

2015
número

13

2ª série

Lisboa_INSA, IP

publicação trimestral_julho - setembro

ISSN: 2183-8873 (em linha)

Observações

Boletim Epidemiológico

editorial

Com a publicação do 13º número regular do Boletim Epidemiológico Observações, inicia-se o 4º ano de produção ininterrupta deste veículo de disseminação da produção científica do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). À semelhança dos números anteriores, também este número inclui artigos nas diversas áreas temáticas que refletem o trabalho dos seis Departamentos técnico-científicos do Instituto Ricardo Jorge.

Ao longo dos três anos agora atingidos com 179 artigos publicados, a produção de 13 números regulares foi complementada com 5 números temáticos de modo a abranger e tornar público um maior volume de conhecimento técnico e científico produzido diariamente pelas equipas de trabalho no INSA. Foram assim publicados volumes na área das doenças infecciosas, alimentação e nutrição, doenças não transmissíveis e saúde ambiental, com participação de autores oriundos de todos os Departamentos técnico-científicos do INSA.

Entre outros, refira-se neste número dois artigos: o artigo sobre os 7 anos de funcionamento da Rede Nacional de Vigilância de Vetores (REVIVE), caso exemplar de atenção a doenças associadas a vetores e trabalho conjunto com as regiões do país; e o artigo sobre 5 anos de funcionamento do sistema de Epidemiologia e Vigilância dos Traumatismos e Acidentes (EVITA).

Ambos os artigos resumem e ilustram uma faceta da aplicação da abordagem epidemiológica que necessita de redes de instituições e profissionais e de constância de trabalho para que possa contribuir para a proteção da saúde da população.

neste número

Editorial

Carlos Matias Dias, Elvira Silvestre (Editores do Boletim Epidemiológico Observações)

p 01

Artigos Breves

Acidentes Domésticos e de Lazer

1. Em casa ou no lazer o acidente pode acontecer: resultados preliminares do sistema EVITA apurados para o período 2010-2014

Mariana Neto, Emanuel Rodrigues

Doenças Infecciosas

2. REVIVE (Rede de Vigilância de Vetores), 2008-2014

Maria João Alves, Maria Margarida Santos-Silva, Hugo Osório, Isabel Lopes de Carvalho, Líbia Zé-Zé, Rita Sousa, Fátima Amaro, Ana Sofia Santos, Sofia Núncio, Equipa REVIVE

3. Toxoplasmose: diagnóstico laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção entre 2009 e 2013

Anabela Vilares, Idalina Ferreira, Susana Martins, Tania Reis, Maria João Gargate

4. Tularémia: uma zoonose emergente?

Carina Carvalho, Sofia Núncio, Isabel Lopes de Carvalho

Doenças Não Transmissíveis

5. O papel dos estrogénios e vias de sinalização do recetor de estrogénio no cancro e infertilidade associados a schistosomose

Mónica C. Botelho

Saúde Ambiental

6. Ocorrência e disseminação da microalga *Gonyostomum semen* em albufeiras portuguesas

Sérgio Paulino, Armanda Vilares, Elisabete Valério

7. Espécies exóticas em lagos ornamentais: adorno ou fonte de desequilíbrio?

Maria Nascimento, Sérgio Paulino, Sónia Faria, Manuela Cano, Nuno Rosa, João Carlos Rodrigues, Lúcia Reis, Luísa Jordão

Segurança Alimentar

8. Aplicação de modelo de digestão *in vitro* para a determinação da bioacessibilidade de patulina em sumos de fruta

Ricardo Assunção, Carla Martins, Mariana Ferreira, Paula Alvíto

Notícias

Registo Nacional de Anomalias Congénitas: relatório 2000/10 e resumo histórico

Laboratório Nacional para Vírus da Poliomielite do INSA: OMS renova acreditação

4ª Reunião da Vigilância Epidemiológica da Gripe em Portugal

Programa Nacional de Rastreio Neonatal: novos materiais informativos

Curso Epidemiologia e bioestatística aplicadas à investigação em saúde

Curso Validação de métodos – determinação de agentes químicos no ar

Workshop As condições de trabalho e a qualidade de vida no quotidiano

Enquanto um dos elementos da política editorial do Instituto, também o Boletim Epidemiológico Observações mantém desde 2012 o seu objectivo de disseminar trabalho científico de forma rápida a públicos-alvo mais vastos que os que recorrem apenas às tradicionais publicações técnicas e científicas com revisão por pares, indexação e fator de impacto. Faltará ao Instituto recuperar os Arquivos do INSA para que essa área seja igualmente coberta, sabendo-se, no entanto, que tal implica um processo editorial e de revisão mais exigente e com sustentabilidade e continuidade desejáveis.

Reconhecendo o papel que as novas vias de comunicação e as tecnologias da informação e da comunicação têm quer na recolha de dados e informação, quer na disseminação da informação e do conhecimento, o desafio dos próximos três anos é o de aumentar o acesso da população portuguesa e dos seus públicos específicos, aos resultados do trabalho que, com bases técnicas e científicas sólidas, contribui diariamente para o melhor conhecimento das bases laboratoriais e epidemiológicas da saúde dos portugueses.

Carlos Matias Dias, Elvira Silvestre

Editores do Boletim Epidemiológico Observações



Em casa ou no lazer o acidente pode acontecer: resultados preliminares do sistema EVITA apurados para o período 2010-2014

Mariana Neto, Emanuel Rodrigues

mariana.neto@insa.min-saude.pt

Unidade de Observação em Saúde e Vigilância Epidemiológica. Departamento de Epidemiologia, INSA.

Introdução e objetivo

Para a maior parte das pessoas a casa é considerada o lugar mais seguro do mundo, percebida como uma barreira protetora das ameaças externas e um garante da intimidade na vida diária. O tempo passado em casa ou dedicado ao lazer são dimensões pessoais muito importantes para o equilíbrio individual e para a construção e interação afetiva e, como tal, são naturalmente muito valorizadas. No entanto, essa percepção de segurança não invalida que estes espaços não sejam palco de acidentes, por vezes graves e, não raramente, mortais.

Os Acidentes Domésticos e de Lazer (ADL) atingem os indivíduos ao longo de toda a sua vida, com relevo para as crianças e seniores (1). Por exemplo, no período 2008-2010, ocorreram na União Europeia 233 000 mortes por acidente, das quais 42% (98 891) foram ADL. Estes foram igualmente causa de 22 865 000 hospitalizações (2). Um panorama semelhante foi observado nos Estados Unidos, com 30 000 mortes e 12 milhões de acidentes não mortais por ano (1).

Os acidentes mortais são a face mais visível do fenómeno: por cada pessoa que perde a vida num acidente, muitas mais existem com incapacidade permanente e mais ainda, com incapacidade temporária, dando origem a elevadas perdas humanas, sociais e de produtividade.

Embora os sistemas de vigilância existentes não sejam exaustivos na recolha de informação sobre esta matéria, o projeto europeu JAMIE – *Joint Action on Monitoring Injuries in Europe* (3) e o

projeto nacional EVITA – Epidemiologia e Vigilância dos Traumatismos e Acidentes (4), que participa no sistema europeu, produzem informação regular a partir da recolha de dados numa amostra de serviços de urgência do Serviço Nacional de Saúde (SNS).

O sistema EVITA, criado em 2000 na continuação do sistema ADELIA – Acidentes Domésticos e de Lazer - Informação Adequada e gerido pelo Departamento de Epidemiologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), tem como objetivo contribuir para a vigilância dos ADL através da i) determinação das frequências e tendências respetivas, e das características das vítimas, das situações e dos agentes envolvidos, ii) e da identificação de situações de risco e de produtos perigosos que possam estar envolvidos, de modo a suportar com evidência o desenvolvimento de políticas e medidas de prevenção adequadas. Apresentamos em seguida alguns resultados dos dados apurados a partir deste sistema para a situação nacional no período 2010-2014.

Material e métodos

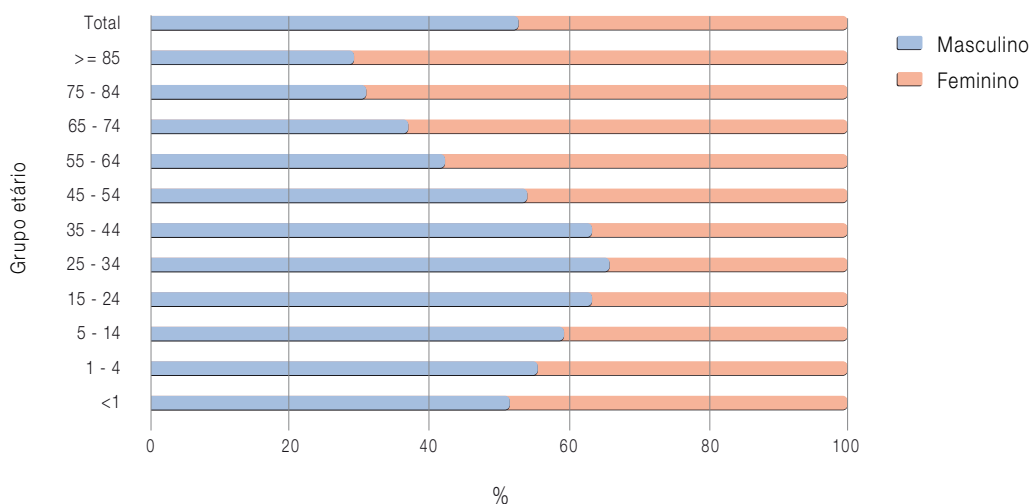
Para o sistema EVITA, ADL são definidos como os acidentes domésticos e de lazer, registados nas urgências do SNS, cuja causa não seja doença, acidente de viação, acidente de trabalho ou violência.

Os dados apresentados reportam-se ao período compreendido entre 1 de janeiro 2010 e 30 de setembro de 2014 e foram recolhidos pelo sistema EVITA que assenta numa amostra de serviços de urgência do SNS, em colaboração com a Administração Central dos Sistemas de Saúde. Os resultados são apresentados sob a forma de gráficos e tabelas de frequência.

Resultados

Durante o período temporal referido, o número total de acidentes domésticos e de lazer registados pelo sistema EVITA foi de 24 752. A distribuição destes ADL por grupo etário e sexo revelou proporções mais elevadas no sexo masculino entre os indivíduos mais novos (0 a 54 anos) e no sexo feminino, nos indivíduos com 55 e mais anos (gráfico 1). No total, a percentagem de ADL foi superior no sexo masculino (52,8%) em relação ao feminino (47,2%).

Gráfico 1: Proporção de acidentes domésticos e de lazer por sexo e grupo etário registados no sistema EVITA no período 2010-2014.



Observou-se um padrão semelhante para cada um dos anos em análise. De facto, os indivíduos do sexo masculino com idades entre 1 e 44 anos evidenciaram valores mais elevados entre 2009 e 2013. Por outro lado, os indivíduos do sexo feminino com idade superior a 55 anos revelaram, em todos os anos, valores mais elevados de ADL. Relativamente aos restantes grupos etários, as

crianças menores de um ano registaram valores mais elevados no sexo feminino em 2010 e 2013 e no sexo masculino nos restantes anos. Os indivíduos pertencentes ao grupo etário 45-54 anos revelaram valores mais elevados no sexo masculino em todos os anos exceto em 2011 (gráfico 2).

Gráfico 2: Proporção de acidentes domésticos e de lazer registados no sistema EVITA por sexo, grupo etário e ano.



artigos breves_ n. 1

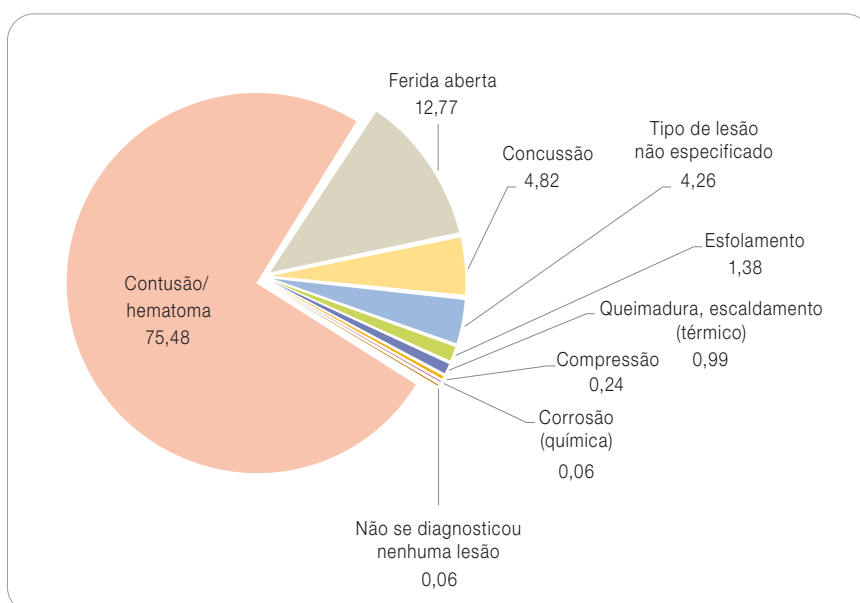
Verificou-se que os mecanismos de lesão que mais contribuiram para o número de ADL foram as quedas ao mesmo nível, destacando-se de forma pronunciada como o motivo mais frequente de ADL em todos os anos estudados, exceto 2011 (tabela 1).

Os tipos de lesão mais frequentes em resultado dos ADL foram contusões/hematomas, os quais constituíram mais de metade de todas as lesões registadas durante o período considerado, seguindo-se ferida aberta, sendo que este padrão se reflete em todos os grupos etários. Assinale-se que um acidente poderá dar origem a mais do que uma lesão (gráfico 3).

Tabela 1: Distribuição de valores percentuais dos 10 principais mecanismos de lesão com maior percentagem de acidentes, por ano de ocorrência.

	Ano de ocorrência					n
	2010	2011	2012	2013	2014	
Queda ao mesmo nível	16,1	13,6	21,0	18,6	25,5	4514
Queda, não especificado	15,6	15,6	14,2	14,9	9,2	3560
Objeto em movimento	5,9	6,3	6,5	5,1	6,8	1481
Corte	1,9	2,8	2,3	2,9	3,1	660
Objeto parado	2,1	3,3	2,3	2,2	2,4	628
Queda sobre ou de escadas	2,5	2,4	2,8	2,1	1,8	579
Pessoa	2,5	2,5	2,6	1,6	2,4	557
Beliscão, compressão	1,4	1,0	0,7	0,4	0,7	187
Atingimento do olho	0,1	0,3	0,5	0,6	0,9	122
Atingimento da boca	0,5	0,4	0,3	0,5	0,3	101

Gráfico 3: Proporção dos ADL registados no sistema EVITA, por tipo de lesão no momento do acidente durante o período 2009-2013.





Conclusões e discussão

O sistema EVITA recolheu 24 752 ADL durante o período em análise. Observou-se uma prevalência superior de ADL no sexo masculino (52,8%) em relação ao feminino (47,2%). Proporções semelhantes foram observadas num estudo realizado em 2009 com base na rede de Médicos-Sentinela de Castilla y León (5).

Nos dados analisados, a distribuição percentual dos ADL revela valores mais elevados nos homens com idades iguais ou inferiores a 54 anos. Esta observação poderá ser explicada pelo facto de os homens preferirem atividades com maior risco físico ou práticas desportivas mais radicais. Pelo contrário, nos grupos etários mais elevados são as mulheres que surgem com a maior proporção de ADL, o que poderá traduzir o facto da população geral conter uma maior proporção de mulheres em idades mais avançadas. Padrão idêntico foi observado no estudo de Castilla y León, mas a proporção de acidentes em homens começa a diminuir por volta dos 35 anos e não aos 45 como no presente estudo. As quedas foram a principal causa de ADL em todos os anos, exceto em 2011. A contusão, hematoma e a ferida aberta foram as lesões mais frequentemente relatadas, associadas a mais de metade de todas as ADL registadas nos anos em estudo. No entanto, este resultado deve ser analisado com cautela pois a informação é declarada pelo acidentado ou acompanhante, ou seja sem base no diagnóstico médico.

Perante a importância que a caracterização destas ocorrências tem para a adoção de medidas adequadas, que terão que ser transversais a vários setores da sociedade e envolver parceiros diversos (6,7), fica patente a importância do sistema EVITA. Todavia, há que salientar que este sistema assenta numa amostra de conveniência e que os dados de 2014 se reportam a 30 de setembro e não ao ano completo.

Referências bibliográficas:

- (1) Gielen AC, McDonald EM, Shields W. Unintentional home injuries across the life span: problems and solutions. *Annu Rev Public Health*. 2015;36:231-53.
- (2) European Association for Injury Prevention and Safety Promotion. Injuries in the European Union: summary of injury statistics for the years 2008-2010. Amsterdam: EuroSafe, 2013. http://ec.europa.eu/health/data_collection/docs/idb_report_2013_en.pdf
- (3) Rogmans WH. Joint action on monitoring injuries in Europe (JAMIE). *Arch Public Health*. 2012;70(1):19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3733502/>
- (4) Contreiras T, Rodrigues E. EVITA–Epidemiologia e Vigilância dos Traumatismos e Acidentes: relatório 2009 – 2012. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge IP, 2014. <http://hdl.handle.net/10400.18/2449>
- (5) Mateos Baruque ML, Vián González EM, Gil Costa M, et al. Incidencia, características epidemiológicas y tipos de accidentes domésticos y de ocio. *Red centinela sanitaria de Castilla y León* (2009). *Aten Primaria*. 2012;44(5):250-6. Epub 2011 Jul 5. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0212656711002526>
- (6) Hosseini H, Hosseini N. Epidemiology and prevention of fall injuries among the elderly. *Hosp Top*. 2008;86(3):15-20.
- (7) Lanzisero, T. Hazard Based Safety Engineering in Relation to Injury Epidemiology and Etiology. In *Product Compliance Engineering (ISPC)*, 2014 IEEE Symposium, pp.41-9.



REVIVE (Rede de Vigilância de Vetores), 2008-2014

Maria João Alves¹, Maria Margarida Santos-Silva¹, Hugo Osório¹, Isabel Lopes de Carvalho¹, Líbia Zé-Zé¹, Rita Sousa¹, Fátima Amaro¹, Ana Sofia Santos¹, Sofia Núncio¹, Equipa REVIVE²

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

(1) Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Equipa REVIVE: Direção-Geral da Saúde, Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Alentejo, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte, Instituto dos Assuntos Sociais e da Saúde da Madeira, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Introdução

As redes de vigilância de artrópodes hematófagos são essenciais para se proceder à deteção atempada de potenciais introduções de espécies exóticas e invasoras com impacto em saúde pública e para prevenir e controlar infeções por agentes patogénicos emergentes.

A criação do projeto REVIVE deveu-se à necessidade de se instalar capacidades para melhorar o conhecimento sobre as espécies de vetores presentes no país e respetiva distribuição e abundância, para o esclarecimento do seu papel como vetor de agentes de doença, assim como para se detetar atempadamente introduções de espécies invasoras com importância em saúde pública. O REVIVE pretende ainda dar cumprimento ao disposto no Regulamento Sanitário Internacional (1) sobre vigilância em portos, aeroportos e outros pontos de entrada no país.

Adicionalmente, algumas espécies autóctones, sobretudo de mosquitos, sem conhecido estatuto de espécies vetoras, podem causar incómodo às populações por fenómenos de superabundância, com consequências graves nas atividades socio-económicas e com prejuízo financeiro.

A vigilância sistemática da atividade de artrópodes hematófagos permite esclarecer sobre a diversidade de espécies e respetiva abundância, o que é indispensável para serem adotadas, em saúde públi-

ca, medidas de educação, prevenção e controlo das populações de vetores de importantes agentes patogénicos para o Homem.

O REVIVE foi iniciado em 2008 e em 2011 nas suas valências REVIVE-Mosquitos e REVIVE-Carraças, respetivamente.

Métodos

No âmbito do projeto REVIVE, as funções do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), através do Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas (CEVDI), incluem garantir a formação técnico-científica dos técnicos de saúde ambiental de cada região de saúde, receber as amostras colhidas durante a época respetiva ("carraças" e "mosquitos-portos e aeroportos" todo o ano; "mosquitos" em outras zonas geográficas de maio a outubro), identificar e pesquisar agentes patogénicos (flavivírus no REVIVE-Mosquitos e *Rickettsia* e *Borrelia* no REVIVE-Carraças), notificar imediatamente qualquer situação de risco à Direção-Geral da Saúde e responsáveis locais, preparar balanços mensais/bimestrais, bem com relatórios anuais e, ainda, promover uma reunião anual de trabalho para todos os membros das equipas envolvidas.

As funções das Administrações Regionais de Saúde, Alentejo, Algarve, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte, e Instituto dos Assuntos Sociais e Saúde da Madeira, incluem garantir a aquisição e manutenção do equipamento de recolha de amostras, planejar e realizar colheitas de artrópodes hematófagos (mosquitos adultos e imaturos, carraças em fase de vida livre ou em fase parasitária em diversos hospedeiros), enviar as amostras ao CEVDI e gerir os resultados recebidos anualmente em função da realidade de saúde pública de cada região.

A Direção-Geral da Saúde acompanha todos os procedimentos e resultados, através dos balanços e relatórios que são enviados periodicamente a esta entidade.



_Resultados

No REVIVE-Mosquitos os espécimes no estágio adulto são colhidos com armadilhas deixadas nos locais durante uma noite ou com aspiradores por pequenos períodos. Nos estádios imaturos os espécimes são recolhidos de criadouros aquáticos, com caços ou instrumentos semelhantes. Apesar do esforço de captura estar a aumentar, tanto nos estádios adultos como imaturos, nota-se um incremento muito significativo de colheitas nos estádios imaturos, sobretudo nos últimos dois anos, provavelmente porque os criadouros de estádios imaturos são de mais fácil acesso e a informação obtida sobre a distribuição de espécies é mais precisa. As técnicas de colheitas de espécimes adultos são mais diversificadas e não aplicadas a todas as espécies, ao contrário do que acontece com as colheitas de imaturos.

No REVIVE-Carraças os espécimes são colhidos na sua fase de vida livre, sobretudo na vegetação, e na fase de vida parasitária em diversos hospedeiros. O aumento do número de carraças removidas de hospedeiros humanos no âmbito do REVIVE tem sido significativo e revela a importância da identificação destes espécimes e da sua capacidade vetorial para informação atempada aos clínicos de prováveis casos de doença no Homem.

O esforço de captura realizado nas regiões tem sido considerável e tem vindo a aumentar anualmente (gráfico 1).

No REVIVE-Mosquitos foram realizadas, de 2008 a 2014, 10955 colheitas, destas 4137 (38%) de mosquitos adultos e 6818 (62%) de mosquitos em estádios imaturos (aquáticos).

No total das colheitas de mosquitos foram identificadas 24 espécies (2), todas autóctones com exceção da espécie *Aedes aegypti*, identificado pela primeira vez na ilha da Madeira em 2004 (3). As espécies mais abundantes identificadas nestes anos foram *Culex pipiens*, *Culiseta longiareolata* e *Ochlerotatus caspius* com abundâncias relativas de 39%, 20% e 19%, respetivamente.

Atualmente os três aeroportos internacionais e os principais portos marítimos, com exceção do porto de Lisboa, estão a ser vigiados para a presença/introdução de espécies de mosquitos.

Na pesquisa de atividade viral (flavivirus – dengue, *west nile*, febre amarela, zika e outros), em cerca de metade das fêmeas de mosquitos colhidas no estágio adulto não foram identificados mosquitos infetados com flavivirus patogénicos para o Homem mas sim flavivirus específicos de insetos (4).

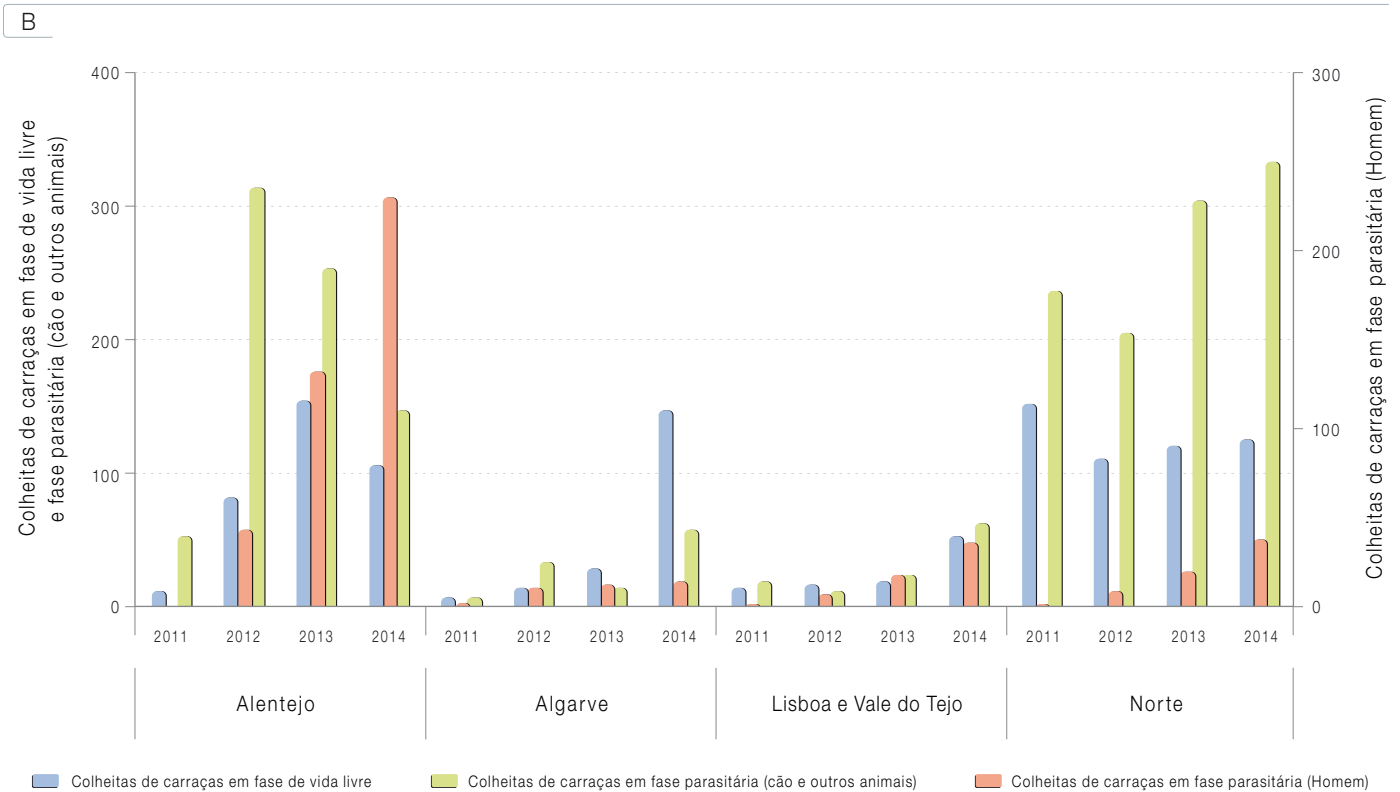
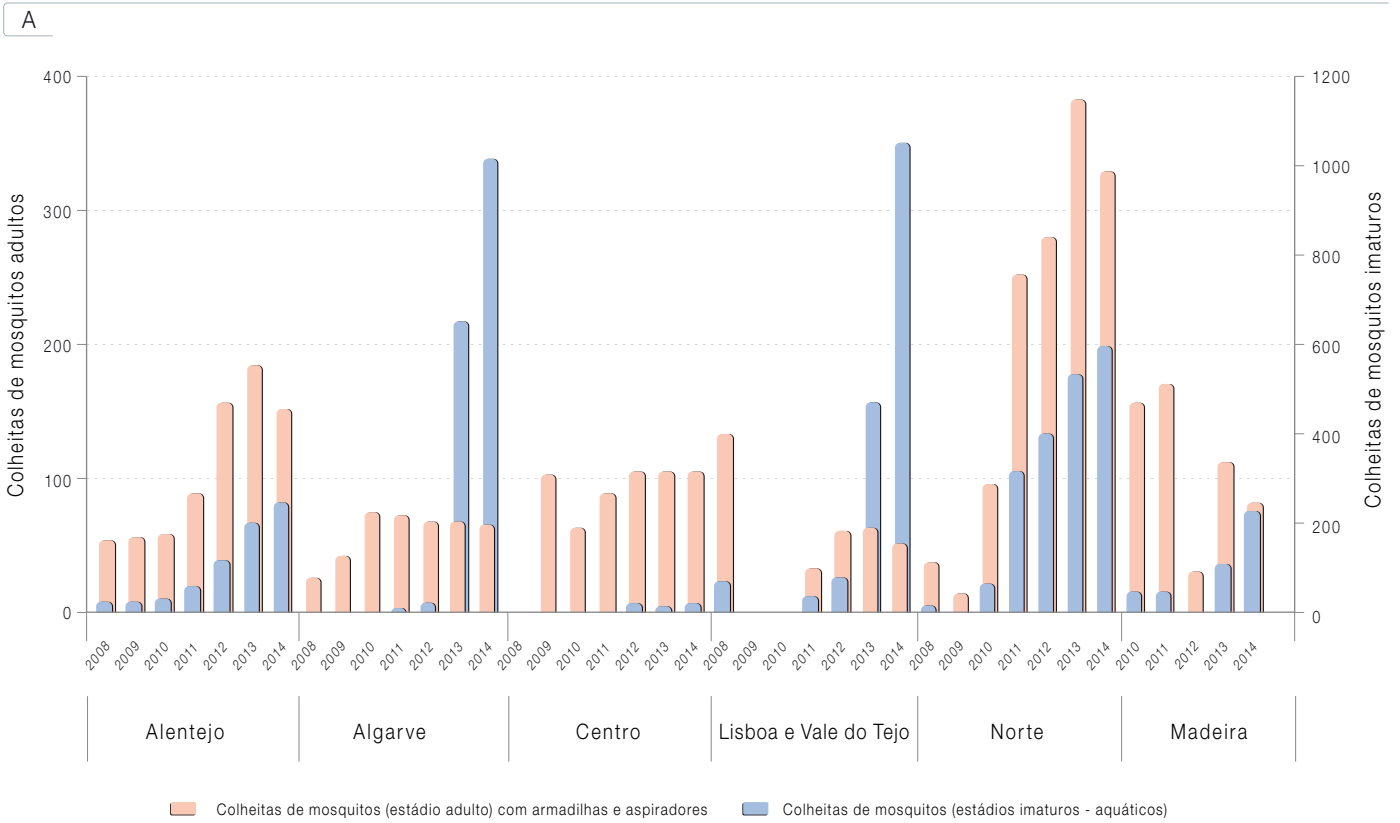
De 2011 a 2014 o esforço de captura de carraças foi de 3833 colheitas, destas 1168 (30%) em carraças em fase de vida livre, 2089 (55%) em fase parasitária (exceto no Homem) e 576 (15%) em fase parasitária no Homem.

No total das colheitas de carraças foram identificadas 14 espécies, todas autóctones com exceção de um exemplar de *Amblyoma* sp. identificado a parasitar o Homem, depois de uma viagem recente a uma zona onde esta espécie está descrita (5). A espécie mais abundante identificada nestes anos foi *Rhipicephalus sanguineus* (77%), conhecida como a carraça comum do cão, seguida por *R. bursa* e *Hyalomma marginatum* com abundâncias relativas de 10% e 5%, respetivamente.

A pesquisa de agentes patogénicos (*Rickettsia* e *Borrelia*) nas carraças permitiu identificar 258 carraças positivas para oito espécies diferentes de *Rickettsia* (*R. conorii*, *R. slovaca*, *R. massiliae*, *R. monacensis*, *R. aeschlimanii*, *R. raoultii*, *R. rioja* e *R. helvetica*) e 33 carraças positivas para cinco espécies de *Borrelia* (*B. lusitaniae*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* e *B. valaisiana*).

artigos breves_ n. 2

Gráfico 1A-B : Resumo do esforço da captura de mosquitos e carraças realizado nas regiões no âmbito do REVIVE-Mosquitos (A) e REVIVE-Carraças (B), 2008-2014.





_Discussão e conclusões

A presença do mosquito *Aedes aegypti* na ilha da Madeira tem sido avaliada pelas partes interessadas em saúde pública desde a sua primeira identificação em 2004. Esta é uma espécie de mosquitos exótica e com características invasoras muito pronunciadas. *Ae. aegypti* é vetor de Dengue, Febre Amarela, Chikungunya e vírus Zika. O facto de ser uma espécie invasora implica que muito rapidamente se torna a espécie com maior abundância relativa, o que consequentemente, pode permitir a ocorrência de surtos, como os 2164 casos de febre de Dengue observados na ilha da Madeira em 2012 e 2013 (6-8). Na Madeira é importante que a abundância relativa desta espécie seja monitorizada, assim como, no continente, a vigilância da sua introdução ou deteção atempada seja objeto de estudo por parte do projeto REVIVE-Mosquitos.

Na Europa, com exceção ainda de Portugal, tem sido identificada outra espécie de mosquito com características invasoras – *Aedes albopictus* – que já foi responsável por casos de dengue e chikungunya autóctones em França e Itália (9-11). O REVIVE-Mosquitos deve também fortalecer a vigilância da sua introdução ou deteção atempada no território português.

Com o REVIVE tem-se constatado que o contacto do Homem com as carraças é frequente. O reforço das capturas realizadas em humanos, no âmbito do REVIVE-Carraças, que se devem sobretudo à colaboração dos profissionais de saúde nos centros de saúde e hospitais com as equipas REVIVE, tem sido essencial para constatar o aumento da incidência das doenças transmitidas por carraças em Portugal (12-14) como também descrito no resto da Europa (15).

Com o REVIVE o conhecimento da caracterização, distribuição geográfica, abundância relativa e períodos de atividade e a capacidade vetorial das espécies de artrópodes hematófagos está cada vez mais aprofundado, assim como a identificação dos principais fatores ecológicos que condicionam a presença ou ausência de determinada espécie num dado local ou época do ano no nosso país.

Agradecimento

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Ministério dos Negócios Estrangeiros. Aviso n.º 12/2008, de 3 de janeiro. DR 1ª série, nº 16, de 23 de janeiro de 2008:638-87. Torna pública a nova redação do Regulamento Sanitário Internacional, adotada pela 58.ª Assembleia Mundial de Saúde em 23 de maio de 2005. <https://dre.pt/application/file/248445>
- (2) Alves MJ, Zê-Zê L, Amaro F, et al. REVIVE 2014 Culicídeos. In Relatório REVIVE 2014 - Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Lisboa: INSA IP, 2015. <http://hdl.handle.net/10400.18/3026>
- (3) Margarida Y, Grácio AJ, Lencastre I, et al. First record of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) in Madeira Island - Portugal. *Acta Parasitol Port.* 2006;13:59-61.
- (4) Calzolari M, Zê-Zê L, Růžek D, et al. Detection of mosquito-only flaviviruses in Europe. *J Gen Virol.* 2012;93(Pt 6):1215-25.
- (5) Santos-Silva MM, Lopes de Carvalho I, Santos AS, et al. REVIVE 2014 Ixodídeos. In Relatório REVIVE 2014 - Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores. Lisboa: INSA IP, 2015. <http://hdl.handle.net/10400.18/3026>
- (6) Alves MJ, Fernandes PL, Amaro F, et al. Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal, October 2012. *Euro Surveill.* 2013;18(6). pii: 20398. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20398>
- (7) European Centre for Disease Prevention and Control. Epidemiological update: Outbreak of dengue in Madeira, Portugal [Em linha]. [consult. 9/7/2015] http://ecdc.europa.eu/en/press/news/_layouts/forms/News_DispatchForm.aspx?List=8db7286c-fe2d-476c-9133-18f4cb15688dID=23
- (8) Direcção-Geral da Saúde. Febre de Dengue: Informação mensal sobre dengue na Ilha da Madeira: situação em 03/02/2013 [Em linha]. [consult. 9/7/2015] <http://www.dgs.pt/?cn=683368347243AAAAA>
- (9) La Roche G, Souarès Y, Armengaud A, et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(39):19676. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19676>
- (10) Marchand E, Prat C, Jeannin C, et al. Autochthonous case of dengue in France, October 2013. *Euro Surveill.* 2013;18(50):20661. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20661>
- (11) Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, et al. Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill.* 2011 Mar 3;16(9). pii: 19805. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19805>
- (12) de Sousa R, Pereira BI, Nazareth C, et al. *Rickettsia slovaca* infection in humans, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(10):1627-9. http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/10/13-0376_article
- (13) Sousa MV, de Carvalho IL, Nuncio MS, et al. Meningomyeloradiculitis as an Unusual Presentation of Neuroborreliosis in Childhood. *Pediatr Infect Dis J.* 2015 Jun 30. [Epub ahead of print]
- (14) Milhano N, de Carvalho IL, Alves AS, et al. Coinfections of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia lusitaniae* in ticks collected in a Safari Park, Portugal. *Ticks Tick Borne Dis.* 2010;1(4):172-7.
- (15) Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, et al. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors.* 2013;6:1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3549795/>



Toxoplasmose: diagnóstico laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção entre 2009 e 2013

Anabela Vilares, Idalina Ferreira, Susana Martins, Tania Reis, Maria João Gargate

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

Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas.
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

_Introdução

O parasita *Toxoplasma gondii* é o agente etiológico responsável pela toxoplasmose, que pode infetar a grande maioria dos vertebrados, incluindo o Homem. A infeção por este parasita apresenta uma distribuição geográfica à escala mundial, sendo a sua prevenção, diagnóstico e tratamento de grande importância clínica e veterinária (1,2).

A transmissão da infeção toxoplásmica ocorre por ingestão de qualquer uma das formas de resistência, sejam os quistos contidos nas carnes de animais infetados ou os oocistos expelidos nas fezes dos felinos que, no solo e após esporulação, tornam-se infetantes e contaminam alimentos e águas. A transmissão por via placentária, através da passagem dos taquizoitos da mãe para o feto, é também uma realidade (1).

Nos indivíduos imunocompetentes, esta parasitose é na sua maioria assintomática, contudo a retinite por toxoplasmose é frequentemente uma causa de doença ocular grave em adultos saudáveis (3). Nos indivíduos imunocomprometidos, a infeção pode ser grave ou mesmo levar à morte quando associada à reativação dos quistos em situações de infeção congénita e adquirida (4). Durante a gestação esta infeção pode causar aborto espontâneo ou doenças congénitas graves (encefalites, coriorretinites, linfadenopatias, entre outras (5). Apesar de na maioria dos recém-nascidos a infeção seja assintomática, estas crianças quando privadas de tratamento podem desenvolver sintomatologia mais tarde, com recidiva de toxoplasmose ocular, que pode levar à cegueira e a problemas neuro-

lógicos durante a infância e adolescência (6,7), nomeadamente esquizofrenia (8-10), transtorno bipolar (11) depressão e tentativas de suicídio (12).

A toxoplasmose é uma importante causa de coriorretinite nos EUA e na Europa, normalmente como consequência de uma infeção congénita (13). Nos EUA registam-se anualmente 750 mortes por toxoplasmose e cerca de 50% destas infeções são de origem alimentar, fazendo da toxoplasmose a terceira causa de morte por esta origem e a primeira causa de infeção por ingestão de águas contaminadas e carnes infetadas (14).

Em Portugal, e de acordo com diferentes estudos, a prevalência desta parasitose na população variou entre 35% na região sul e 60% no norte do país (15). Em 2005, num estudo realizado em hospitais e centros de saúde de todo o país verificou-se que a prevalência tem vindo a diminuir (16). A informação sobre a prevalência da toxoplasmose no nosso país é escassa. No entanto, os últimos dados datados de 1979/80 (ano em que foi realizado o primeiro inquérito serológico nacional em Portugal continental) apresentavam um valor de 47%. Em breve será publicado um estudo com a evolução da prevalência dos anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* na população portuguesa desde 1979 até 2013, encontrando-se neste momento o artigo em submissão numa revista científica.

_Objetivo

Este estudo tem como objetivo descrever as características demográficas de doentes com quadro clínico suspeito de toxoplasmose, cujo diagnóstico laboratorial foi confirmado no Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 2009 e dezembro de 2013.

_Métodos

Foi realizada uma análise retrospectiva dos resultados laboratoriais de todos os casos com suspeita clínica de toxoplasmose congénita e adquirida, que recorreram ao INSA para confirmação ou exclusão do diagnóstico entre 2009 e 2013.

artigos breves_ n. 3

Para o diagnóstico laboratorial da infeção congénita (pré e pós-natal) foram utilizados métodos serológicos (Aglutinação Directa (AD), *Enzyme-Linked Fluorescent Assay* (ELFA), *Immunoglobulin Immunosorbent Agglutination Assay* (ISAGA), e *Imunoblot* (IB)), métodos moleculares (PCR em tempo real) para amplificação da região repetida REP-529bp (17) e, ainda, inoculação em ratinhos utilizando diferentes produtos biológicos, nomeadamente sangue (mãe e filho), líquido amniótico e placenta. Para o diagnóstico laboratorial da infeção adquirida foram efetuadas os mesmos métodos serológicos e moleculares descritos no parágrafo anterior.

Para a análise descritiva dos dados demográficos dos casos confirmados recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas.

_Resultados

Durante o período em estudo foram confirmados 695 casos suspeitos de toxoplasmose num total de 3255 analisados. Dos 695 casos confirmados, 681 (97,9%) eram doentes com infeção toxoplásmica adquirida e 14 (2,0%) eram doentes com infeção congénita (gráfico 1).

Na infeção adquirida verificou-se que 90,5% (616/681) pertenciam ao sexo feminino, 7,2% (49/681) ao masculino e em 2,3% (16/681) dos casos o género não foi conhecido (gráfico 2).

Gráfico 1: Distribuição anual da infeção toxoplásmica adquirida e congénita, 2009-2013.

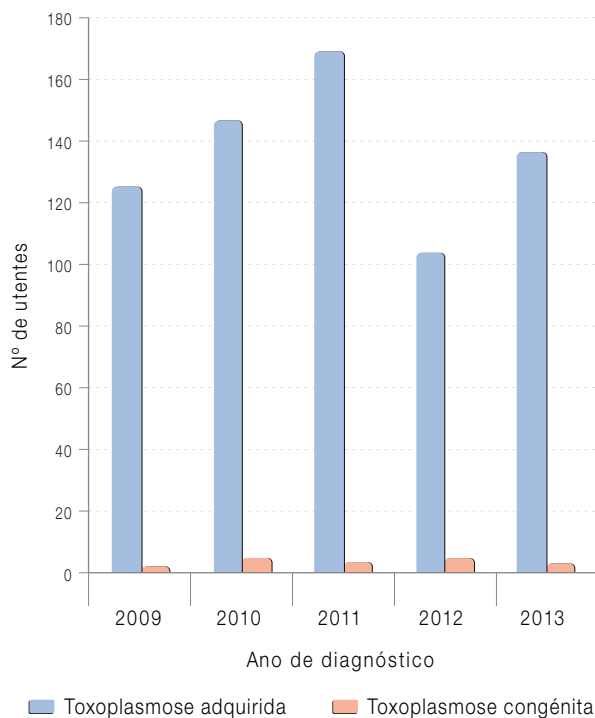
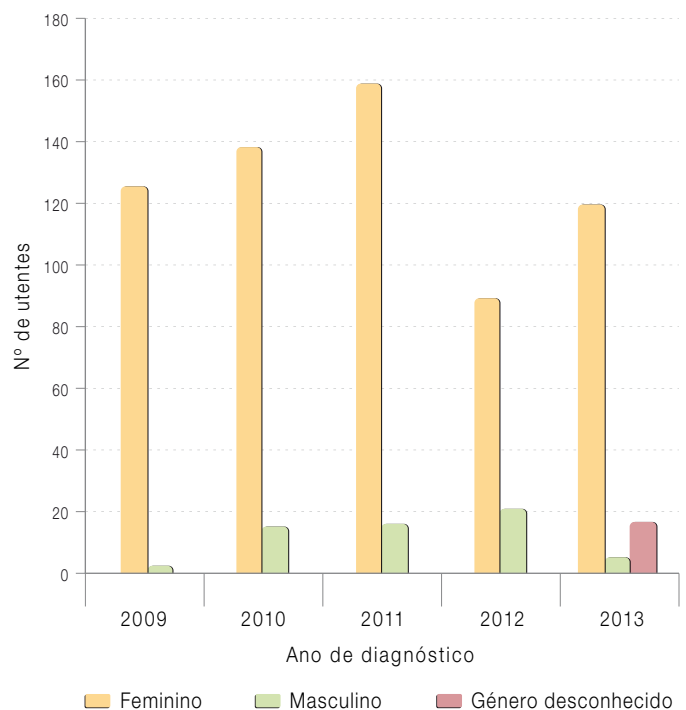


Gráfico 2: Distribuição anual da infeção toxoplásmica adquirida por género, 2009-2013.



artigos breves_ n. 3

Em relação à distribuição dos casos de infeção toxoplásmica adquirida por grupo etário observou-se que a maioria das mulheres pertencia ao grupo 25-44 anos de idade (429/616; 70%), seguido do grupo etário 15-24 anos (129/616; 20%), sendo a maioria dos homens pertencentes ao grupo etário entre o 25 e os 64 anos (gráfico 3).

Dos 14 casos de toxoplasmose congénita diagnosticados durante os 5 anos em análise constatou-se que todos eram crianças com menos de um ano de idade (tabela 1).

Gráfico 3: Distribuição anual da infeção toxoplásmica adquirida por género e grupo etário, 2009-2013.



Tabela 1: Distribuição anual da infeção toxoplásmica por grupo etário, 2009-2013.

Grupo etário	Ano de diagnóstico					Total
	2009	2010	2011	2012	2013	
< 1 ano	1	4	3	4	2	14
1 a 4 anos	0	0	0	0	0	0
5 a 14 anos	4	0	0	0	0	4
15 a 24 anos	32	41	25	19	21	138
25 a 44 anos	66	106	115	75	88	450
45 a 64 anos	1	0	9	7	3	20
>65 anos	1	0	4	3	0	8
Idade desconhecida	21	0	16	0	24	61
Total	126	151	172	108	138	695

_Discussão e conclusão

O diagnóstico pré e pós-natal integrado da toxoplasmose (Serologia, PCR e Inoculação no murganho) é realizado em Portugal exclusivamente no INSA, contudo o diagnóstico da toxoplasmose adquirida é realizado em todo país, sendo recorrentemente enviados produtos biológicos para laboratório do INSA para confirmação desta parasitose.

Um caso de toxoplasmose congénita é confirmado pela existência de pelo menos um dos quatro critérios seguintes: a) confirmação da presença de *Toxoplasma gondii* em tecidos ou fluidos corporais (recém-nascido); b) deteção de ácido nucleico de *Toxoplasma gondii* numa amostra biológica (fluidos corporais do recém-nascido); c) resposta de anticorpos específicos para *Toxoplasma gondii* (Ig M, IgG e IgA) num recém-nascido; d) títulos sempre estáveis de IgG de *Toxoplasma gondii* em crianças com menos de 12 meses (18).



De acordo com os critérios laboratoriais aplicados ao diagnóstico de toxoplasmose congénita, os 14 casos de infeção obtidos neste estudo foram positivos por pesquisa de anticorpos IgG e IgM, por inoculação no murganho e por deteção molecular.

À semelhança de outros países europeus, este estudo mostrou que o maior número de casos ocorreu na faixa etária dos 25 aos 44 anos de idade e predominantemente em mulheres, o que seria de esperar uma vez que Portugal é um dos países da União Europeia onde é preconizado realizar o diagnóstico laboratorial sistemático da toxoplasmose a todas as mulheres grávidas (19).

Apesar da frequência de casos de infeção congénita ser baixa ao longo dos cinco anos do estudo (2%; 14/695), é importante referir que 42,7% das infeções adquiridas ocorreram em grávidas, que posteriormente poderão ter originado infeções congénitas, passando o parasita ao filho através da placenta. Este facto demonstra, só por si, a importância da vigilância da toxoplasmose laboratorial no período pré-concepcional e, mais ainda, durante a gravidez.

A nível mundial, a incidência anual da toxoplasmose congénita é de 190 100 casos (20). Nos países europeus, a infeção materna tem uma incidência de 1 a 14 por 1000 mulheres, sendo França o país europeu com maior incidência da infeção por *T. gondii* na gravidez (2/1000 grávidas) (21), o que poderá estar relacionado com as práticas alimentares existentes nestes países.

Entre 2004 e 2007, foi realizado um estudo na Grande Lisboa, onde foram estudadas 3126 mulheres e onde foi registada uma taxa de anticorpos anti-*T. gondii* de 25,7%. Neste mesmo estudo, a taxa de positividade na população estrangeira foi superior em relação às grávidas com nacionalidade portuguesa (30,6% vs 23,8%). A taxa de seroconversão estimada foi de 1,7/1000 seronegativas. Em nenhum grupo etário a percentagem de mulheres com IgG positiva foi superior a 50%, sendo que nas mulheres com idade inferior a 30 anos a taxa de seropositividade foi de 23% e nas mulheres com mais de 30 anos foi de 30%. Neste estudo não foi diagnosticado nenhum caso de toxoplasmose congénita (22). Num outro estudo, realizado recentemente na região Norte do País, foi verificada uma seroprevalência de 24,4% em mulheres com idades compreendi-

das entre os 16 e os 45 anos de idade. Esta realidade, indica que 75,6% das mulheres em idade fértil no Norte do País correm o risco de se infetar com este parasita (23).

Assim, e em conclusão, a identificação dos casos de toxoplasmose no estudo aqui apresentado corrobora os resultados referenciados nos estudos anteriores e demonstra, a importância da vigilância ativa e sistemática desta infeção, em particular na mulher grávida e nos indivíduos imunocomprometidos, por serem grupos populacionais onde esta parasitose é responsável por taxas de morbilidade e letalidade elevadas.

Agradecimento

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Tenter AM, Heckerth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000;30(12-13):1217-58. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3109627/>
- (2) Su C, Evans D, Cole RH, et al. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. Science. 2003;299(5605):414-6.
- (3) Gilbert RE, Dunn DT, Lightman S, et al. Incidence of symptomatic toxoplasma eye disease: aetiology and public health implications. Epidemiol Infect. 1999;123(2):283-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2810761/>
- (4) Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis. 1992;15(2):211-22.
- (5) McLeod R, Boyer K, Roizen N, et al. The child with congenital toxoplasmosis. Curr Clin Top Infect Dis. 2000;20:189-208.
- (6) Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004;363(9425):1965-76.
- (7) Zhou P, Chen Z, Li HL, et al. *Toxoplasma gondii* infection in humans in China. Parasit Vectors. 2011 Aug;4:165. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3174123/>
- (8) Torrey EF, Yolken RH. *Toxoplasma gondii* and Schizophrenia. Emerg Infect Dis. 2003;9(11):1375-80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3035534/>
- (9) Yolken RH, Torrey EF. Are some cases of psychosis caused by microbial agents? A review of the evidence. Mol Psychiatry. 2008;13(5):470-9. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/mono100B.pdf>
- (10) Horacek J, Flegr J, Tintera J, et al. Latent toxoplasmosis reduces gray matter density in schizophrenia but not in controls: voxel-based-morphometry (VBM) study. World J Biol Psychiatry. 2012;13(7):501-9. Epub 2011 May 23.
- (11) Tedla Y, Shibre T, Ali O, et al. Serum antibodies to *Toxoplasma gondii* and Herpesviridae family viruses in individuals with schizophrenia and bipolar disorder: a case-control study. Ethiop Med J. 2011;49(3):211-20.
- (12) Groër MW, Yolken RH, Xiao JC, et al. Prenatal depression and anxiety in *Toxoplasma gondii*-positive women. Am J Obstet Gynecol. 2011;204(5):433.e1-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144318/>
- (13) Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. Clin Infect Dis. 1996;23(2):277-82. <http://cid.oxfordjournals.org/content/23/2/277.long>
- (14) Hedberg C. Food-related illness and death in the United States. Emerg Infect Dis. 1999;5(6):840-2 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2640792/>; Mead PS, Slutsker L, Griffin PM, et al. Food-related illness and death in the United States reply to dr. hedberg. Emerg Infect Dis. 1999;5(6):841-2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2640798/>



artigos breves_ n. 3

- (15) Angelo MH. [Legal dispositions and preventive strategies in congenital toxoplasmosis in Portugal]. Arch Pediatr. 2003;10 Suppl 1:25-6.
- (16) Machado M. Conhecimento e prevenção da toxoplasmose na grávida: contribuição para o estudo da toxoplasmose em Portugal. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2005.
- (17) Kasper DC, Sadeghi K, Prusa AR, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of Toxoplasma gondii in amniotic fluid. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;63(1):10-5. Epub 2008 Nov 6.
- (18) Direção-Geral da Saúde. Despacho n.º 5681-A/2014, 21 de abril. DR 2.º série (1.º supl.), n.º 82, de 29 de abril de 2014:11374-(2-20). Notificação obrigatória de doenças transmissíveis e outros riscos em saúde pública. <https://dre.pt/application/file/25697650>
- (19) Direção-Geral da Saúde. Norma n.º 037/2011 de 30/09/2011, atualizada a 20/12/2013. Exames laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco. <http://www.saude-reprodutiva.dgs.pt/normas-e-orientacoes/gravidez/norma-n-0372011-de-30092011.aspx>
- (20) Torgerson PR, Mastroiacovo P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. Bull World Health Organ. 2013;91(7):501-8. <http://www.who.int/bulletin/volumes/91/7/12-111732.pdf?ua=1>
- (21) McDonald SA, Devleeschauwer B, Speybroeck N, et al. Data-driven methods for imputing national-level incidence in global burden of disease studies. Bull World Health Organ. 2015;93(4):228-36. <http://www.who.int/bulletin/volumes/93/4/14-139972.pdf?ua=1>
- (22) Lito D, Francisco T, Salva I. Serologia TORCH e rastreio para streptococcus do grupo b em grávidas. Acta Med Port. 2013;26(5): 549-54. <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/viewFile/564/3789>
- (23) Lopes AP, Dubey JP, Moutinho O, et al. Seroepidemiology of Toxoplasma gondii infection in women from the North of Portugal in their childbearing years. Epidemiol Infect. 2012;140(5):872-7. Epub 2011 Aug 31.



Tularémia: uma zoonose emergente?

Carina Carvalho¹, Sofia Núncio¹, Isabel Lopes de Carvalho^{1,2}

isabel.carvalho@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência de Doenças Infecciosas Transmitidas por Vetores; (2) Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução

A tularémia é uma zoonose causada pela bactéria *Francisella tularensis*, classificada pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) como agente de Classe A (1,2).

F. tularensis foi isolada pela primeira vez em 1912 na Califórnia por George McCoy e Charles Chapin e, desde então, detetada em várias espécies silvestres (1,3). Os lagomorfos e roedores são considerados os principais reservatórios de *F. tularensis* na natureza e assumem particular relevância face ao potencial risco de transmissão ao Homem, quer por contacto direto quer através dos vetores competentes, como carraças e mosquitos (4). A espécie *F. tularensis* é a mais patogénica do género *Francisella* e engloba três subespécies (*F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica* e *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*) com distribuições geográficas e graus de virulência distintos (5). *F. novicida* é reconhecida como uma quarta subespécie, embora esta classificação não tenha sido oficialmente adotada (6,7). Apenas as subespécies *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Tipo A) e *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Tipo B) têm uma distribuição geográfica expressiva na população humana (5).

A principal via de infeção para o Homem é a cutânea. Outras vias incluem a conjuntiva ocular, as mucosas da boca e nariz e a via gastrointestinal. O período de incubação é geralmente de três a cinco dias e a doença tem início agudo com febre (38-40°C), cefaleias, fadiga, mialgias e arrepios de frio. Estão descritas várias formas clínicas de tularémia: ulceroglandular, glandular, oculoglandular, orofaríngea, pneumónica, tifoidal e séptica. As duas primeiras são as mais comuns e encontram-se frequentemente associadas à picada de artrópodes ou ao contato com animais infetados (1,8).

Relativamente ao diagnóstico laboratorial, a cultura é o método de referência para o diagnóstico da tularémia e é realizada em condições de biossegurança de nível 3 (BSL3) (1,8). Os métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido aplicados com sucesso na identificação rápida e na classificação de *Francisella*, quando a cultura não é possível ou é negativa. O PCR em tempo real TaqMan™ (rtPCR) apresenta elevada especificidade e sensibilidade e baseia-se na amplificação de três sequências-alvo, nomeadamente o gene *tul4*, o gene *fopA* e o elemento de inserção *ISFTu2*. O rtPCR foi também desenvolvido para diferenciar subespécies e está direcionado para uma região variável designada “ilha de patogenicidade” (9,10). Para genotipagem usam-se métodos mais discriminatórios como o MLVA (*Multiple-locus Variable Number Tandem Repeat Analysis*) (11).

A vigilância epidemiológica da tularémia existe na Europa desde 2003 (Decisão n.º 2003/534/CE) (12). Apesar de ser considerada uma doença pouco frequente têm sido notificados surtos recentes em vários países, nomeadamente em Espanha, França, na Escandinávia, nos Balcans e na Hungria e casos esporádicos na Áustria, em Itália ou no Reino Unido (13).

Desde 1998, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) disponibiliza o diagnóstico laboratorial desta patologia. Em Portugal, *F. tularensis* subsp. *holarctica* foi detetada pela primeira vez em 2007, por métodos moleculares, numa amostra humana e num ixodídeo (14). Dentro desta linha de investigação têm vindo a ser realizados vários estudos epidemiológicos com o intuito de esclarecer a prevalência desta doença em Portugal.

Objetivo

Descrever a frequência de *F. tularensis* em Portugal, em amostras humanas, artrópodes vetores e potenciais reservatórios como os lagomorfos silvestres entre 1 de janeiro de 2011 e 15 de junho de 2015.

Materiais e métodos

No período em estudo foram estudadas 5372 amostras de diferentes origens. O tipo e número de amostras, período de amostragem espécies identificadas e técnicas laboratoriais realizadas constam do quadro 1.

Quadro 1: Descrição das amostras analisadas e técnicas laboratoriais realizadas no INSA, 1 de janeiro de 2011 - 15 de junho de 2015.

Tipo de amostras	Nº amostras	Período de amostragem	Nº espécies identificadas	Origem geográfica	Método de extração de DNA	Método de deteção	Método de tipificação
Humanas	93	2011-Junho 2015	-	Território nacional	Coluna ¹	Microaglutinação <i>in house</i> /PCR	-
Mosquitos	4949	2007-2010	12 ^a	Território nacional	Coluna ¹ ; fenol: clorofórmio	PCR	-
Carraças	237		7 ^b	Distritos de Vila Real, Bragança e Évora	Coluna ¹	PCR	<i>sdhA</i> , VNTR
Lagomorfos (Fígado e baço)	93	Época cinegética 2011 e 2012	2 ^c	Distrito de Évora	Coluna ¹	rtPCR	rtPCR

a) 12 espécies pertencentes a 5 géneros: *Culx* spp., *Ochlerotatus* spp., *Anopheles* spp., *Culiseta* spp., *Aedes* spp. (número muito limitado de espécimens *Aedes aegypti* da Ilha da Madeira); b) 7 espécies pertencentes a 4 géneros *Dermacentor* spp., *Ixodes* spp., *Rhipicephalus* spp., *Hyalomma* spp.; c) 2 *Oryctolagus cuniculus*; *Lepus granatensis*; 1) *Dneasy Blood and Tissue kit* (Qiagen, Hilden, Germany).

Resultados e discussão

Entre 1 de janeiro de 2011 e 15 de junho de 2015, o INSA recebeu 93 amostras humanas para confirmação de diagnóstico de infeção por *Francisella tularensis* (tabela 1). Todas as amostras analisadas foram negativas, não havendo também casos clínicos notificados em Portugal desde 2011.

De um total de 237 carraças estudadas, 15 espécimens (6.33%) das espécies *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *I. ricinus* e *R. sanguineus* foram positivas para a presença de *F. tularensis* subsp. *holarctica*, sugerindo que, no nosso país, as carraças possam ser os vetores mais importante desta zoonose, tal como acontece na maioria dos países europeus (15). Os 4949 mosquitos investigados foram negativos para a presença de *F. tularensis*, indicando que estes artrópodes não parecem desempenhar um papel relevante na transmissão da tularémia ao homem em Portugal (16).

F. tularensis subsp. *holarctica* foi recentemente detetada em lagomorfos silvestres pela primeira vez em Portugal. Das 93 amostras analisadas, seis (6.45%) foram positivas para a presença desta

bactéria (15). Os lagomorfos são indicadores biológicos de tularémia, estando diretamente implicados na transmissão da doença ao homem, uma vez que estão entre as espécies cinegéticas mais caçadas na Península Ibérica. Neste contexto, o papel dos lagomorfos como reservatório e potencial veículo de transmissão de tularémia necessita de ser clarificado continuando a ser objeto de estudo.

Tabela 1: Diagnóstico laboratorial de infeção por *Francisella tularensis* realizado no INSA, 1 de janeiro de 2011 - 15 junho de 2015.

Método	Ano de diagnóstico				
	2011	2012	2013	2014	2015
Serologia (microaglutinação <i>in house</i>)	21	13	14	25	5
PCR	12	1	2	0	0



artigos breves_ n. 4

Conclusões

Apesar da tularémia ser considerada uma doença pouco frequente, a elevada infeciosidade de *F. tularensis* e a sua fácil dispersão por aërossois ou através de água contaminada tornam este agente etiológico numa potencial arma de bioterrorismo (8). Acresce que a sua ampla distribuição geográfica e emergência, atualmente observada na Europa, conduziram ao reforço da vigilância e do conhecimento sobre a doença, sobretudo entre as populações de risco, nomeadamente caçadores e profissionais de saúde (3). Assim, e do ponto de vista de saúde pública, o potencial impacto desta doença enquanto zoonose emergente não deve ser negligenciado. A par da sensibilização junto às populações de risco, a vigilância da tularémia nos animais sentinela é essencial para a monitorização e prevenção de eventuais surtos epidémicos, sobretudo em regiões onde o contato com potenciais reservatórios e vetores é mais frequente.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Equipa REVIVE – Rede de Vigilância de Vetores, à FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia (projeto PTDC/SAU-ESA/104947/2008; C. Carvalho, bolsreira de doutoramento SFRH/BD/79225/2011) e à Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th ed. New York : Elsevier/Churchill Livingstone, 2005. Vol 2, pp. 2674-83.
- (2) Centers for Disease Control and Prevention. Emergency Preparedness and Response [Em linha]. [consult. 9/7/2015] <http://emergency.cdc.gov/firsthours/bioterrorism.asp>
- (3) Carvalho CL, Lopes de Carvalho I, Zé-Zé L, et al. Tularaemia: a challenging zoonosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2014;37(2):85-96. Review.
- (4) Gyuranecz M, Szeredi L, Makrai L, et al. Tularemia of European Brown Hare (*Lepus europaeus*): a pathological, histopathological, and immunohistochemical study. *Vet Pathol*. 2010;47(5):958-63. <http://vet.sagepub.com/content/47/5/958.full.pdf+html>
- (5) Vogler AJ, Birdsall D, Price LB, et al. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J Bacteriol*. 2009;191(8):2474-84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2668398/>
- (6) Johansson A, Celli J, Conlan W, et al. Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(Pt 8):1717-8.
- (7) Busse HJ, Huber B, Anda P, et al. Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis* - response to Johansson et al. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(Pt 8):1718-20.
- (8) WHO Guidelines on Tularaemia. Geneva: World Health Organization, 2007, p. 115 http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_EPR_2007_7.pdf
- (9) Versage JL, Severin DD, Chu MC, et al. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J Clin Microbiol*. 2003;41(12):5492-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309004/>
- (10) Kugeler KJ, Pappert R, Zhou Y, et al. Real-time PCR for *Francisella tularensis* types A and B. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(11):1799-801. http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/12/11/06-0629_article
- (11) Vogler AJ, Birdsall D, Wagner DM, et al. An optimized, multiplexed multi-locus variable-number tandem repeat analysis system for genotyping *Francisella tularensis*. *Lett Appl Microbiol*. 2009;48(1):140-4. Epub 2008 Nov 19.
- (12) União Europeia. Comissão das Comunidades Europeias. Decisão n.º 2003/534/CE, de 17 de Julho de 2003 que altera a Decisão n.º 2119/98/CE do Parlamento Europeu e do Conselho e a Decisão n.º 2000/96/CE no que diz respeito às doenças transmissíveis enumeradas naquelas decisões e que altera a Decisão n.º 2002/253/CE no que diz respeito às definições de casos de doenças transmissíveis. JO. 23.7.2003: L 184/35-39. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003D0534&from=PT>
- (13) European Center for Disease Control and Prevention. Annual Epidemiologic Report: reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC, 2013, pp. 119-121. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-Report-2012.pdf>
- (14) de Carvalho IL, Escudero R, Garcia-Amil C, et al. *Francisella tularensis*, Portugal. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(4):666-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2725955/>
- (15) Lopes de Carvalho I, Toledo A, Carvalho CL, et al. *Francisella* species in ticks and animals, Iberian Peninsula. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015 (em publicação).
- (16) Carvalho CL, Zé-Zé L, Duarte EL, et al. Screening of mosquitoes as vectors of *F. tularensis* in Portugal. 7th International Conference on Tularemia, Breckenridge, Colorado, 2012.



O papel dos estrogénios e vias de sinalização do recetor de estrogénio no cancro e infertilidade associados a schistosomose

Mónica C. Botelho

monica.botelho@insa.min-saude.pt

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

Instituto de Patologia e Imunologia Molecular, Universidade do Porto.

Introdução

A schistosomose é uma doença tropical negligenciada causada por um parasita do género *Schistosoma*. A sua transmissão ocorre por meio de água doce. Esta helmintíase é a segunda parasitose mais importante depois da malária causando altas taxas de morbilidade e mortalidade. Em todo o mundo existem pelo menos 76 países afetados por schistosomose com uma prevalência superior a 200 milhões de pessoas. Destes, 20 milhões têm doença grave e 120 milhões são considerados assintomáticos. O risco de infeção afeta cerca de 600 milhões de indivíduos, incluindo viajantes provenientes dos países desenvolvidos (1,2).

Os três principais agentes da schistosomose humana são: *Schistosoma japonicum* e *S. mansoni* que causam a schistosomose intestinal no Leste da Ásia, África, América do Sul e Caribe, enquanto *S. haematobium* ocorre em toda a África e no Médio Oriente, causando a schistosomose urogenital. Existem mais indivíduos infetados com *S. haematobium* do que com as outras espécies. Dos 112 milhões de casos de infeção por *S. haematobium* na África subsaariana, 70 milhões apresentam hematúria, 18 milhões patologia da mucosa da bexiga, e 10 milhões apresentam hidronefrose levando a lesões graves nos rins (3-5). Nestes doentes, a deposição de ovos de *S. haematobium* na mucosa da bexiga leva eventualmente ao carcinoma de células escamosas da bexiga (6,7). Assim, o *S. haematobium* foi classificado como cancerígeno do Grupo 1 pela Agência Internacional do Cancro (IARC) (8,9). Além disso, cerca de 75% das mulheres infetadas com *S. haematobium* sofrem de schis-

tosomose genital feminina (FGS) do trato genital inferior (4). Esta patologia resulta da deposição de ovos de schistosoma no útero, colo do útero, vagina e / ou vulva, com a consequente resposta inflamatória; também aumenta a susceptibilidade da mulher ao HIV (10-12). A FGS causa sangramento, secreção, dor nas relações sexuais e diminuiu a fertilidade, além de ser causa de vergonha e estigma nas populações africanas (13).

Os mecanismos celulares e moleculares que explicam a associação da infeção por *S. haematobium* com cancro e infertilidade ainda não são bem conhecidos (13,14). No entanto, moléculas derivadas do metabolismo de estrogénio e as vias de sinalização do recetor de estrogénio têm sido descritos para ambas as associações.

Objetivo

No presente trabalho discutimos novos dados sobre o papel dos estrogénios e recetores de estrogénio tanto na carcinogénese como na infertilidade associadas a schistosomose urogenital.

Mecanismo molecular do metabolismo dos estrogénios

Os estrogénios são hormonas esteróides produzidas nos ovários, glândulas supra-renais e placenta durante a gravidez. O hipotálamo segrega a hormona libertadora de gonadotropina (GnRH), que estimula a pituitária anterior para libertar a hormona folículo-estimulante (FSH) e hormona luteinizante (LH). A FSH e a LH induzem a produção de estrogénio na forma de estradiol e estrona pelos ovários. Estes estrogénios ligam-se a recetores de estrogénio (ER) em tecidos alvo da mama, do útero, do cérebro, osso, fígado e coração (15). Quando a molécula de estrogénio se liga ao seu recetor, uma alteração conformacional no ER permite a sua interação com uma sequência específica do gene regulador do ERE (elemento de resposta ao estrogénio) que por sua vez induz a transcrição da sequência codificadora alvo. A proteína ER resultante promove mudanças na célula de acordo com o tipo de tecido e condições subjacentes. O ciclo fica completo quando níveis elevados de estrogénio no sangue enviam um *feedback* negativo para o hipotálamo para suprimir a libertação de GnRH (15).

Carcinoma espinocelular da bexiga associado a *S. haematobium*

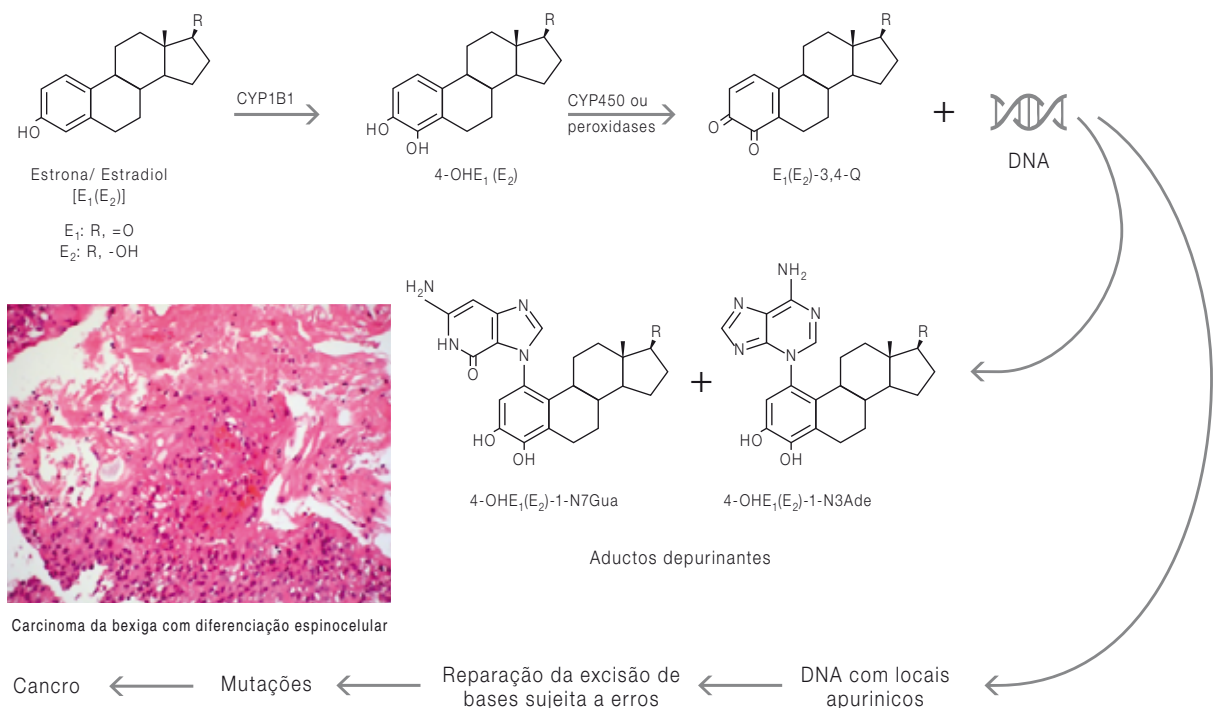
O carcinoma espinocelular (SSC) ou de células escamosas é uma neoplasia maligna pouco diferenciada. O SCC é a forma comum de cancro da bexiga na África rural, onde o *S. haematobium* é predominante (16,17). Em contraste, a maioria do cancro da bexiga em países desenvolvidos e regiões não endémicas para a schistosomose urogenital é o carcinoma urotelial (TCC). Os ovos do parasita que ficam presos na mucosa da bexiga levam à hematuria e à inflamação crónica, aumentando o risco de SCC da bexiga. A incidência de SCC associado a schistosomose urogenital é estimada em 3-4 casos por 100 000 (18).

Ao estudar a causa de hipogonadismo induzido por schistosomose em doentes infectados com *S. haematobium* e *S. mansoni*, Botelho *et al.* (14) observaram uma elevação notável dos níveis séricos de estradiol, enquanto que os níveis de LH e FSH mantiveram-se normais. Colocou-se a hipótese de que o excesso de estradiol seria externo ao hospedeiro (14). Na verdade, verificou-se que a molécula responsável

por este efeito é semelhante ao estrogénio, produzida pelo parasita, e em estudos com células MCF-7 (responsivas ao estrogénio), revelou ser um antagonista do estradiol reprimindo a atividade de transcrição do RE. Além disso, estas novas moléculas estrogénicas foram identificadas no extrato total do parasita, bem como no soro de indivíduos infetados com esta doença parasitária (19). A repressão da transcrição do RE também foi observada em células uroteliais e no tecido de bexiga de ratinhos instilados com extrato total de *S. haematobium* (20).

Estas moléculas estrogénicas também foram identificadas no extrato de ovo de *S. haematobium*, e caracterizadas por Espectrofotometria de Massa (MS). A maioria destes compostos são catecóis de estrogénios (1,2). Os catecóis de estrogénios são formados por hidroxilação do anel aromático de esteróides. A hidroxilação de ambos os C-2 e C-3 de um anel esteróide sofre uma oxidação adicional em estradiol-2,3-quinona. Os efeitos genotóxicos destes metabolitos de estrogénio podem ser atribuídos a oxidação de catecóis de estrogénio para quinonas seguida de ciclos redox e formação de espécies reativas de oxigénio que por sua vez reagem com o DNA (figura 1) (21,22).

Figura 1: Via metabólica dos estrogénios. A formação de catecóis de estrogénio, i.e. 2-hydroxy(OH)E₁(E₂) e 4-OHE₁(E₂) leva à formação de quinonas através da oxidação de semiquinonas, E₁(E₂)-3,4Q que eventualmente reagem com o DNA originando aductos depurinantes. Estes aductos podem levar a mutações que por sua vez podem levar ao carcinoma da bexiga (SCC; microfotografia) (1).





Dado o contexto da associação entre a infeção por *S. haematobium* e cancro de bexiga, a presença de moléculas cancerígenas em ovos de *S. haematobium* pode ter aplicações para novas abordagens para o controlo da doença (1,2,19). O metabolismo de estrogénios e a produção de aductos depurinantes de DNA pode promover danos no DNA do hospedeiro levando eventualmente a transformação celular. O efeito cancerígeno destes aductos poderia explicar a ligação entre a schistosomose haematobia crónica e SCC da bexiga (1,2).

_Schistosoma haematobium e infertilidade

A infertilidade é uma condição médica comum, afetando 1 em cada 6 casais (15-20%) em todo o mundo (23). Estudos em humanos e em animais revelaram uma associação entre níveis baixos de estrogénio e espermatogénese anormal e infertilidade masculina (24-26).

Perturbações hormonais em mulheres com FGS pode estar ligada à infertilidade e fecundidade diminuída (12,27). Recentemente, metabolitos de estrogénio foram detectados por MS em urina de mulheres infetadas com *S. haematobium*. Estes metabolitos são semelhantes aos identificados anteriormente no extrato total e de ovo de *S. haematobium* (1,2). A presença destes metabolitos está significativamente associada à infertilidade em mulheres infetadas (12). Estes compostos reagem com purinas do DNA para formar aductos depurinantes. Estes aductos do DNA podem levar a mutações que por sua vez podem estar subjacentes à infertilidade observada nestas mulheres (12,27).

_Conclusão e perspetivas futuras

São necessários estudos adicionais para identificar e caracterizar a síntese destas moléculas pelo *Schistosoma* e seus efeitos no hospedeiro. Com efeito, bloqueando a ligação da molécula ao seu recetor, com a utilização de terapia anti-hormonal, tal como a ICI 182.780, um anti-estrogénico com a capacidade para inibir e regular negativamente o ER (28), pode ser explorada como uma terapia complementar para a schistosomose.

No futuro, serão avaliados os efeitos específicos das moléculas estrogénicas identificadas nos extratos de schistosomas utilizando modelos celulares e animais.

Referências bibliográficas:

- (1) Botelho MC, Alves H, Barros A, et al. The role of estrogens and estrogen receptor signaling pathways in cancer and infertility: the case of schistosomes. *Trends Parasitol.* 2015;31(6):246-250.
- (2) Botelho MC, Vale N, Gouveia MJ, et al. Tumour-like phenotypes in urothelial cells after exposure to antigens from eggs of *Schistosoma haematobium*: an oestrogen-DNA adducts mediated pathway? *Int J Parasitol.* 2013;43(1):17-26. Epub 2012 Dec 20.
- (3) van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop.* 2003;86(2-3):125-39.
- (4) Hotez PJ, Fenwick A, Kjetland EF. Africa's 32 cents solution for HIV/AIDS. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(5):e430 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2682705/>
- (5) King CH. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. *Acta Trop.* 2010;113(2):95-104. Epub 2009 Dec 4. Review. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2812649/>
- (6) Hodder SL, Mahmoud AA, Sorenson K, et al. Predisposition to urinary tract epithelial metaplasia in *Schistosoma haematobium* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;63(3-4):133-8. <http://www.ajtmh.org/content/63/3/133.long>
- (7) Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 2006 Jun 15;118(12):3030-44.
- (8) Bouvard V, Baan R, Straif K, et al.; WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10(4):321-2.
- (9) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A review of human carcinogens. Part B: biological agents. Lyon: IARC, 2009 (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans ; v. 100B). <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/mono100B.pdf>
- (10) Feldmeier H, Krantz I, Poggensee G. Female genital schistosomiasis as a risk-factor for the transmission of HIV. *Int J STD AIDS.* 1994;5(5):368-72.
- (11) Kjetland EF, Ndhlovu PD, Gomo E, et al. Association between genital schistosomiasis and HIV in rural Zimbabwean women. *AIDS.* 2006;20(4):593-600.
- (12) Jourdan PM, Roald B, Poggensee G, et al. Increased vascularity in cervicovaginal mucosa with *Schistosoma haematobium* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(6):e1170. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3110160/>
- (13) Santos J, Gouveia MJ, Vale N, et al. Urinary estrogen metabolites and self-reported infertility in women infected with *Schistosoma haematobium*. *PLoS One.* 2014;9(5):e96774. doi: 10.1371/journal.pone.0096774. eCollection 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4029575/>
- (14) Botelho MC, Crespo M, Almeida A, et al. *Schistosoma haematobium* and *Schistosomiasis mansoni*: production of an estradiol-related compound detected by ELISA. *Exp Parasitol.* 2009;122(3):250-3.
- (15) Jensen EV. The contribution of "alternative approaches" to understanding steroid hormone action. *Mol Endocrinol.* 2005;19(6):1439-42.
- (16) Mostafa MH, Sheweita SA, O'Connor PJ. Relationship between schistosomiasis and bladder cancer. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1):97-111. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88908/>
- (17) Zhong X, Isharwal S, Naples JM, et al. Hypermethylation of genes detected in urine from Ghanaian adults with bladder pathology associated with *Schistosoma haematobium* infection. *PLoS One.* 2013;8(3):e59089.
- (18) Shiff C, Veltri R, Naples J, et al. Ultrasound verification of bladder damage is associated with known biomarkers of bladder cancer in adults chronically infected with *Schistosoma haematobium* in Ghana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(9):847-54.
- (19) Botelho MC, Soares R, Vale N, et al. *Schistosoma haematobium*: identification of new estrogenic molecules with estradiol antagonistic activity and ability to inactivate estrogen receptor in mammalian cells. *Exp Parasitol.* 2010;126(4):526-35.
- (20) Botelho MC, Ribeiro R, Vale N, et al. Inactivation of estrogen receptor by *Schistosoma haematobium* total antigen in bladder urothelial cells. *Oncol Rep.* 2012;27(2):356-62. Epub 2011 Nov 15. <http://www.spandidos-publications.com/or/27/2/356>
- (21) Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, et al. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(20):10937-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23537/>
- (22) Cavalieri EL, Rogan EG. Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;125(3-5):169-80. Review. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4423478/>



artigos breves_ n. 5

- (22) Cavalieri EL, Rogan EG. Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;125(3-5):169-80. Review. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4423478/>
- (23) Sousa M, Cunha M, Viana P, et al. Outcomes of human blastocyst transfer after slow-freezing using sequential culture: a clinical report. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285(5):1473-8. Epub 2011 Dec 20.
- (24) Saunders PT. Does estrogen receptor beta play a significant role in human reproduction? *Trends Endocrinol Metab.* 2005;16(5):222-7. Review.
- (25) Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC179885/>
- (26) Khattri A, Pandey RK, Gupta NJ, et al. Estrogen receptor beta gene mutations in Indian infertile men. *Mol Hum Reprod.* 2009;15(8):513-20. <http://molehr.oxfordjournals.org/content/15/8/513.long>
- (27) Botelho MC, Sousa M. New biomarkers to fight urogenital schistosomiasis: a major neglected tropical disease. *Biomark Med.* 2014;8(9):1061-3.
- (28) Guerreiro S, Monteiro R, Martins MJ, et al. Distinct modulation of alkaline phosphatase isoenzymes by 17beta-estradiol and xanthohumol in breast cancer MCF-7 cells. *Clin Biochem.* 2007;40(3-4):268-73. Epub 2006 Oct 19.

Ocorrência e disseminação da microalga *Gonyostomum semen* em albufeiras portuguesas

Sérgio Paulino, Arminda Vilares, Elisabete Valério

sergio.paulino@insa.min-saude.pt

Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia. Unidade de Água e Solo. Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

Introdução

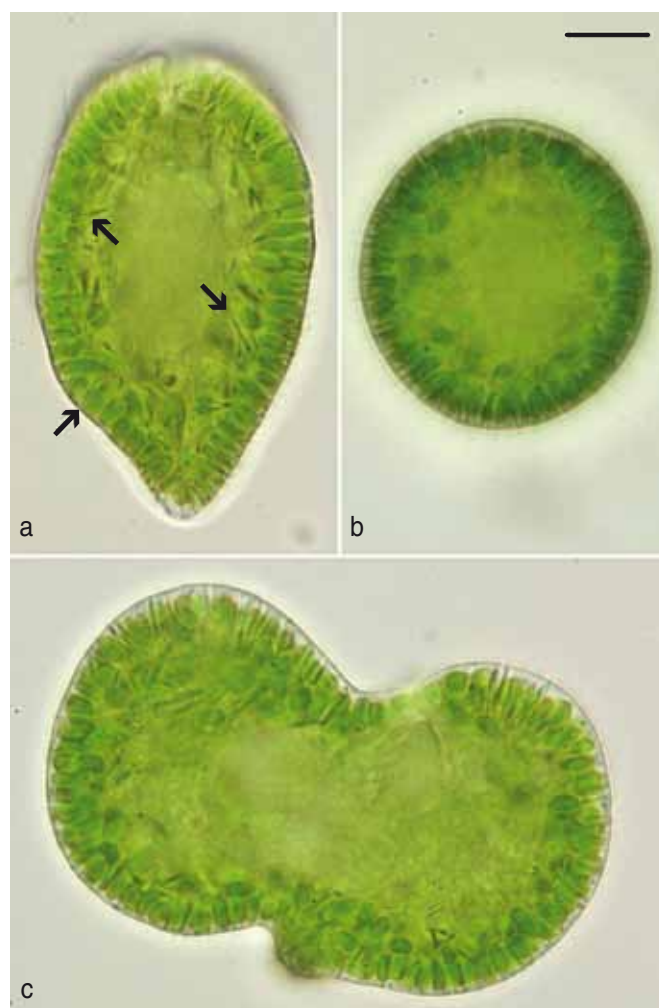
Gonyostomum semen é uma microalga flagelada pertencente à classe Raphidiphyceae. Comum em lagos distróficos da Fenoscandinávia, esta microalga tem expandido a sua distribuição geográfica nas últimas quatro décadas, colonizando lagos e albufeiras não distróficos no norte e centro da Europa (1-4). Tal como outras espécies invasoras, *G. semen* tem a capacidade de, em pouco tempo, dominar a comunidade fitoplanctónica, produzindo com frequência densas florescências, em particular, durante os meses de verão (5,6).

Não existe ainda consenso relativamente aos fatores que promovem a sua expansão geográfica e a formação de florescências sazonais. Porém, vários estudos sugerem uma estreita relação entre a prevalência de *G. semen* e o aumento de compostos húmicos, de nutrientes, da temperatura e da estratificação de oxigénio, bem como da presença de baixos teores de cálcio nos lagos e albufeiras afetados, associados a uma diminuição no pH e na pressão exercida pelos predadores (3,6-9). A invulgar capacidade de adaptação desta microalga a novos ambientes parece estar relacionada não só com a sua capacidade em produzir cistos quando exposta a condições adversas (10), mas também com os seus ciclos diários de migração vertical (11), que afetam de forma decisiva o seu contacto com predadores.

Apesar de, até hoje, não ter sido descrita a produção de toxinas nesta microalga, a sua dominância nas comunidades fitoplanctónicas influencia de forma negativa a diversidade e salubridade dos ecossistemas. As células de *G. semen* são relativamente grandes e frágeis (comprimento 36–92 µm; largura 23-69 µm) (10), pos-

suem um sofisticado sistema de defesa, muito semelhante ao de alguns ciliados, composto por numerosas inclusões intracelulares cilíndricas, denominadas tricocistos (figura 1), que se dispõem internamente junto ao bordo da membrana da célula (12). Quando estimulados mecanicamente ou por contacto com outros organismos, estas estruturas libertam filamentos mucilaginosos com um comprimento até 500 µm (11). A sua expulsão parece estar associada à excreção de substâncias tóxicas ou irritantes não identificadas (7) - compostos possivelmente implicados na lise de alguns dos seus mais diretos competidores na comunidade fitoplanctónica (9).

Figura 1: Formas celulares de *Gonyostomum semen* observadas em amostras colhidas na albufeira da Lapa em novembro de 2014.



a – célula vegetativa; b – cisto temporário; c – hologâmets em fusão.
A escala corresponde a 10 µm. As setas assinalam os tricocistos.

artigos breves_ n. 6

A ocorrência de florescências de *G. semen* tem ainda um impacto profundo na qualidade da água para uso recreativo e para consumo humano. Sujeitos a estímulo mecânico, os tricocistos ejetam filamentos de mucilagem, que se agarram à pele dos banhistas, provocando prurido e irritações cutâneas (7,11). Por outro lado, a presença de grandes quantidades de mucilagem na água, afeta de forma significativa a eficiência das estações de tratamento de água, causando a colmatagem dos sistemas de filtros, e produzindo odor e sabor desagradáveis na água tratada para consumo humano (13).

Objetivos

Neste artigo pretende-se descrever a deteção de *G. semen* em amostras de água doce colhidas em albufeiras portuguesas. São ainda apresentados dados preliminares relativos à sua distribuição geográfica em território continental, no período entre 2009 e 2014.

Resultados e discussão

Nos últimos 5 anos, identificámos a presença desta microalga em amostras colhidas em 13 albufeiras portuguesas, nas bacias hidrográficas do Douro, Mondego e Tejo (figura 2). Estas ocorrências foram, na sua maioria, esporádicas e com uma expressão pouco significativa na comunidade fitoplanctónica. Contudo, em 4 destas albufeiras - assinaladas a vermelho na figura 2 - a presença de *G. semen* foi, recorrente, por vezes com biovolumes superiores a $1,0 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ e predomínios excedendo os 50% relativamente ao biovolume fitoplanctónico total. Estes crescimentos em massa foram observados, maioritariamente, nos meses de setembro a dezembro, de 2012 a 2014.

As 4 albufeiras em causa são pouco profundas e localizam-se em áreas com topografias acidentadas e com abundantes coberturas vegetais naturais. Estas condições tendem a favorecer a deposição de matéria orgânica em decomposição nos leitos submersos, o que por sua vez poderá conduzir à formação de uma elevada quantidade de compostos húmicos em suspensão/dissolução na coluna de água (14) – um fator aparentemente fundamental no estabelecimento e expansão populacional de *G. semen* (2,7).

A análise microscópica das amostras colhidas nestas albufeiras tem revelado não só a presença de numerosas células vegetativas, como

Figura 2: Albufeiras portuguesas onde foram observadas microalgas pertencentes à espécie *Gonyostomum semen* (2009-2014).



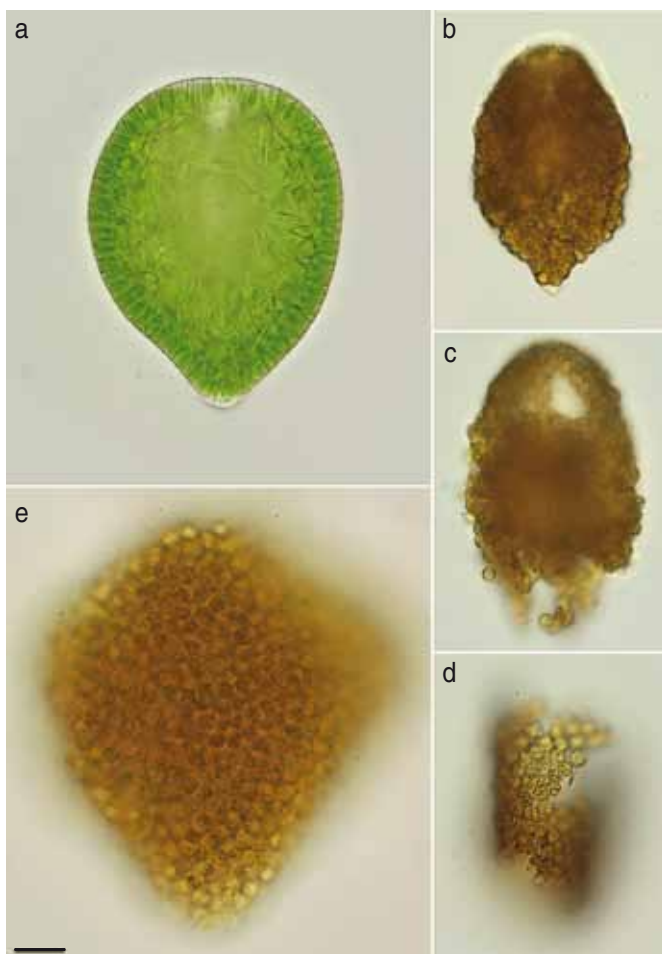
Estão assinalados a vermelho os locais onde se observa esta espécie de forma recorrente.

também de formas transicionais, incluindo cistos temporários e pares de hologâmetas em fusão (figura 1c) (10). Nos lagos da Fenoscandinávia, estas fases do ciclo de vida de *G. semen* são tipicamente observadas durante os meses de verão e outono – período em que as temperaturas da coluna de água ascendem a valores superiores a 10°C (15).

Esta é a primeira vez que é descrita a observação e distribuição geográfica de *G. semen* em albufeiras portuguesas. A sua presença na Península Ibérica tinha sido já detetada em 2000, na albufeira de Valparaíso, no noroeste de Espanha – uma albufeira situada na bacia hidrográfica do Douro, a poucas dezenas de quilómetros da fronteira com Portugal (16). Esta ocorrência sugere a possibilidade desta microalga poder estar presente em território nacional há já algumas dé-

casas. O facto de ter sido detetada apenas agora resulta provavelmente de dificuldades na sua identificação causadas pela rutura da membrana celular (**figura 3c,d**) e outras alterações morfológicas induzidas pelo lugol usado na fixação das amostras para quantificação de fitoplâncton. Quando destruídas, as células de *G. semen* libertam para o exterior agregados de cloroplastos (**figura 3d**), com uma morfologia muito semelhante à de algumas colónias de cianobactérias da Ordem Chroococcales, nomeadamente as pertencentes à espécie *Microcystis flos-aquae* (**figura 3e**). Esta semelhança morfológica poderá causar erros importantes de identificação e, conseqüentemente, de quantificação.

Figura 3: Comparação da morfologia de células vegetativas de *Gonyostomum semen* em fresco (a) e fixadas (b, c e d) com o aspeto de uma colónia de *Microcystis flos-aquae* (e).



A escala corresponde a 10 µm.

Conclusões

Este registo assume particular importância, uma vez que reforça a necessidade de formação contínua dos profissionais envolvidos na monitorização das comunidades fitoplanctónicas residentes nas albufeiras portuguesas, especialmente nas regiões geográficas onde já foi detetada a presença desta microalga.

Acresce também o facto de que a atual falta de caracterização de possíveis compostos bioativos produzidos por *G. semen* não permite ainda avaliar o real impacto das suas florescências no meio ambiente e, sobretudo, na saúde pública, pelo que é de todo o interesse proceder ao isolamento de estirpes desta microalga de forma a poder realizar uma correta avaliação de risco.

Referências bibliográficas:

- (1) Hongve D, Lovstad Ø, Bjørndalen, K. *Gonyostomum semen* – a new nuisance to bathers in Norwegian lakes. Verh. Internat. Verein Limnol. 1988;23:430-4.
- (2) Lepistö L, Antikainen S, Kivinen J. The occurrence of *Gonyostomum semen* (Ehr.) Diesing in Finnish lakes. Hydrobiologia. 1994;273(1):1-8.
- (3) Rengefors K, Weyhenmeyer GA, Bloch I. Temperature as a driver for the expansion of the microalga *Gonyostomum semen* in Swedish lakes. Harmful Algae. 2012;18:65-73.
- (4) Maileht K, Nöges T, Nöges P, et al. Water colour, phosphorus and alkalinity are the major determinants of the dominant phytoplankton species in European lakes. Hydrobiologia. 2013;704(1):115-26.
- (5) Pithart D, Pechar L, Mattsson, G. Summer blooms of raphidophyte *Gonyostomum semen* and its diurnal vertical migration in a floodplain pool. Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie. 1997;85(suppl. 119): 119-33.
- (6) Lebert K, Fernández MF, Hagman, Camilla HC, et al. Grazing resistance allows bloom formation and may explain invasion success of *Gonyostomum semen*. Limnol. Oceanogr. 2012;57(3):727-34.
- (7) Cronberg G, Lindmark G, Björk S. Mass development of the flagellate *Gonyostomum semen* (Raphidophyta) in Swedish forest lakes – an effect of acidification?. Hydrobiologia. 1988;161(1):217-36.
- (8) Findlay DL, Paterson MJ, Hendzel LL, et al. Factors influencing *Gonyostomum semen* blooms in a small boreal reservoir lake. Hydrobiologia. 2005;533(1):243-52.
- (9) Rengefors K, Pålsson C, Hansson LA, et al. Cell lysis of competitors and osmotrophy enhance growth of the bloom-forming alga *Gonyostomum semen*. Aquat Microb Ecol. 2008;51:87-96. http://www.int-res.com/articles/ame_oa/a051p087.pdf
- (10) Figueroa RI, Rengefors K. Life cycle and sexuality of the freshwater raphidophyte *Gonyostomum semen* (Raphidophyceae). J Phycol. 2006;42(4):859-71.
- (11) Salonen K, Rosenberg M. Advantages from diel vertical migration can explain the dominance of *Gonyostomum semen* (Raphidophyceae) in a small, steeply-stratified humic lake. J. Plankton Res. 2000;22(10):1841-53.
- (12) Sörensen I. *Gonyostomum semen* (Ehrenb.) Diesing—en vattenorganism av teoretiskt och praktiskt intresse. Svensk Faunistisk Revy. 1954;2:47-52.
- (13) Berge D. Forurensningsutviklingen i drikkevannskilden Oppgårdstjernet i Frogn kommune – Årsakssammenheng. Oslo: Norsk institutt for vannforskning, 1991. (NIVA/rapport;2533). <http://hdl.handle.net/11250/206260>
- (14) Steinberg, CEW, Kamara S, Prokhotskaya VY, et al. Dissolved humic substances – ecological driving forces from the individual to the ecosystem level?. Freshwater Biology. 2006; 51(7): 1189-210.
- (15) Cronberg G. The life cycle of *Gonyostomum semen* (Raphidophyceae). Phycologia. 2005; 44 (3): 285-93.
- (16) Negro AI, De Hoyos C, Vega JC. Phytoplankton structure and dynamics in Lake Sanabria and Valparaíso reservoir (NW Spain). Hydrobiologia. 2000; 424(1-3):25-37.



Espécies exóticas em lagos ornamentais: adorno ou fonte de desequilíbrio?

Maria Nascimento¹, Sérgio Paulino², Sónia Faria^{2,3},
Manuela Cano², Nuno Rosa², João Carlos Rodrigues³,
Lúcia Reis³, Luísa Jordão²

maria.jordao@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Coimbra.

(2) Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

(3) Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução

Os lagos ornamentais presentes em espaços lúdicos são fundamentais para o equilíbrio nos meios urbanos. Contudo, os microrganismos que neles habitam podem representar uma ameaça para a saúde dos que usufruem destes espaços. O microbioma destes equipamentos urbanos é profundamente afetado pelo seu uso inadequado pelo Homem (deposição de lixo doméstico) e pelos animais que neles habitam ou usufruem.

A população de microrganismos na água pode ainda ser afetada pelas alterações climáticas. Estas alterações macros são alvo de muitos estudos devido ao reconhecido aumento das temperaturas registadas que, entre outros efeitos, promovem a proliferação das populações microbianas (1). Contudo, pequenas alterações, aparentemente inócuas, derivadas da ação do Homem nos ecossistemas podem ter consequências preocupantes. O fenómeno da globalização que contribuiu para o desenvolvimento económico e social também promoveu o intercâmbio de espécies indígenas. Este fenómeno levou à introdução de espécies originárias de uma determinada região (espécies indígenas) em locais onde nunca chegariam naturalmente sendo aí consideradas espécies exóticas.

Em Portugal, foram registados vários casos de introdução de espécies exóticas que alteraram o equilíbrio do ecossistema onde foram inseridas. O achigã é o exemplo dum animal exótico que foi introduzido em rios, lagoas e outros sistemas de água doce. Como este peixe é predador contribui para a diminuição de pequenas espécies nativas alterando o equilíbrio do ecossistema (2). Este fenómeno também foi observado no reino vegetal. O jacinto-de-água

sendo uma planta de crescimento rápido forma tapetes que podem cobrir totalmente a superfície dos cursos de água onde é introduzido. Este fenómeno contribui para a diminuição da qualidade da água e aumento da eutrofização. Para além destes existem muitos outros exemplos de introdução acidental ou consciente sem intenção danosa que originam graves desequilíbrios ambientais (3).

Objetivo

Este trabalho teve como objetivo analisar a evolução sazonal da população de microrganismos dum lago ornamental da região de Lisboa.

Metodologia

Amostragem

As amostras foram recolhidas num lago ornamental da região de Lisboa. A recolha foi efetuada num frasco estéril (100 mL) ou com zaragoatas estéreis numa área de 10 cm² para análise da água ou do biofilme, respetivamente. O acondicionamento e transporte da amostra foi efetuado como descrito anteriormente por Fernandes e colegas (4).

Caraterização dos microrganismos presentes na amostra

O ensaio para o isolamento e identificação das bactérias foi efetuado conforme descrito por Fernandes e colegas (4) com uma alteração. O meio Drigalsky foi substituído por CLED.

Para os fungos após incubação durante 4-5 dias a 25°C em agar de extrato de malte (MEA), foi retirada uma porção da colónia contendo um pouco de agar, utilizando uma lanceta e uma agulha devidamente esterilizadas, tendo o cuidado de selecionar zonas em diferentes estádios de desenvolvimento. Esta foi colocada numa lâmina de vidro sobre uma gota de azul de lactofenol, as hifas foram cuidadosamente separadas das estruturas formadoras de esporos, os conidióforos, e o conjunto foi coberto com uma lamela. A preparação foi observada num microscópio ótico com ampliações que oscilaram entre as 100 e as 1000 vezes. As colónias de fungos foram identificadas com base nas suas características macro (cor, textura, aspeto, tipo de crescimento, etc.) e microscópicas, utilizando como orientação manuais de micologia (5,6).

A análise da população fitoplanctónica presente no lago foi realizada como descrito anteriormente (4).

Ensaio de formação de biofilmes

O ensaio foi realizado para as estirpes encontradas no biofilme conforme descrito por Bandeira e colegas (7). A capacidade das diferentes bactérias formarem biofilmes isoladamente ou em conjunto foi avaliada a 25°C e 37°C.

Preparação de amostras para microscopia eletrónica de varrimento

Para análise do fitoplâncton por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) 10 mL da amostra de água foram centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos. Após ter sido ressuscitado em aproximadamente 200 µl de água o sedimento foi transferido para um porta-amostra previamente revestido com fita de carbono e deixado a secar à temperatura ambiente. No caso dos fungos uma parte da colónia cultivada em MEA foi transferida com o auxílio duma pinça para um porta-amostra revestido com fita de carbono. As amostras foram analisadas num SEM de baixo vácuo (Phenom).

_Resultados e discussão

Inicialmente o objetivo deste estudo era analisar o impacto das estações do ano na flora dos lagos dum parque de Lisboa. O primeiro lago a ser analisado tinha revelado na colheita de inverno (fevereiro) a existência duma população bacteriana constituída por *Klebsiella pneumoniae ozaenae*, *Pastorella* e *Shigella* não tendo sido deteta-

dos nem fungos nem leveduras. Na colheita de água realizada em maio estes resultados apresentaram alterações significativas. No meio não seletivo, independentemente da temperatura de incubação, foi sempre detetado um número incontável de microrganismos (> 300 unidades formadoras de colónias- UFC). As UFC presentes a 30 e 37°C no meio CLED eram semelhantes tendo a sua identificação revelado a presença de *Enterobacter aerogenes* e *Aeromonas sobria*. No grupo das bactérias foi ainda identificado a partir do meio não seletivo incubado a 44°C uma bactéria do género *Bacillus*. Ao contrário do registado na colheita de inverno desta vez a *Klebsiella pneumoniae* estava ausente, foram detetados fungos dos géneros *Fusarium* e *Penicillium* e uma levedura (*Rhodotorula* sp). Na figura 1A é apresentada uma cultura de *Penicillium* e na figura 1B um pormenor do mesmo obtido por SEM.

De seguida resolvemos caracterizar a flora microbiana presente no biofilme do lago. Desta forma pretendemos verificar se as alterações registadas na população planctónica se refletiam também nos biofilmes. Tanto os dois géneros de fungos como as *Aeromonas* presentes na água foram identificados no biofilme. Adicionalmente, foi também identificado um coco-bacilos Gram-negativo o *Chromobacterium violaceum*. No caso das *Aeromonas* foram

Figura 1: Fungo do género *Penicillium* isolado numa amostra de água ornamental realizada em maio. Cultura do fungo em agar de extrato de malte (A) e um pormenor obtido por SEM (B).



artigos breves_ n. 7

encontradas duas espécies *Aeromonas veroni*, também presente na água, e *Aeromonas sobria*. Estes resultados levantaram várias questões. A primeira seria se a ocorrência de temperaturas atipicamente elevadas durante o mês de maio, características dos meses de verão, poderiam justificar esta alteração da flora microbiana por si só. O predomínio da população de *Aeromonas* tipicamente associadas à colonização/ infecção de peixes (8) sugeria a existência de outros fatores. No período de tempo que separou as duas colheitas foi introduzida neste lago uma população de carpas Koi originárias do Japão. A introdução de espécies exóticas, e por arrasto dos microrganismos que as colonizam, pode alterar de forma significativa o equilíbrio do ecossistema. Assim, a alteração da população microbiana do lago pode não ser devida unicamente à transição das estações do ano mas também à introdução das carpas Koi.

O próximo passo consistiu no estudo da cinética de formação do biofilme bacteriano. A análise da **tabela 1** mostra que as estirpes de *Aeromonas* apresentam uma maior capacidade de formação de biofilme do que o *C. violaceum*. De acordo com o observado para os biofilmes de *K. pneumoniae* presentes nas amostras de fevereiro todas as bactérias, com exceção do *C. violaceum*, apresentam maior capacidade de formação de biofilme a 25°C do que a 37°C. Esta observação indicia uma adaptação das bactérias às condições ambientais. O resultado observado para o *C. violaceum* poderá ser explicado pelas variações experimentais e pela sua menor apetência para formar biofilme. Uma vez que a partir das amostras de biofilmes foram isoladas várias bactérias tentamos mimetizar a formação dum biofilme misto em condições laboratoriais. Ao contrário do esperado a performance das bactérias individualmente, com exceção do *C. violaceum*, era melhor do que quando associadas. Este resultado sugere que ao nível ambien-

tal se pode observar um fenómeno semelhante ao observado nos biofilmes da cavidade oral. Neste caso existe uma divisão entre os microrganismos que iniciam a formação de biofilme e outros que se associam posteriormente (9). Assim, resolvemos mimetizar este fenómeno começando por deixar as várias espécies de *Aeromonas* formarem um biofilme maduro (aproximadamente durante 18h) tendo depois adicionado o *C. violaceum*. Os resultados preliminares obtidos demonstram que nos estadios iniciais (2, 4h) a associação com as *Aeromonas* facilita a formação de biofilme pelo *C. violaceum*. Contudo, estes resultados carecem de validação uma vez que teremos de demonstrar que o acréscimo de biomassa se deve apenas ao *C. violaceum*. Outro aspeto que também deverá ser investigado é o papel desempenhado pelos fungos na formação e persistência do biofilme.

Tabela 1: Avaliação da formação de biofilmes a diferentes temperaturas.

Bactérias	Formação de biofilme (OD _{570nm})	
	25°C	37°C
<i>A. sobria 1</i>	0,284 ± 0,06	0,155 ± 0,03
<i>C. violaceum</i>	0,017 ± 0,01	0,096 ± 0,05
<i>A. veronii</i>	0,761 ± 0,11	0,185 ± 0,004
<i>A. sobria 2</i>	0,756 ± 0,24	0,119 ± 0,09

A capacidade de formação de biofilme pelas bactérias foi avaliada após 24h de incubação a 25°C ou 37°C por um método espectralométrico.

O último aspeto estudado foi a evolução da população de fitoplâncton. Embora o estado trófico do lago se tenha mantido inalterado (eutrófico), o equilíbrio entre as populações existentes foi alterado (**tabela 2**). As populações de cianobactérias, clorófitas, criptófitas e dinoflagelados registaram um aumento tanto em densidade como

Grupos fitoplanctónicos	Densidade (células/mL)		Biovolume (mm ³ /L)	
	Fevereiro	Maio	Fevereiro	Maio
Cianobactérias	1357	567762	0,04	6,25
Carófitas	95	-	0,02	-
Clorófitas	2286	20333	2,44	2,44
Criptófitas	-	381	-	0,22
Diatomáceas	4143	2524	1,48	1,48
Dinoflagelados	71	762	1,85	1,85
Haptófitas	24	-	4,09x10 ⁻⁴	-
Total	7976	591762	5,84	12,25

Tabela 2: Análise da densidade e biovolume da população fitoplanctónica.

artigos breves_ n. 7

em diversidade. O fenómeno inverso, diminuição da população, foi observado para as carófitas e diatomáceas. As haptófitas não foram sequer detetadas na amostra colhida em maio. Na **figura 2** é apresentado um representante das diatomáceas o *Achnanthydium minutissimum*.

Figura 2: Microfotografia de *Achnanthydium minutissimum*, pertencente ao grupo das diatomáceas, obtida por SEM.



O aumento da população foi particularmente significativo para as cianobactérias (cerca de 78%). Algumas espécies de cianobactérias produzem florescências tóxicas que são mais frequentes durante o verão. A monitorização destes fenómenos durante as duas últimas décadas incidiu por imperativos legais sobre as microcistinas que são um dos grupos mais usuais de cianotoxinas. Uma vez que está descrita a acumulação de microcistinas ao nível do tecido dos peixes a introdução das carpas, o aproximar da estação quente e o aumento da população de cianobactérias conse-

lha a monitorização deste ecossistema para evitar eventuais problemas para a saúde dos que com ele interagem (10). Outro aspeto curioso foi a diminuição da densidade de microrganismos fitoplanctónicos associados à produção de compostos com atividade anti-fúngica, como por exemplo a clorófito *Chlamydomonas reinhardtii* (11), e o aparecimento de fungos e leveduras no lago.

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram como uma pequena alteração pode ter impacto num ecossistema. A introdução duma espécie de peixes exóticos juntamente com a transição das estações do ano alterou profundamente o equilíbrio do ecossistema em estudo. Esta observação é um alerta para refletirmos sobre o modo como interagimos com o meio ambiente.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Climate change and health [Em linha]. Fact sheet n° 266. Rev. Aug. 2014. [consult. 15/7/2015] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs266/en/>
- (2) Ribeiro F, Collares-Pereira MJ. Life-history variability of non-native centrarchids in regulated river systems of the lower River Guadiana drainage (south-west Iberian Peninsula). *J Fish Biol.* 2010;76(3):522-37.
- (3) de Almeida JD, Freitas H. Exotic naturalized flora of continental Portugal: a reassessment. *Botanica Complutensis.* 2006;30:117-30. <http://revistas.ucm.es/index.php/BOCM/article/view/BOCM0606110117A/6271>
- (4) Fernandes V, Paulino S, Costa C, et al. Avaliação do risco para a saúde pública resultante do contacto com águas recreativas e ornamentais. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2015 abril-junho;4(12):7-11. <http://hdl.handle.net/10400.18/3031>
- (5) Samson RA, Houbakken J, Thrane U, et al. (eds). *Order Food and Indoor Fungi.* Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre, 2010. (CBS Laboratory Manual Series 2).
- (6) Larone D H. *Medically important fungi: a guide to identification.* 2nd. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993.
- (7) Bandeira M, Carvalho PA, Duarte A, et al. Exploring Dangerous Connections between *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections. *Pathogens.* 2014 ;3(3):720-31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4243437/>
- (8) Zhou QL, Wang YJ, Xie J, et al. Distribution and virulence gene comparison of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish and water environment. *Pol J Microbiol.* 2013;62(3):299-302. <http://www.pjm.microbiology.pl/archive/vol6232013299.pdf>
- (9) Tabenski L, Maisch T, Santarelli F, et al. Individual growth detection of bacterial species in an in vitro oral polymicrobial biofilm model. *Arch Microbiol.* 2014;196(11):819-28.
- (10) Ni W, Zhang J, Luo Y. Microcystin accumulation in bighead carp (*Aristichthys nobilis*) during a *Microcystis*-dominated bloom and risk assessment of the dietary intake in a fish pond in China. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015 Jul 8. Doi 10.1007/s11356-015-4974-9. [Epub ahead of print].
- (11) Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. In: Mendez-Vilas A. (ed.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* Badajoz: Formatex Research Center, 2011, pp. 1272-80. (Microbiology book series; 3). <http://www.formatex.info/microbiology3/book/1272-1284.pdf>



Aplicação de modelo de digestão *in vitro* para a determinação da bioacessibilidade de patulina em sumos de fruta

Ricardo Assunção^{1,2,3}, Carla Martins¹, Mariana Ferreira^{1,4},
Paula Alvito^{1,3}

ricardo.assuncao@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

(2) Universidade de Évora.

(3) CESAM-Centro de Estudos do Ambiente e do Mar. Faculdade de Ciências,
Universidade de Lisboa.

(4) Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

Introdução

A ingestão de alimentos é considerada a principal via de exposição a contaminantes, contudo a quantidade total de um contaminante ingerido (dose externa) nem sempre reflete a quantidade disponível para ser absorvida a nível intestinal (bioacessibilidade) e consequentemente provocar efeitos tóxicos (1,2).

Apesar da relevância fisiológica, os ensaios *in vivo* nem sempre podem ser usados para avaliar a toxicidade de contaminantes alimentares, atendendo a razões éticas, constrangimentos técnicos, custos e elevada variabilidade interindividual (3). Por forma a contornar estas desvantagens, e no que diz respeito ao estudo da digestão, a utilização de metodologias *in vitro* de simulação da digestão constitui uma ferramenta com crescente aplicação no domínio da toxicologia alimentar. Os modelos de digestão *in vitro* simulam, de uma forma simplificada, o processo de digestão humana a nível oral, gástrico e intestinal, permitindo a determinação da bioacessibilidade de componentes alimentares a partir da sua matriz durante o trânsito gastrointestinal (4). Estes modelos de digestão *in vitro* pretendem recriar as condições fisiológicas do trato gastrointestinal, nomeadamente, a composição química dos fluidos digestivos, pH, e tempo de permanência característico de cada compartimento (1,4). A bioacessibilidade é influenciada pela composição da matriz alimentar, nomeadamente, a sua natureza e a presença de outros alimentos (5).

A contaminação de alimentos com micotoxinas representa atualmente um dos mais importantes assuntos no domínio da segurança

alimentar (6). As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos e que apresentam efeitos teratogénicos, carcinogénicos, mutagénicos, imunotóxicos ou nefrotóxicos para os seres humanos (7). A patulina (PAT), uma micotoxina produzida por fungos do género *Penicillium* spp. durante o processo de deterioração da fruta, representa uma preocupação particular uma vez que a exposição humana a esta micotoxina pode resultar em toxicidade aguda ou crónica. As crianças são uma população particularmente vulnerável à exposição a PAT devido ao elevado consumo de produtos à base de maçã ou derivados de fruta (8).

Objetivos

O presente estudo pretende determinar a bioacessibilidade da PAT em sumos de fruta, utilizando para o efeito um modelo de digestão *in vitro*, bem como estudar a influência da composição e natureza do sumo. Considerando que habitualmente os sumos podem ser ingeridos simultaneamente com refeições sólidas, será ainda avaliado o efeito da adição de uma refeição à base de carne.

Material e métodos

Os estudos de bioacessibilidade foram realizados de acordo com o modelo de digestão *in vitro* descrito por Versantvoort e colaboradores (2005). Os ensaios foram realizados na presença e na ausência de uma refeição sólida (preparado comercial para crianças de carne com esparguete) em duplicado. Sete sumos de fruta de composição (maçã e outros frutos) e natureza (turvos e lípidos) diferentes, foram adquiridos em supermercados da região de Lisboa. A bioacessibilidade foi expressa em percentagem (%) e determinada pela razão entre o teor de patulina antes e após digestão.

As condições analíticas usadas para determinação da PAT nos extratos digeridos foram as descritas por Barreira e colaboradores (2010), usando uma metodologia de extração em fase sólida com determinação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência e deteção por ultravioleta (SPE-HPLC-UV). Todos os extratos da digestão foram analisados em duplicado e os valores médios da PAT foram expressos em $\mu\text{g.Kg}^{-1}$. A metodologia analítica apresentou um limite de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ) de $0.9 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ e $2.9 \mu\text{g.Kg}^{-1}$, respetivamente, e um coeficiente de variação de 3%.

Resultados e discussão

Os valores de bioacessibilidade na ausência de refeição sólida variaram entre 14,33% e 48,52% com um valor médio de $27,65 \pm 13,50\%$. Os valores de bioacessibilidade na presença de refeição variaram entre 1,67% e 15,11% com um valor médio de $7,89 \pm 4,03\%$ (tabela 1). A bioacessibilidade na ausência de refeição apresentou um valor significativamente mais elevado do que na presença de refeição ($p=0,001$). O valor médio de bioacessibilidade para os sumos de fruta límpidos (24,68%) revelou ser inferior à dos sumos de fruta turvos (31,60%), apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa ($p=0,088$), quando na ausência de refeição padrão. Pelo contrário, na presença de refeição, o valor médio de bioacessibilidade dos sumos de fruta límpidos (9,71%) revelou ser superior à dos sumos turvos (5,46%), sendo a diferença estatisticamente não significativa ($p=0,093$).

Os resultados disponíveis sobre a bioacessibilidade da PAT em sumos de fruta ou produtos à base de maçã são escassos assim como relativamente à influência da adição de uma refeição sólida. Brandon e colaboradores (2012) determinaram valores superiores compreendidos entre 55-85% em produtos à base de maçã, usando o mesmo método de digestão do presente estudo (9). Raiola e colaboradores (2012) determinaram valores idênticos para dois sumos de maçã (29% e 25%), mas usando outro método de digestão (2). O desenvolvimento e utilização de metodologias de digestão *in vitro* harmonizadas é pois essencial para uma comparação mais eficaz entre resultados. A presença de outros tipos de fruta nos sumos, para além de maçã, poderá também influenciar os resultados. A bioacessibilidade de micotoxinas pode variar para diferentes tipos de alimentos, nomeadamente, massas alimentares (10).

Tabela 1: Bioacessibilidade (%) da patulina em sete sumos de fruta (límpidos e turvos), na ausência ou na presença de uma refeição sólida.

Sumo de fruta	Natureza	Bioacessibilidade (%) Ausência de refeição	Média ± SD	Bioacessibilidade (%) Presença de refeição	Média ± SD
Maçã	L	14,33	$15,55 \pm 1,73$	6,80	$9,48 \pm 3,80$
		16,77		12,17	
Maçã e outros 3 frutos	L	17,97	$18,70 \pm 1,03$	13,25	$12,99 \pm 0,37$
		19,43		12,73	
Maçã e outros 5 frutos	L	16,41	$16,10 \pm 0,45$	15,11	$8,39 \pm 9,50$
		15,78		1,67	
Maçã e outros 8 frutos	L	48,52	$48,39 \pm 0,19$	9,41	$7,99 \pm 2,00$
		48,25		6,58	
Bioacessibilidade sumos límpidos			$24,68 \pm 14,71$		$9,71 \pm 4,47$
Maçã	T	27,57	$27,17 \pm 0,57$	4,50	$4,65 \pm 0,21$
		26,76		4,80	
Maçã e cenoura	T	22,59	$21,33 \pm 1,78$	5,39	$5,05 \pm 0,48$
		20,07		4,71	
Maçã e outros 5 frutos	T	44,46	$46,30 \pm 2,60$	5,14	$6,68 \pm 2,18$
		48,14		8,22	
Bioacessibilidade sumos turvos			$31,60 \pm 11,77$		$5,46 \pm 1,39$
Bioacessibilidade total			$27,65 \pm 13,50^*$		$7,89 \pm 4,03^*$

L - Límpido; T - Turvo; SD - desvio padrão; * - $p < 0,05$ (Teste *Mann-Whitney*), comparando a bioacessibilidade de PAT na ausência e na presença da refeição.

Conclusões

A utilização de metodologias *in vitro* permite determinar as doses efetivas que vão exercer os potenciais efeitos tóxicos nos seres humanos. O presente estudo salienta a influência da adição de uma refeição sólida na bioacessibilidade de contaminantes alimentares.

O uso combinado de modelos *in vitro* que simulem a digestão e a absorção intestinal (11), disponibilizam uma abordagem ampla do que sucede no decurso do processo de digestão e absorção de contaminantes alimentares.

Financiamento

Este trabalho foi realizado no âmbito do projeto "MycoMix" (PTDC/DTP-FTO/0417/2012), financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Artigo baseado em: Assunção R, Ferreira M, Martins C, et al. Applicability of *in vitro* methods to study patulin bioaccessibility and its effects on intestinal membrane integrity. *J Toxicol Environ Health A*. 2014;77(14-16):983-92.

Referências bibliográficas:

- (1) Versantvoort CH, Oomen AG, Van de Kamp E, et al. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(1):31-40.
- (2) Raiola A, Meca G, García-Llatas G, et al. Study of thermal resistance and *in vitro* bioaccessibility of patulin from artificially contaminated apple products. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(9):3068-72.
- (3) Ménard O, Cattenoz T, Guillemin H, et al. Validation of a new *in vitro* dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chem*. 2014;145:1039-45. Epub 2013 Sep 14.
- (4) Hur SJ, Lim BO, Decker EA, et al. *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chem*. 2011;125(1):1-12. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.036
- (5) Versantvoort, CHM, van de Kamp E, Rempelberg CJM. Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. Bilthoven: RIVM, 2004 (RIVM report 320102002/2004). http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=rivmp:13066&type=org&disposition=inline&ns_nc=1
- (6) WHO global strategy for food safety : safer food for better health. Geneva: World Health Organization, 2002, p.11. <http://whqlibdoc.who.int/publications/9241545747.pdf>
- (7) van Egmond HP, Schothorst RC, Jonker MA. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389(1):147-57.
- (8) Barreira MJ, Alvito PC, Almeida CMM. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chem*. 2010;121(3): 653-8.
- (9) Brandon EFA, Baars AJ, Te Biesebeek JD, et al. Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children. *World Mycotoxin J*. 2012;5(4):391-403.
- (10) Raiola A, Meca G, Mañes J, et al. Bioaccessibility of deoxynivalenol and its natural co-occurrence with ochratoxin A and aflatoxin B1 in Italian commercial pasta. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(2):280-7. Epub 2011 Oct 8.
- (11) De Nijs M, van den Top HJ, Portier L, et al. Digestibility and absorption of deoxynivalenol-3-beta-glucoside in *in vitro* models. *World Mycotoxin J*. 2012; 5(3): 319-24.



Registo Nacional de Anomalias Congénitas Relatório 2000-2010 e Resumo histórico

O Instituto Ricardo Jorge acaba de publicar o relatório sobre vigilância epidemiológica das anomalias congénitas referente a 11 anos (2000 a 2010). O RENAC é um registo nosológico de base populacional que recebe notificações da ocorrência de anomalias congénitas (AC) no Continente e Regiões Autónomas, sendo registados os casos de AC *major* diagnosticadas em recém-nascidos vivos, em fetos mortos e nos fetos submetidos a interrupção médica da gravidez. Ao assinalar 20 anos de existência, para melhor conhecimento do Registo, disponibiliza ainda a coleção completa dos relatórios em formato digital, acompanhado de um resumo histórico do percurso do RENAC desde a sua criação.

Relatório RENAC 2000-2010:

<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Paginas/RENAC2000-2010.aspx>

Resumo histórico dos 20 anos do RENAC:

<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Paginas/20anosRENAC.aspx>

Laboratório Nacional para Vírus da Poliomielite do INSA

OMS renova acreditação

A Organização Mundial da Saúde para a região europeia (OMS Europa) renovou recentemente a acreditação do Laboratório Nacional de Doenças Evitáveis pela Vacinação do Instituto Ricardo Jorge como o laboratório nacional da OMS para os vírus da Poliomielite. Esta acreditação reconhecida ao laboratório desde 2000, certifica que o laboratório utiliza as metodologias preconizadas pela OMS, dispõe de todo o equipamento específico e de pessoal qualificado para realizar o diagnóstico laboratorial para os vírus da Poliomielite, nomeadamente o isolamento viral, tipificação e diferenciação intratípica.

A avaliação das condições dos laboratórios é efetuada anualmente, dispondo a OMS de uma rede europeia de laboratórios para a Poliomielite, no âmbito dos planos de ação europeus para a erradicação desta doença. Também em Portugal existe um Programa Nacional de Erradicação da Poliomielite - Plano de Ação Pós-Eliminação, que visa assegurar a vigilância e deteção da infeção por este vírus, papel em que o Laboratório do Instituto Ricardo Jorge assume um papel de relevo.

Mais informações disponíveis em:

http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Paginas/OMS_acredLabDoeEvit.aspx

4ª Reunião da Vigilância Epidemiológica da Gripe em Portugal

Lisboa, INSA, 6 outubro 2015

No dia 6 de outubro decorrerá no Instituto Ricardo Jorge a próxima reunião anual da vigilância epidemiológica da gripe em Portugal, no âmbito das suas Jornadas de Doenças Infecciosas 2015. O encontro, coorganizado pelo Instituto Ricardo Jorge e a Direção-Geral da Saúde, debaterá os resultados da vigilância epidemiológica da gripe na época 2014/2015 e a vacinação antigripal, sendo ainda discutidas novas abordagens da vigilância dos vírus respiratórios e as perspetivas de trabalho do Programa nacional para a próxima época (2015/2016).

Programa brevemente disponível em: www.insa.pt

Programa Nacional de Rastreio Neonatal

Edição de novos materiais informativos

Foram lançados novos materiais informativos de divulgação do Programa Nacional de Rastreio Neonatal, também conhecido por teste do pezinho. Este rastreio nacional, existente desde 1979, permite diagnosticar um conjunto de doenças graves ainda antes do aparecimento dos sinais clínicos, possibilitando o tratamento precoce.

Folheto e cartaz disponíveis em:

http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Paginas/Tpezinho_novosmatinf.aspx

Curso Epidemiologia e bioestatística aplicadas à investigação em saúde

Lisboa, INSA/ENSP, 25 setembro 2015

A abordagem e os métodos epidemiológicos e bioestatísticos são essenciais para a investigação, vigilância, monitorização e observação em saúde. Especialistas do Departamento de Epidemiologia do Instituto Ricardo Jorge realizam um curso de 5 dias com a finalidade de promover competências no desenho, planeamento, execução, análise e interpretação de estudos de investigação epidemiológica em saúde. O curso destina-se especialmente a investigadores e profissionais de saúde e áreas afins.

Programa e inscrição: <http://formext.insa.pt/course/category.php?id=3>



Curso Validação de métodos: determinação de agentes químicos no ar

Lisboa, INSA, 24-25 setembro 2015

A necessidade de se mostrar a qualidade das medições químicas é cada vez mais exigida e reconhecida. A avaliação da exposição a agentes químicos requer a existência de métodos de amostragem e análise que permitam determinar a concentração dos agentes no local de trabalho usando métodos analíticos que possam ser validados (ISO/IEC 17025).

São objetivos do curso promover competências para elaborar procedimentos de validação de métodos de ensaio aplicados à determinação de agentes químicos no ar e demonstrar que o método de ensaio apresenta as características necessárias para obtenção de resultados com qualidade exigida.

O curso destina-se principalmente a técnicos de laboratórios públicos e privados com responsabilidade na implementação e validação de métodos para determinação de agentes químicos ambientais.

Programa e inscrição: <http://formext.insa.pt/course/category.php?id=20>

Workshop As condições de trabalho e a qualidade de vida no quotidiano

Lisboa, INSA, 27 outubro 2015

A globalização e as novas tecnologias têm vindo a alterar a natureza do trabalho: modificam riscos antigos, potenciam outros e introduzem novos. São mudanças rápidas que desafiam sistemas de prevenção, confrontados com situações, simultaneamente, de complexidade crescente e de escassez de recursos.

Neste âmbito, o *workshop* "As condições de trabalho e a qualidade de vida no quotidiano: o contributo da Segurança e Saúde no Trabalho" pretende sensibilizar os profissionais para a necessidade do cumprimento das boas práticas no local de trabalho e aprofundar a discussão em torno de aspetos críticos essenciais à promoção da qualidade de vida no trabalho e ao Bem-Estar do indivíduo.

O encontro desenvolver-se-á em 4 painéis de debate: Risco no local de trabalho, Avaliação e gestão do risco em contexto laboratorial, Controlo de infeção e Condições de trabalho: *stress* no dia-a-dia.

A iniciativa destina-se a profissionais de saúde e outros interessados na temática da Higiene, Segurança e Saúde no trabalho.

Programa e inscrição: <http://formext.insa.pt/course/category.php?id=16>

ficha técnica

_ Título: Boletim Epidemiológico Observações

_ Periodicidade: Trimestral

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

_ Numeração: 2ª série
Volume 4, número 13
Julho - Setembro 2015

_ 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
Luciana Costa, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis
Jorge Machado, Departamento de Doenças Infecciosas
Manuela Caniça, Conselho Científico do INSA
Manuela Cano, Departamento de Saúde Ambiental
Peter Jordan, Departamento de Genética Humana
Silvia Viegas, Departamento de Alimentação e Nutrição

_ Revisão Científica
Astrid Vicente, Doenças Não Transmissíveis | Carlos Matias Dias, Acidentes Domésticos e de Lazer | Cristina Furtado, Doenças Infecciosas | Manuela Cano, Saúde Ambiental | Silvia Viegas, Segurança Alimentar

_ Coordenação técnica Elvira Silvestre, Biblioteca da Saúde
_ Composição e paginação Francisco Tellechea, Biblioteca da Saúde
(segundo layout inicial de Nuno Almodovar Design, Lda.)

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2015.

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 nº 1a).

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

Tel.: (+351) 217 519 200
Fax: (+351) 217 529 400
E-mail: info@insa.min-saude.pt

www.insa.pt