U.S. Swine Health Information Center, Center for Animal Health and Food Safety-University of Minnesota. Swine Disease Global Surveillance Report. June 4 - July 1 2024. <https://www.swinehealth.org/wp-content/uploads/2024/07/July-Report.pdf>
- (6) Domańska-Blicharz K, Świętoń E, Świątalska A, et al. Outbreak of highly pathogenic avian influenza A(H5N1) clade 2.3.4.4b virus in cats, Poland, June to July 2023. Euro Surveill. 2023 Aug;28(31):2300366. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.31.2300366>. Erratum in: Euro Surveill. 2024 Mar;29(10). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.10.240307c>
- (7) Eisfeld AJ, Biswas A, Guan L, et al. Pathogenicity and transmissibility of bovine H5N1 influenza virus. Nature. 2024 Sep;633(8029):426-432. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07766-6>
- (8) World Health Organization. Protocol To Investigate non-seasonal influenza and other emerging acute respiratory diseases. Geneva: WHO, 2018. <https://iris.who.int/handle/10665/275657>

artigos breves\_ n. 5

- (9) Despacho n.º 4843/2023, de 21 de abril. DR n.º 79/2023, Série II, 2023-04-21, pp. 94-96. Designa o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I. P. (INSA, I. P.), como coordenador da Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Infecção pelo Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios.  
<https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/doc/4843-2023-212111153>
- (10) European Commission. One Health-Overview: What is the One Health approach? [online]. [consult. 01/08/2024]. [https://health.ec.europa.eu/one-health/overview\\_en#what-is-the-one-health-approach](https://health.ec.europa.eu/one-health/overview_en#what-is-the-one-health-approach)
- (11) Sinclair JR. Importance of a One Health approach in advancing global health security and the Sustainable Development Goals. Rev Sci Tech. 2019 May;38(1):145-154. <https://doi.org/10.20506/rst.38.1.2949>
- (12) WHO Regional Office for the South East Asia. Guidance on Selection and Use of One Health Operational Tools. New Delhi: SEARO, 2024. <https://iris.who.int/handle/10665/376977>
- (13) Direção-Geral da Alimentação e Veterinária. Casos de GAAP em aves selvagens [online]. [consult. 06/08/2024]. <https://www.dgav.pt/destaques/conteudo/casos-de-gaap-em-aves-selvagens/>

## Mucopolissacaridoses em população pediátrica: resultados de uma abordagem precoce no âmbito do projeto FIND

*Mucopolysaccharidosis in the pediatric population: results of an early diagnosis approach in the scope of the FIND project*

Paulo Gaspar<sup>1</sup>, Raquel Neiva<sup>1</sup>, Lisbeth Silva<sup>1</sup>, Luísa Diogo<sup>2</sup>, Ana Cristina Ferreira<sup>3</sup>, Ana M Miranda<sup>4</sup>, Diana Antunes<sup>5</sup>, Pedro Louro<sup>2,6</sup>, Sara Ribeiro<sup>2</sup>, Sara Oliveira<sup>2</sup>, Paula Garcia<sup>7</sup>, Esmeralda Rodrigues<sup>8</sup>, Teresa Campos<sup>8</sup>, Carmen Silva<sup>8</sup>, Patricia Janeiro<sup>9</sup>, Sérgio Sousa<sup>2</sup>, Altina Lopes<sup>1</sup>, Célia Nogueira<sup>1</sup>, Cristina Pereira<sup>1</sup>, Sandra Alves<sup>10</sup>, Elisa Leão Teles<sup>8</sup>, Laura Vilarinho<sup>1,10</sup>

paulo.gaspar@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Rastreo Neonatal, Metabolismo e Genética. Departamento de Genética Humana. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa Portugal

(2) Centro de Referência das Doenças Hereditárias do Metabolismo. Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

(3) Centro de Referência das Doenças Hereditárias do Metabolismo. Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(4) Departamento de Pediatria, Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca, Amadora, Portugal

(5) Departamento de Genética. Hospital de Dona Estefânia, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(6) Clínica de Risco de Cancro Familiar. Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, Lisboa, Portugal

(7) Departamento de Genética. Centro Materno-Infantil do Norte, Centro Hospitalar Universitário do Porto, Porto, Portugal

(8) Centro de Referência das Doenças Hereditárias do Metabolismo, Hospital de São João, Porto, Portugal

(9) Centro de Referência das Doenças Hereditárias do Metabolismo. Hospital Santa Maria, Centro Hospitalar de Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

(10) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

As Mucopolissacaridoses (MPSs), constituem um subgrupo das Doenças Lisossomais de Sobrecarga, causadas por deficiências em enzimas lisossomais, que catalisam a degradação dos glicosaminoglicanos. As MPSs têm apresentação multissistémica, heterogénea e consequentemente de diagnóstico difícil. O projeto FIND tem como objetivo alertar os clínicos para sinais e sintomas de risco ao mesmo tempo que disponibiliza uma ferramenta de diagnóstico.

Este estudo pretende descrever uma abordagem desenvolvida no âmbito do projeto FIND para identificar doentes com mucopolissacaridoses (MPSs) em idade pediátrica, antes do aparecimento dos sintomas mais graves. A identificação atempada permitirá uma intervenção terapêutica precoce, assim como oferecer aconselhamento genético às famílias afetadas.

O projeto FIND permitiu a identificação de 12 doentes de MPSs e a sua referenciação para os respetivos centros de tratamento.

Este estudo, para além da sua vertente educativa, coloca à disposição dos clínicos um ótimo meio para a identificação e caracterização de casos sintomáticos de MPS em idade pediátrica.

### \_Abstract

*Mucopolysaccharidoses are a subgroup of Lysosomal Storage Disorders characterized by the accumulation of glycosaminoglycans in cells, tissues, and organs due to specific enzyme deficiencies. In early disease stages, diagnosis can be postponed for years or even missed in late onset forms. This study aims to describe an approach developed within the scope of the FIND project to identify patients with mucopolysaccharidoses (MPSs) at a pediatric age, before the appearance of the most severe symptoms,*

*allowing early therapeutic intervention, as well as offering genetic counseling to affected families.*

*The FIND project was designed to claim awareness to the red flags of MPS at pediatric age and to provide a tool for physicians to diagnose these pathologies, since most of them are amenable to enzyme replacement therapy. The clinical suspicion was addressed by performing seven distinct enzymatic assays in dried blood spots. In the cases of a deficiency, the quantification and identification of the glycosaminoglycans were performed and the genetic study carried out.*

*In the first eight years of the project, we have identified twelve patients among the 385 samples received. FIND project allows an early identification and characterization of symptomatic MPSs patient, as well as other related pathologies at pediatric age.*

### \_Introdução

As Mucopolissacaridoses (MPSs) são um sub-grupo das Doenças Lisossomais de Sobrecarga (DLs), onde ocorre a acumulação de glicosaminoglicanos (conhecidos como GAGs ou mucopolissacarídeos). Os GAGs são uma família de glicoconjugados que incluem o sulfato de dermatano, sulfato de queratano, sulfato de heparano, sulfato de condroitina e o ácido hialurónico. Cada MPS é caracterizada por uma acumulação específica de GAGs, dependendo da deficiência enzimática presente, conduzindo consequente-

mente a diferentes fenótipos (1,2). Todas as MPSs são de transmissão autossómica recessiva, com exceção da MPS II, que é ligada ao cromossoma X. Estas patologias são crónicas, progressivas e multissistémicas, com diferentes graus de gravidade e evolução. O largo espectro de apresentações clínicas, torna o diagnóstico difícil e complexo, podendo conduzir a um diagnóstico tardio, especialmente em doentes com formas mais leves. Mesmo nos doentes com comprometimento cognitivo grave o seu diagnóstico pode ocorrer até 18 meses após o início dos sintomas, período durante o qual se podem registar alterações irreversíveis nos órgãos (1,3-5). Cimaz, *et al.* afirmaram que apenas 20% das formas leves de MPS I são diagnosticadas corretamente, levando a intervenções tardias e ao surgimento de sintomas deletérios (6). As principais características das MPSs são a baixa estatura, organomegalia, infecções respiratórias recorrentes, hérnias, fácies grosseiros, alterações ósseas e atraso no desenvolvimento psicomotor (1). O tratamento das MPS envolve uma abordagem multidisciplinar, com o objetivo de atenuar os sintomas e melhorar a qualidade de vida dos doentes. Isso pode incluir terapias de substituição enzimática (TSE), tratamento cirúrgico para corrigir complicações ortopédicas e uma intervenção especializada para problemas respiratórios e cardíacos. A TSE encontra-se disponível para a maioria destas doenças. O transplante de células-tronco hematopoéticas também é uma opção para doentes de MPS I com forma grave, antes dos 2 anos (7-9). Avanços significativos têm sido feitos na pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos, como a terapia génica, que poderão melhorar o prognóstico e qualidade de vida dos doentes com MPSs. O tratamento precoce pode retardar significativamente ou prevenir o início dos principais sinais clínicos, modificando substancialmente a história natural da doença, especialmente nas formas atenuadas (10). A colaboração entre diferentes especialidades médicas, cuidadores e doentes é crucial para garantir uma intervenção eficaz da doença. Por conseguinte, a educação contínua e a partilha de conhecimentos entre profissionais de saúde são essenciais para melhorar os resultados e a qualidade de vida dos doentes com MPSs (11).

O projeto FIND, resultante de uma parceria entre a Secção de Doenças Hereditárias do Metabolismo da Sociedade Portuguesa de Pediatria (SDHM-SPP) e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), foi iniciado com o intuito de realizar um diagnóstico atempado, podendo melhorar o prognóstico destes doentes, especialmente quando opções terapêuticas estão disponíveis. O projeto tem como objetivos principais: a divulgação dos sinais de alerta que permitam equacionar o diagnóstico das MPSs e a disponibilização de uma ferramenta que possibilite o estudo e diagnóstico deste grupo de patologias o mais precocemente possível.

### **\_Objetivos**

Este estudo pretende descrever uma abordagem desenvolvida no âmbito do projeto FIND para identificar doentes com mucopolissacaridoses (MPSs). Visa, por um lado, chamar a atenção para os principais sintomas deste grupo de patologias e, por outro, conduzir à sua identificação precoce.

### **\_Métodos**

#### ***Formação de profissionais de saúde***

Devido à sobreposição dos sintomas de MPS com patologias mais comuns, o projeto FIND foi lançado para aumentar a consciencialização das MPSs entre as diversas especialidades médicas. Foi distribuído um folheto informativo (figura 1) em todos os hospitais gerais e divulgação em reuniões científicas, *workshops*, versando fundamentalmente a área pediátrica. Foi igualmente criado um site informativo (<http://projetofind.pt/>)

#### ***Colheita de amostras***

Paralelamente, o projeto também disponibilizou um ensaio fácil e rápido que permite o diagnóstico precoce destas patologias. Em caso de suspeita de MPSs, o clínico poderá solicitar um *kit* de diagnóstico, enviando um *email* para [projecto.find@gmail.com](mailto:projecto.find@gmail.com), fornecendo o nome e endereço para entrega dos *kits*. Após a colheita de sangue, as amostras de sangue seco (DBS) foram enviadas através de um envelope

pré-pago, endereçado à Unidade de Rastreio Neonatal, Metabolismo e Genética, Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Porto, onde os testes enzimáticos destas patologias foram realizados.

### Ensaio enzimáticos

Sete ensaios enzimáticos foram realizados em DBS (tabela 1), com recurso a substratos fluorescentes específicos, para cada uma das MPSs. A fluorescência foi medida (ex345nm; em 460nm) e os resultados foram obtidos com recurso a uma curva de calibração de 4-metilumbeliferona e expressos em nmol/h/spot (12,13).

### Determinação de GAGs

Os GAGs foram determinados na primeira urina da manhã ou em urina ocasional, de acordo com o protocolo descrito em Withman, *et al.* (14).

### Estudo molecular

Nas amostras em que uma atividade enzimática reduzida foi identificada, prosseguiu-se com o estudo molecular do respectivo gene codificante.

Figura 1: Folheto informativo sobre as MPSs no âmbito do projeto FIND.



Tabela 1: Deficiência enzimáticas e GAGs excretados nas Mucopolissacaridoses

Mucopolissacaridose	Doença	Gene	Deficiência Enzimática	Glicosaminoglicanos excretados
MPS I	Hurler, Scheie, Hurler\Scheie	IDUA	$\alpha$ -iduronase	SD/SH
MPS II	Hunter	IDS	Iduronato-2-sulfatase	SD/SH
MPS III B	Sanfillippo B	NAGLU	N-acetyl- $\alpha$ -D-glucosaminidase	SH
MPS IV	Morquio A	GALNS	Galactose-6-sulfatase	SK/SC
	Morquio B	GLB1	$\beta$ -galactosidase	SK
MPS VI	Maroteaux-Lamy	ARSB	Arilsulfatase B	SD
MPS VII	Sly	GUSB	$\beta$ -glucuronidase	SD/SH/SC

SD – sulfato de dermatano; SK – sulfato de queratano; SH – sulfato de heparano; SC – sulfato de condroitina

## \_Resultados

Dos 419 kits solicitados em todo o país, recebemos 385 amostras. Todas as amostras foram acompanhadas por uma breve história clínica e uma requisição médica. A média de idade dos doentes foi de 5,4 anos e a mediana foi de 3,2 anos. Os principais sintomas que levaram os pediatras a suspeitar de MPSs estão representados no **gráfico 1**. Na maioria dos doentes, foram observados dois a três sintomas, sendo a fâcies grosseira (24%) e o envolvimento cognitivo (19%) os mais frequentes. Os sintomas menos frequentes foram a opacidade corneana, a perda auditiva e o síndrome do túnel cárpico.

Foram determinadas as sete atividades enzimáticas, descricionadas na **tabela 1**, apresentando 90% das amostras rececionadas, resultados dentro dos valores de referência. Nas restantes amostras, uma ou mais atividades enzimáticas estavam alteradas em comparação com os valores de referência. Nesses casos, novas amostras de sangue total, colhidas em heparina de lítio, foram solicitadas para confirmar ou excluir a deficiência enzimática identificada. Após a confirmação da deficiência enzimática leucocitária, foi realizado o respetivo estudo molecular e quando possível a análise dos GAGs. Nas 385 amostras analisadas, identificamos 12 doentes (**tabela 2**). Este estudo permitiu a identificação de 5 doentes de MPS I, 1 doente de MPS II, 2 doentes de MPS IIIB, 1 doente de MPS IVA, 2 doentes de GM1 e 1 doente de MPS VI.

Gráfico 1: 📄 Dados fenotípicos relativos às MPSs observados na população em estudo (n de amostras=385).

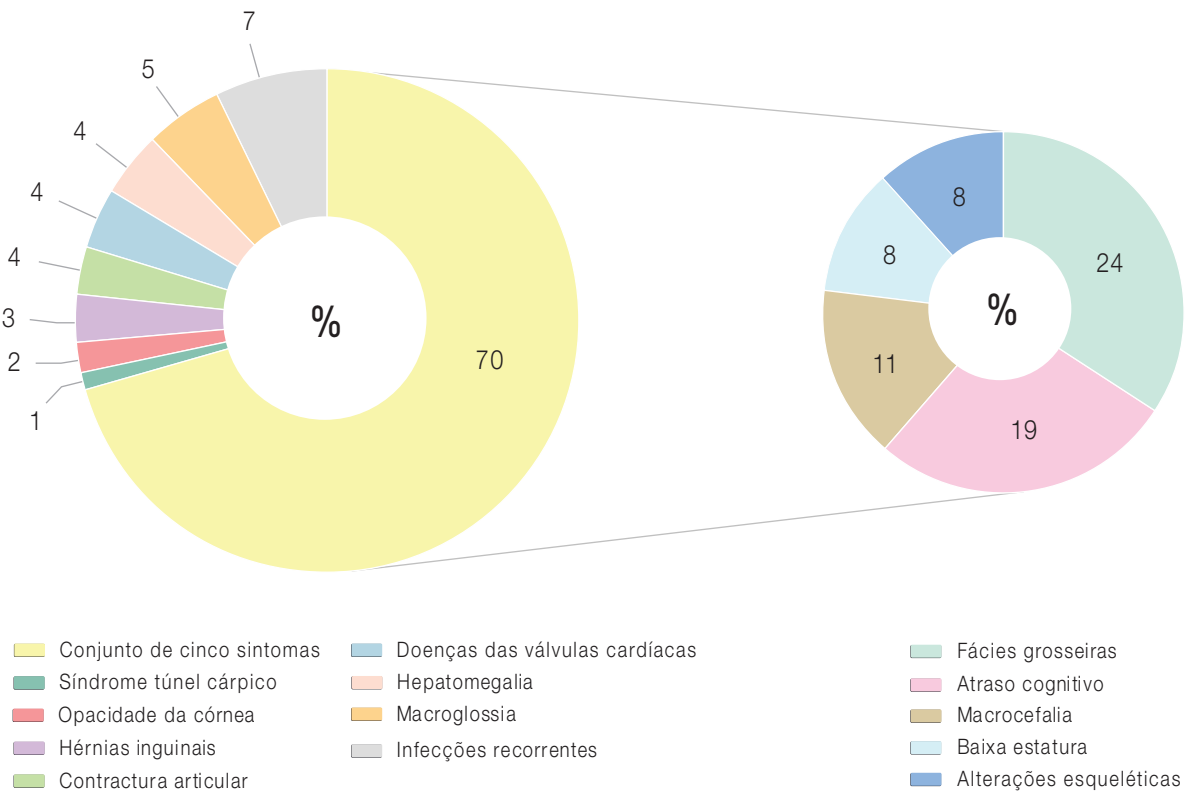


Tabela 2 : Breve descrição dos 12 casos de MPSs identificados neste estudo.

	Doença	Gene	Enzima deficiente	Idade ao diagnóstico	Atividade enzimática em DBS (nmo/h/spot)	GAGs (mg/mmol creat)	Estudo molecular
D1	MPS I	<i>IDUA</i>	$\alpha$ -iduronidase	2 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	N.D.	p.W402X./p.P533R
D2	MPS I	<i>IDUA</i>	$\alpha$ -iduronidase	2 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	56 (VR: 6.0 – 22.0)	p.W402X./p.P533R
D3	MPS II	<i>IDS</i>	Iduronate-2-sulfatase	3 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	79 (VR: 9.0 – 20.0)	GAATC> AGAGG (IDSP1> IDS)+
D4	glangliosidosis GM1	<i>GLB1</i>	$\beta$ -galactosidase	10 meses	0.09 (VR: 2.0 – 7.0)	104 (VR: 4.0 – 31.0)	c.588-89insT/ p.W527X
D5	glangliosidosis GM1	<i>GLB1</i>	$\beta$ -galactosidase	10 anos	0.05 (VR: 0.2 – 7.0)	11 (VR: 4.0 – 11.0)	p.R201H/ c.1572_1577insG
D6	MPS I	<i>IDUA</i>	$\alpha$ -iduronidase	3 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	107 (VR: 6.0 – 16.0)	c.144-146delT ( R48del)/p.W402X
D7	MPS I	<i>IDUA</i>	$\alpha$ -iduronidase	6 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	88 (VR: 4.0 – 11.0)	p.P533R/p.P533R
D8	MPS I	<i>IDUA</i>	$\alpha$ -iduronidase	2 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	46,5 (VR: 6.0 – 22.0)	p.P533R/p.P533R
D9	MPS IIIB	<i>NAGLU</i>	N-acetyl- $\alpha$ -D-glucosaminidase	4 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.6)	25 (VR: 6.0 – 22.0)	p.N435T/p.R643C
D10	MPS VI	<i>ARSB</i>	Ariisulfatase B	2 anos	0.02 (VR: 0.1 – 0.5)	N.D.	p.D53G/p.L72R
D11	MPS IIIB	<i>NAGLU</i>	N-acetyl- $\alpha$ -D-glucosaminidase	9 anos	0.01 (VR: 0.1 – 0.9)	N.D.	p.Gln662*/p.Gln662*
D12	MPS IVA	<i>GALNS</i>	Galactose-6-sulfatase	N.D.	0.01 (VR: 0.02 – 0.20)	N.D.	p.A291T/ p.A291T

D - Doente; VR - Valores de Referência; N.D. - Não disponível; + - troca entre o pseudogene e o gene; \* - codão stop

## Discussão

Este estudo, assim como um similar a decorrer em Espanha, tem uma parte educacional, com ênfase nos principais sinais de alerta de um grupo de doenças raras, que afetam 4,8 em 100.000 pessoas, que por vezes passam despercebidos ou são erroneamente diagnosticados como outra patologia, devido ao seu envolvimento multissistémico (15,16).

Por outro lado, o projeto FIND, devido à forma fácil e económica de obter uma amostra para análise, associada à baixa quantidade de amostra de sangue necessária para realizar um ensaio enzimático, disponibiliza aos médicos uma ferramenta para caracterizar doentes pediátricos com sintomas de MPS. Devido à sua estabilidade, a colheita de sangue em papel filtro pode ser enviada por correio normal, sem a necessidade de transporte especial, permitindo estudos de populações de alto risco, o que não é possível com um tubo de sangue total.

Este estudo permite simultaneamente o diagnóstico de um grupo de patologias que compartilham muitas características clínicas em idade pediátrica. Nesta população pediátrica de alto risco, temos uma incidência de MPSs de 1 em 32 doentes estudados. Em 60% dos doentes identificados, a idade média de diagnóstico foi de 3 anos, o que é inferior em comparação com a idade média de diagnóstico para MPSs descrita por Pinto, *et al.* (17).

Este estudo revela, para além da eficácia desta abordagem, que foi bem-sucedido também na parte educacional para este grupo de doenças. Por outro lado, ao comparar o estudo com projetos similares, que basicamente diagnosticam MPSs e mucopolisacarídeos, medindo a quantidade de armazenamento de GAGs, o nosso estudo tem a possibilidade de disponibilizar um diagnóstico diferencial, como gangliosidoses tipo 1, deficiência múltipla de sulfatases e também galactosialidoses (7,8,18,19).

## \_Conclusão

O projeto FIND permitiu a identificação de 12 doentes com mucopolissacaridoses (MPSs) e a sua referenciação para os respetivos centros de tratamento.

Este estudo revela a eficácia e utilidade da abordagem diferenciada do projeto FIND. Para além da sua vertente educativa, coloca à disposição dos clínicos um ótimo meio para a identificação e caracterização de casos sintomáticos de MPS em idade pediátrica.

Uma intervenção terapêutica precoce, evita o aparecimento de sintomas mais graves.

## Referências bibliográficas:

- (1) Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. IN: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. (eds). The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th ed. New York: McGrawHill, 2001, pp. 3421-53. <https://doi.org/10.1036/ommbid.165>
- (2) Coutinho MF, Lacerda L, Alves S. Glycosaminoglycan storage disorders: a review. *Biochem Res Int.* 2012;2012:471325. <https://doi.org/10.1155/2012/471325>
- (3) Caciotti A, Garman SC, Rivera-Colón Y, et al. GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: an update on genetic alterations and clinical findings. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jul;1812(7):782-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.018>
- (4) Muenzer J. Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford).* 2011 Dec;50(Suppl 5):v4-12. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker394>. Review.
- (5) Lei HL, Ye J, Qiu WJ, et al. Beta-galactosidase deficiencies and novel GLB1 mutations in three Chinese patients with Morquio B disease or GM1 gangliosidosis. *World J Pediatr.* 2012 Nov;8(4):359-62. <https://doi.org/10.1007/s12519-012-0382-0>.
- (6) Cimaz R, Vijay S, Haase C, et al. Attenuated type I mucopolysaccharidosis in the differential diagnosis of juvenile idiopathic arthritis: a series of 13 patients with Scheie syndrome. *Clin Exp Rheumatol.* 2006 Mar-Apr;24(2):196-202. <https://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=2821>
- (7) Giugliani R, Ramaswami U, Tylki-Szymańska A, et al. The mucopolysaccharidoses. IN: Metha AB, Winchester B (eds). *Lysosomal Storage Disorders – A Practical Guide.* Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 2012, pp. 94-100. <https://doi.org/10.1002/9781119697312.ch16>
- (8) Giugliani R, Federhen A, Vairo F, et al. Emerging drugs for the treatment of mucopolysaccharidoses. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2016;21(1):9-26. <https://doi.org/10.1517/14728214.2016.1123690>
- (9) de Ru MH, Boelens JJ, Das AM, et al. Enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stem cell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure. *Orphanet J Rare Dis.* 2011 Aug 10;6:55. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-55>
- (10) Laraway S, Breen C, Mercer J, et al. Does early use of enzyme replacement therapy alter the natural history of mucopolysaccharidosis I? Experience in three siblings. *Mol Genet Metab.* 2013 Jul;109(3):315-6. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.04.023>
- (11) Somanadhan S, Larkin PJ. Parents' experiences of living with, and caring for children, adolescents and young adults with Mucopolysaccharidosis (MPS). *Orphanet J Rare Dis.* 2016 Oct 10;11(1):138. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0521-0>
- (12) Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, et al. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem.* 2001 Dec;47(12):2098-102. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.12.2098>
- (13) Civaliero G, Michelin K, de Mari J, et al. Twelve different enzyme assays on dried-blood filter paper samples for detection of patients with selected inherited lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta.* 2006 Oct;372(1-2):98-102. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.03.029>
- (14) Whiteman P. The quantitative determination of glycosaminoglycans in urine with Alcian Blue 8GX. *Biochem J.* 1973 Feb;131(2):351-7. <https://doi.org/10.1042/bj1310351>
- (15) Colón Mejeras C, Álvarez González JV, Couce Pico ML. Proyecto FIND. Resultados del primer año de trabajo en la detección precoz de las mucopolisacaridoses. *Acta Pediatr Esp.* 2015;73(10): 265-67. <https://www.actapediatrica.com/index.php/secciones/originales/1176-proyecto-find-resultados-del-primer-ano-de-trabajo-en-la-deteccion-precoz-de-las-mucopolisacaridoses>
- (16) Colón C, Álvarez JV, Castaño C, et al. A selective screening program for the early detection of mucopolysaccharidosis: Results of the FIND project - a 2-year follow-up study. *Medicine (Baltimore).* 2017 May;96(19):e6887. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006887>
- (17) Pinto R, Caseiro C, Lemos M, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur J Hum Genet.* 2004 Feb;12(2):87-92. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201044>
- (18) Caciotti A, Catarzi S, Tonin R, et al. Galactosialidosis: review and analysis of CTSA gene mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 2013 Aug 2;8:114. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-114>. Review.
- (19) Caciotti A, Garman SC, Rivera-Colón Y, et al. GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: an update on genetic alterations and clinical findings. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jul;1812(7):782-90. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.03.018>

## \_ Lagos ornamentais como reservatórios de microrganismos resistentes a antimicrobianos

### Ornamental lakes as potential reservoirs for microorganisms resistant to antimicrobial agents

João Rodrigues<sup>1</sup>, Rui Matias<sup>1</sup>, Luísa Jordão<sup>2</sup>

maria.jordao@insa.min-saude.pt

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

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

#### \_Resumo

Os espaços verdes nas grandes cidades têm ganho uma importância crescente para a qualidade de vida e saúde da população. Os lagos e fontes ornamentais presentes nestes espaços são muito atrativos, mas podem esconder alguns perigos.

Neste estudo foi avaliada mensalmente durante um ano a flora bacteriana (planctónica e organizada em biofilmes) presente num lago ornamental de um parque urbano situado em Lisboa (Portugal).

Foram identificadas bactérias pertencentes a 14 Géneros diferentes, mas apenas as *Aeromonas* spp. foram identificadas em todas as colheitas na água e/ou biofilmes sendo consideradas residentes. A suscetibilidade aos antibióticos e à cloração foram avaliadas para esta população residente. Os resultados obtidos permitiram identificar um grupo de bactérias residentes que não são alvo de pesquisa dedicada de acordo com a legislação em vigor em Portugal. O nível de eficácia da cloração na eliminação de biofilmes destes microrganismos sugere a necessidade de monitorização e/ou uso de métodos de desinfeção mais eficazes.

#### \_Abstract

Urban parks and other green spaces in large cities have gained increasing importance for the quality of life and health of inhabitants. The lakes and ornamental fountains present in these spaces are very attractive, but can hide some dangers.

In this study, the bacterial flora (planktonic and organized in biofilms) present in an ornamental lake in an urban park located in Lisbon (Portugal) was evaluated monthly for a year.

Bacteria from 14 different Genus were identified, but only *Aeromonas* spp. were identified in all water collections and/or biofilms being considered as residents. Susceptibility to antibiotics and chlorination were assessed for this resident population.

The obtained results allowed the identification of a resident bacterial group that are not target of dedicated research in accordance with the legislation in force in Portugal. The level of effectiveness of chlorination in eradicating biofilms of these microorganisms suggests the need for monitoring and/or use of more effective disinfection methods.

#### \_Introdução

A vida nas grandes cidades e respetivas áreas metropolitanas tem tanto de conveniente como de problemático e estressante. Uma forma de combater estes fatores negativos, que tem ganho crescente popularidade, é usufruir do tempo livre nos parques das cidades, praticando desportos ao ar livre ou simplesmente interagindo com a natureza. Nos últimos tempos tem-se assistido a uma revitalização das áreas verdes nestes aglomerados urbanos com a recuperação de jardins e parques. Estas áreas são benéficas para a saúde pública e a preservação ambiental. Entre os contributos positivos para a saúde pública destaca-se a prática de atividade física com impacto na condição psicológica e interações sociais (1).

Na maioria dos parques existem lagos artificiais, fontes ornamentais ou outros cursos de água. A água é essencial à vida e promove o bem-estar geral. No entanto, pode servir de reservatório para agentes infecciosos e químicos tóxicos constituindo uma ameaça para a saúde humana. Por exemplo, as fontes decorativas têm sido relacionadas com surtos da doença do Legionário (2). Nas águas ornamentais habitam frequentemente animais como aves e peixes ornamentais que podem introduzir agentes microbianos potencialmente patogénicos para o Homem como por exemplo as *Aeromonas* spp. (3). As *Aeromonas* spp., ubíquas em diversas massas de água, embora sejam maioritariamente associadas a infeções em peixes, podem provocar infeções no Homem que variam entre desarranjos gastrointestinais, infeções do globo ocular e septicémia que pode ser fatal (4,5).

A existência de multirresistência a antimicrobianos em *Aeromonas spp.* isoladas de peixes e água está descrita (6-8). O crescente uso de antibióticos na saúde humana, animal e vegetal associado à capacidade de formação de biofilmes pelos microrganismos (9) tem contribuído para a diminuição da sua eficácia representando um grave problema de saúde pública.

No ambiente, os microrganismos persistem preferencialmente em biofilmes definidos como comunidades microbianas bem estruturadas constituídas por microrganismos e pela matriz extracelular por eles secretada (10). A presença de biofilmes nos sistemas de abastecimento de água pode contribuir para diminuir a eficácia dos procedimentos de desinfecção, como a cloragem (11). O uso generalizado deste processo de desinfecção contribuiu para a seleção de bactérias resistentes ao cloro, por mecanismos ainda não elucidados na totalidade (12,13), podendo representar um problema para a saúde pública (14).

## \_Objetivos

Este trabalho tem como objetivos: i) caracterizar a população bacteriana presente num lago ornamental localizado num parque urbano de Lisboa e ii) avaliar a suscetibilidade dos isolados do único grupo bacteriano residente (*Aeromonas spp.*) a agentes antimicrobianos.

## \_Metodologia

### Amostragem

As amostras foram recolhidas num lago ornamental da região de Lisboa (Portugal) entre março de 2016 e fevereiro de 2017 com uma periodicidade mensal. A recolha foi efetuada num frasco estéril (100 mL) ou com zaragatoas estéreis numa área de 10 cm<sup>2</sup> para análise da água ou do biofilme, respetivamente (15). O acondicionamento e transporte da amostra foi efetuado como descrito anteriormente. A temperatura da água, pH e concentração de cloro foram determinadas no local como descrito anteriormente (16).

### Caracterização microbiológica das amostras

As amostras de água e biofilmes foram processadas como descrito anteriormente (15). Duma forma resumida, 10 mL de água foram filtrados através duma membrana com poro de 0,45 µm. Os filtros foram transferidos para meio Drigalski e Muller Hinton (MH) agar e incubados a 30°C ou 37°C durante 24 horas. Os biofilmes foram dispersos em 10 mL de PBS e processados da mesma forma. As bactérias presentes nos meios de cultura foram identificadas por métodos bioquímicos ou por espectrometria de massa usando o VITEK2 ou o Vitek-MS Legacy, respetivamente.

### Caracterização da população de *Aeromonas spp.* (identificação e perfil de resistência a antibióticos)

Os isolados de *Aeromonas spp.* foram cultivados durante 18h a 37°C em MH agar. O ADN foi extraído destas culturas frescas usando o Kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue de acordo com as instruções do fabricante. A identificação de isolados de *Aeromonas* em nível de espécie foi confirmada por sequenciação de 16S rRNA como descrito anteriormente (16).

A atividade antimicrobiana foi testada utilizando o método de difusão em disco conforme descrito pela EUCAST. Resumidamente, uma suspensão bacteriana com uma turvação de 0,5 McFarland foi inoculada em MH agar e testada com os seguintes antibióticos (Oxoid): ceftazidima (CAZ 10 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), levofloxacina (LEV 5 µg), trimetoprima-sulfametoxazol (STX 25 µg), cefoxitina (FOX 30 µg), imipenem (IMP 10 µg), meropenem (MEM 10 µg) e gentamicina (CN 30 µg). Após incubação a 35 ± 1° C durante 18h ± 2h procedeu-se à leitura dos halos de inibição. Os resultados foram interpretados de acordo com as diretrizes do EUCAST para *Aeromonas spp.* (CAZ, CIP, LEV e STX) quando disponíveis (17) e de acordo com Skwor e colegas para *Enterobacteriaceae* (FOX, IMP, MEM e CN) (8).

### Avaliação da produção de biofilmes por *Aeromonas* spp.

O ensaio foi realizado conforme descrito antes por Nascimento e colegas (16). A produção de biofilme foi avaliada pelo método de coloração com cristal violeta após 24h de incubação; sendo as bactérias classificadas quanto à sua capacidade de formar biofilme de acordo com o critério estabelecido por Stepanovic (18) que define as seguintes categorias: fortes (SBP), moderados (MBP), fracos (WBP) produtores de biofilmes e não produtores de biofilmes (NBP).

### Avaliação do efeito da cloragem em biofilmes de *Aeromonas* spp.

Os isolados de *A. veronii* classificados como SBP foram selecionados para este ensaio tendo sido usados biofilmes com 24h. Os biofilmes foram lavados de forma a remover as bactérias planctónicas e incubados durante 3h à temperatura ambiente com agitação com água (Controlo) ou mistura de cloragem. Esta mistura foi preparada adicionando NaOCl 14% à água de nascente, acidificada até pH 3, tendo o cloro livre sido doseado por fotometria usando o *kit* Lovibond® *Water Testing*, de acordo com as instruções do fabricante. O volume da solução de NaOCl foi ajustado de forma a obter uma concentração de cloro livre de aproximadamente 10 mg/L. Decorridas 3h, foi adicionada uma solução de amónia a 24% até se obter um pH neutro. A viabilidade do biofilme foi avaliada através do ensaio de MTT como descrito por Nascimento e colegas (16).

### \_Resultados e discussão

Este estudo começou com a identificação da população bacterianas e de algumas características físico químicas da água de um lago ornamental de um parque localizado em Lisboa. Os resultados dos parâmetros físico-químicos são apresentados na **tabela 1**. A temperatura da água variou entre os 14°C e os 29°C de acordo com as estações do ano. Um pH ligeiramente alcalino foi constante ao longo do estudo assim como uma baixa concentração de cloro que em sete dos doze meses do estudo foi inferior ao limite de deteção do método (0,05 mg/L).

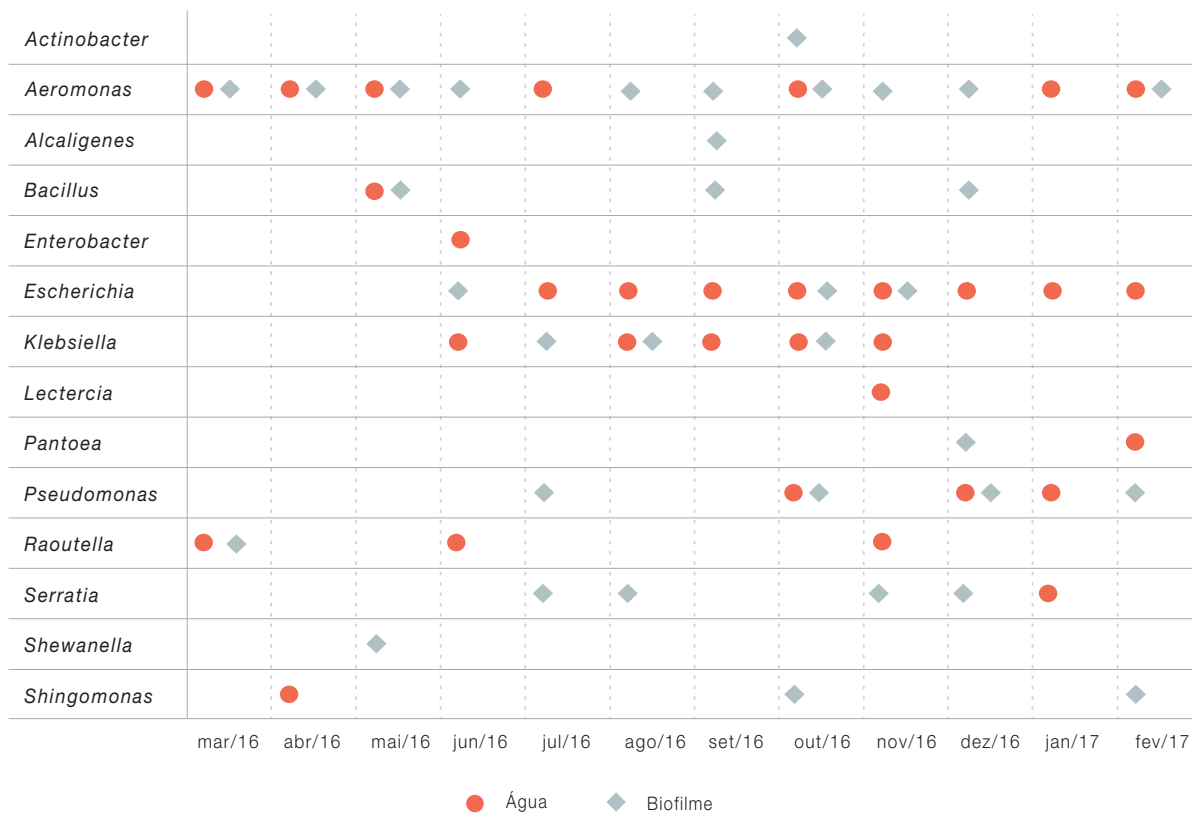
Tabela 1: Características físico-químicas da água.

Colheita	Temperatura (°C)	pH	Cloro (mg/L)
março 2016	14,7	7,93	0,16
abril 2016	17,2	8,18	0,10
maio 2016	19,9	8,95	0,05
junho 2016	25,0	8,02	---
julho 2016	27,0	8,50	---
agosto 2016	29,0	7,53	---
setembro 2016	19,6	7,60	---
outubro 2016	20,0	8,05	---
novembro 2016	17,0	8,01	---
dezembro 2016	17,0	8,05	---
janeiro 2017	17,0	8,14	0,16
fevereiro 2017	14,0	7,91	0,10

(---) valor inferior a 0,05 mg/L

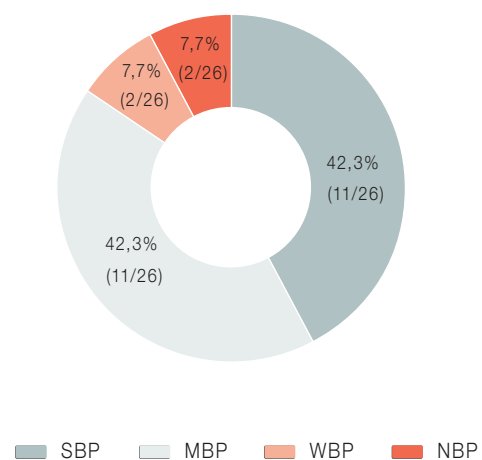
No lago ornamental estudado foram identificados nas amostras de água e biofilmes bactérias pertencentes a 14 Géneros distintos (**gráfico 1**). A ocorrência das diferentes bactérias foi distinta existindo bactérias isoladas exclusivamente na água (*Enterobacter cloacae* complex e *Lectercia adecarboxylata*) ou no biofilme (*Actinobacter lwofii*, *Alcaligenes faecalis* spp. *faecalis* e *Shewanella putrefaciens*); contudo, a maioria das bactérias foram isoladas da água e/ou biofilme (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Raoutella*, *Serratia* e *Shingomonas*) simultaneamente ou em colheitas distintas. Neste grupo destacamos *Serratia* (*S. fonticola*, *S. marcescens* e *S. plymuthica*) e *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. oryzihabitans* e *P. putida*) isoladas em cinco colheitas; *Klebsiella* (*K. oxytoca* e *K. pneumoniae*) isoladas em seis colheitas; *Escherichia* (*E. fergusonii* e *E. coli*) isoladas em nove colheitas e *Aeromonas* (*A. hydrophyla/caviae*, *A. sobria* e *A. veronii*) isoladas em todas as colheitas e como tal consideradas residentes. A presença de *E. coli* (indicador de contaminação fecal) e bactérias associadas a infeções no Homem como por exemplo *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. alerta para a necessidade de monitorizar as águas ornamentais (19,20).

Gráfico 1: Caracterização da população bacteriana de um lago ornamental durante o período de um ano.



No caso da população residente de *Aeromonas* spp., constituída por 26 isolados, foi realizado um estudo mais detalhado. A capacidade de formar biofilme foi avaliada tendo os isolados sido classificados em: não formadores de biofilme (NBP), formadores de biofilme fracos (WBP) moderados (MBP) e fortes (SBP). A maioria dos isolados demonstrou ser um forte formador de biofilme (SBP- 42,3%) ou moderado formador de biofilme (MBP- 42,3%), com apenas 7,7% dos isolados a ser classificados como WBP e os restantes 7,7% como NBP (gráfico 2). Uma vez que a formação de biofilmes é considerada um mecanismo de virulência que confere aos microrganismos a capacidade de resistirem a fatores de stress, estudamos com mais detalhe os isolados classificados como SBP.

Gráfico 2: Classificação dos diferentes isolados de *A. veronii* quanto à capacidade de formarem biofilmes.



Isolado com forte (SBP), moderada (MBP), fraca (WBP) ou sem (NBP) capacidade para formar biofilme.

artigos breves\_ n. 7

Inicialmente, utilizamos a sequenciação parcial do 16S rRNA para confirmar a identificação por ViteK-MS: *A. sobria* (H<sub>2</sub>O/16/32; H<sub>2</sub>O/16/47; H<sub>2</sub>O/16/54; Biof/16/49; Biof/16/50 e Biof/16/53), *A. hydrophila/ caviae* (H<sub>2</sub>O/16/51) e *A. veronii* (H<sub>2</sub>O/16/52 e Biof/16/48). Os resultados obtidos pelos dois métodos foram concordantes apenas para dois dos nove isolados uma vez que por sequenciação parcial do 16S RNA todos os isolados foram classificados como *A. veronii*. Este resultado pode ser explicado pelo fato de *A. veronii* e *A. sobria* serem geneticamente muito próximas sendo difíceis de diferenciar e por o Vitek-MS estar desenhado para identificação de microrganismos com interesse clínico e não ambientais. Uma vez que o método de sequenciação parcial apresenta uma maior especificidade resolvemos adotar a classificação por ele gerada, embora estejamos cientes que não está isento de erro. Uma vez que para identificação fazemos uma comparação com as seqüências depositadas em bases de dados públicas identificadas de acordo com a classificação vigente de *Aeromonas* spp., que variou ao longo do tempo, tal pode condicionar o resultado final (5).

De seguida avaliamos a suscetibilidades dos diferentes isolados a um painel constituído por oito antibióticos: duas cefalosporinas (ceftazidima- CAZ10, cefoxitina- FOX30), dois carbapenemos (imipenem-IMP10 e meropenem-MEM10), duas fluorquinolonas (ciprofloxacina- CIP5 e levofloxacina- LEV 5), um aminoglicosido (CN30) e sulfometoxazol (STX25). Todos os isolados de *A. veronii* apresentam resistência a um ou mais antibióticos (tabela 2): três isolados (H<sub>2</sub>O/16/47; H<sub>2</sub>O/16/52 e Biof/16/50) são resistentes a um antibiótico (CN30); quatro isolados são resistentes a dois antibióticos sendo que um é resistente a CAZ e LEV (H<sub>2</sub>O/16/32) e os restantes três a IMP10 e CN30 (H<sub>2</sub>O/16/51; H<sub>2</sub>O/16/54; Biof/16/53); dois isolados (Biof/16/48 e Biof/16/49) são resistentes a três antibióticos (IMP10, MEM10 e CN30) sendo considerados multirresistentes (MDR). Embora a amostra seja pequena, não permitindo por isso retirar ilações, todos os isolados MDR têm origem em biofilmes que estão associados à emergência de estirpes microbianas resistentes aos antimicrobianos. O cálculo do índice de resistência múltipla aos antibióticos (MAR<sub>index</sub>) apresentado na tabela 3 revelou que as *A. veronii* têm origem numa fonte de contaminação de risco elevado (8). A existência de uma considerável resistência a antibióticos de reserva como os carbapenemos (IMP10 e MEM10) é simultaneamente surpreendente e preocupante (21).

tipla aos antibióticos (MAR<sub>index</sub>) apresentado na tabela 3 revelou que as *A. veronii* têm origem numa fonte de contaminação de risco elevado (8). A existência de uma considerável resistência a antibióticos de reserva como os carbapenemos (IMP10 e MEM10) é simultaneamente surpreendente e preocupante (21).

Tabela 2: Avaliação da suscetibilidade dos isolados de *A. veronii* aos antibióticos.

ID	CAZ10	CIP5	LEV5	STX25	FOX30	IMP10	MEM10	CN30
H <sub>2</sub> O/16/32	R	--	R	S	S	S	S	S
H <sub>2</sub> O/16/47	S	S	S	S	S	S	S	R
H <sub>2</sub> O/16/51	S	S	S	S	S	R	--	R
H <sub>2</sub> O/16/52	S	S	S	S	S	--	--	R
H <sub>2</sub> O/16/54	S	S	S	S	S	R	--	R
Biof/16/48	--	S	S	S	S	R	R	R
Biof/16/49	S	S	S	S	S	R	R	R
Biof/16/50	S	S	S	S	S	S	--	R
Biof/16/53	S	S	S	S	S	R	--	R

(R) resistente, (S) sensível e (--) sensível, com exposição aumentada, (CAZ 10) ceftazidima 10 µg, (CIP 5) ciprofloxacina 5 µg, (LEV 5) levofloxacina 5 µg, (STX 25) sulfametoxazole 25 µg, (FOX 30) cefoxitina 30 µg, (IMP10) imipenem 10 µg, (MEM10) meropenem 10 µg, (CN30) gentamicina 30 µg.

Tabela 3: Perfil de resistência da população de *A. veronii*.

Bactéria (Nº de isolados)	% (Nº) de isolados resistentes ao antibiotico <sup>a</sup>					MAR <sub>index</sub> <sup>b</sup>
	CAZ10	LEV5	IMP10	MEM10	CN30	
<i>A. veronii</i> (n=9)	11,1% (1)	11,1% (1)	55,6% (5)	22,2% (2)	88,9% (8)	0,250

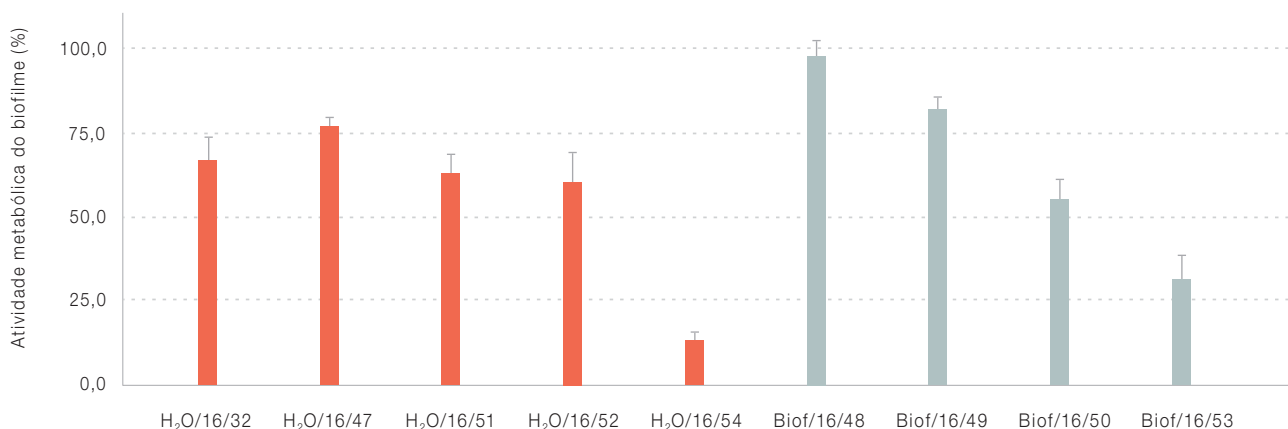
<sup>a</sup> Na tabela foram incluídos os antibióticos para os quais foi observada resistência: CAZ10: ceftazidima, 10 µg, FOX30: cefoxitina, 30 µg; IMP10: imipenem, 10µg; CN30: gentamicina, 30 µg.

<sup>b</sup> MARindex índice de resistência múltipla aos antibióticos (MAR).

A existência de reservatórios ambientais de microrganismos potencialmente patogénicos para o Homem em espaços bastante frequentados pela população pode constituir um risco. Este risco será ainda mais considerável se estes microrganismos forem resistentes a diversos antibióticos como neste caso. Uma vez que a cloragem é o método mais frequentemente utilizado no tratamento de água resolvemos testar a sua eficácia na eliminação destes microrganismos quando organizados em biofilmes. Como se pode observar na gráfico 3, apenas dois dos nove isolados apresentam uma redução superior a 50 % da sua atividade metabólica quando expostos durante 3 horas a este tratamento. Estes resultados suportam o papel de proteção a agressões externas

desempenhado pelos biofilmes, uma vez que as formas planctónicas das mesmas bactérias foram erradicadas quando submetidas às mesmas condições ou mesmo às concentrações residuais de cloro permitidas na água para consumo humano distribuída pela rede de abastecimento. A tolerância de *Aeromonas* spp. ao cloro foi descrita por outros autores (22,23) pelo que os resultados aqui apresentados relativamente à tolerância dos biofilmes demonstram a necessidade de evitar a formação dos mesmos nos sistemas de abastecimento de água, a fim de garantir a segurança da água. A elucidação dos mecanismos a tolerância ao cloro pode ser benéfica para o desenvolvimento de alternativas para os procedimentos de desinfecção da água.

Gráfico 3: Avaliação do efeito da cloragem na viabilidade do biofilme.



## Conclusão

Este trabalho contribuiu para aumentar o conhecimento relativamente ao ecossistema estudado.

A caracterização da flora microbiana permitiu identificar a presença de bactérias potencialmente patogénicas para o Homem que não são alvo de pesquisa dedicada de acordo com a legislação em vigor em Portugal.

Este trabalho mostra que é importante estudar o efeito dos processos de desinfecção de águas nas populações bacterianas.

## Referências bibliográficas:

- (1) Hunter RF, Christian H, Veitch J, et al. The impact of interventions to promote physical activity in urban green space: a systematic review and recommendations for future research. *Soc Sci Med*. 2015 Jan;124:246-56. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2014.11.051>. Epub 2014 Nov 26.
- (2) European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease in Europe, 2013. Stockholm: ECDC, 2015. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/legionnaires-disease-europe-2013>
- (3) Smith KF, Schmidt V, Rosen GE, et al. Microbial diversity and potential pathogens in ornamental fish aquarium water. *PLoS One*. 2012;7(9):e39971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039971>
- (4) Pessoa RBG, de Oliveira WF, Correia MTDS, et al. *Aeromonas* and Human Health Disorders: Clinical Approaches. *Front Microbiol*. 2022 May 31;13:868890. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.868890>

artigos breves\_ n. 7

- (5) Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Jan;23(1):35-73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>
- (6) Conte D, Palmeiro JK, Bavaroski AA, et al. Antimicrobial resistance in *Aeromonas* species isolated from aquatic environments in Brazil. *J Appl Microbiol.* 2021 Jul;131(1):169-81. <https://doi.org/10.1111/jam.14965>
- (7) Ninhin DT, Le DV, Van KV, et al. Prevalence, Virulence Gene Distribution and Alarming the Multidrug Resistance of *Aeromonas hydrophila* Associated with Disease Outbreaks in Freshwater Aquaculture. *Antibiotics (Basel).* 2021 May 4;10(5):532. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050532>
- (8) Skwor T, Stringer S, Haggerty J, et al. Prevalence of Potentially Pathogenic Antibiotic-Resistant *Aeromonas* spp. in Treated Urban Wastewater Effluents versus Recipient Riverine Populations: a 3-Year Comparative Study. *Appl Environ Microbiol.* 2020 Jan 21;86(3):e02053-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02053-19>
- (9) Martinez JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut.* 2009 Nov;157(11):2893-902. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.05119>
- (10) Ansari MI, Schiwon K, Malik A, et al. Biofilm formation by environmental bacteria. In: Malik A, Grohmann E (eds). *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development.* Springer: Rotterdam, NL, 2012. pp. 341-77.
- (11) Koizumi Y, Ichijo T, Uchii K, et al. Changes in bacterial diversity and community structure in drinking water distribution system revealed by high throughput sequencing. *J Microorg Control.* 2023;28(1):27-34. [https://doi.org/10.4265/jmc.28.1\\_27](https://doi.org/10.4265/jmc.28.1_27)
- (12) Luo LW, Wu YH, Chen GQ, et al. Chlorine-resistant bacteria (CRB) in the reverse osmosis system for wastewater reclamation: Isolation, identification and membrane fouling mechanisms. *Water Res.* 2022 Feb 1;209:117966. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117966>. Epub 2021 Dec 15.
- (13) Cho M, Kim J, Kim JY, et al. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants. *Water Res.* 2010 Jun;44(11):3410-8. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.017>
- (14) Lu YW, Liang XX, Wang CY, et al. Synergistic nanowire-assisted electroporation and chlorination for inactivation of chlorine-resistant bacteria in drinking water systems via inducing cell pores for chlorine permeation. *Water Res.* 2023 Feb 1;229:119399. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119399>. Epub 2022 Nov 20.
- (15) Sousa M, Morgado P, Rodrigues J, et al. Caracterização da população bacteriana em barragens na bacia hidrográfica do Sado. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2019;8(Supl 11):44-48. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7144>
- (16) Nascimento M, Rodrigues J, Matias R, et al. *Aeromonas* spp. in Freshwater Bodies: Antimicrobial Resistance and Biofilm Assembly. *Antibiotics (Basel).* 2024 Feb 8;13(2):166. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13020166>
- (17) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 12.0. 2022. [Online]. (consult. 2022.01.31). [https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints)
- (18) Stepanović S, Vuković D, Hola V, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007 Aug;115(8):891-9. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
- (19) Heijnen L, de Vries HJ, van Pelt G, et al. Qualitative detection of *E. coli* in distributed drinking water using real-time reverse transcription PCR targeting 16S rRNA: Validation and practical experiences. *Water Res.* 2024 Aug 1;259:121843. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121843>
- (20) LeChevallier MW, Prosser T, Stevens M. Opportunistic Pathogens in Drinking Water Distribution Systems-A Review. *Microorganisms.* 2024 Apr 30;12(5):916. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050916>
- (21) World Health Organization. AWaRe Classification of Antibiotics for Evaluation and Monitoring of Use. 2023. [Online]. (consult. 2024.01.12). <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2023.04>
- (22) Scoaris Dde O, Colacite J, Nakamura CV, et al. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008 Jan-Feb;93(1-2):111-22. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9185-z>
- (23) Wadström T, Ljungh A. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as food- and waterborne pathogens. *Int J Food Microbiol.* 1991 Apr;12(4):303-11. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90144-e](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90144-e)

## \_ Associação entre os fatores socioeconómicos da família, o excesso de peso e a perceção do consumo de refrigerantes, *snacks* doces e salgados de crianças em idade escolar durante a pandemia da COVID-19

*Association between family socioeconomic factors, overweight and perceived consumption of soft drinks, sweet and savoury snacks among schoolchildren during the COVID-19 pandemic*

Inês Figueira<sup>1</sup>, Ana Rito<sup>2</sup>

ana.rito@insa.min-saude.pt

(1) Centro de Estudos e Investigação em Dinâmicas Sociais e Saúde, Lisboa, Portugal

(2) Centro Colaborativo da Organização Mundial da Saúde para a Nutrição e Obesidade Infantil - Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

A nível global, a obesidade infantil, os hábitos alimentares e as desigualdades socioeconómicas representam um desafio contemporâneo de saúde pública. O principal objetivo deste estudo é caracterizar as associações entre os fatores socioeconómicos da família com a perceção do consumo de alimentos de elevada densidade energética durante a pandemia em comparação com o período pré-pandemia e com a prevalência de excesso de peso das crianças portuguesas em idade escolar.

Este estudo segue um desenho observacional transversal com base nos dados da 6ª ronda do COSI Portugal. A informação relativa aos indicadores socioeconómicos da família e aos hábitos alimentares das crianças durante a pandemia foi obtida através do questionário aplicado à família. A prevalência de excesso de peso infantil foi calculada tendo por base as medidas antropométricas recolhidas de acordo com um protocolo metodológico.

Durante a pandemia, a menor escolaridade, bem como o desemprego maternos estavam associados a uma diminuição do consumo de refrigerantes açucarados e de *snacks* doces e salgados, pelas crianças. O excesso de peso infantil estava relacionado com a menor escolaridade materna e paterna.

Este estudo constituiu um importante ponto de partida para um melhor entendimento das disparidades socioeconómicas no excesso de peso infantil e nos hábitos alimentares das crianças, permitindo identificar os grupos populacionais mais vulneráveis e, assim, suportar políticas e intervenções equitativas para fazer face a esta epidemia.

### \_Abstract

Globally, childhood obesity, eating habits and socioeconomic inequalities represent a contemporary Public Health challenge. The main objective of this study is to characterise the associations between family socioeconomic factors and the perceived consumption of energy-dense foods during the pandemic in comparison to pre-pandemic period, and the prevalence of overweight among Portuguese school-age children.

This study follows an observational cross-sectional design based on data from the 6th round of COSI Portugal. The information on parental socioeconomic indicators and children's eating habits during and after pandemic were obtained through family form. The data on anthropometric measurements was collected according to a methodological protocol.

*During pandemic period, maternal lower education and unemployment were associated with a decrease in children's consumption of soft drinks containing sugar and of sweet and savoury snacks. Childhood overweight was correlated with lower maternal and paternal education.*

*This study was an important step for a better understanding of socioeconomic disparities in childhood overweight and in children's eating habits in order to identify the most vulnerable population's groups and support equitable policy and practice to respond to this epidemic.*

### \_Introdução

O excesso de peso infantil (incluindo a obesidade) continua a ser considerado um dos maiores desafios de saúde pública das últimas décadas, tanto a nível nacional como internacional. Esta condição complexa afeta milhões de crianças em todo o mundo e a sua prevalência tem vindo a aumentar de forma alarmante, incluindo em Portugal afetando uma em cada três crianças (1,2). A obesidade tem sido associada a um maior risco de morbilidade e mortalidade prematura, com consequências para a saúde ao longo da vida, particularmente relacionadas com o desenvolvimento de doenças crónicas não transmissíveis (DNTs) (3). A sua etiologia é multifatorial, incluindo fatores hereditários, metabólicos, culturais, ambientais e comportamentais, em que o contexto socioeconómico e os hábitos alimentares desempenham um papel determinante (4,5).

De acordo com a literatura, os hábitos alimentares não saudáveis, caracterizados pelo elevado e frequente consumo de alimentos de elevada densidade energética, ricos em gordura, açúcar e sal, e os fatores socioeconómicos (SES), definidos pelo baixo nível de escolaridade, rendimento e

definidos pelo baixo nível de escolaridade, rendimento e desemprego dos pais, têm sido associados à obesidade infantil entre as crianças (6,7). O panorama global destaca os gradientes socioeconómicos da obesidade infantil e os seus determinantes em todas as regiões e grupos populacionais a nível internacional, com especial destaque para os grupos mais vulneráveis (8-10).

O surgimento de uma pandemia criou um cenário excepcional sem precedentes que contribuiu para uma crise social e económica com graves implicações para as crianças e as suas famílias (11). As medidas de controlo da COVID-19 alteraram os hábitos e rotinas diárias, promovendo uma mudança ao nível dos determinantes de obesidade infantil, incluindo os comportamentos relacionados com o estilo de vida e as condições socioeconómicas (12-14).

Considerando que as crianças são indivíduos vulneráveis que se encontram numa fase importante de crescimento e desenvolvimento que pode ser decisiva para o seu estado de saúde é, por isso, essencial a aposta na investigação nesta área para futuras melhorias na saúde das crianças ao longo da sua vida (15). Dado o *momentum* e a sua relevância, o impacto da pandemia da COVID-19 em questões relacionadas com a saúde tem sido um tópico de interesse global na investigação em saúde pública nos últimos anos, assim como os indicadores socioeconómicos e a obesidade infantil, ambos tópicos amplamente estudados pela comunidade científica nas últimas décadas. No entanto, em Portugal a literatura disponível sobre a prevalência de excesso de peso infantil e hábitos alimentares não saudáveis em famílias com baixo nível socioeconómico e as respetivas associações é, ainda, escassa e limitada (16-19), nomeadamente ao nível de estudos relativos aos períodos de pandemia, em particular, destinados a compreender o impacto da pandemia nos seus comportamentos de estilo de vida e o papel dos fatores socioeconómicos.

O presente estudo pretende inverter esta tendência na investigação, alargando a reduzida evidência atual e atenuando a lacuna de informação sobre estes temas relevantes.

A existência destes dados nacionais que permitam caracterizar as associações entre os fatores socioeconómicos da família com a perceção do consumo de alimentos de elevada densidade energética durante a pandemia em comparação com o período pré-pandemia e com a prevalência de excesso de peso das crianças portuguesas em idade escolar, é essencial para apoiar a conceção e implementação de futuras intervenções e políticas de saúde pública no contexto pós-pandémico.

### \_Objetivo

Este estudo tem como objetivo analisar se o nível socioeconómico da família está associado ao excesso de peso infantil (incluindo obesidade) bem como à perceção parental de consumo alimentar das crianças portuguesas em idade escolar durante a pandemia da COVID-19 comparativamente ao período pré-pandémico.

### \_Material e métodos

Este estudo observacional transversal utilizou dados da 6.<sup>a</sup> ronda do estudo COSI Portugal recolhidos no ano letivo 2021/2022. O COSI Portugal está integrado no Sistema de vigilância *Childhood Obesity Surveillance Initiative* da Organização Mundial da Saúde (OMS) Europa que decorre a cada três anos desde 2008 e tem como objetivo monitorizar o estado nutricional infantil e os seus determinantes (20). A recolha de dados seguiu o protocolo e o manual de procedimentos definidos pela OMS (21-22).

O cálculo do estado nutricional infantil foi realizado através das medições antropométricas (peso e estatura) com base nas curvas de crescimento definidas pela OMS (23). Através da aplicação do Questionário Família (autorresposta) foi recolhida a informação relativa aos hábitos alimentares da criança e as informações socioeconómicas da família.

Os indicadores socioeconómicos da família foram categorizados em: nível de escolaridade materna e paterna “baixo” (“2.º ciclo Ensino Básico ou anterior”, “3.º ciclo Ensino Básico” e “Ensino Secundário ou Técnico-Profissional”); ou “elevado”

(“Ensino Superior” e “Ensino Pós-Graduado”), situação da mãe e do pai face ao emprego (classificado como “empregado/a”, “desempregado/a” ou “inativo/a”) e perceção do nível de rendimentos (categorizado como “baixa”, “média” ou “elevada”) (24).

Relativamente aos hábitos alimentares das crianças, foi recolhida informação acerca do consumo de refrigerantes açucarados, *snacks* doces e *snacks* salgados. Os pais foram questionados sobre a sua perceção relativa ao consumo destes alimentos entre o período “durante a pandemia” e o período “pré-pandemia” (se tinha diminuído, aumentado ou se se tinha mantido igual). O período “durante a pandemia”, foi considerado pelos Encarregados de Educação/pais, como o período em que a criança permaneceu em casa, sem ir à escola, devido às restrições impostas pela pandemia da COVID-19, tendo sido considerado o período “pré-pandemia” o período que antecedeu o aparecimento da pandemia da COVID-19 em Portugal (antes de 2 de março 2020).

A análise estatística descritiva foi calculada para todas as variáveis. Para avaliar a associação entre as variáveis dependentes (perceção parental do consumo alimentar das crianças e o excesso de peso infantil) e independentes (fatores socioeconómicos), foram realizadas uma regressão logística e uma regressão multinomial, com o cálculo dos *odds ratio* (OR) e respetivos intervalos de confiança (IC) a 95%. O nível de significância estatístico utilizado foi  $p < 0,05$ .

Esta análise foi realizada com recurso ao *software* estatístico IBM SPSS Statistics 28.

## Resultados

A caracterização da amostra em estudo encontra-se descrita na [tabela 1](#).

A amostra apresenta 50,0% de crianças de ambos os sexos, com maior proporção de crianças com 7 anos de idade (49,0%), maioritariamente residentes em áreas urbanas (73,5%). No que diz respeito às variáveis socioeconómicas,

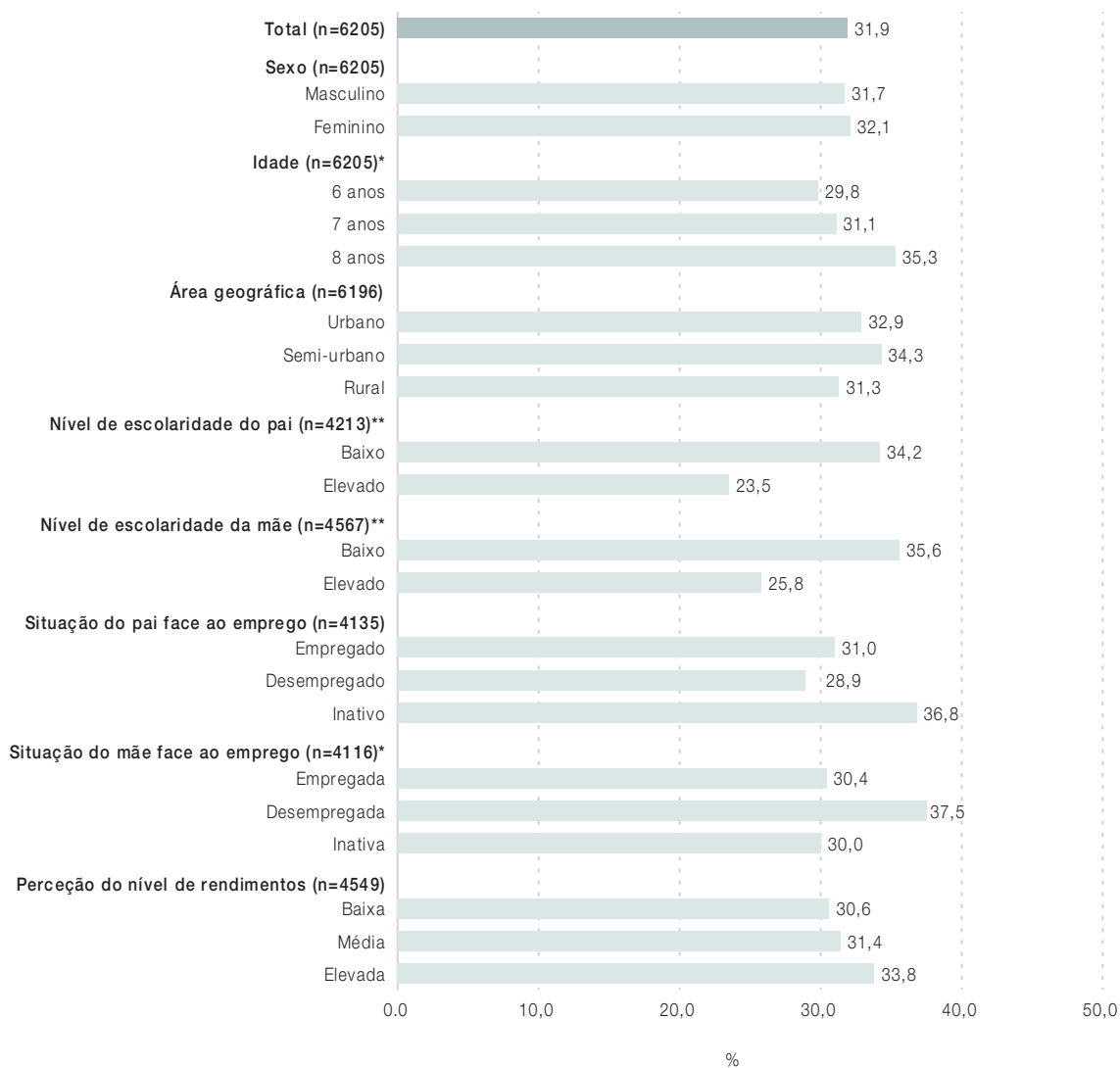
verificou-se que a maioria das crianças pertence a famílias cujos pai e mãe apresentavam um nível de escolaridade baixo (72,7% e 58,4%, respetivamente) e ambos os pais se encontravam empregados (94,4% e 83,3%, respetivamente). Destas famílias, a maioria referiu ter uma perceção de nível de rendimentos média ou baixa (69,9%).

Tabela 1: Caracterização da amostra em estudo.

Características	n	(%)
<b>Sexo (n=6205)</b>		
Masculino	3103	50,0
Feminino	3102	50,0
<b>Idade (n=6205)</b>		
6 anos	1454	23,4
7 anos	3038	49,0
8 anos	1713	27,6
<b>Área geográfica (n=6196)</b>		
Urbana	4556	73,5
Semi-urbana	890	14,4
Rural	750	12,1
<b>Nível de escolaridade do pai (n=4213)</b>		
Baixo	3062	72,7
Elevado	1151	27,3
<b>Nível de escolaridade da mãe (n=4567)</b>		
Baixo	2667	58,4
Elevado	1900	41,6
<b>Situação do pai face ao emprego (n=4135)</b>		
Empregado	3905	94,4
Desempregado	135	3,3
Inativo	95	2,3
<b>Situação da mãe face ao emprego (n=4542)</b>		
Empregada	3785	83,3
Desempregada	364	8,0
Inativa	393	8,7
<b>Perceção do nível de rendimentos (n=4549)</b>		
Baixa	955	21,0
Média	2223	48,9
Elevada	1371	30,1

Quando analisado o estado nutricional infantil, segundo o **gráfico 1** é possível constatar que 31,9% das crianças apresenta excesso de peso sendo que a prevalência é significativamente superior em crianças mais velhas (8 anos) (35,3%,  $p=0,002$ ), em crianças cujas mães e os pais apresentam menor nível de escolaridade (35,6% e 34,2%, respetivamente,  $p<0,001$ ) e nas crianças cuja mãe está desempregada (37,5%,  $p=0,013$ ).

**Gráfico 1:** Relação entre a prevalência de excesso de peso infantil (incluindo obesidade) e as características demográficas e socioeconómicas.



\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,001$ .

A **tabela 2** descreve a regressão multinomial realizada através dos valores de OR ajustados e respetivos IC, aferindo quais das variáveis em estudo, nomeadamente as relacionadas com as características socioeconómicas da família podem estar associadas com a perceção parental relativa ao consumo de refrigerantes açucarados e *snacks* doces e salgados por parte das crianças, durante pandemia da COVID-19 em relação ao período pré-pandémico.

Através da análise dos valores que tiveram significado estatístico ( $p < 0,05$ ), é possível concluir que ter uma mãe com um nível de escolaridade baixo estava associado a uma diminuição do consumo de refrigerantes açucarados (OR=1,43, IC95%: 1,11-1,84) e inversamente associado a

um aumento do consumo de *snacks* doces e salgados por parte das crianças (OR=0,58, IC95%: 0,47-0,71 e OR=0,66, IC95%: 0,52-0,83, respetivamente), durante a pandemia.

O facto de a mãe estar desempregada também estava relacionado com uma diminuição do consumo de refrigerantes açucarados, *snacks* doces e *snacks* salgados por parte das crianças (OR=1,64, IC95%: 1,13-2,38; OR=1,94, IC95%: 1,26-2,97 e OR=1,53, IC95%: 1,01-2,32, respetivamente) durante o período da COVID-19 em relação ao período pré-pandémico. Adicionalmente, as crianças cujas mães estavam desempregadas durante a pandemia apresentavam menor probabilidade de ter aumentado o consumo de *snacks* doces (OR=0,64, IC95%: 0,44-0,95) durante este período.

**Tabela 2:** Regressão multinomial das características socioeconómicas com a perceção parental do consumo alimentar de crianças durante a pandemia comparativamente ao período pré-pandémico.

Características	Refrigerantes açucarados		Snacks doces		Snacks salgados	
	Diminuiu vs. manteve-se igual OR (IC 95%)*	Aumentou vs. manteve-se igual OR (IC 95%)*	Diminuiu vs. manteve-se igual OR (IC 95%)*	Aumentou vs. manteve-se igual OR (IC 95%)*	Diminuiu vs. manteve-se igual OR (IC 95%)*	Aumentou vs. manteve-se igual OR (IC 95%)*
<b>Nível de escolaridade do pai</b>						
Elevado	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)
Baixo	1,28 (0,96-1,70)	1,08 (0,73-1,61)	1,37 (0,96-1,96)	1,22 (0,98-1,52)	1,23 (0,89-1,70)	1,19 (0,92-1,53)
<b>Nível de escolaridade da mãe</b>						
Elevado	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)
Baixo	<b>1,43 (1,11-1,84)</b>	0,77 (0,53-1,11)	1,16 (0,85-1,58)	<b>0,58 (0,47-0,71)</b>	1,32 (1,00-1,76)	<b>0,66 (0,52-0,83)</b>
<b>Situação do pai face ao emprego</b>						
Empregado	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)
Desempregado	1,08 (0,58-2,02)	1,79 (0,79-4,07)	0,55 (0,22-1,42)	1,16 (0,66-2,02)	0,93 (0,45-1,92)	1,49 (0,82-2,71)
Inativo	1,23 (0,64-2,38)	0,90 (0,27-2,97)	1,10 (0,48-2,53)	1,29 (0,69-2,42)	1,07 (0,49-2,32)	1,46 (0,74-2,91)
<b>Situação da mãe face ao emprego</b>						
Empregada	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)
Desempregada	<b>1,64 (1,13-2,38)</b>	1,38 (0,75-2,55)	<b>1,94 (1,26-2,97)</b>	1,10 (0,76-1,60)	<b>1,53 (1,01-2,32)</b>	0,98 (0,63-1,50)
Inativa	1,24 (0,86-1,78)	1,08 (0,59-1,99)	1,21 (0,78-1,87)	<b>0,64 (0,44-0,95)</b>	1,27 (0,85-1,89)	0,66 (0,43-1,04)
<b>Perceção do nível de rendimentos</b>						
Elevado	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)	1,00 (ref)
Médio	1,08 (0,84-1,37)	1,32 (0,91-1,93)	1,00 (0,75-1,35)	0,97 (0,79-1,20)	0,99 (0,75-1,29)	0,91 (0,72-1,16)
Baixo	0,96 (0,71-1,31)	0,90 (0,55-1,48)	0,87 (0,60-1,26)	0,94 (0,73-1,22)	0,86 (0,61-1,21)	0,89 (0,67-1,20)

\*Ajustado para o sexo e a idade da criança e para todos os outros fatores socioeconómicos presentes na tabela. Os valores a negrito indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (ref) categoria da variável considerada de referência na avaliação.

A **tabela 3** apresenta as possíveis associações entre ter ou não ter excesso de peso infantil e as características socioeconómicas da família, onde se conclui que as crianças que pertencem a uma família cuja mãe (OR=1,38, IC95%: 1,15-1,66) e o pai (OR=1,47, IC95%: 1,19-1,80) apresentam um nível de escolaridade baixo têm maiores probabilidades de apresentar excesso de peso, comparativamente às crianças que têm pais com um nível de escolaridade elevado. Pelo contrário, as crianças cujos pais têm uma perceção do nível de rendimentos média, apresentavam menor probabilidade de ter excesso de peso, comparativamente às crianças cujos pais tinham uma perceção do nível de rendimentos alta (OR=0,81, IC95%: 0,68-0,97).

**Tabela 3:** ↓ Regressão logística das características socioeconómicas com o excesso de peso infantil (incluindo obesidade).

Características	Ter excesso de peso vs. não ter excesso de peso OR (IC 95%)*
<b>Nível de escolaridade do pai</b>	
Elevado	1,00 (ref)
Baixo	<b>1,47 (1,19-1,80)</b>
<b>Nível de escolaridade da mãe</b>	
Elevado	1,00 (ref)
Baixo	<b>1,38 (1,15-1,66)</b>
<b>Situação do pai face ao emprego</b>	
Empregado	1,00 (ref)
Desempregado	0,85 (0,52-1,40)
Inativo	1,34 (0,79-2,26)
<b>Situação da mãe face ao emprego</b>	
Empregada	1,00 (ref)
Desempregada	1,24 (0,93-1,66)
Inativa	0,93 (0,70-1,24)
<b>Perceção do nível de rendimentos</b>	
Elevado	1,00 (ref)
Médio	<b>0,81 (0,68-0,97)</b>
Baixo	0,81 (0,64-1,01)

\*Ajustado para o sexo e a idade da criança e para todos os outros fatores socioeconómicos presentes na tabela. Os valores a negrito indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). (ref) categoria da variável considerada de referência na avaliação.

## \_Discussão

Os fatores socioeconómicos que caracterizam a família, como o baixo nível de escolaridade e o desemprego dos pais parecem estar associados a uma diminuição do consumo de refrigerantes açucarados e *snacks* por parte das crianças portuguesas em idade escolar durante a pandemia da COVID-19, comparativamente ao período pré-pandémico.

O período de pandemia marcado pelas medidas de contenção do vírus pautou o contexto internacional e nacional por instabilidade ao nível da situação profissional e financeira das famílias, bem como ao nível dos comportamentos de estilo de vida, nomeadamente os hábitos alimentares (25-27). Apesar do baixo nível socioeconómico da família, estar tendencialmente associado a um padrão alimentar menos saudável (12,28,29), o mesmo não se verificou neste estudo quando analisados os dados referentes ao período pandémico, baseados na perceção dos pais. Ao refletir sobre estes dados, alguns aspetos podem ajudar a compreender estes resultados.

Durante uma crise socioeconómica como a pandemia da COVID-19, em que as famílias experienciaram um nível desproporcional de dificuldades económicas e uma diminuição do rendimento disponível, o acesso e a compra de alimentos e, conseqüentemente, o consumo alimentar das famílias é afetado (30,31). Uma das possíveis explicações para os resultados deste estudo poderá ser o facto de, durante a pandemia, a situação de desemprego, os recursos financeiros limitados e o custo de vida mais elevado poderem ter limitado o rendimento disponível para a compra e aquisição de alimentos. Assim, estas famílias poderão ter tido a necessidade de dar prioridade à compra de bens alimentares essenciais para preparação e confeção de refeições caseiras, evitando o gasto de dinheiro em bens alimentares não essenciais, como os *snacks*. De facto, a literatura descreve o aumento do padrão de confeção e consumo de refeições caseiras durante recessões económicas anteriores (32,33), mas também durante a pandemia da COVID-19 (34,35).

Por outro lado, para além das restrições à circulação de pessoas, a pandemia impôs o encerramento parcial ou total de restaurantes de *fast-food*, o que poderá ter-se refletido numa diminuição do consumo dos alimentos e bebidas comercializados nestes estabelecimentos (36), contribuindo para um aumento das refeições preparadas em casa, uma vez que muitas famílias passaram mais tempo em casa, tendo mais oportunidades de cozinhar e consumir as refeições em conjunto (37-40).

Adicionalmente, de acordo com o presente estudo, o baixo nível socioeconómico da família parece estar relacionado com uma maior prevalência de excesso de peso infantil. Esta tendência é igualmente reportada e corroborada por outros estudos realizados no período anterior à pandemia (19,41-43).

Estes resultados poderão ser justificados por fatores que poderão mediar estas associações, como a disponibilidade e a acessibilidade física e económica dos produtos alimentares, e a autoeficácia e a literacia alimentar e nutricional dos indivíduos (6,44,45). Nesta perspetiva, as famílias com baixo nível socioeconómico tendem a apresentar menos recursos materiais e a frequentar ambientes mais “obesogénicos” (46-48). Por outro lado, estas famílias apresentam menos recursos psicossociais, tais como uma menor literacia em saúde e nutrição (conhecimentos, competências), e uma menor autoeficácia em relação a uma alimentação saudável (49). Estes dados são particularmente preocupantes num país onde se registam níveis reduzidos de literacia em saúde (50), e se tem verificado um aumento do custo de vida para as famílias (51) evidenciando, assim, a necessidade de agir nesta matéria.

## \_Conclusão

A obesidade infantil e os seus determinantes continuam a representar uma problemática contemporânea nas sociedades atuais, dadas as suas consequências sanitárias, sociais e económicas a curto e a longo prazo, constituindo um desafio a nível global.

Considerando os impactos sem precedentes causados pela pandemia da COVID-19 e as suas restrições, o presente estudo constituiu um passo importante para um melhor entendimento relativamente à mudança de comportamentos, nomeadamente à alteração do consumo alimentar por parte das crianças durante a pandemia da COVID-19 reportada pelo país, mas, também, da influência das disparidades socioeconómicas na prevalência do excesso de peso infantil (incluindo a obesidade).

Assim, é fundamental continuar a desenvolver investigação nesta área, nomeadamente através da avaliação e monitorização sistemática do estado nutricional da população e dos seus determinantes para melhor poder informar, planear, desenhar e implementar estratégias de intervenção equitativas, eficazes e sustentáveis.

## Referências bibliográficas:

- (1) NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet*. 2017 Dec 16;390(10113):2627-42. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32129-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3)
- (2) Rito A, Mendes S, Figueira I, et al. Childhood Obesity Surveillance Initiative: COSI Portugal 2022. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2023. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/8630>
- (3) Abdelaal M, le Roux CW, Docherty NG. Morbidity and mortality associated with obesity. *Ann Transl Med*. 2017 Apr;5(7):161. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.107>
- (4) Kansra AR, Lakkunarajah S, Jay MS. Childhood and Adolescent Obesity: A Review. *Front Pediatr*. 2020;8:581461. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.581461>
- (5) Jebelle H, Kelly AS, O'Malley G, et al. Obesity in children and adolescents: epidemiology, causes, assessment, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2022;10(5):351-65. [https://doi.org/10.1016/s2213-8587\(22\)00047-x](https://doi.org/10.1016/s2213-8587(22)00047-x)
- (6) Zarnowiecki DM, Dollman J, Parletta N. Associations between predictors of children's dietary intake and socioeconomic position: a systematic review of the literature. *Obes Rev*. 2014;15(5):375-91. <https://doi.org/10.1111/obr.12139>
- (7) Vazquez CE, Cubbin C. Socioeconomic Status and Childhood Obesity: a Review of Literature from the Past Decade to Inform Intervention Research. *Curr Obes Rep*. 2020;9(4):562-70. <https://doi.org/10.1007/s13679-020-00400-2>
- (8) Dinsa GD, Goryakin Y, Fumagalli E, et al. Obesity and socioeconomic status in developing countries: a systematic review. *Obes Rev*. 2012;13(11):1067-79. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789x.2012.01017.x>
- (9) Barrioso L, Miqueleiz E, Albaladejo R, et al. Socioeconomic position and childhood-adolescent weight status in rich countries: a systematic review, 1990-2013. *BMC Pediatr*. 2015;15:129. <https://doi.org/10.1186/s12887-015-0443-3>
- (10) Bridger Staatz C, Kelly Y, Lacey RE, et al. Socioeconomic position and body composition in childhood in high- and middle-income countries: a systematic review and narrative synthesis. *Int J Obes (Lond)*. 2021 Nov;45(11):2316-34. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00899-y>

- (11) Andrade C, Gillen M, Molina JA, et al. The Social and Economic Impact of Covid-19 on Family Functioning and Well-Being: Where do we go from here? *J Fam Econ Issues*. 2022;43(2):205-12. <https://doi.org/10.1007/s10834-022-09848-x>
- (12) Brakspear L, Boules D, Nicholls D, et al. The Impact of COVID-19-Related Living Restrictions on Eating Behaviours in Children and Adolescents: A Systematic Review. *Nutrients*. 2022;14(17):3657. <https://doi.org/10.3390/nu14173657>
- (13) Okely AD, Kariippanon KE, Guan H, et al. Global effect of COVID-19 pandemic on physical activity, sedentary behaviour and sleep among 3- to 5-year-old children: a longitudinal study of 14 countries. *BMC Public Health*. 2021;21(1):940. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-10852-3>
- (14) Nicola M, Alsaifi Z, Sohrabi C, et al. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. *Int J Surg*. 2020;78:185-93. <https://doi.org/10.1016/j.ijisu.2020.04.018>
- (15) Clark H, Coll-Seck AM, Banerjee A, et al. A future for the world's children? A WHO-UNICEF-Lancet Commission. *Lancet*. 2020;395(10224):605-58. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)32540-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)32540-1)
- (16) Moreira P, Santos S, Padrão P, et al. Food patterns according to sociodemographics, physical activity, sleeping and obesity in Portuguese children. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(3):1121-38. <https://doi.org/10.3390/ijerph7031121>
- (17) Vilela S, Oliveira A, Pinto E, et al. The influence of socioeconomic factors and family context on energy-dense food consumption among 2-year-old children. *Eur J Clin Nutr*. 2015;69(1):47-54. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.140>
- (18) Vilela S, Muresan I, Correia D, et al. The role of socio-economic factors in food consumption of Portuguese children and adolescents: results from the National Food, Nutrition and Physical Activity Survey 2015-2016. *Br J Nutr*. 2020;124(6):591-601. <https://doi.org/10.1017/s0007114520001373>
- (19) Rodrigues D, Costa D, Gama A, et al. Socioeconomic inequalities in the prevalence of overweight and obesity among Portuguese preschool-aged children: Changes from 2009 to 2016. *Am J Hum Biol*. 2022;34(1):e23582. <https://doi.org/10.1002/ajhb.23582>
- (20) Breda J, McColl K, Buon cristiano M, et al. Methodology and implementation of the WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI). *Obes Rev*. 2021;22(Suppl 6):e13215. <https://doi.org/10.1111/obr.13215>
- (21) World Health Organization. Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI) protocol 2016. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2017. <https://iris.who.int/handle/10665/354793>
- (22) World Health Organization. Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI): data collection procedures: October 2016. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2017. <https://iris.who.int/handle/10665/354792>
- (23) de Onis M, Onyango AW, Borghi E, et al. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ*. 2007;85(9):660-7. <http://dx.doi.org/10.2471/BLT.07.043497>
- (24) Fisman AS, Buon cristiano M, Williams J, et al. Socioeconomic differences in food habits among 6- to 9-year-old children from 23 countries-WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI 2015/2017). *Obes Rev*. 2021;22(-Suppl 6):e13211. <https://doi.org/10.1111/obr.13211>
- (25) Lu X, Lin Z. COVID-19, Economic Impact, Mental Health, and Coping Behaviors: A Conceptual Framework and Future Research Directions. *Front Psychol*. 2021;12:759974. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2021.759974>
- (26) Trofholz A, Hersch D, Norderud K, et al. Changes to the home food environment and parent feeding practices during the COVID-19 pandemic: A qualitative exploration. *Appetite*. 2022;169:105806. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105806>
- (27) Adams EL, Caccavale LJ, Smith D, et al. Food Insecurity, the Home Food Environment, and Parent Feeding Practices in the Era of COVID-19. *Obesity (Silver Spring)*. 2020;28(11):2056-63. <https://doi.org/10.1002/oby.22996>
- (28) Jansen E, Thapaliya G, Aghababian A, et al. Parental stress, food parenting practices and child snack intake during the COVID-19 pandemic. *Appetite*. 2021;161:105119. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105119>
- (29) Rundle AG, Park Y, Herbstman JB, et al. COVID-19-Related School Closings and Risk of Weight Gain Among Children. *Obesity (Silver Spring)*. 2020;28(6):1008-9. <https://doi.org/10.1002/oby.22813>
- (30) Hristov H, Millard J, Pravst I, et al. European household spending and socio-economic impacts on food behavior during the first wave of COVID-19. *Front Nutr*. 2022 Aug 3;9:869091. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.869091>
- (31) Geranios K, Kagabo R, Kim J. Impact of COVID-19 and Socioeconomic Status on Delayed Care and Unemployment. *Health Equity*. 2022;6(1):91-7. <https://doi.org/10.1089/heap.2021.0115>
- (32) Smith LP, Ng SW, Popkin BM. Resistant to the recession: low-income adults' maintenance of cooking and away-from-home eating behaviors during times of economic turbulence. *Am J Public Health*. 2014;104(5):840-6. <https://doi.org/10.2105/ajph.2013.301677>
- (33) Brzozowski M, Lu Y. Home Cooking, Food Consumption and Food Production among the Unemployed and Retired Households. *Canadian Public Policy / Analyse de Politiques*. 2010;36(1):107-28. <https://www.jstor.org/stable/20695159>
- (34) Ferrante MJ, Goldsmith J, Tauriello S, et al. Food Acquisition and Daily Life for U.S. Families with 4-to 8-Year-Old Children during COVID-19: Findings from a Nationally Representative Survey. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(4):1734. <https://doi.org/10.3390/ijerph18041734>
- (35) Sarda B, Delamairé C, Serry A-J, et al. Changes in home cooking and culinary practices among the French population during the COVID-19 lockdown. *Appetite*. 2022;168:105743. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105743>
- (36) King AJ, Burke LM, Halson SL, et al. The Challenge of Maintaining Metabolic Health During a Global Pandemic. *Sports Med*. 2020;50(7):1233-41. <https://doi.org/10.1007/s40279-020-01295-8>
- (37) Adams EL, Caccavale LJ, Smith D, et al. Food Insecurity, the Home Food Environment, and Parent Feeding Practices in the Era of COVID-19. *Obesity (Silver Spring)*. 2020;28(11):2056-63. <https://doi.org/10.1002/oby.22996>
- (38) Titis E. Parental Perspectives of the Impact of COVID-19 Lockdown on Food-Related Behaviors: Systematic Review. *Foods*. 2022;11(18):2851. <https://doi.org/10.3390/foods11182851>
- (39) Sarda B, Delamairé C, Serry A-J, et al. Changes in home cooking and culinary practices among the French population during the COVID-19 lockdown. *Appetite*. 2022;168:105743. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2021.105743>
- (40) Mazzolani BC, Smaira FI, Astley C, et al. Changes in Eating Habits and Sedentary Behavior During the COVID-19 Pandemic in Adolescents With Chronic Conditions. *Frontiers in Pediatrics*. 2021 Dec 13;9:714120. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.714120>
- (41) Chung A, Backholer K, Wong E, et al. Trends in child and adolescent obesity prevalence in economically advanced countries according to socioeconomic position: a systematic review. *Obes Rev*. 2016;17(3):276-95. <https://doi.org/10.1111/obr.12360>
- (42) Wu S, Ding Y, Wu F, et al. Socio-economic position as an intervention against overweight and obesity in children: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2015 Jun 26;5:11354. <https://doi.org/10.1038/srep11354>
- (43) White PA, Awad YA, Gauvin L, et al. Household income and maternal education in early childhood and risk of overweight and obesity in late childhood: Findings from seven birth cohort studies in six high-income countries. *Int J Obes (Lond)*. 2022 Sep;46(9):1703-11. <https://doi.org/10.1038/s41366-022-01171-7>
- (44) Mekonnen T, Havdal HH, Lien N, et al. Mediators of socioeconomic inequalities in dietary behaviours among youth: A systematic review. *Obes Rev*. 2020;21(7):e13016. <https://doi.org/10.1111/obr.13016>
- (45) Friel S, Pescud M, Malbon E, et al. Using systems science to understand the determinants of inequities in healthy eating. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188872>
- (46) Darmon N, Drewnowski A. Contribution of food prices and diet cost to socioeconomic disparities in diet quality and health: a systematic review and analysis. *Nutr Rev*. 2015;73(10):643-60. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv027>

artigos breves\_ n. 8

- (47) Cassady DL, Liaw K, Miller LM. Disparities in Obesity-Related Outdoor Advertising by Neighborhood Income and Race. *J Urban Health*. 2015;92(5):835-42. <https://doi.org/10.1007/s11524-015-9980-1>
- (48) van Ansem WJ, van Lenthe FJ, Schrijvers CT, et al. Socio-economic inequalities in children's snack consumption and sugar-sweetened beverage consumption: the contribution of home environmental factors. *Br J Nutr*. 2014;112(3):467-76. <https://doi.org/10.1017/s0007114514001007>
- (49) Mackenbach JD, Nelissen KGM, Dijkstra SC, et al. A Systematic Review on Socio-economic Differences in the Association between the Food Environment and Dietary Behaviors. *Nutrients*. 2019;11(9):2215. <https://doi.org/10.3390/nu11092215>
- (50) Arriaga M, Francisco R, Nogueira P, et al. Health Literacy in Portugal: Results of the Health Literacy Population Survey Project 2019-2021. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Apr 1;19(7):4225. <https://doi.org/10.3390/ijerph19074225>
- (51) Instituto Nacional de Estatística. Índice de Preços no Consumidor - Taxa de variação média anual do IPC foi 7,8% em 2022 e a taxa de variação homóloga diminuiu para 9,6% em dezembro - Dezembro de 2022. Lisboa: INE, 2023. [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_destaques&DESTAQUESdest\\_boui=577455859&DESTAQUESmodo=2&xlang=pt](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_destaques&DESTAQUESdest_boui=577455859&DESTAQUESmodo=2&xlang=pt)

## Monitorização da composição nutricional de bebidas (refrigerantes e leites aromatizados) disponíveis no mercado português em 2024: a redução de açúcar e a presença de edulcorantes?

*Monitoring the nutritional composition of drinks (soft drinks and flavored milks) available on the Portuguese market in 2024: the reduction in sugar and the presence in sweeteners?*

Andreia Lopes, Paulo Fernandes, Roberto Brazão, M. Graça Dias

andreia.lopes@insa.min-saude.pt

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

### Resumo

O consumo excessivo de açúcar está relacionado com o desenvolvimento de doenças crónicas, nomeadamente a obesidade e a diabetes tipo 2, conforme o evidenciam diversos estudos científicos. Para reduzir a prevalência deste tipo de doenças, o Governo português aprovou a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS) que, entre outros objetivos, pretende uma redução progressiva do consumo diário de açúcar.

Na qualidade de parceiros estratégicos na implementação da EIPAS, procedeu-se à monitorização do teor de açúcar nas categorias de alimentos refrigerantes e leites aromatizados, disponíveis no mercado português. Os dados foram recolhidos no comércio eletrónico das maiores cadeias de supermercados, durante o ano de 2024. Decorrente dos objetivos de reformulação e da conseqüente redução de açúcar, considerou-se relevante avaliar também a presença de edulcorantes (aditivos alimentares utilizados para adoçar os alimentos).

As medianas dos teores de açúcar foram de 4,10 g/100 mL para os refrigerantes e 2,4 g/100 mL (excluindo o valor da lactose), para os leites aromatizados. Estes valores foram comparados com os do estudo de monitorização do teor de açúcar nestes alimentos realizado em 2019, e confrontados com os limites da EIPAS de 2,5 g/100 mL, tendo sido verificada uma redução progressiva do teor de açúcar por parte da indústria alimentar.

Na categoria refrigerantes, com base na lista de ingredientes apenas 22% não continham edulcorantes. No caso dos leites aromatizados, verificou-se que 73% não continham edulcorantes.

### Abstract

Excessive sugar consumption is related to the development of chronic diseases, namely obesity and type 2 diabetes, as shown by several scientific studies. To reduce the prevalence of this type of disease, the Portuguese government approved the Integrated Strategy for the Promotion of Healthy Eating (EIPAS), which, among other objectives, aims to progressively reduce daily sugar consumption.

As strategic partners in the implementation of EIPAS, we monitored the sugar content in the soft drink and flavored milk food categories available on the Portuguese market. Data was collected in e-commerce from the largest supermarket chains, during the year 2024. Due to the reformulation objectives and the consequent reduction in sugar, it was considered relevant to also evaluate the presence of sweeteners (food

additives used to sweeten food).

The median sugar levels were 4.10 g/100 mL for soft drinks and 2.4 g/100 mL (excluding the lactose value) for flavored milks. These values were compared with those from the study monitoring the sugar content in these foods carried out in 2019, and compared with the EIPAS limits of 2.5 g/100 mL, with a progressive reduction in sugar content by the industry being verified.

In the soft drinks category, based on the list of ingredients, only 22% did not contain sweeteners. In the case of flavored milks, it was found that 73% did not contain sweeteners.

### Introdução

O excesso de peso, que inclui a pré-obesidade e a obesidade, atinge 67,6% da população adulta portuguesa e a obesidade apresenta uma prevalência de 28,7% (1). De acordo com as projeções da Organização Mundial da Saúde (OMS), Portugal, à semelhança dos outros países da região europeia da OMS, está a seguir uma trajetória de evolução que dificilmente irá permitir o cumprimento da meta relativa ao não crescimento do número de pessoas com excesso de peso e obesidade até 2025. Também o excesso de peso infantil atinge proporções elevadas. Em 2022, 31,9% das crianças dos 6 aos 8 anos apresentava excesso de peso e 13,5% vivia com obesidade (1).

A obesidade é uma doença crónica que, além de condicionar de forma significativa a qualidade de vida e o bem-estar das pessoas, constitui um fator de risco para o desenvolvimento de outras doenças muito prevalentes no nosso país, como a diabetes, as doenças cardiovasculares e as doenças oncológicas, o que a torna num dos fatores de risco que mais contribui para a carga da doença em Portugal. (1)

A OMS e a Comissão Europeia recomendam que as estratégias nacionais de alimentação e nutrição devem ter como objetivos: modificar a oferta alimentar de determinados alimentos, nomeadamente os que apresentam elevado teor de açúcar; incentivar ações de reformulação nutricional dos produtos alimentares através de uma ação articulada com a indústria alimentar; capacitar os cidadãos e profissionais que trabalham ou influenciam o consumo de alimentos para as escolhas alimentares saudáveis.

A OMS recomenda que menos de 10% do nosso consumo energético total seja proveniente de açúcares livres (açúcar adicionado a alimentos e bebidas, assim como aqueles que estão naturalmente presentes no mel, xaropes, sumos de fruta ou concentrados de fruta) e, idealmente, abaixo dos 5%, para se obterem maiores ganhos em saúde <sup>(2)</sup>.

Os refrigerantes apresentam o consumo médio mais elevado a seguir à água (88 g/dia). Os adolescentes são o grupo etário com prevalência mais elevada, destacando-se pelo consumo muito superior de bebidas açucaradas, quer de refrigerantes (161 g/dia) ou de néctares (38 g/dia) relativamente aos outros grupos etários. <sup>(3)</sup>

Em Portugal, a Estratégia Integrada para a Alimentação Saudável (EIPAS), invoca um esforço integrado para a criação de ambientes promotores da saúde, pelo que incentiva a reformulação dos produtos do mercado. Assim, no que respeita ao consumo de açúcar, preconiza que o teor de açúcar deverá ser inferior a 2,5 g por 100 mL, no caso dos alimentos líquidos. <sup>(4)</sup>

O Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, em articulação com os objetivos da EIPAS procedeu à monitorização do teor de açúcar nas categorias de alimentos refrigerantes e leites aromatizados. Decorrente dos objetivos de reformulação e da consequente redução de açúcar, considerou-se rele-

vante avaliar também a presença de edulcorantes (aditivos alimentares usados para adoçar os alimentos), como seus substitutos.

Sobre esta temática, a OMS publicou orientações acerca da utilização de edulcorantes, nas quais recomenda que a substituição de açúcares livres por edulcorantes não deve ser considerada como uma estratégia para controlar o peso corporal e reduzir o risco de doenças crónicas.

Esta recomendação assenta em evidência científica disponível que sugere que a utilização de edulcorantes não confere qualquer benefício a longo prazo na redução da gordura corporal, quer em adultos quer em crianças. Adicionalmente, estes resultados também sugerem que se podem verificar efeitos potencialmente indesejáveis do uso prolongado de edulcorantes, em particular um risco aumentado de diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e mortalidade em adultos. Importa, contudo, realçar que estas orientações são independentes das avaliações toxicológicas relativamente à segurança do consumo de edulcorantes e, portanto, não se destinam a atualizar ou substituir as orientações sobre níveis seguros ou máximos de ingestão estabelecidos pelo Comité Conjunto de Especialistas da Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO)/OMS sobre Aditivos Alimentares (JECFA) ou outros órgãos competentes. <sup>(5)</sup>

### **\_Objetivo**

Monitorizar o teor de açúcar nas categorias de alimentos, refrigerantes e leites aromatizados disponíveis no mercado português em 2024, e a presença (ou não) de edulcorantes como substitutos do açúcar, para conhecimento da realidade nacional atual e consequente apoio às autoridades de saúde, com o propósito de se atingirem as metas preconizadas pela EIPAS.

## \_Material e métodos

Procedeu-se à avaliação do teor de açúcar nas categorias alimentares refrigerantes (n=104) e leites aromatizados (n=37). Os dados foram recolhidos através da informação constante dos rótulos disponibilizados no comércio eletrónico das maiores cadeias de supermercados a operar no mercado português. Os valores obtidos foram comparados com as recomendações da EIPAS para o teor de açúcar: 2,5 g/100 mL para alimentos líquidos. Estes valores foram comparados com os valores obtidos no estudo de monitorização do teor de açúcar nestes alimentos realizado em 2019, em que se utilizou a mesma metodologia. <sup>(6)</sup>

Adicionalmente, para ambas as categorias, foi efetuado um levantamento quanto à existência de edulcorantes na lista de ingredientes.

Tendo em consideração que o rótulo exibe o teor total de açúcar, posteriormente, para os leites aromatizados, a este valor foi subtraído o teor médio de lactose, açúcar naturalmente presente nestes produtos. Para o efeito utilizou-se como referência o guia *Perfil Nutricional - Restrições à publicidade alimentar dirigida a crianças* (2019), publicado pela Direção-Geral da Saúde, por ser o documento em que se estabelece o teor de lactose no leite de 5,5 g/100 mL, com base nos teores máximos encontrados no leite disponível no mercado português <sup>(7)</sup>.

## \_Resultados e discussão

Do total de 104 refrigerantes analisados (**gráfico 1**), 34 (33%) apresentaram teores de açúcar de acordo com os limites estabelecidos pela EIPAS para alimentos líquidos, 2,5 g/100 mL. A mediana do teor de açúcar para esta categoria foi de 4,10 g/100 mL, encontrando-se acima dos valores de referência. Quanto ao valor energético, a mediana corresponde a 19 kcal/100 mL.

Numa amostra de 37 leites aromatizados (**gráfico 2**), verificou-se que nenhum cumpria os limites da EIPAS para teor de açúcar, o que está relacionado com o valor da lactose. A mediana de açúcar para esta categoria corresponde a 7,9 g/100 mL, pelo que, se a este valor retirássemos os 5,5 g/100 mL de lactose, ficaríamos com uma mediana de 2,4 g/100 mL, e, portanto, dentro dos limites estipulados pela EIPAS. Quanto ao valor energético, a mediana corresponde a 60 kcal/100 mL.

O estudo realizado em 2019 revelou para os refrigerantes e leites aromatizados medianas de 4,5 e 9,3 g /100 mL, respetivamente, o que revela em relação aos valores agora obtidos um esforço da indústria no sentido da sua redução.

Relativamente à frequência de edulcorantes, na categoria refrigerantes (n=104), observou-se que apenas 23 (22%) não continham edulcorantes na lista de ingredientes. Dos 81 (com edulcorantes), foi possível constatar que 65 (63%) possuíam mais do que um edulcorante e que 30 (29%) possuíam pelo menos três. (**tabela 1**)

Considerando apenas os refrigerantes que continham açúcar (n=87), 74% possuíam um ou mais edulcorantes.

No caso dos leites aromatizados (n=37), verificou-se que 27 (73%) não continham edulcorantes. Nos 10 leites aromatizados com edulcorantes, a sucralose e o acesulfame k surgiram em conjunto e apenas numa amostra surgiram quatro edulcorantes em simultâneo (sucralose, acesulfame k, glicosídeos de esteviol provenientes de estévia e ciclamato de sódio) (**tabela 2**).

Como limitação deste tipo de estudo aponta-se a ausência dos teores de edulcorantes na rotulagem nutricional, por não ser obrigatório, nunca permitindo avaliar reduções/aumentos ao longo do tempo. Adicionalmente, a presença de edulcorantes nestas categorias de alimentos não foi avaliada em 2019.

Gráfico 1: Teor de açúcar nos refrigerantes analisados (n=104).

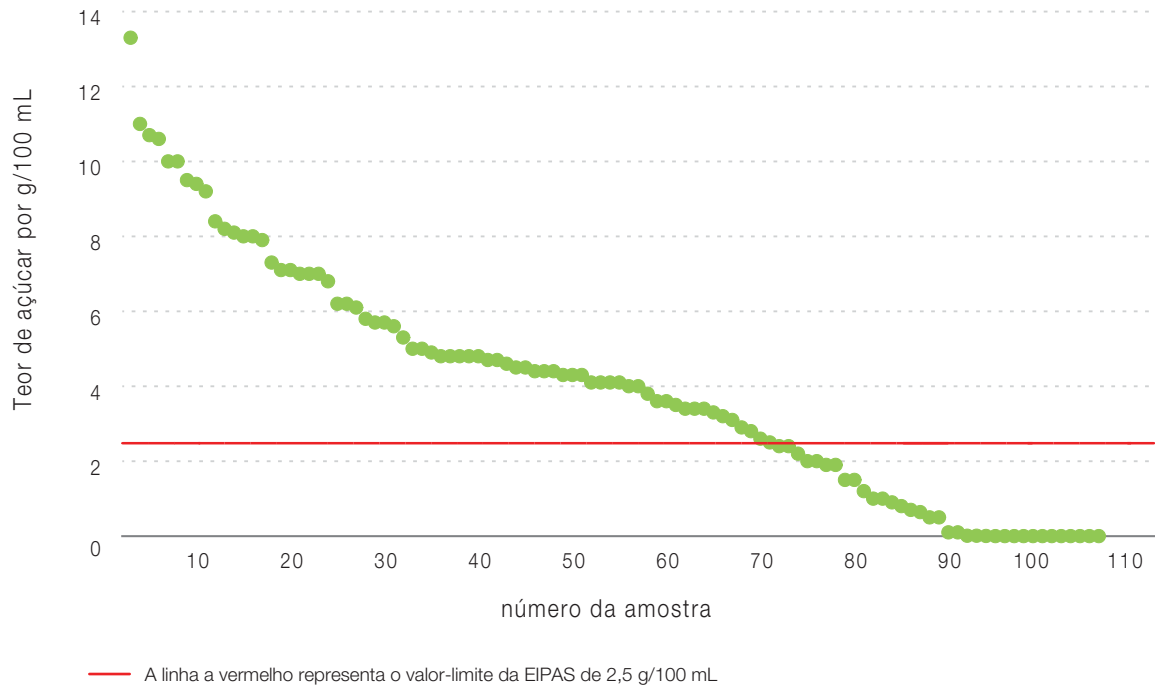


Gráfico 2: Teor de açúcar nos leites aromatizados estudados (n=37), com base na rotulagem.

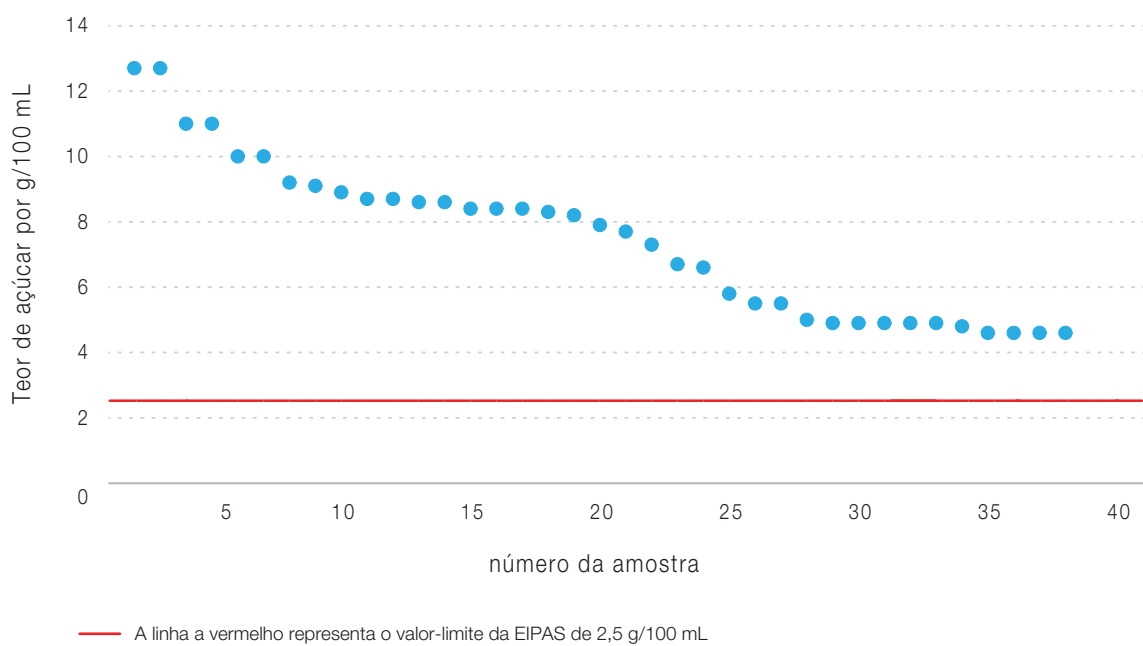


Tabela 1: ↓ Frequência de edulcorantes com base na lista de ingredientes das amostras de refrigerantes.

Refrigerantes (n=81)	
Edulcorantes	Frequência de edulcorantes (encontrados na lista de ingredientes)
Sucralose	57
Acessulfame K	52
Aspartame	24
Ácido ciclâmico e seus sais de sódio (Na) e cálcio(Ca)	18
Sacarina sódica	9
Glicosídeos de esteviol provenientes de estévia	1

Tabela 2: ↓ Frequência de edulcorantes nas amostras de leites aromatizados.

Leites aromatizados (n=10)	
Edulcorantes	Frequência de edulcorantes (encontrados na lista de ingredientes)
Sucralose	10
Acessulfame K	10
Glicosídeos de esteviol provenientes de estévia	1
Ciclamato de sódio	1

## Conclusões

A redução consistente do teor de açúcar nas categorias estudadas, demonstra o contributo da indústria para este objetivo. No entanto, 78% dos refrigerantes e 27% dos leites aromatizados continham edulcorantes.

De acordo com os valores retirados da rotulagem, os refrigerantes apresentaram uma mediana do teor de açúcar inferior à dos leites aromatizados (sem subtração do teor de açúcar naturalmente presente no leite, lactose), o que não significa que sejam mais saudáveis, já que o leite contribui para a ingestão de nutrientes como proteína, vitaminas e minerais, ao contrário dos refrigerantes.

É importante desincentivar o consumo deste tipo de bebidas, com especial enfoque para os refrigerantes, quer pelo baixo valor nutricional, quer pelo facto de o elevado consumo parecer estar também associado a um baixo consumo de água. Em relação a estas duas categorias deverá privilegiar-se o consumo de água e de leites na sua versão mais natural (sem adição de açúcar e edulcorantes).

É necessário o aumento da literacia da população, através de rotulagem mais apelativa/de mais fácil interpretação e de campanhas de sensibilização, no sentido de contribuir para que a população faça escolhas alimentares mais saudáveis.

É de referir que na população com níveis de escolaridade mais elevados há um consumo significativamente menor de refrigerantes e néctares, e maior de sumos de fruta natural e sumos 100%, relativamente aos menos escolarizados (IAN-AF) (3).

## Referências bibliográficas:

- (1) Despacho n.º 12634/2023, de 11 de dezembro. DR. 2.ª série de 2023-12-11, n.º 237:99-101. Determina a implementação de um Modelo Integrado de Cuidados para a Prevenção e Tratamento da Obesidade. <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/despacho/12634-2023-225444234>
- (2) World Health Organization. Guideline: sugars intake for adults and children. Geneva: WHO, 2015. <https://iris.who.int/handle/10665/149782>
- (3) Lopes C, Torres D, Oliveira A, et al. Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física, IAN-AF 2015-2016: relatório de resultados - Parte II (versão atualizada v.1.5 setembro 2017). Porto: Universidade do Porto, 2017. <https://ian-af.up.pt/resultados>
- (4) Despacho n.º 11418/2017, de 29 de dezembro. DR. 2.ª série de 2017-12-29, n.º 249:29595-8. Aprova a Estratégia Integrada para a Promoção da Alimentação Saudável (EIPAS). <https://dre.pt/pesquisa/-/search/114424591/details/normal?!=1>
- (5) World Health Organization. Use of non-sugar sweeteners: WHO guideline. Geneva: WHO, 2023. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240073616>
- (6) Lopes A, Fernandes P, Brazão R, et al. Monitorização do teor de açúcar em algumas categorias de alimentos disponíveis no mercado: realidade portuguesa em 2019. Boletim Epidemiológico Observações. 2020;9(27):4-7. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7233>
- (7) Direção-Geral da Saúde. Perfil Nutricional - Restrições à publicidade alimentar dirigida a crianças. Lisboa: DGS, 2019. <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/perfil-nutricional-restricoes-a-publicidade-alimentar-dirigida-a-criancas-2019-pdf.aspx>

## Monitorização da ingestão de aditivos alimentares: ferramentas de avaliação do consumo e da ingestão

### Monitoring the intake of food additives: consumption and intake assessment tools

Inês Nunes<sup>1</sup>, Elsa Vasco<sup>2</sup>

elsa.vasco@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisboa, Portugal

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

#### \_Resumo

Com a mudança nos hábitos alimentares dos consumidores ao longo do tempo e a crescente disponibilidade de alimentos processados, tornou-se difícil evitar este tipo de produtos. Esta tendência pode levar a um aumento da ingestão de aditivos alimentares pela população. Neste contexto, com o objetivo de implementar um sistema de monitorização da ingestão de aditivos alimentares pela população portuguesa, no âmbito do projeto “Monitaditivos”, coordenado pelo INSA, desenvolveram-se duas novas ferramentas: o questionário de avaliação do consumo alimentar de produtos com aditivos alimentares (QCAonline), em software REDCap; e a plataforma de avaliação da ingestão de aditivos alimentares (PAIAA), em Microsoft Access®. As duas ferramentas permitem estimar a ingestão de aditivos alimentares pela população estudada e ainda, avaliar o risco da Ingestão Diária Estimada ultrapassar a Dose Diária Admissível. As ferramentas provaram ser eficazes contribuindo para a implementação do sistema de monitorização.

#### \_Abstract

Due to changes in consumers' eating habits over time and the increasing availability of processed foods, avoiding such products has become difficult. This trend may lead to a rise in the population's intake of food additives. In this regard, with the aim of implementing a system able to monitor the intake of food additives by the Portuguese population, within the scope of the project “Monitaditivos”, coordinated by National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, two new tools were developed: a questionnaire to evaluate food consumption of products with food additives (QCAonline), in REDCap software; and the food additive intake assessment platform (PAIAA), in Microsoft Access®. Both tools enable the estimation of food additive intake within the target population and assess the risk that the Estimated Daily Intake may exceed the Acceptable Daily Intake. These tools proved to be effective in supporting the monitoring system implementation.

#### \_Introdução

Desde sempre, a humanidade procurou técnicas para conservar e aumentar a segurança dos alimentos. Assim, surgiram os aditivos alimentares, que desempenham um papel crucial na oferta alimentar moderna. São adicionados intencionalmente para facilitar o processamento, melhorar o valor nutritivo, reduzir a deterioração e modificar ou melhorar a aparência e o sabor dos alimentos, tornando-os mais atraentes para os consumidores. A União Europeia (UE) regula a autorização e a utilização de aditivos alimentares de forma a proteger a saúde dos consumidores e garantir a livre circulação dos alimentos (1). Com base em dados toxicológicos (metabolismo, toxicidade, carcinogenicidade, genotoxicidade) e características do aditivo (identificação química, fabrico, análise, destino no alimento, uso proposto), a EFSA (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar) determina a Dose Diária Admissível (DDA), o nível abaixo do qual a ingestão da substância pode ser considerada segura. Esta avaliação permite decidir se os aditivos são autorizados em doses “quantum satis” (sem teor numérico máximo e usados conforme boas práticas de fabrico), com limites máximos de utilização (LMU), ou se não são autorizados (1). Apenas os aditivos considerados seguros, para as utilizações propostas, estão na lista da UE (2). Atualmente, devido às mudanças nos hábitos alimentares, é difícil evitar alimentos processados, o que pode resultar numa maior ingestão de aditivos alimentares, especialmente em grupos vulneráveis como crianças e jovens, devido à maior ingestão por peso corporal. Neste sentido, conforme o artigo n.º 27 do Regulamento (UE) n.º 1333/2008 (1), a Comissão Europeia exige aos Estados-membros a monitorização do consumo e do uso de aditivos alimentares de forma a assegurar

que esta utilização não excede a DDA estabelecida para cada aditivo. O projeto “Monitaditivos”, em desenvolvimento no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), visa criar um sistema de monitorização da ingestão de aditivos alimentares em Portugal. Através deste sistema, pretende-se estimar a ingestão diária dos aditivos alimentares, combinando os dados de consumo alimentar da população com dados de teor de cada aditivo por género alimentício, de modo a avaliar o risco associado à ingestão, por comparação com a DDA.

### \_Objetivo

No presente trabalho, pretende-se apresentar duas novas ferramentas desenvolvidas para a implementação do sistema de monitorização da ingestão de aditivos alimentares: o questionário de avaliação do consumo alimentar de produtos com aditivos alimentares (QCAonline) e a plataforma de avaliação da ingestão de aditivos alimentares (PAIAA).

### \_Materiais e métodos

A monitorização da ingestão de aditivos alimentares requer a integração de dados sociodemográficos, antropométricos, de consumo alimentar e de teor de aditivos alimentares nos alimentos. Neste sentido foram desenvolvidas as ferramentas QCAonline e PAIAA.

O questionário QCAonline, elaborado com recurso à aplicação *web* REDCap, que cria e gere questionários e bases de dados *online*, regista os hábitos alimentares das 24 horas anteriores, em dois dias distintos. O QCAonline foi construído com três seções diferentes: dados sociodemográficos (idade, sexo, distrito e escolaridade), dados antropométricos (peso e altura) e dados de consumo alimentar (de 24 alimentos, com porções e horários). Os alimentos do questionário foram selecionados de entre as categorias de géneros alimentícios com adição de aditivos alimentares, conforme o Regulamento n.º 1129/2011 (2).

A plataforma PAIAA, desenvolvida em Microsoft Access®, que funciona como base de dados, calcula a Ingestão Diária Estimada (IDE), compara a IDE com a Dose Diária Admissível (DDA) e caracteriza os resultados obtidos. As bases de dados criadas estão organizadas em tabelas e os cálculos na forma de consultas. Para o cálculo da IDE (mg/kg peso corporal/dia), aplicou-se a expressão (1), em que “c” corresponde ao teor do aditivo no alimento (mg/kg ou mg/L) ou ao Limite Máximo de Utilização (LMU), “x” ao consumo do alimento (kg/dia, ou L/dia) e “p” ao peso corporal (kg). A avaliação da ingestão compara a IDE com a DDA: se a IDE for inferior à DDA, a plataforma indica “A dose diária admissível não foi excedida”; se for superior, indica “A dose diária admissível foi excedida”.

$$\text{Ingestão diária estimada (mg/kg peso corporal/dia)} = \sum \frac{c_i \times x_i}{p_i} \quad (1)$$

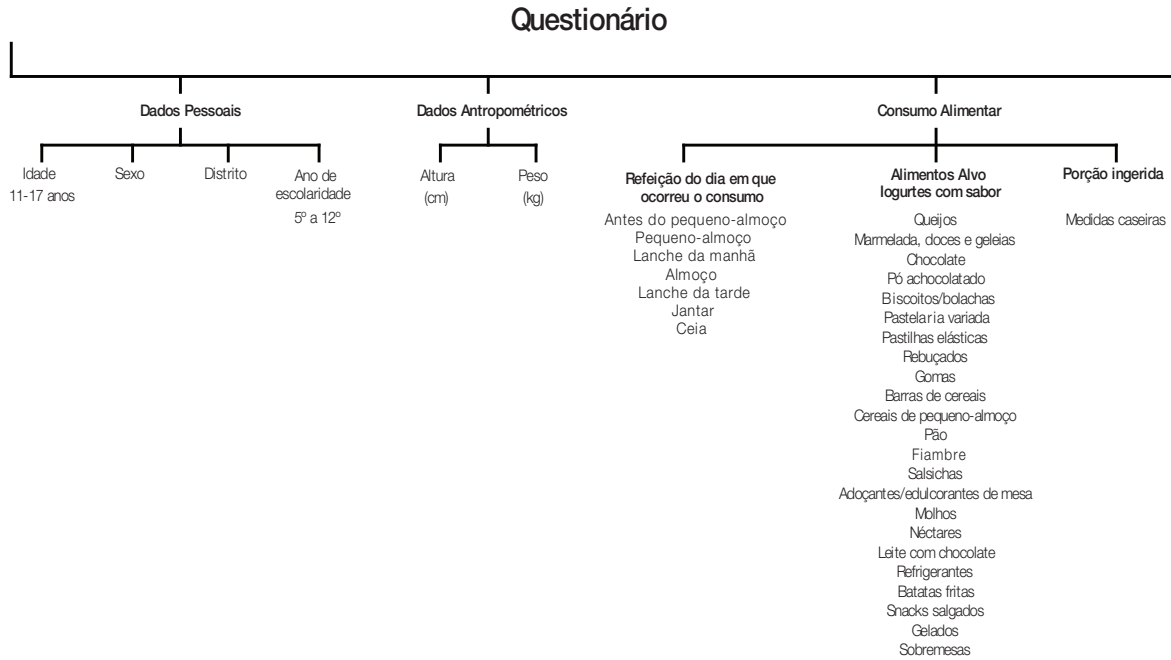
A caracterização dos resultados é organizada para a amostra populacional (sexo, idade e estado nutricional) e para cada aditivo alimentar. A plataforma encontra-se detalhadamente descrita em Nunes (3).

### \_Resultados e discussão

O esquema da **figura 1** apresenta, de forma detalhada, a informação que consta nas perguntas das três seções do QCAonline.

O QCAonline é acedido por meio de um *link* gerado pelo *software* REDCap em qualquer dispositivo móvel com *Internet* ou computador.

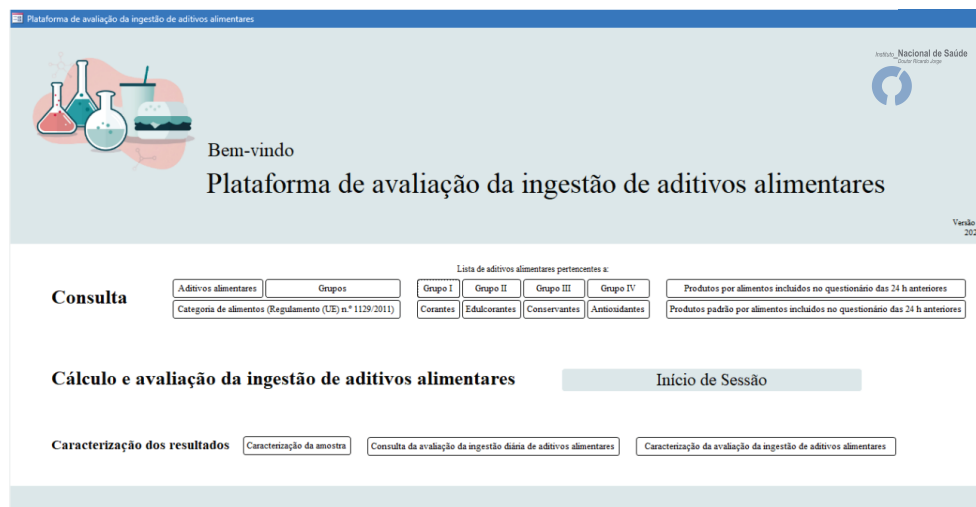
Figura 1: Esquema detalhado das perguntas das três secções do QCAonline.



Os resultados obtidos do preenchimento do QCAonline ficam armazenados numa base de dados no REDCap, que pode ser exportada para CSV/Excel®, SPSS ou R, entre outros.

A PAIAA encontra-se organizada em três áreas distintas – a área de consulta, a área do cálculo e avaliação da ingestão de aditivos alimentares, e a área da caracterização dos resultados (figura 2).

Figura 2: Visualização da plataforma de avaliação da ingestão de aditivos alimentares (PAIAA).



A plataforma armazena informação, na área da consulta sobre: i) aditivos alimentares (designação, número E, grupo, classe, DDA, LMUs); ii) grupos de aditivos; iii) categorias de alimentos; iv) 24 alimentos do QCAonline (diferentes marcas e aditivos presentes no rótulo) e v) alimentos padrão (constituídos por todos os aditivos presentes em cada alimento do QCAonline, considerando o pior cenário).

Na área de cálculo e avaliação da ingestão de aditivos alimentares, é possível calcular e avaliar a ingestão por inquirido, alimento e aditivo. Os resultados em Excel do QCAonline são diretamente exportados para a PAIAA. Após iniciar a sessão, é possível seleccionar o inquirido e verificar se a ingestão de aditivos é superior à DDA (figura 3).

Figura 3: Visualização, como exemplo, dos formulários na área do cálculo da ingestão na avaliação por aditivos alimentares.

**Início de Sessão**

Selecione perfil

**Cálculo da ingestão diária de aditivos alimentares e Avaliação da ingestão diária de aditivos alimentares**

**Avaliação da ingestão diária do aditivo E 250 Nitrito de sódio**

Conservante

Dados Pessoais | Consumo de fiambre | Consumo de salsichas | Ingestão diária do aditivo E 250 | Avaliação da ingestão diária do aditivo E 250

Produto Padrão	Teor máximo (mg/kg ou mg/L, consoante o caso)	Ingestão diária do aditivo (mg/kg peso corporal/dia)
Fiambre	100	0.00000
Salsichas	100	0.02273

**Avaliação da ingestão diária do aditivo E 250 Nitrito de sódio**

Conservante

Dados Pessoais | Consumo de fiambre | Consumo de salsichas | Ingestão diária do aditivo E 250 | Avaliação da ingestão diária do aditivo E 250

**Avaliação da ingestão diária do aditivo E 250**

A dose diária admissível não foi excedida

E 250

Avaliação da UE DDA  
DDA (mg/kg peso corporal/dia) UE: 0.07  
DDA (mg/kg peso corporal/dia) JECFA  
Ingestão total do aditivo (mg/kg peso corporal/dia): 0.02273

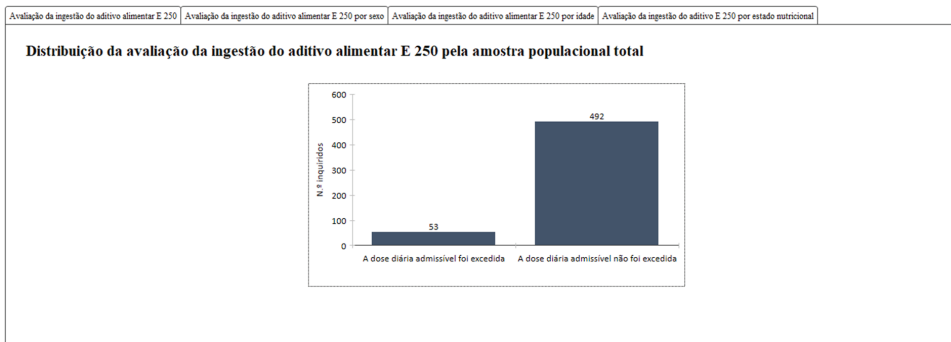
Na área de caracterização dos resultados, encontra-se a descrição da amostra da população estudada por sexo, idade, escolaridade, distrito de residência, e estado nutricional. A avaliação da ingestão de aditivos alimentares por inquirido pode ser consultada e exportada para Excel, incluindo dados de idade, sexo, distrito, altura, peso e ingestão do aditivo. A caracterização por aditivo mostra a distribuição da ingestão

na amostra (número de inquiridos que ultrapassam ou não a DDA) por sexo, idade e estado nutricional. A informação é atualizada à medida que se adicionam novos dados. A **figura 4** ilustra gráficos da ingestão de um aditivo na população total, e por sexo, obtidos diretamente da plataforma.

Figura 4: Resultados (exemplos) da plataforma para a caracterização da avaliação da ingestão do aditivo alimentar E250, a) distribuição da amostra populacional total, b) distribuição por sexo

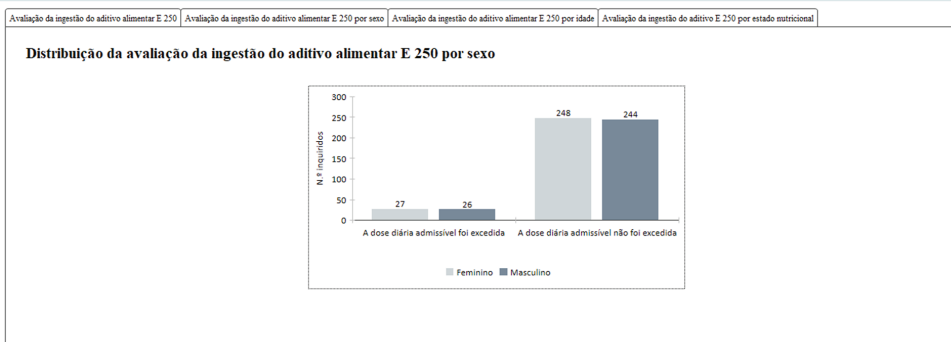
a)

Caracterização da avaliação da ingestão do aditivo alimentar E 250 Nitrito de Sódio  
Conservante



b)

Caracterização da avaliação da ingestão do aditivo alimentar E 250 Nitrito de Sódio  
Conservante



## **\_Conclusões**

O projeto “Monitaditivos” coordenado pelo INSA, é o primeiro dedicado à monitorização de aditivos alimentares na população portuguesa e as ferramentas apresentadas foram desenvolvidas pela primeira vez com este objetivo específico.

O questionário de avaliação do consumo alimentar provou ser eficaz na obtenção de dados sociodemográficos, antropométricos e de consumo alimentar. O facto de ser uma ferramenta *online* permitiu um acesso facilitado pelos participantes (em computador ou dispositivo móvel).

A associação dos questionários a uma base de dados evitou erros de transcrição, sendo a informação exportada diretamente para a plataforma de avaliação da ingestão de aditivos alimentares. A plataforma possibilitou, de uma forma rápida, o cálculo da ingestão diária estimada por inquirido, para os aditivos alimentares presentes nos alimentos do questionário, e a sua comparação com a Dose Diária Admissível.

As ferramentas desenvolvidas constituem parte do sistema de monitorização de avaliação da ingestão de aditivos alimentares que está em implementação no INSA e que representa uma obrigação de cada Estado-membro que decorre da regulamentação europeia.

### **Referências bibliográficas:**

- (1) Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares. JO L 354 de 31.12.2008:16-33. <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/1333/oj>
- (2) Regulamento (UE) n.º 1129/2011 da Comissão, de 11 de novembro de 2011, que altera o anexo II do Regulamento (CE) n.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares. JO L 295 de 12.11.2011:1-177. <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1129/oj>
- (3) Nunes. IP. Avaliação da ingestão de aditivos alimentares: Criação/otimização de uma plataforma informática de cálculo, 2023. (Dissertações de Mestrado). <http://hdl.handle.net/10400.21/16803>



## ficha técnica

**\_ Título:** Boletim Epidemiológico Observações

**\_ Periodicidade:** Quadrimestral

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

**\_ Numeração:** 2ª série

Volume 13, número 36  
maio - agosto 2024

**\_ Diretor**

Fernando de **Almeida**, Presidente do Conselho Diretivo do INSA

**\_ Editores**

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

**\_ Conselho Editorial Científico**

*Carlos Matias Dias*, Departamento de Epidemiologia  
*Cristina Furtado*, Departamento de Doenças Infecciosas  
*Manuela Cano*, Departamento de Saúde Ambiental  
*Maria João Silva*, Departamento de Genética Humana  
*Paulo Dario*, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis  
*Rita Batista*, Departamento de Alimentação e Nutrição  
*Luísa Romão*, Conselho Científico do INSA

**\_ Coordenação editorial** *Elvira Silvestre*, Biblioteca da Saúde

**\_ Composição e paginação** *Rodrigo Jorge*

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

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2024.

Reprodução autorizada desde que a fonte seja citada, exceto para fins comerciais.  
Isento de Registo na ERC ao abrigo do Decreto-Regulamento 8/99 de 9 de junho artº 12º nº1 a).

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

Tel.: (+351) 217 519 200

Fax: (+351) 217 529 400

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

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