



2014

número

09

2ª série

Lisboa\_INSA, IP

publicação trimestral \_ julho - setembro

ISSN: 2183-8873 (em linha)

# Observações

**Boletim Epidemiológico****editorial****\_Tecnologias de informação, literacia e bem-estar**

Em pouco mais de 50 anos as tecnologias de informação e comunicação contribuíram para uma mudança ímpar, progressiva e profunda do nosso dia-a-dia.

A Saúde é um dos domínios em que o efeito é muito evidente, uma vez que estas tecnologias contribuíram para o desenvolvimento de meios de diagnóstico e terapêutica muito sofisticados e eficazes, com resultados notáveis ao nível do estado de saúde e bem-estar do cidadão e das populações. Ao mesmo tempo, são também um dos pilares dos sistemas de prestação de cuidados por permitirem a produção e a gestão de informação e conhecimento necessários para suportar a decisão nos vários campos e patamares destes sistemas.

Hoje em dia não seria possível responder aos desafios que a sociedade global coloca no campo da saúde sem dispor de estruturas tecnológicas capazes de recolher, armazenar e disponibilizar informação de elevada qualidade que permita produzir evidência científica e manter, por exemplo, uma vigilância eficaz e atempada sobre um conjunto de fenómenos relevantes, como algumas doenças infecciosas ou agentes perigosos para a saúde.

Um efeito muito particular destas tecnologias reside no facto de permitirem a comunicação quase instantânea e global de informação, o que podendo ser excelente no campo científico, pode não ser isento de riscos se esta informação for veiculada pela comunicação social e pelas redes sociais de forma distorcida ou incompleta.

Sublinhe-se que, por vezes, o cidadão comum tem muitas dificuldades em descodificar e interpretar a informação relacionada com a saúde com níveis diferentes de rigor que circula nestes canais, levando a que certas situações possam ser percebidas como tendo

[→ continua](#)**nesto número****Editorial****Tecnologias de informação, literacia e bem-estar**

p 01

*Mariana Augusto Neto (Médica especialista em Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia do INSA)***Artigos Breves****Saúde Ambiental****1\_ Qualidade do ar interior em lares de idosos em Portugal, Projeto GERIA**

p 03

*Ana Mendes, Livia Aguiar, Cristiana Pereira, Paula Neves, Susana Silva, João Paulo Teixeira***2\_ Avaliação da contaminação do ar por fibras respiráveis em edifícios com materiais em fibrocimento**

p 07

*Maria do Carmo Proença, Fátima Aguiar, Nuno Rosa***Alimentação e Nutrição****3\_ Ocorrência de acrilamida em alimentos portugueses: resultados preliminares**

p 09

*Joana Agostinho, Catarina André, Isabel Castanheira***Doenças Não Transmissíveis****4\_ Prevalência de Acidente Vascular Cerebral na população portuguesa: dados da amostra ECOS 2013**

p 12

*Mafalda Sousa-Uva, Carlos Matias Dias***5\_ Associação de genes HLA e não HLA com a suscetibilidade para a sarcoidose na população portuguesa do norte**

p 15

*Helena Alves, Bruno Lima, António Mórals***Doenças Infecciosas****6\_ Brucelose humana: análise retrospectiva de casos clínicos suspeitos de infeção entre 2002 e 2013**

p 19

*Ana Pelerito, Rita Cordeiro, Rita Matos, Maria Augusta Santos, Sofia Soeiro, Sofia Nuncio***7\_ Carbúnculo: uma doença rara em Portugal?**

p 22

*Rita Cordeiro, Ana Pelerito, Sofia Nuncio***8\_ Subtipagem do vírus da Hepatite C por sequenciação: um contributo para o conhecimento da diversidade genética**

p 26

*Elizabeth Pádua, Ana Patrícia Avó, Ivone Águas Doce, Catarina Almeida, Helena Cortes Martins*

elevado potencial de ameaça à vida e ao bem-estar, sem o serem realmente, e vice-versa, introduzindo uma componente emocional que não pode ser ignorada.

Como exemplos destes efeitos, refere-se a recusa de alguns pais, noutros países, em vacinar os filhos com base em certos dados científicos não confirmados e divulgados acriticamente e, no nosso País, a recente preocupação com a remoção dos materiais contendo amianto existentes em diversos locais, especialmente escolas.

Neste último caso, não se põe em questão que se trate de uma preocupação legítima. A persistência de materiais contendo amianto utilizados no período 1950-1990 do século passado na construção civil é uma realidade e constitui um problema de saúde pública e de saúde ocupacional a necessitar de intervenção urgente, integrada, planeada e coerente por parte das entidades responsáveis. No entanto, o artigo que se publica nesta edição sobre a avaliação da contaminação do ar ilustra de forma muito evidente o diferencial entre a informação veiculada pela comunicação social e o risco realmente existente no que respeita a um dos materiais em causa (fibrocimento) e que mais polémica tem suscitado.

O cidadão deve estar habilitado a poder identificar e a gerir de forma adequada os riscos para a saúde, tanto no dia-a-dia como no seu local de trabalho. Referimo-nos à capacidade das pessoas obterem, processarem e compreenderem informação básica sobre saúde – literacia - que é considerada um elemento crítico pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (1) e como um dos determinantes do bem-estar pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) (2).

Perante estes paradoxos dos tempos atuais, o facto de dispormos de dispositivos e estruturas muito sofisticados na saúde, não invalida que, para obter um integral *return on investment*, nesta como em todas as outras áreas da saúde pública, seja necessária a adoção de medidas que favoreçam a melhoria da literacia, tanto da comunicação social como da população em geral, de forma a contribuir para a diminuição das desigualdades entre os cidadãos e para que estes possam realizar todo o seu potencial de saúde.

Assinale-se por último e como corolário, que este tipo de intervenções em saúde pública tem efeitos amplificadores e sinérgicos de outras medidas de carácter mais estrutural, são um investimento que cria valor no sentido de gerar uma sociedade sustentável e justa, devendo ser avaliados e geridos de forma sistemática e não tratados como uma mera despesa.

Mariana Augusto Neto  
Médica especialista em Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia do INSA

#### Referências bibliográficas:

- (1) Kickbusch I, Pelikan JM, Apfel F, et al. (eds). Health literacy: the solid facts. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 2013. [LINK](#)
- (2) OECD Guidelines on Measuring Subjective Well-being. Paris: OECD Publishing, 2013. [LINK](#)



## Qualidade do ar interior em lares de idosos em Portugal, projeto GERIA

Ana Mendes, Lúvia Aguiar, Cristiana Pereira, Paula Neves, Susana Silva, João Paulo Teixeira

ana.sofia.mendes@insa.min-saude.pt

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

### Introdução

O estudo da qualidade de vida do idoso ocupa um lugar de destaque na nossa sociedade devido às alterações demográficas nos países desenvolvidos. De acordo com as Nações Unidas, no ano de 2012, a percentagem total de população com idade igual ou superior a 60 anos na Europa era de 22% com a perspetiva de aumento até aos 34% em 2050 <sup>(1)</sup>. Os países europeus apresentam a maior taxa de idosos em comparação com as restantes nações, sendo a África o continente com a menor percentagem de pessoas com mais de 60 anos. Portugal é o oitavo país mais envelhecido no Mundo e o sexto da Europa, com uma população idosa (> 60 anos) de 23%. No nosso país o número de residências e lares da 3ª idade aumentou 49% entre 1998 e 2010 <sup>(2)</sup>.

Estudos indicam que esta faixa etária da população passa cerca de 19-20 h/dia em ambientes fechados tornando-se mais vulneráveis a complicações de saúde associadas à poluição do ar interior. Os idosos representam uma população suscetível apresentando um sistema imunológico mais enfraquecido e uma maior prevalência de doenças crónicas e de problemas respiratórios. Vários estudos demonstram que a concentração de poluentes no interior pode ser 10-20 vezes mais elevada do que no exterior, com um impacto crescente sobre a qualidade da vida dos seus ocupantes, podendo originar ou agravar doenças sobretudo do foro respiratório e cardiovascular. Esses efeitos podem resultar no aumento do uso de medicação e visitas ao médico, bem como, no acréscimo de admissões em hospital e mortes prematuras. Para além da qualidade do ar interior (QAI) também o ambiente térmico é um fator chave que pode afetar o conforto, a saúde e o bem-estar dos ocupantes <sup>(3)</sup>.

Nesse sentido, o objetivo principal do Projeto GERIA [www.geria.webnode.com] consiste na avaliação da relação entre a qualidade do ambiente interior e a saúde respiratória em populações suscetíveis, promovendo a qualidade de vida nos idosos residentes em lares da 3ª idade.

Para a consecução dos objetivos propostos estão a ser estudados 22 lares na cidade do Porto e 18 em Lisboa no âmbito da QAI e conforto térmico (CT). Este artigo apresenta os resultados das instituições estudadas na cidade do Porto. O Projeto está em curso, contando com equipas multidisciplinares a trabalhar nas áreas da avaliação das condições ambientais, testes clínicos e monitorização da ventilação.

### Material e métodos

A seleção da amostra a estudar na cidade do Porto foi efetuada por conveniência, sendo convidadas a participar todas as instituições da terceira idade com a vertente residência e lar de idosos que estão inscritas na 'Carta Social'. De um total de 58 instituições aceitaram participar no estudo 38% (n=22). A recolha dos dados nas instituições decorreu entre novembro 2011 a agosto 2013.

Cada lar de idosos foi estudado nas seguintes componentes:

- (i) visita de caracterização do edificado e ventilação;
- (ii) avaliação de parâmetros ambientais em duas estações do ano (verão e inverno), incluindo agentes químicos [partículas suspensas no ar PM<sub>10</sub> e PM<sub>2.5</sub>, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), monóxido de carbono (CO), formaldeído e compostos orgânicos voláteis totais (COVT)], agentes biológicos (bactérias e fungos) e avaliação dos índices do conforto térmico [voto médio previsto (PMV) e percentagem prevista de insatisfeitos (PPD)]. A fase da monitorização ambiental incluiu amostragens de ar no período diurno (com início às 10h da manhã, durante 4 a 8 horas), representando a fase de maior atividade nas instituições. Em cada lar foram efetuadas 6 amostragens em espaços interiores (sala de convívio, sala de refeição, quartos e gabinete médico) e uma amostragem no exterior para comparação. As amostragens foram conduzidas de forma discreta de modo a não perturbar o normal funcionamento da instituição e atividades dos residentes. Os amostradores ambientais foram colocados a uma altura

artigos breves\_ n. 1

de 0,6 a 1,5 m do solo (representativo da altura da zona de respiração) e o mais perto do centro do espaço a analisar. As monitorizações de conforto térmico foram efetuadas a uma altura de 60 cm do solo (representando a posição 'sentado' – altura do abdómen). De acordo com a norma ISO 7730:2005 (4), e confirmada por observação das atividades dos idosos, foi considerada uma taxa metabólica de 1,0 met (sentado, relaxado) e o isolamento térmico conferido pela roupa de 1 clo no verão e 1,3 clo no inverno. Os valores obtidos foram comparados com a legislação nacional (5) e as normativas internacionais em vigor.

### Resultados e discussão

Os 22 lares analisados estão localizados no perímetro urbano da Cidade do Porto, em que 77% dos quais se situam em áreas de tráfego automóvel intenso. Em todos os edifícios monitorizados existe proibição de fumar no interior. Um total de 716 idosos residem nestes centros, perfazendo uma taxa de ocupação dos edifícios entre 7 e 136 residentes por edifício. A Tabela 1 apresenta as características principais do edificado.

A monitorização ambiental dos lares de idosos apresenta os seguintes resultados:

- (i) concentrações médias de PM<sub>2,5</sub> acima dos valores de referência da legislação nacional (50 µg/m<sup>3</sup>) e internacional (35 µg/m<sup>3</sup>) (6), em ambas as estações analisadas;
- (ii) COVT, bactérias, CO e CO<sub>2</sub> apresentam concentrações interiores significativamente mais altas que no exterior, nos dois períodos avaliados;
- (iii) PM<sub>10</sub>, COVT, bactérias e CO<sub>2</sub> apresentam diferenças significativas entre o verão e o inverno;
- (iv) COVT, bactérias e CO<sub>2</sub> mostram variações significativas entre os vários espaços avaliados em cada instituição;
- (v) 4% das amostras de fungos indicaram ser positivas para espécies oportunistas de *Aspergillus*;
- (vi) o índice PMV na estação de inverno, apresenta resultados entre -1 (ligeiramente fresco) e -2 (fresco) (Gráfico 1) na escala de sensação térmica, o que pode potenciar infeções do trato respiratório, particularmente em populações suscetíveis como os idosos (7, 8); de referir também que vários estudos mostram que os idosos pre-

ferem ambientes cerca de 2°C mais quentes que a restante população (9), e que a temperatura de conforto para esta população idosa sedentária se encontra acima dos 25°C (10);

(vii) os índices PPD e PMV mostram também diferenças significativas entre o inverno e verão;

(viii) foram encontradas associações significativas entre as características do edificado 'Isolamento Térmico', 'Aquecimento' e 'Caixilharias Janelas' e a concentração ambiental interior dos seguintes parâmetros avaliados: 'bactérias', 'fungos', 'temperatura', 'humidade relativa' e 'índice PPD' (Tabela 2).

Tabela 1: Características do edificado (n=22).

	n	%
<b>PAREDES</b>		
Tijolo	6	30
Pedra	11	49
Tijolo + Pedra	5	22
<b>ISOLAMENTO TÉRMICO</b>	6	30
<b>TIPO DE VENTILAÇÃO</b>		
Natural	3	13
Ventilação mista	19	87
<b>AQUECIMENTO</b>		
Aquecimento central (AC)	12	53
Equipamentos autónomos (EA)	9	43
AC + EA	1	4
<b>CAIXILHARIAS JANELAS</b>		
Com selantes	13	43
Vidro duplo	3	13
Vidro simples	19	87
<b>PATOLOGIAS DO EDIFÍCIO</b>		
Condensações + Infiltrações	13	61

artigos breves\_ n. 1

Gráfico 1: PMV e PPD por área avaliada e estação do ano.

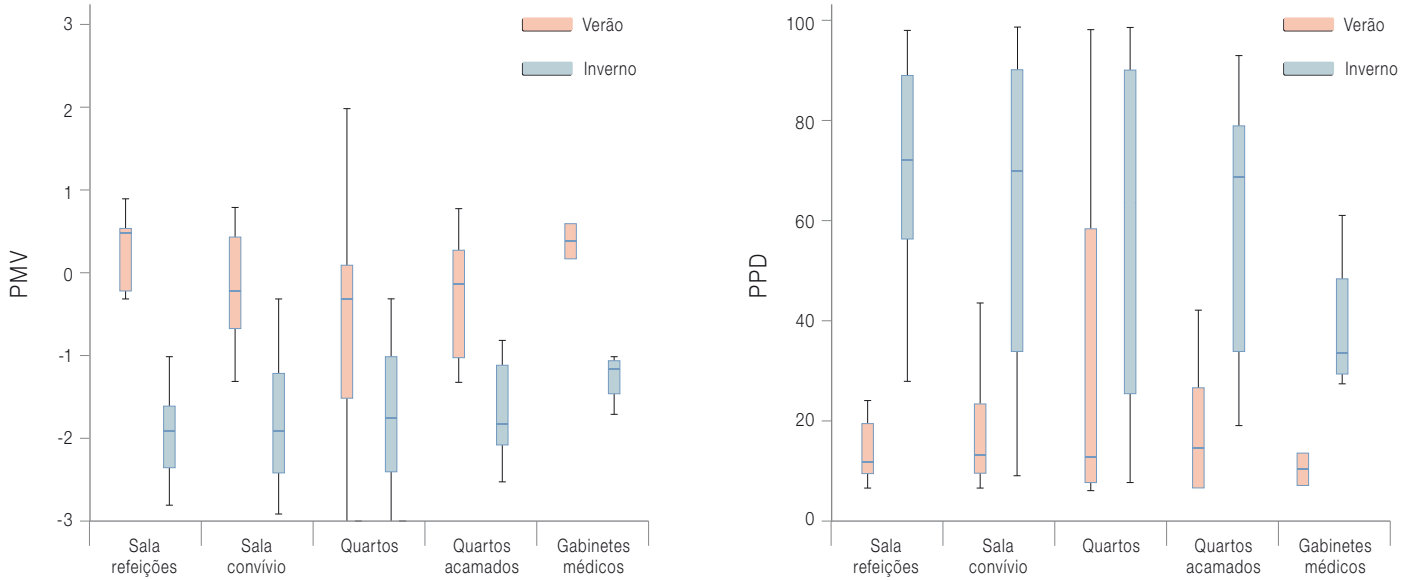


Tabela 2: Características do edificado e associação com os parâmetros do ambiente interior.

Variáveis edificado	Parâmetros ambientais												
	PM <sub>10</sub>	PM <sub>2,5</sub>	TVOC	HCHO	Bactérias	Fungos	CO	CO <sub>2</sub>	Temp.	HR	Vel. Ar	PPD	PMV
Taxa ocupação					■				■	■		■	■
Poluição exterior			■	■		■			■				
Paredes (material)			■		■				■	■			
Isolamento		■	■	■		■	■		■	■		■	■
Telhado (revestimento)					■	■	■		■	■		■	■
Tipo de ventilação		■			■	■				■			
Aquecimento		■	■	■	■		■		■	■		■	■
Patologias do edifício		■			■	■	■						
Janelas (material)	■				■	■			■	■		■	■
Selantes					■			■					
Tipo de selantes	■		■		■	■		■					
Caixilharias janelas	■		■	■		■	■	■	■			■	■
Tipo de vidro			■						■			■	
Chão (revestimento)		■	■	■		■			■	■	■		

Diferenças significativas entre variável do edificado e variável ambiental: ■ p < 0.001 ■ p < 0.01 ■ p < 0.05



## \_Conclusões

Os riscos que advêm da exposição a contaminantes do ar em ambientes interiores dependem de uma complexidade de fatores, tais como o tempo e padrão de exposição, bem como de fatores de confundimento como a idade, o género, a herança genética e o subjacente estado de saúde. Nesse sentido, o nosso estudo pretende responder a algumas destas questões, contribuindo para a prevenção da doença.

Os resultados obtidos indicam a necessidade de ter em atenção as elevadas concentrações de  $PM_{2.5}$  que podem potenciar o agravamento ou aparecimento de doenças respiratórias crónicas. É necessária especial atenção a valores de concentração máximos obtidos de poluentes químicos e algumas espécies de fungos que podem comprometer o bem-estar dos residentes.

De forma a prevenir as baixas temperaturas e desconforto, particularmente na época de inverno, algumas medidas poderão ser implementadas no edificado: (i) isolamento térmico de tetos, paredes e janelas adequado ao clima mediterrâneo; (ii) máximo proveito da ventilação natural com a criação de um plano e horário de aberturas de janelas diário, sem causar incómodo aos residentes; (iii) aplicação de medidas 'casa passiva' de forma a promover uma ventilação confortável com recuperação de calor.

Seria necessário e de extrema relevância a realização de mais estudos neste âmbito, de forma a estabelecer uma monitorização da exposição ao ambiente interior dos lares de idosos em Portugal, contribuindo assim para a prevenção de efeitos adversos na saúde induzidos pela QAI nesta população suscetível.

## \_Financiamento

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

## Referências bibliográficas:

- (1) United Nations. Population Ageing and Development 2012. UN: New York, 2012. [LINK](#)
- (2) Ministério da Solidariedade e da Segurança Social. Carta Social e Rede de Serviços e Equipamentos. Lisboa: MESS, 2010. [LINK](#)
- (3) Mendes A, Pereira C, Mendes D, et al. Indoor air quality and thermal comfort-results of a pilot study in elderly care centers in Portugal. J Toxicol Environ Health A. 2013;76(4-5):333-44.
- (4) International Organisation for Standardisation. ISO 7730:2005 – Ergonomics of the thermal environment – Analytical determination and interpretation of thermal comfort using calculation of the PMV and PPD indices and local thermal comfort criteria.
- (5) Portaria n.º 353-A/2013, de 4 de dezembro. DR 1ª série, nº 235:6644-(2)-(9). Regulamento de desempenho energético dos edifícios de comércio e serviços (recs): requisitos de ventilação e qualidade do ar interior. [LINK](#)
- (6) Environmental Protection Agency. The National Ambient Air Quality Standards for Particle Pollution. Revised Air Quality Standards for particle Pollution and Updates to the Air Quality Index (AQI). Washington DC: EPA, 2012. [LINK](#)
- (7) Boita F, Couderc LJ, Crestani B, et al., Evaluation of pulmonary function in the elderly. Intergroupe Pneumo Geriatrie SPLF-SFGG. Rev Mal Respir. 2006;23(6):619-28.
- (8) Hajat S, Bird W, Haines A. Cold weather and GP consultations for respiratory conditions by elderly people in 16 locations in the UK. Eur J Epidemiol. 2004;19(10):959-68.
- (9) Halonen JI, Zanobetti A, Sparrow D, et al., Associations between outdoor temperature and markers of inflammation: a cohort study. Environ Health. 2010;9:42. doi: 10.1186/1476-069X-9-42. [LINK](#)
- (10) Hwang RL, Chen CP. Field study on behaviors and adaptation of elderly people and their thermal comfort requirements in residential environments. Indoor Air. 2010; 20(3): 235-45.



## Avaliação da contaminação do ar por fibras respiráveis em edifícios com materiais em fibrocimento

Maria do Carmo Proença, Fátima Aguiar, Nuno Rosa

[carmo.proenca@insa.min-saude.pt](mailto:carmo.proenca@insa.min-saude.pt)

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

### Introdução

Amianto ou asbestos é o termo genérico para designar um grupo de seis silicatos naturais de magnésio e/ou ferro que apresentam formas fibrosas e que, dadas as suas excelentes qualidades, em particular, a elasticidade, incombustibilidade, fraca condutibilidade térmica e resistência a altas temperaturas, aos produtos químicos, à putrefação e à corrosão, foi largamente utilizado até à sua proibição em 2005.

Os tipos de amianto mais utilizados na indústria foram a crocidolite (amianto azul), a amosite (amianto castanho) e o crisólito (amianto branco). Outros tipos de amianto, com menor significado industrial, são a antofilite, a tremolite e a actinolite.

Estudos epidemiológicos revelaram que a exposição a qualquer tipo de fibras de amianto está associada ao desenvolvimento de asbestose (fibrose pulmonar), lesões pleurais, cancro do pulmão e mesotelioma, um tipo de cancro raro, que afeta a pleura ou o peritoneu.

O reconhecimento do amianto como cancerígeno só foi possível muitos anos após a sua massiva utilização na construção civil, no pós-guerra, dado o longo período de latência para o aparecimento das patologias associadas (15-40 anos).

Embora a utilização do amianto esteja atualmente proibida, estima-se que esteja aplicado em cerca de 3000 produtos diferentes, o que obriga a que se mantenha uma vigilância adequada dos locais onde se encontra, por forma a reduzir o risco de exposição a este agente.

A existência de materiais contendo amianto não implica necessariamente um risco acrescido para a saúde dos seus ocupantes, já que o risco é função do tipo de material (friável ou não friável) e local de aplicação no edifício (acessível ou confinado).

O fibrocimento, aplicado no nosso país em inúmeras coberturas, é um material que contém fibras de amianto (10 a 20%) fortemente aglutinadas por cimento. Trata-se, por isso, de um material não friável, cuja probabilidade de libertação de fibras para o ar ambiente é muito baixa, quase nula, considerando-se que a sua ocorrência será ocasional e apenas em caso de degradação do material ou de agressão direta.

Atualmente, a facilidade de acesso à informação e a maior divulgação nos meios de comunicação social dos riscos associados ao amianto, têm vindo a traduzir-se numa crescente preocupação, quer dos responsáveis dos edifícios, quer do público em geral, conduzindo muitas vezes a situações de alarme desnecessárias, que levam a atuações incorretas que poderão aumentar o risco de exposição.

Pretende-se, com o presente estudo, avaliar a exposição ambiental a fibras respiráveis em suspensão no ar em edifícios com materiais em fibrocimento.

### Material e Métodos

No período de 1992 a 2013, a Unidade de Ar e Saúde Ocupacional do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) efetuou determinações da concentração ambiental de fibras respiráveis em suspensão no ar em vários edifícios contendo fibrocimento, tendo em vista a avaliação da exposição ambiental.

A amostragem de fibras respiráveis em suspensão no ar e a sua posterior análise seguiram o preconizado no método "Determination of airborne fibre number concentrations: a recommended method, by phase-contrast optical microscopy (membrane filter method)" (1). Efetuaram-se amostragens ambientais à altura das vias respiratórias, com a duração média de 5 horas, utilizando filtros de membrana de 25 mm de diâmetro e porosidade de 0,8 µm (referência AAWG02500, Millipore) montados em porta-filtros anti-estáticos, recorrendo a bombas de amostragem calibradas a 2 L/minuto.

O número mínimo de amostras colhidas foi calculado tomando por base a área coberta pelo fibrocimento de acordo com as especificações da Norma ISO 16000 -7 (2007) (2).

Os filtros foram posteriormente tratados em laboratório utilizando um vaporizador de acetona (Vap-100) para preparação das lâminas.

artigos breves\_ n. 2

As fibras foram contadas utilizando um microscópio óptico de contraste de fase (Leitz Biomed), recorrendo a um graticulo da Walton-Becket (tipo G22) e a uma lâmina de teste HSE/NPL Mark II, de acordo com o preconizado no método atrás referido.

Os resultados das determinações, bem como os locais estudados, foram posteriormente analisados de forma a caracterizar a exposição a fibras respiráveis em presença de materiais em fibrocimento.

### Resultados e discussão

Entre 1992 e 2013 foram estudados 73 edifícios com materiais em fibrocimento, tendo sido analisadas um total de 1003 amostras pela Unidade do Ar e Saúde Ocupacional do INSA.

A análise dos resultados apresentados no **Gráfico 1**, evidencia um aumento significativo no nº de amostras estudadas após a proibição do uso do amianto em 2005, verificando-se que uma parte significativa dos edifícios estudados correspondeu a escolas (27-36 %).

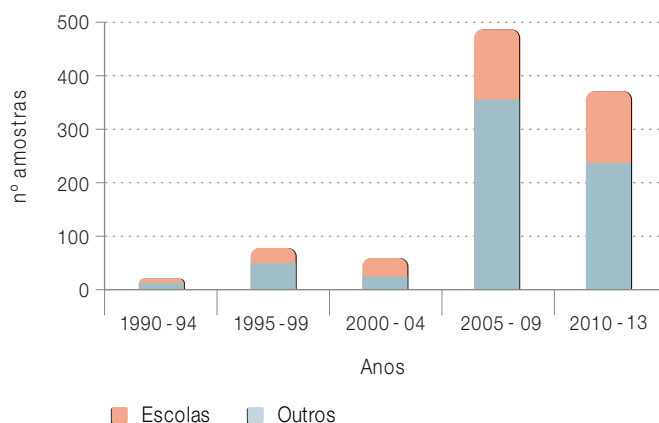
De acordo com o recomendado pela Organização Mundial de Saúde (1), em contexto de exposição ambiental (não ocupacional), para que um determinado local possa ser considerado seguro para ocupação/reocupação, a concentração de fibras respiráveis em suspensão no ar deverá ser igual ou inferior a 0,01 fibra/cm<sup>3</sup>, valor indicador de “área limpa”.

Analisando o **Gráfico 2**, verifica-se que apenas 2% dos locais com fibrocimento apresentaram concentrações de fibras respiráveis superiores a 0,01 fibra/cm<sup>3</sup>.

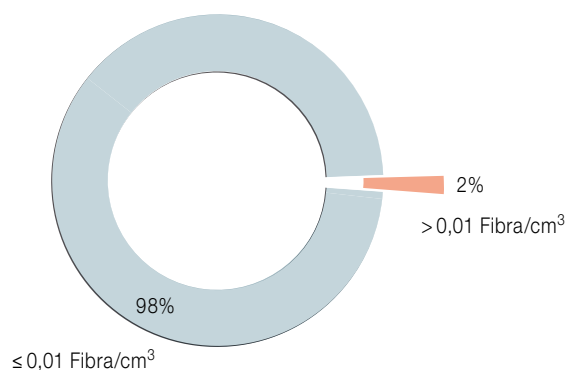
Os resultados obtidos permitem confirmar que o fibrocimento, desde que em bom estado de conservação, é um material de muito baixo risco no que concerne à exposição a fibras de amianto (3). O método (1) utilizado não possibilita a distinção entre fibras de amianto e outro tipo de fibras respiráveis, pelo que as concentrações determinadas, correspondem a todas as fibras respiráveis presentes na amostra, amianto e outras.

No entanto, salienta-se que, caso o material se encontre degradado e/ou acessível à agressão direta, deverá ser efetuada uma avaliação do risco para suportar a decisão de tratar ou remover.

**Gráfico 1:** ↓ *Evolução do nº de amostras colhidas em edifícios com materiais em fibrocimento.*



**Gráfico 2:** ↓ *Concentrações de fibras respiráveis em suspensão no ar (em fibras/cm<sup>3</sup>) em edifícios com materiais em fibrocimento.*



#### Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Determination of airborne fibre number concentrations: a recommended method, by phase-contrast optical microscopy (membrane filter method). Geneva: WHO, 1997. [LINK](#)
- (2) International Organisation for Standardisation. ISO 16000-7:2007 – Indoor Air – Part 7 - Sampling Strategy for determination of airborne asbestos fibres concentrations.
- (3) Comissão Europeia. Assuntos Sociais e Igualdade de Oportunidades. Comité de Altos Responsáveis de Inspeção do Trabalho. Guia de boas práticas para prevenir ou minimizar os riscos decorrentes do amianto, em trabalhos que envolvam (ou possam envolver) amianto, destinado a empregadores, trabalhadores e inspetores do trabalho. Lisboa: ACT, 2006. [LINK](#)



## Ocorrência de acrilamida em alimentos portugueses: resultados preliminares

Joana Agostinho<sup>1</sup>, Catarina André<sup>2</sup>, Isabel Castanheira<sup>2</sup>

isabel.castanheira@insa.min-saude.pt

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

(2) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

### Introdução

A presença de contaminantes tóxicos em alimentos tem vindo a aumentar nos últimos anos e têm sido realizadas vários estudos para avaliar quantitativamente e qualitativamente o risco que acarreta para a saúde da população.

A acrilamida é classificada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como sendo um composto com prováveis efeitos cancerígenos para os humanos. A preocupação com os teores de acrilamida nos alimentos deve-se ao facto de terem sido encontrados elevados teores em alimentos quando processados a altas temperaturas. A acrilamida forma-se pela reação de *Maillard* que ocorre entre o grupo amina livre de aminoácidos e o grupo carbonilo de açúcares redutores a uma temperatura superior a 120 °C. Neste contexto, durante a última década, têm sido estudados por todo o mundo, os mecanismos de formação da acrilamida e os métodos mais adequados para a sua análise nos alimentos.

Têm sido realizados esforços, por parte dos Estados-Membros, pela Comissão Europeia e ainda pela indústria alimentar, para reduzir os teores de acrilamida nos alimentos. O teor deste contaminante nos alimentos tem sido monitorizado por 25 países europeus e reportado à *European Food Safety Authority* (EFSA) que assegurará a compilação desses dados numa base de dados (1-3). Desta forma, este trabalho pode vir a fornecer dados que podem ser utilizados pela indústria e pelas entidades de segurança alimentar.

### Objetivo

O objetivo do presente estudo foi comparar os teores de acrilamida em alimentos consumidos em Portugal com os valores indicativos publicados pela EFSA.

### Materiais e métodos

Os produtos analisados foram selecionados de acordo com as Recomendações da Comissão Europeia relativa aos teores de acrilamida nos alimentos. As amostras (oito) foram obtidas aleatoriamente nos supermercados locais correspondendo a produtos e marcas de maior consumo. Os alimentos analisados incluem, batatas fritas em casa fabricadas com batatas frescas em fritura por imersão, batatas fritas de pacote fabricadas com batatas frescas, bolachas do tipo água e sal e de gengibre, café, sucedâneos de café, cereais de pequeno-almoço e cereais de chocolate.

As amostras, depois de trituradas e homogeneizadas foram submetidas a extração em fase sólida (SPE) e posteriormente analisadas num cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a um detetor de massas *tandem* (UPLC-MS/MS) e para a separação foi utilizada uma coluna BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm) da Waters. A acrilamida foi identificada por comparação com o perfil cromatográfico do padrão analítico. Os resultados são apresentados em µg de acrilamida por kg de alimento.

### Resultados e discussão

Na *Figura 1* é apresentado um exemplo de um cromatograma obtido para a amostra de batata frita de pacote. Como se pode observar o método é adequado para a determinação de acrilamida pois não apresenta interferentes.

No *Gráfico 1* são apresentados os resultados obtidos para as amostras analisadas. O teor de acrilamida variou entre 25,2 ± 2,8 µg/kg de alimento no café e 376 ± 26 µg/kg de alimento nas batatas fritas caseiras.

Pela análise crítica comparativa dos resultados obtidos e dos monitorizados e publicados pela EFSA (3) (*Tabela 1*) verifica-se que os teores de acrilamida nos alimentos analisados encontram-se abaixo dos valores indicativos.

Figura 1: Cromatograma referente à amostra de batatas fritas de pacote fabricadas com batatas frescas.

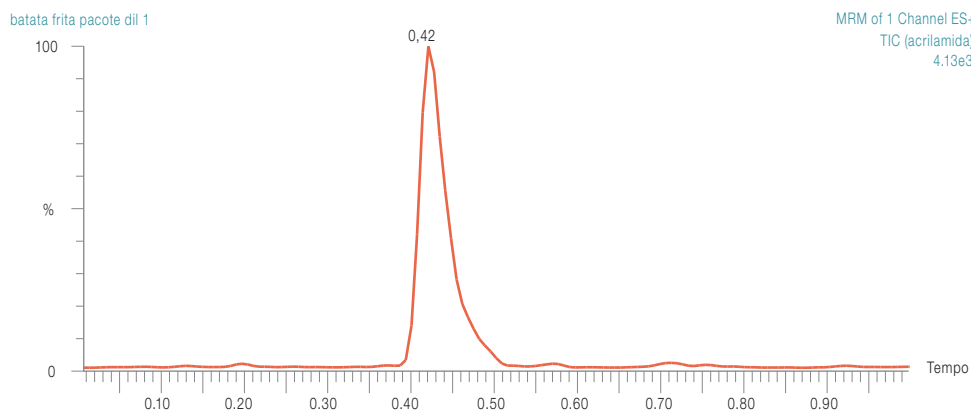


Gráfico 1: Teores de acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) quantificados em diferentes matrizes alimentares.

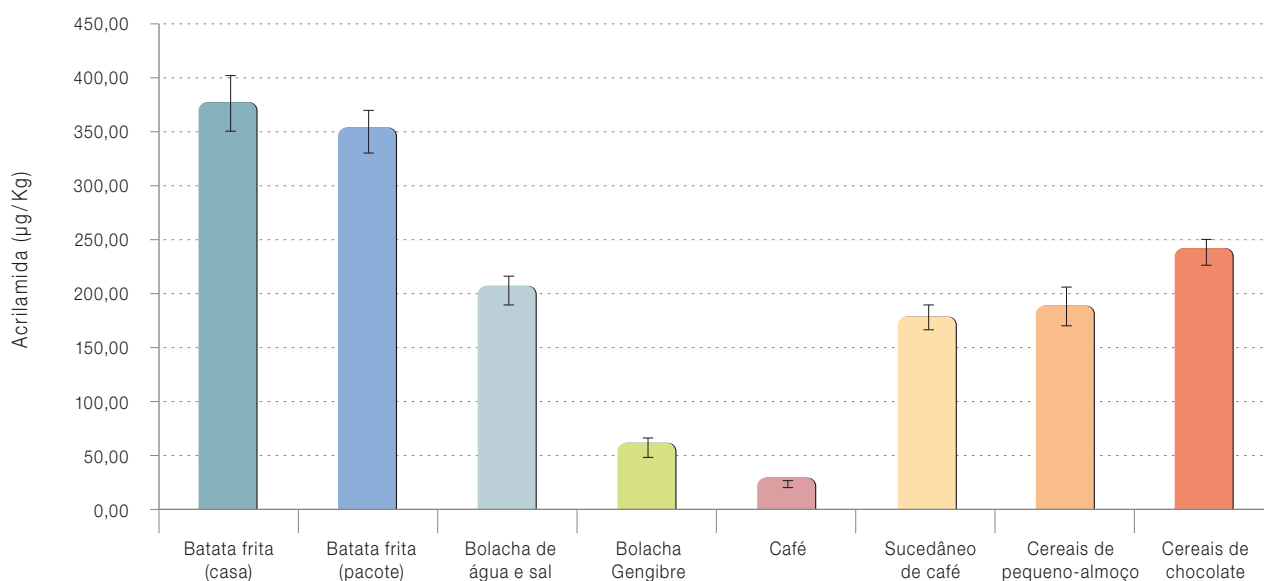


Tabela 1: Teores de acrilamida determinados no INSA e indicativos da EFSA ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ).

	Valores determinados no INSA	Valores indicativos monitorizados pela EFSA
Batata frita (casa)	376	600
Batata frita (pacote)	350	1000
Bolacha de água e sal	203	500
Bolacha Gengibre	58,0	1000
Café	25,2	450
Sucedâneo de café	178	2000
Cereais de pequeno-almoço	188	300
Cereais de chocolate	238	300



## **\_Conclusão**

O método para determinação de acrilamida em alimentos portugueses foi desenvolvido e otimizado por UPLC-MS/MS, com extração prévia por SPE, em diversas matrizes alimentares. Estes valores podem ser indicativos da ocorrência deste contaminante formado na fase de processamento do alimento.

## **\_Agradecimentos**

Os autores agradecem ao projecto TDS - Total Diet Study o apoio financeiro.

## **Referências bibliográficas:**

- (1) European Food Safety Authority. Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. EFSA Journal. 2012;10(10):2938. [LINK](#)
- (2) União Europeia. Recomendação da Comissão, de 2 de Junho de 2010, relativa à monitorização dos teores de acrilamida nos alimentos. JO. 2010. L 137/4-10. [LINK](#)
- (3) União Europeia. Recomendação da Comissão, de 8 de novembro de 2013, relativa à investigação dos teores de acrilamida nos alimentos. JO. 2013. L 301/15-17. [LINK](#)

## Prevalência de Acidente Vascular Cerebral na população portuguesa: dados da amostra ECOS 2013

Mafalda Sousa-Uva, Carlos Matias Dias

mafalda.uva@insa.min-saude.pt

Departamento de Epidemiologia, INSA.

### Introdução

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é uma das principais causas de morte em Portugal. De acordo com algumas estimativas cerca de 6 pessoas sofrem um AVC em cada hora, de que resultam 2 a 3 óbitos (1). Em Portugal, a taxa de mortalidade padronizada por doenças cerebrovasculares diminuiu entre 2007 e 2011 de 79,9 óbitos por 100 000 habitantes para os 61,9 (2).

Dados recolhidos pela Rede Médico-Sentinelas em 2011, estimaram a taxa de incidência de AVC em 251,6/100 000 utentes/ano, concluindo que em ambos os sexos a taxa de incidência de AVC atingiu o seu valor máximo no grupo etário dos 75 e mais anos com 1408,5/100 000 utentes/ano no sexo masculino e 1186,0/100 000 no feminino (3).

Em Portugal existem relativamente poucos estudos sobre prevalência de AVC, face à magnitude do problema, e os existentes abordam amostras de dimensão reduzida, a nível local ou regional, sendo que o estudo mais referenciado na literatura foi realizado em 1992 no concelho de Coimbra, numa amostra da população com idade igual ou superior a 50 anos, onde foi estimada uma prevalência de AVC de 8% (4). Mais recentemente, em 2007, o estudo VALSIM com 16 856 participantes, estimou uma prevalência de AVC de 2,1% nos utentes adultos de uma amostra de unidades de saúde em cuidados de saúde primários em Portugal (5).

### Métodos

Desenvolveu-se um estudo transversal, de prevalência, tendo como população alvo os residentes em Portugal Continental, através de um inquérito por entrevista telefónica à amostra de famílias do ECOS (Em Casa Observamos Saúde) em novembro de 2013. Em cada unidade de alojamento foi inquirido apenas um elemento, com 18 ou mais anos de idade, que prestou informação sobre

todos os elementos do agregado. Esta amostra aleatória inclui cerca de 1000 Unidades de Alojamento (UA), contactáveis por telefone fixo ou móvel, estratificada por Região (NUTS II divisão de 2002) do Continente, com alocação homogénea, o que representa 2719 indivíduos (6, 7).

A análise estatística centrou-se no cálculo das proporções populacionais, bruta e estratificada por sexo, grupo etário e região, de pessoas que declararam ter tido alguma vez na vida diagnóstico de AVC confirmado por um médico (prevalência ao longo da vida) (8, 9, 10, 11). O nível de significância estatística fixou-se em 5%. A análise estatística utilizou o programa SPSS Statistics 22 (12).

### Resultados

A prevalência bruta de AVC, estimada para a população residente em Portugal Continental com telefone fixo e, ou, móvel, foi de 1,9% (Intervalo de Confiança 95%, IC95% 1,3-2,9). O valor mais elevado verificou-se no sexo masculino (2,6%, IC95% 1,6-4,2) sendo a estimativa no sexo feminino cerca de 50% inferior (1,3%, IC95% 0,6-2,7) (Gráfico 1).

A prevalência mais elevada de AVC foi observada nos Homens com idade entre os 65 e os 74 anos (14,1%, IC95% 7,1-26,0) (Gráfico 2), não se tendo obtido referência de AVC para idades inferiores a 35 anos em qualquer dos sexos.

A região do Alentejo foi aquela onde se verificou a maior prevalência de AVC (3,6%, IC95% 1,7-7,2) e a região do Norte onde se verificou a menor (1,1%, IC95% 0,5-2,4) (Gráfico 3).

Gráfico 1: Estimativa da prevalência de Acidente Vascular Cerebral na população portuguesa em 2013, total e desagregada por sexo.

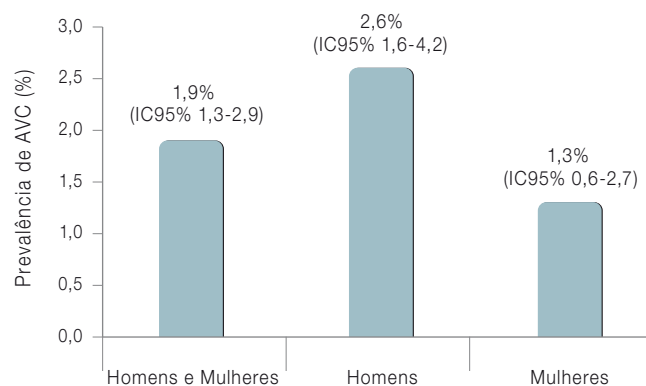


Gráfico 2: **Estimativa da prevalência de Acidente Vascular Cerebral na população portuguesa em 2013, desagregada por sexo e grupo etário.**

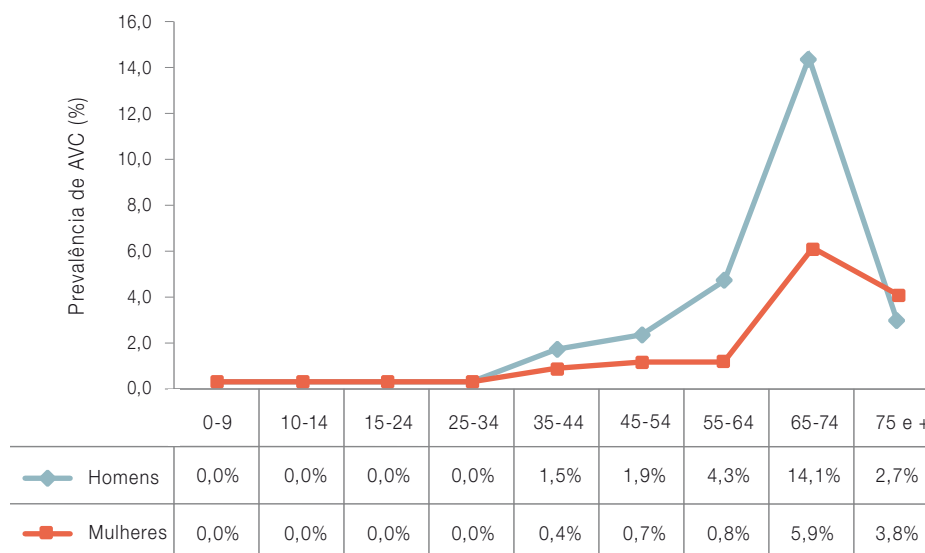
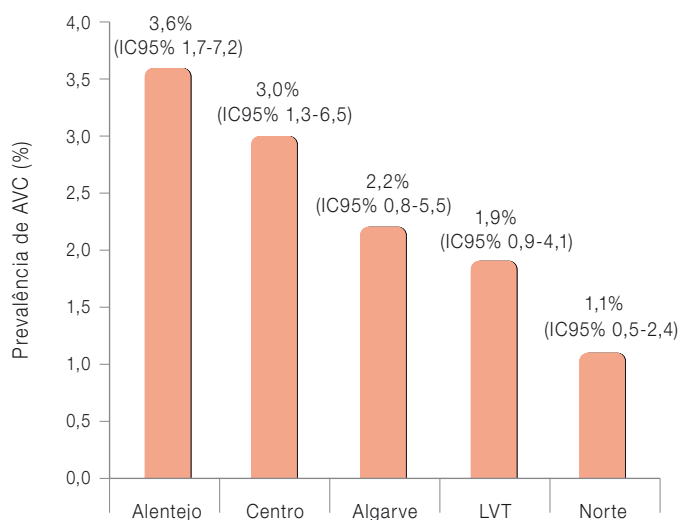


Gráfico 3: **Estimativa da prevalência de Acidente Vascular Cerebral na população portuguesa em 2013, desagregada por região.**



### \_Discussão

A estimativa da prevalência auto-reportada de AVC na população residente em Portugal Continental com telefone fixo e, ou, móvel foi de 1.9% (IC95% 1.3-2.9), resultado próximo ao valor obtido pelos estudos VALSIM (2.1%) (5), PHYSA (3.2%) (*Portuguese Hypertention and Salt Study*) (13) e Inquérito Nacional de Saúde (INS) 05/06 (1.6%) (14). As diferenças entre as estimativas do presente estudo e do estudo PHYSA, poderão dever-se às diferentes populações em estudo (no estudo PHYSA a população adulta residente em Portugal Continental e no presente estudo a população residente em Portugal Continental com telefone fixo, móvel ou ambos); aos diferentes anos em análise, 2012 no estudo PHYSA e 2013 neste estudo; ou à não ponderação da estimativa do estudo PHYSA consoante a distribuição etária e por sexo da população residente em Portugal Continental em 2012 segundo o Instituto Nacional de Estatística.

Verificou-se uma prevalência mais elevada de AVC no sexo masculino, em conformidade com os resultados do estudo de Gonçalves e Cardoso (1997), do INS 05/06 e do estudo VALSIM (4, 5, 14), mas não com os resultados obtidos por Silva (2013) (15), provavelmente porque este último estudou uma amostra de utentes de um centro de saúde, com 65 e mais anos de idade, com uma distribuição por sexo diferente da observada na população portuguesa, factores de selecção que enviesam muito provavelmente a estimativa.



## artigos breves\_ n. 4

Os dados de incidência e mortalidade por AVC têm, também, vindo a revelar-se consistentemente mais elevados nos Homens, em concordância com os resultados de prevalência do presente estudo (16). Também a prevalência de hipertensão arterial, um dos principais factores de risco para o AVC, foi superior no Homens em 2012 segundo o estudo PHYSA, apoiando estes resultados (13).

Observou-se que a prevalência de AVC aumenta com a idade, tal como descrito no estudo VALSIM e no INS 05/06 (5, 14), contudo com uma importante diferença, designadamente, a maior prevalência verificar-se nos homens no grupo etário dos 65-74. Refira-se que a prevalência mais elevada de AVC se havia verificado no INS 05/06 em idade mais avançada (75 a 84 anos), o que pode sugerir um efeito mais precoce dos factores de risco para esta doença.

A prevalência mais elevada de AVC foi observada na região do Alentejo (3.6%, IC95% 1.7-7.2), encontrando-se de acordo com o estudo PAP no qual a maior prevalência de hipertensão arterial não controlada foi verificada nessa mesma região (17).

- (11) Instituto Nacional de Estatística. [Estimativas da população residente, por idade, segundo o sexo e NUTS II em 2012] [Em linha] [consult. 9/7/2014]. [LINK](#)
- (12) IBM SPSS Statistics V22.0 [Em linha]. United States : IBM, agosto 2013 [consult. 9/7/2014]. [LINK](#)
- (13) Sociedade Portuguesa de Hipertensão. Portuguese hypertension and salt study, 2012 [Em linha] [consult. 9/7/2014]. [LINK](#)
- (14) Instituto Nacional de Estatística, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Inquérito Nacional de Saúde 2005/5006. Lisboa: INE/INSA, 2009. [LINK](#)
- (15) Silva L. Estudo da prevalência de AVC e sua associação com a qualidade de vida na população com mais de 65 anos da área abrangida pelo Centro de Saúde de Manteigas. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde /UBI, 2013. [LINK](#)
- (16) Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico. Health at a glance: Europe 2012. Paris: OECD Publishing, 2009. [LINK](#)
- (17) De Macedo ME, Lima MJ, Silva AO, et al. Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in Portugal. The PAP study. Rev Port Cardiol. 2007;26(1):21-39. [LINK](#)

**Referências bibliográficas:**

- (1) Sá MJ. AVC - Primeira causa de morte em Portugal. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa. 2009;6:12-19. [LINK](#)
- (2) Direção-Geral da Saúde. Portugal - Doenças cérebro-cardiovasculares em números - 2013 : Programa Nacional para as Doenças Cérebro-cardiovasculares. Lisboa, DGS, 2013. [LINK](#)
- (3) Rodrigues AP, Silva S, Batista I, et al. Médicos-Sentinela : o que se fez em 2012. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014. [LINK](#)
- (4) Gonçalves AF, Cardoso SM. The prevalence of cerebrovascular stroke in Coimbra. Acta Med Port. 1997;10(8-9):543-50. [LINK](#)
- (5) Fiuza M, Cortez-Dias N, Martins S, et al. Prevalence and risk factors for stroke in primary health care in Portugal. Insights of the VALSIM study. Lisboa: Centro Nacional de Coleção de Dados em Cardiologia/ Sociedade Portuguesa de Cardiologia, 2009. Poster [LINK](#)
- (6) Direção-Geral Saúde. Orientação nº 031/2011 de 27/09/2011 (atual. 31/10/2011) - Vacinação contra a gripe com a vacina trivalente na época 2011/2012 - Alargamento dos grupos de risco para vacinação gratuita. [LINK](#)
- (7) Observatório Nacional de Saúde. Em Casa, pelo telefone, observamos Saúde: descrição e avaliação de uma metodologia. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2003. [LINK](#)
- (8) Instituto Nacional de Estatística. Censos 2011-Resultados provisórios. XV Recenseamento Geral da População e V Recenseamento Geral da Habitação. Lisboa: INE, 2011. [LINK](#)
- (9) Autoridade Nacional de Comunicações. Inquérito ao consumo de comunicações electrónicas: população residencial (dezembro de 2009). Lisboa: ANACOM, 2010. [LINK](#)
- (10) European Commission. E-Communications Household Survey : summary : report. Special Eurobarometer 293, 2008. [LINK](#)

## Associação de genes HLA e não HLA com a suscetibilidade para a sarcoidose na população portuguesa do norte

Helena Alves<sup>1</sup>, Bruno Lima<sup>2</sup>, António Morais<sup>3</sup>

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

(1) Unidade da Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis. Centro de Saúde Pública Doutor Goncalves Ferreira. Departamento Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, INSA.

(2) Oficina de BioEstatística, Vilar Formoso.

(3) Serviço de Pneumologia. Centro Hospitalar de São João, Porto; Faculdade de Medicina. Universidade do Porto.

### Introdução

A sarcoidose é uma doença granulomatosa multi-sistémica de origem desconhecida caracterizada por uma inflamação granulomatosa nos órgãos afectados, sobretudo nos pulmões e gânglios linfáticos (1, 2, 3). Pode classificar-se como uma doença poligénica, multifatorial, para a patogénese da qual concorrem fatores ambientais em interação com múltiplos genes. As diferentes formas de apresentação clínica, casos de agregação familiar e diferentes incidências geográficas e raciais, suportam o papel determinante dos fatores genéticos (4).

### Patogénese da sarcoidose

A opinião corrente aceite é a de que a patogénese da sarcoidose envolve uma sucessão de reações imunológicas que leva à formação dos granulomas e que envolvem a internalização de um ou mais antígenos estranhos, o seu processamento e apresentação pelas células dendríticas ou macrófagos, envolvendo o complexo major de Histocompatibilidade (MHC), péptido e o recetor da célula T (TCR). Posteriormente, o desenvolvimento das células T efectoras específicas e a ativação dos macrófagos levará à indução da formação dos granulomas (5).

A resposta inflamatória iniciada com os linfócitos T CD4+ e ativação do TCR potencia a libertação de citocinas pelos macrófagos e células T Helper tipo 1.

A libertação do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), do interferon gama (IFN $\gamma$ ), da interleucina 2 (IL-2), e de fatores de crescimento, resulta no desenvolvimento de granulomas não caseosos (6, 7, 8).

A resolução da inflamação, a sua persistência ou a fibrose dependem de um equilíbrio delicado que envolve as células inflamatórias, as células reguladoras, a apoptose e as respostas TH1/TH2 às citocinas, sendo que a resolução da inflamação depende do equilíbrio no tecido, entre as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) e as reguladoras IL-10 e *Transforming Growth Factor Beta* (TGF-Beta) (9).

O substrato imunológico necessário para a ocorrência da inflamação granulomatosa está ainda por esclarecer e a heterogeneidade da doença indicia múltiplos fatores concorrentes, onde a infeção viral prévia ou a resposta imunológica a um transplante pulmonar ou de medula óssea, convivem em observações clínicas de inflamação *sarcoid-like*.

Este polimorfismo na ocorrência das manifestações da doença demonstra interações complexas entre fatores genéticos vários, envolvendo citocinas, expressão e apresentação antigénica, células imunes, mediadores químicos de inflamação e apoptose (9).

### Genética da sarcoidose

Em consequência das evidências do componente genético e imunológico e das reações inflamatórias envolvidas na patogénese da sarcoidose, os genes que codificam a apresentação e reconhecimento antigénico, os antígenos leucocitários humanos (HLA) e os genes das citocinas e seus recetores têm sido estudados ao longo dos anos. Muitos deles foram confirmados pelos scans do genoma e *genome wide association studies* (GWAS) efetuados nos últimos anos. Foram ainda identificados outros genes candidatos, aparentemente sem função imune, cujos polimorfismos podem influenciar o desenvolvimento ou evolução da doença.

### HLA

A associação mais forte e mais consistente é a associação com os antígenos HLA classe II, descrita como estando ligada quer à susceptibilidade para a doença, quer à sua expressão fenotípica (10-12).

Sendo o MHC uma das zonas do genoma com maior densidade de genes e com maior desequilíbrio de ligação, algumas das associações encontradas nesta e noutras doenças podem ser devidas não aos genes que codificam os antígenos leucocitários humanos, mas a outros na sua proximidade e em desequilíbrio de ligação com os *loci* HLA (13).

## BTNL2

Um dos genes descritos como associado à suscetibilidade para a sarcoidose em diferentes populações e com diferentes fenótipos, localizado no MHC, entre as regiões HLA-classe II e Classe III, é o gene *BTNL2* (butyrophilinlike 2) (14-16). As moléculas BTNL são estruturalmente homólogas a moléculas co-estimulatórias expressas nas células apresentadoras do antigénio (APCs), críticas para a resposta imune efetora.

A expressão da molécula *BTNL2* nas células dendríticas (baço e nódulos linfáticos) e nas células B periféricas, suportam o papel que se lhe atribui na modulação da função das APCs (16). A molécula *BTNL2* inibe a proliferação das células T, a produção de IL-2 e a produção de citocinas pro-inflamatórias em culturas de células T. A mutação observada (G > A) no SNP rs2076530 resulta numa proteína truncada que afetará a sua localização e função na membrana celular.

Embora não estejam completamente conhecidas as implicações da mutação deste gene, é espectável que uma expressão de membrana alterada de uma molécula indutora de um sinal negativo para os linfócitos T possa ter como consequência um estado de hiperativação descontrolada destas células, que é uma das características patológicas na sarcoidose (1).

Para além de ter sido descrito como um potencial fator de risco para a sarcoidose a associação do alelo A do SNP rs2076530 com a cronidade também tem sido reportada.

## Annexin A11

No cromossoma 10q22.3 foi entretanto identificado outro gene, Annexin A11, com um polimorfismo fortemente associado à sarcoidose (SNP rs1049550 C/T). Uma diminuição ou disfunção da anexina A11 pode afetar a via da apoptose e induzir um desequilíbrio entre a apoptose e a sobrevivência das células inflamatórias ativadas.

Estudos recentes em populações com origem na Alemanha, República Checa e América demonstraram uma forte associação da doença com o SNP (rs1049550 C/T) no gene Annexina A11 (*ANXA11*), localizado no Cromossoma 10q22.3 (17-19).

Esta variante funcional denominada *ANXA11* R230C, tem sido apontada como um marcador de proteção e modificador da doença na sarcoidose (18).

A mutação está localizada no exão 6 e resulta numa substituição de uma Citosina com uma Timidina (C/T), que altera o codão de uma arginina básica para uma cisteína polar no resíduo 230 (R230) (20, 21).

## \_Estudos no norte de Portugal

Em Portugal, na zona norte, foram efetuados 3 estudos, em doentes com sarcoidose oriundos da consulta de Pneumologia do Hospital de S. João do Porto (11, 16, 22).

### Polimorfismos HLA e TNF-alfa

O primeiro estudo foi publicado em 2008, incluiu 104 doentes com sarcoidose e nele foram estudados os polimorfismos dos alelos HLA classe I e classe II e do TNF-alfa (11).

Foi realizada a tipagem HLA- A\*, -B\*, -C\*, DRB1\*, DQB1\* e TNF-alfa por métodos de biologia molecular. O DNA foi extraído do sangue periférico e as tipagens foram feitas por métodos de PCR-SSP e de PCR-hibridização reversa. As frequências alélicas foram comparadas com controlos saudáveis da mesma região.

Foram encontradas frequências aumentadas do HLA-B\*08 (10,6% vs. 6,1%), O.R.=1.8 e p=0.02, e do HLA-DRB1\*12 (4,3% vs. 1,7%), O.R.=2.63 e p=0.03. Os doentes com eritema nodoso tinham frequências aumentadas dos alelos HLA-DRB1\*03 (28% vs. 9,3%), R.R.=2.39, e pc=0.01 e do HLA-DQB1\*02 (38% vs. 18%), R.R.=2.1 e pc=0.02.

O alelo HLA-DQB1\*03 estava diminuído nos doentes com padrão obstrutivo R.R.=0.53 e pc=0.05.

O alelo HLA-DRB1\*15 estava relacionado com o padrão restritivo e reduzida capacidade de difusão (21,1% vs. 6,6%), R.R.=2.46 e p=0.01 e (18,1% vs. 3,8%), R.R.=1.87 e pc= 0.05 respetivamente. O genótipo TNF-alfa A/A (*high*) estava significativamente associado com o eritema nodoso (p=0.04).

Este artigo concluiu que também nestes doentes foram encontradas evidências que suportam a associação genética do HLA classe I e classe II com a suscetibilidade para a sarcoidose, o seu tipo de apresentação, a sua gravidade e evolução.

Também para o TNF-alfa, e de acordo com o previamente descrito em outras publicações, o genótipo TNF-alfa A/A (*high*) tinha uma associação significativa com o eritema nodoso.

### BTNL2

Foi efetuado um estudo caso-controlo de 151 doentes e 150 controlos da zona norte (*Quadro 1*), para estudo das frequências alélicas do SNP *BTNL2* rs2076530 G/A e avaliação da associação dos polimorfismos deste SNP com a suscetibilidade para a sarcoidose e a evolução da doença.

artigos breves\_ n. 5

As frequências alélicas do *BTNL2* rs206530 A estavam significativamente aumentadas na sarcoidose sem desequilíbrio de ligação com os alelos HLA-DRB1, exceto no subgrupo de doentes com o Síndrome de Löfgren, onde o alelo determinante era o HLA-DRB1\*03.

Verificou-se ainda que o alelo A estava também aumentado nos doentes com doença torácica isolada embora não houvesse diferença no estadiamento radiológico nem na evolução da doença.

Por seu lado, o alelo HLA-DRB1\*03, para além da associação com o Síndrome de Löfgren estava significativamente relacionado com a resolução da doença.

Este estudo confirmou na população portuguesa a associação do alelo A do SNP *BTNL2* rs2076530 com a suscetibilidade para a sarcoidose, encontrando ainda fatores de risco genéticos independentes em diferentes fenótipos clínicos da doença (com e sem Síndrome de Löfgren, doença torácica isolada e a associação HLA-DRB1\*03 com a resolução da doença).

**ANXA11**

O polimorfismo da Anexina A11 foi estudado em 208 doentes e 197 controlos saudáveis (22) (Quadro 1). Todos os doentes tinham sarcoidose torácica clinicamente, com confirmação radiológica e testes de função pulmonar.

A presença de granulomas não caseosos de células epitelioides foi determinada em biópsias em 69% dos casos. Todos os indivíduos sem confirmação histológica preenchiam os critérios internacionais da *European Respiratory Society* (ERS), a *American Thoracic Soci-*

*ety* (ATS) e a *World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Diseases* (WASOG).

O Síndrome de Löfgren foi definido como a presença de linfadenopatia hilar bilateral, febre, artralgia do tornozelo e eritema nodoso. A genotipagem do SNP rs1049550 efetuada em DNA genómico por sequenciação revelou uma frequência do alelo T significativamente mais baixa nos doentes com sarcoidose (33,2%) do que nos controlos (44,9%) ( $p < 0.001$ ) e o genótipo CC era significativamente mais frequente nos doentes (47,6% vs 31,0%,  $p = 0.001$ ).

Não foram encontradas diferenças significativas na frequência deste alelo entre os doentes com e sem Síndrome de Löfgren. No entanto, a comparação destes subgrupos com os controlos revelou, que só havia uma significativa diminuição da frequência do alelo T no subgrupo dos que não tinham Síndrome de Löfgren.

Não foi encontrada associação significativa entre a presença do alelo T e a progressão da doença para a resolução ou cronicidade à semelhança de outros autores.

Este estudo confirmou a forte associação descrita anteriormente bem como o efeito protector do alelo T do SNP da anexina A11 rs1049550 C/T na susceptibilidade para a sarcoidose numa população caucasiana portuguesa.

A Anexina A11 é segregada pelos neutrófilos ativados e estão referidas alterações da sua expressão citoplasmática durante a fagocitose, pelo que é espectável que a *ANXA11* interfira com a função dos neutrófilos para além de regular a apoptose, podendo afetar a inflamação intersticial e a granulomatosa.

Quadro 1: Estudos efetuados na população do norte de Portugal para os genes *ANXA11* e *BTNL2*.

Autores	Gene	Alelo	Tamanho da amostra		OR	95% CI	p-value
			Sarcoidose	Controlos			
Morais A et al 2013 (22)	<i>ANXA11</i>	rs1049550 C	278 (66,8%)	217 (55,1%)	1		
	<i>ANXA11</i>	rs1049550 T	138 (33,2%)	177 (44,9%)	0.61	0,45-0,82	<0.001
	<i>ANXA11</i>	Genótipo CC	99 (47,6%)	61 (31,0%)	1		0.001
Nº indivíduos (n)			208	197			
Totais alelos (2n)			416	394			
Morais A et al 2012 (16)	<i>BTNL2</i>	rs2076530 A	197 (65,2%)	167 (55,7%)	1.49	1,06 -2,10	0.01
	<i>BTNL2</i>	rs2076530 G	105 (34,8%)	133 (44,3%)	0.67	0,48 -0,94	0.01
Nº indivíduos (n)			151	150			
Totais alelos (2n)			302	300			

## Meta-análise

Numa meta-análise entretanto apresentada pelos mesmos autores, com um total de 6 estudos, que incluem 3297 casos de sarcoidose e 3346 controlos saudáveis (**Quadro 2**), verificou-se que o alelo ANXA11 T era menos frequente no grupo de doentes com sarcoidose do que no grupo controlo, com um valor de  $p < 0.001$ , o qual mostra uma associação protectora deste alelo com a sarcoidose (**23, 24, 25**).

Consideram assim que esta meta-análise indica que há evidência suficiente para demonstrar uma associação conclusiva entre o ANXA11 SNP rs1049550 e a susceptibilidade para a sarcoidose.

**Quadro 2:** ↓ *Resumo dos estudos de associação da sarcoidose com o SNP rs1049550 C/T do gene ANXA11.*

Estudo	País	Tamanho da amostra (n)	
		sarcoidose	controlos
Hofmann <i>et al</i> 2008 <sup>(17)</sup>	Alemanha	1636	1811
Li <i>et al</i> 2010 <sup>(24)</sup>	Alemanha	349	313
Mrazek <i>et al</i> 2011 <sup>(18)</sup>	República Checa	245	254
Morais <i>et al</i> 2013 <sup>(22)</sup>	Portugal	208	197
Levin <i>et al</i> 2013 <sup>(19)</sup>	USA	447	353
Zhang <i>et al</i> 2014 <sup>(25)</sup>	China	412	418

### Referências bibliográficas:

- (1) American Thoracic Society, European Respiratory Society, World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders. Statement on sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med. 1999;160(2): 736-55. Adopted by the ATS Board of Directors and by the ERS Executive Committee, Feb 1999. [LINK](#)
- (2) Spagnolo P, Luppi F, Roversi P, et al. Sarcoidosis: challenging diagnostic aspects of an old disease. Am J Med. 2012;125(2):118-25.
- (3) Soler P, Basset F. Morphology and distribution of the cells of a sarcoid granuloma: ultrastructural study of serial sections. Ann N Y Acad Sci. 1976;278:147-60.
- (4) Grunewald J. Review: role of genetics in susceptibility and outcome of sarcoidosis. Semin Respir Crit Care Med 2010; 31: 380-9.
- (5) Zissel G, Prasse A, Müller-Quernheim J. Sarcoidosis-immunopathogenetic concepts. Semin Respir Crit Care Med. 2007;28(1):3-14. Review.
- (6) Paone G, Lucantoni G, Leone A, et al. Human neutrophil peptides stimulate tumor necrosis factor-alpha release by alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. Chest. 2009;135(2):586-7.
- (7) Agostini C, Trentin L, Facco M, et al. Role of IL-15, IL-2, and their receptors in the development of T cell alveolitis in pulmonary sarcoidosis. J Immunol. 1996;157(2):910-8.

- (8) Robinson BW, McLemore TL, Crystal RG. Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. J Clin Invest. 1985;75(5):1488-95. [LINK](#)
- (9) Noor A, Knox KS. Immunopathogenesis of sarcoidosis. Clin Dermatol. 2007;25(3):250-8.
- (10) Grunewald J, Brynedal B, Darlington P, et al. Different HLA-DRB1 allele distributions in distinct clinical subgroups of sarcoidosis patients. Respir Res. 2010; 11: 25. doi: 10.1186/1465-9921-11-25. [LINK](#)
- (11) Morais A, Alves H, Lima B, et al. HLA class I and II and TNFalpha gene polymorphisms in sarcoidosis patients. Rev Port Pneumol. 2008;14(6): 727-46.
- (12) Iannuzzi MC, Rybicki BA. Genetics of sarcoidosis: candidate genes and genome scans. Proc Am Thorac Soc. 2007;4(1):108-16. Review. [LINK](#)
- (13) Grunewald J. Genetics of sarcoidosis. Curr Opin Pulm Med. 2008;14(5): 434-9.
- (14) Valentonyte R, Hampe J, Huse K, et al. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. Nat Genet. 2005;37(4):357-64.
- (15) Spagnolo P, Sato H, Grutters JC, et al. Analysis of BTNL2 genetic polymorphisms in British and Dutch patients with sarcoidosis. Tissue Antigens. 2007; 70(3):219-27.
- (16) Morais A, Lima B, Peixoto MJ, et al. BTNL2 gene polymorphism associations with susceptibility and phenotype expression in sarcoidosis. Respir Med. 2012;106(12):1771-7.
- (17) Hofmann S, Franke A, Fischer A, et al. Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. Nat Genet. 2008; 40(9):1103-6.
- (18) Mrazek F, Stahelova A, Kriegova E, et al. Functional variant ANXA11 R230C: true marker of protection and candidate disease modifier in sarcoidosis. Genes Immun. 2011; 12(6):490-4.
- (19) Levin AM, Iannuzzi MC, Montgomery CG, et al. Association of ANXA11 genetic variation with sarcoidosis in African Americans and European Americans. Genes Immun. 2013;14(1): 13-8. [LINK](#)
- (20) Mizutani A, Usuda N, Tokumitsu H, et al. CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei of cultured fibroblast 3Y1 cells. J Biol Chem. 1992; 267(19):13498-504. [LINK](#)
- (21) Fatimathas L, Moss SE. Characterisation of the sarcoidosis associated variant of annexin A11. Gen Physiol Biophys. 2009;28 Spec No Focus:F29-38. [LINK](#)
- (22) Morais A, Lima B, Peixoto M, et al. Annexin A11 gene polymorphism (R230C variant) and sarcoidosis in a Portuguese population. Tissue Antigens. 2013; 82(3):186-91.
- (23) Bruno A, Lima, António Morais, Helena Alves. ANXA11 Association with sarcoidosis susceptibility: a meta-analysis of non-family-based studies. Tissue Antigens. 2014;84:110-1. Poster/abstract [LINK](#)
- (24) Li Y, Pabst S, Kubisch C, et al. First independent replication study confirms the strong genetic association of ANXA11 with sarcoidosis. Thorax. 2010;65(10):939-40. [LINK](#)
- (25) Zhang LG, Xiao ZJ, Shi GC, et al. ANXA11 gene polymorphisms are associated with sarcoidosis in han chinese. BMJ Open. 2014. [In press]



## Brucelose humana: análise retrospectiva de casos clínicos suspeitos de infeção entre 2002 e 2013

Ana Pelerito<sup>1</sup>, Rita Cordeiro<sup>1</sup>, Rita Matos<sup>2</sup>,  
Maria Augusta Santos<sup>2</sup>, Sofia Soeiro<sup>2</sup>, Sofia Núncio<sup>1</sup>

ana.pelerito@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Unidade laboratorial Integrada. Laboratório de Imunologia. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

### Introdução

A brucelose é uma das zoonoses mais frequentes a nível mundial causada por bactérias intracelulares facultativas do género *Brucella* (1). O género *Brucella* engloba atualmente 11 espécies, cinco das quais (*B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. ovis* e raramente *B. canis*) podem provocar doença no Homem. *B. melitensis* é a espécie mais virulenta e a mais prevalente em todo o Mundo (1).

Em Portugal, a brucelose é uma doença de declaração obrigatória, sendo uma das três zoonoses mais incidente, com casos humanos notificados em todas as regiões do Continente, conforme consta do relatório 2009-2012 da Direção-Geral da Saúde (DGS) (2). A inclusão de *Brucella* spp. na lista de agentes com potencialidade para ser utilizado como arma biológica aumentou a preocupação das autoridades responsáveis pela saúde humana e animal (3) e obrigou os laboratórios de referência a assegurarem a melhoria e constante atualização dos métodos laboratoriais de diagnóstico e deteção rápida de *Brucella* spp em humanos, animais e alimentos (4,5).

A brucelose humana é uma doença sistémica que pode comprometer qualquer órgão ou sistema de forma subaguda, aguda ou crónica. A doença apresenta diversas formas clínicas, dependentes da espécie, do modo de transmissão e também da resposta do hospedeiro (6,7).

O diagnóstico laboratorial assenta na utilização de métodos diretos, como sejam o isolamento do agente etiológico por exame cultural e a deteção de ácidos nucleicos por métodos moleculares, e também em métodos indiretos para deteção de anticorpos específicos.

No entanto, os métodos convencionais de diagnóstico da brucelose humana não diferenciam as espécies do género *Brucella* spp. Recentemente, foram desenvolvidos vários métodos moleculares, nomeadamente o PCR em tempo real, que apresenta maior potencial para uma identificação direta e rápida das espécies do género *Brucella* spp.

### Objetivo

Este estudo tem como objetivo descrever as características demográficas dos doentes com quadro clínico suspeito de brucelose, cujo diagnóstico laboratorial foi confirmado no Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre 2002 e 2013.

### Material e métodos

Foi efetuada uma análise retrospectiva dos resultados laboratoriais de todos os doentes com suspeita clínica de brucelose, que recorreram ao INSA para confirmação ou exclusão do diagnóstico entre 2002 e 2013.

Para o diagnóstico laboratorial da infeção por brucelose foram utilizados métodos serológicos para pesquisa de anticorpos (Rosa Bengala, *Wright*, 2-mercaptoetanol, teste de *Coombs*, imunofluorescência indireta e reação imunoenzimática). Todas as amostras de soro e/ou líquido céfalo-raquidiano (LCR) foram analisadas por, pelo menos, duas das técnicas descritas anteriormente no Laboratório de Imunologia de Lisboa e Porto do INSA. Paralelamente, foi também realizado um estudo molecular, que visou a identificação da espécie do género *Brucella* spp por PCR em tempo real, utilizando sondas de hidrólise em amostra clínicas de sangue, LCR, biópsias e estirpes isoladas de hemoculturas, que foram recebidas na Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação do INSA entre 2010 e 2013.

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

### Resultados

Entre janeiro de 2002 e dezembro de 2013 foram analisadas no INSA amostras biológicas de 5990 doentes com suspeita clínica de brucelose, dos quais 10,3% (617/5990) apresentaram serologia positiva para *Brucella* spp. A distribuição de casos por ano

artigos breves\_ n. 6

de diagnóstico variou entre 5,8% em 2008 e 15,9% em 2002. Em 2013, foram confirmados 12,6% (31/247) dos casos com suspeita clínica de brucelose, correspondendo a uma frequência superior à média obtida nos 12 anos em estudo (Gráfico 1).

Dos 617 doentes positivos para *Brucella* spp, 60.7% (375/617) pertenciam ao género masculino e 39.2% (242/617) ao género feminino. A idade foi conhecida em 76% (469/617) dos casos com infeção por *Brucella* spp, dos quais metade (50,3%; 236/469) eram do grupo etário 36-65 anos (Gráfico 2).

Entre 2010 e 2013 foram igualmente estudados, por PCR em tempo real, 162 doentes sendo a espécie *Brucella melitensis* a única identificada em 12.3% (20/162) dos casos analisados (Gráfico 3).

Foi possível obter informação sobre o género em 13 dos 20 doentes com amostras positivas por PCR em tempo real, verificando-se uma razão dos sexos de 1:1. Quanto à distribuição por idade nestes doentes, observou-se que a média etária foi de 48,5 anos (variando entre 6 e 91 anos) e que o grupo 36-65 anos foi o mais frequente.

Gráfico 1: Distribuição dos casos de brucelose, 2002 e 2013.

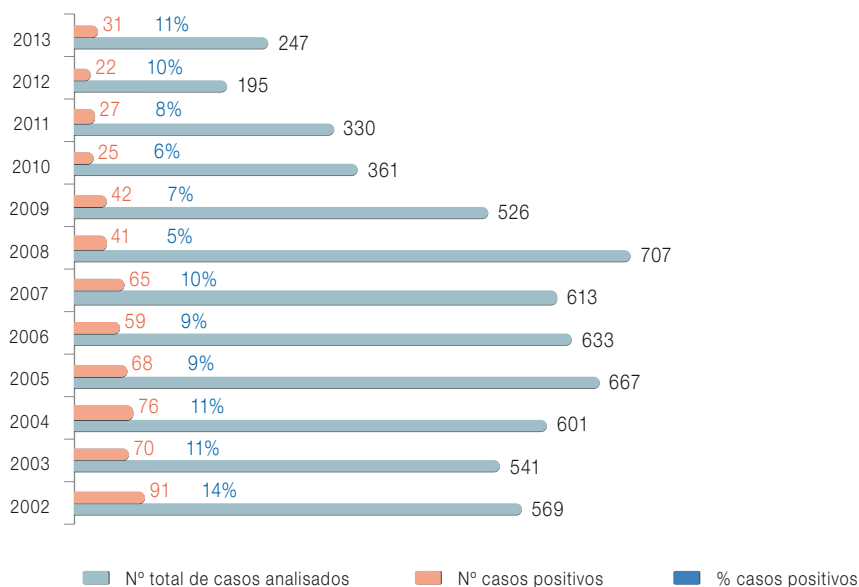


Gráfico 2: Distribuição de casos de brucelose por género e grupo etário, 2002-2013.

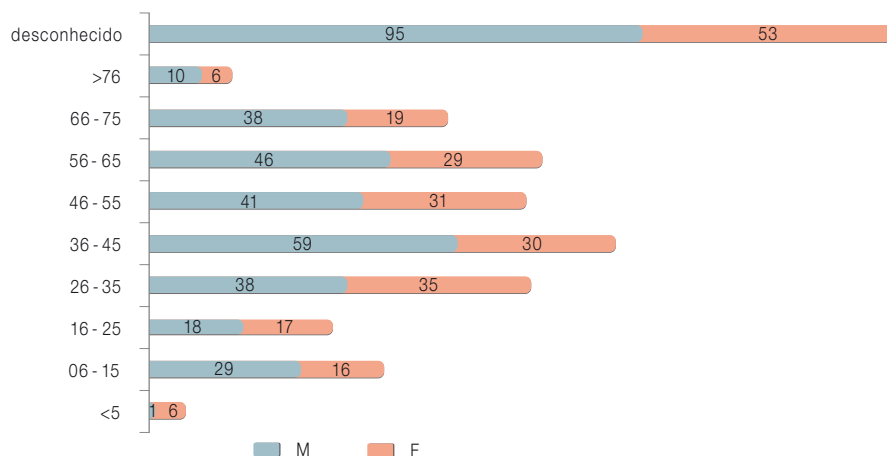
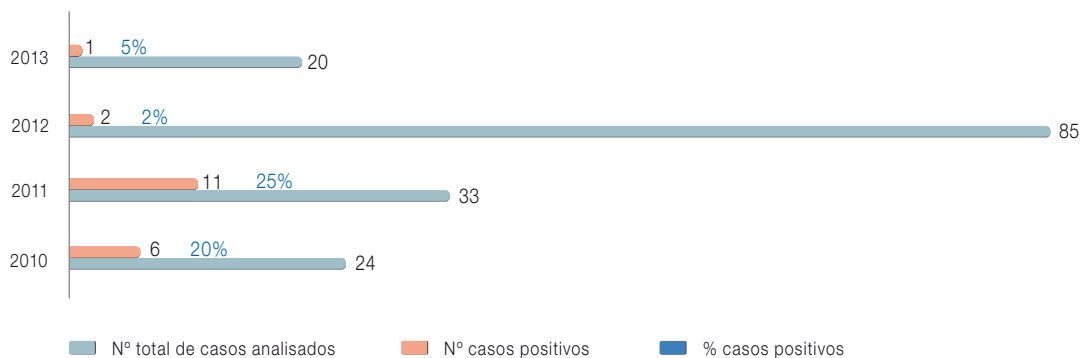


Gráfico 3: ↓ Distribuição dos casos de brucelose identificados por PCR em tempo real, 2010-2013.



### \_Discussão e conclusões

Em Portugal, a brucelose é uma das três zoonoses mais incidente, com casos humanos declarados em todas as regiões do Continente.

Das 162 amostras recebidas no INSA, entre 2010 e 2013, 20 foram positivas para *B. melitensis*. À semelhança do resto do Mundo (1), este estudo indicia que *B. melitensis* é também a espécie mais frequente em Portugal. Este facto, demonstra, por si só, a utilidade da técnica molecular PCR, particularmente quando aplicada a doentes com sintomatologia clínica e resultados serológicos negativos, conseguindo-se, assim, a identificação rápida do agente etiológico ainda na fase aguda da infeção.

Em conclusão, pode-se afirmar que a brucelose continua a ser uma realidade em Portugal e que este estudo reforça a necessidade de se manter uma vigilância epidemiológica ativa, que permita a deteção precoce de todos os casos de infeção. Entre 2009 e 2012 verificou-se uma diferença entre os casos notificados à DGS (n=296) e os casos identificados no INSA (n=116). Esta diferença é facilmente justificada, quer pela existência de outros laboratórios nacionais a realizar o diagnóstico, quer por alguns dos casos notificados à DGS não terem confirmação laboratorial. No entanto, esta constatação, alerta para a importância de se integrar a informação clínica e laboratorial dos casos sob vigilância, por forma a aumentar a sensibilidade dos sistemas de vigilância e, assim, melhor se conhecer a real situação epidemiológica da brucelose e de outras doenças infecciosas em Portugal.

### \_Agradecimentos

Ao Gabinete de Tecnologias e Sistemas de Informação do INSA pelos dados disponibilizados. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

### Referências bibliográficas:

- (1) Young EJ. Brucella species. In: 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: 2669-72.
- (2) Direção-Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória 2009-2012. Lisboa: DGS, 2013. Vol. 1. [LINK](#)
- (3) Hinic V, Brodard A, Thomann A, et al. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* and *B. neotamae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *J Microbiol Meth.* 2008;75(2): 375-8.
- (4) Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, et al. The new global map of human Brucellosis. *Lancet Infect Dis.* 2006 6(2):91-9.
- (5) Tzaneva V, Ivanova S, Georgieva M, et al. Investigation of the spread of Brucellosis among human and animal populations in southeastern Bulgaria, 2007. *Euro Surveill.* 2009;14(17):pii=19187. [LINK](#)
- (6) European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013;11(4):3129. [LINK](#)
- (7) Jacobs MK. The history of biologic warfare and bioterrorism. *Dematol Clin.* 2004;22(3):231-46, v.



## Carbúnculo: uma doença rara em Portugal?

Rita Cordeiro, Ana Pelerito, Sofia Núncio

rita.cordeiro@insa.min-saude.pt

Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

### Introdução

O carbúnculo é uma doença infecciosa aguda provocada pela bactéria *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*), um bacilo Gram positivo formador de esporos encapsulados que produzem exotoxinas (1).

O carbúnculo é comum nos animais herbívoros, selvagens ou domésticos, mas também pode afetar o Homem quando exposto a animais infetados, tecidos de animais infetados ou a elevadas concentrações de esporos da bactéria. Esta doença é mais frequente em países em desenvolvimento ou em países onde não há uma política de vacinação ou esta é difícil de instituir, como são exemplos, as regiões agrícolas da Europa Central e do Sul, a África subsariana, a Ásia central e ocidental, a Europa mediterrânea e oriental e as Caraíbas. Nos países industrializados, é considerada uma doença rara e a infeção no Homem é normalmente adquirida pela exposição ocupacional durante a manipulação de animais infetados ou produtos derivados de animais infetados (2).

Os principais fatores de virulência de *B. anthracis* são a exotoxina, constituída por três componentes proteicos localizados no plasmídeo pXO1 (antigénio protetor, fator edema e fator letal) e a cápsula, constituída por ácido poli-D glutâmico. Os três genes (*capA*, *capB* e *capC*) responsáveis pela síntese da cápsula estão localizados no plasmídeo pXO2. A capacidade dos esporos de *B. anthracis* conseguirem sobreviver durante anos no solo é também um fator de virulência importante desta bactéria (3).

As infeções por *B. anthracis* no Homem resultam da inoculação de esporos, através da pele exposta a solos contaminados ou a produtos de animais infetados (ossos, pele, lã, pêlo e outros produtos de origem animal).

O carbúnculo no Homem pode surgir de três formas: cutânea (cerca de 95% dos casos), pulmonar, com um quadro clínico de uma pneumonia atípica severa, e gastrointestinal. Se a doença não for tratada, a taxa de letalidade varia entre 5% a 20% no carbúnculo cutâneo e é superior a 85% nos casos de carbúnculo pulmonar e gastrointestinal. O tratamento com antibióticos é eficaz e pode evitar a maioria das mortes nos casos de carbúnculo cutâneo. No entanto, a letalidade é elevada nos casos de carbúnculo pulmonar e gastrointestinal, mesmo com a instituição atempada da terapêutica (2).

*B. anthracis* está no topo da lista dos agentes potenciais e passíveis de serem utilizados como armas biológicas em atos de Bioterrorismo. Em 2001, esta bactéria foi utilizada neste contexto, quando nos Estados Unidos da América foram enviados vários envelopes contendo esporos de *B. anthracis* a membros do Governo, originando consequências graves na economia e na saúde pública, não só do país, mas também a nível mundial (4).

A doença pode ser controlada pela vacinação de animais e de pessoas que vivem onde a doença é endémica, mas é difícil eliminar os esporos dos solos contaminados que podem persistir durante anos. A vacinação dos animais e do Homem fornece uma proteção efetiva, apesar de apresentar efeitos secundários no Homem (2).

Em termos de economia e saúde pública, a importância da doença reside na sua capacidade de afetar um grande número de animais de uma só vez. As carcaças dos animais representam um perigo para o Homem e para os outros animais, tanto nas proximidades como à distância pelo contacto de produtos derivados de origem animal (2).

### Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo a descrição do passado e do presente dos casos de carbúnculo notificados em Portugal.

### Material e métodos

Foi realizada uma análise retrospectiva dos casos notificados de carbúnculo no Homem e nos animais em Portugal, utilizando como fontes de dados os relatórios da Direção-Geral da Saúde e da Direção-Geral de Alimentação e Veterinária.

artigos breves\_ n. 7

**\_Resultados**

Atualmente em Portugal, o carbúnculo é uma doença rara, sendo mais comum em zonas agrícolas. Desde 1949, o carbúnculo é considerado uma doença de declaração obrigatória tanto no Homem como nos animais. Tal como acontece noutros países, o carbúnculo é mais frequente em animais domésticos, como bovinos, ovinos e caprinos.

Portugal foi um dos primeiros países a utilizar a vacina de *Pasteur*, em 1887. Entre 1953 e 1975, a vacinação animal foi obrigatória nas áreas endémicas ou com risco acrescido de exposição, à data a região Norte (Trás-os-Montes e Beiras) e o Alentejo, onde foi administrada a vacina de *Sterne*, produzida localmente. Estas áreas contavam com 73% dos casos de carbúnculo em animais em Portugal. Desde então, a vacinação dos animais tornou-se voluntária em Portugal (4).

Os últimos programas de vacinação ocorreram nos anos noventa, nomeadamente em 1996 e 1997, onde milhares de animais foram vacinados (5). Atualmente, não há registos de vacinação animal em Portugal.

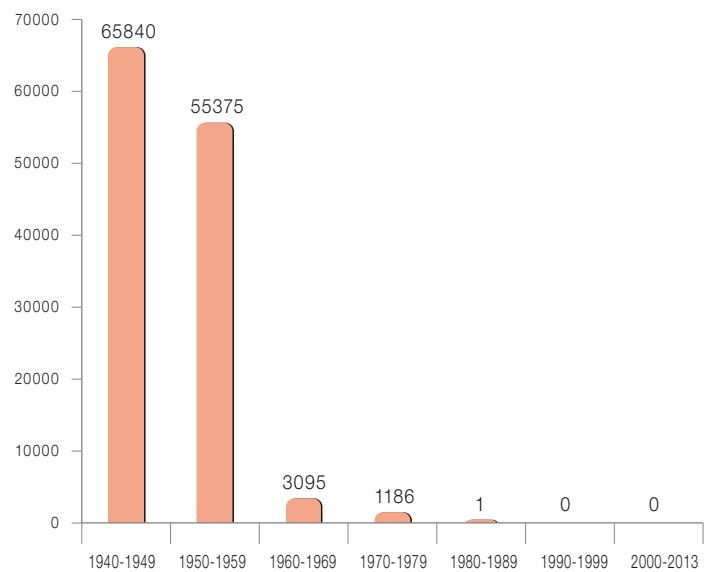
Tendo em conta o número de casos de carbúnculo em animais, durante os anos 40 e 50, esta doença apresentava uma incidência elevada, que diminuiu significativamente durante as décadas seguintes (Gráfico 1), devido à campanha de vacinação em massa, realizada em 1953 (4). O último caso de carbúnculo em animais foi notificado em Portugal em 1985.

Em Portugal, o carbúnculo é mais frequente em pessoas expostas a animais infetados, produtos derivados de animais infetados ou esporos existentes no solo, constituindo grupos de risco os produtores de gado, os veterinários ou manipuladores de produtos de origem animal.

Tal como aconteceu com os animais, a incidência de carbúnculo no Homem em Portugal diminuiu consideravelmente nas décadas de 50 e 60, como consequência da campanha de vacinação animal levada a cabo com sucesso pelas autoridades veterinárias nos anos 50 (Gráfico 2) (6, 7, 8, 9, 10).

Durante os últimos 30 anos, entre 1986 e 2013, foram notificados 85 casos humanos de carbúnculo, 61% dos quais ocorreram na região do Alentejo (Gráfico 3A). Os doentes foram na maioria homens adultos, no entanto, ocorreram sete casos em crianças com idade entre os 5 e os 14 anos (Gráfico 3B) (6, 7, 8, 9, 10).

**Gráfico 1:** Número de casos de carbúnculo em animais notificados em Portugal, 1940-2013 (4).



**Gráfico 2:** Número de casos de carbúnculo em humanos notificados em Portugal, 1950-2013 (6, 7, 8, 9, 10).

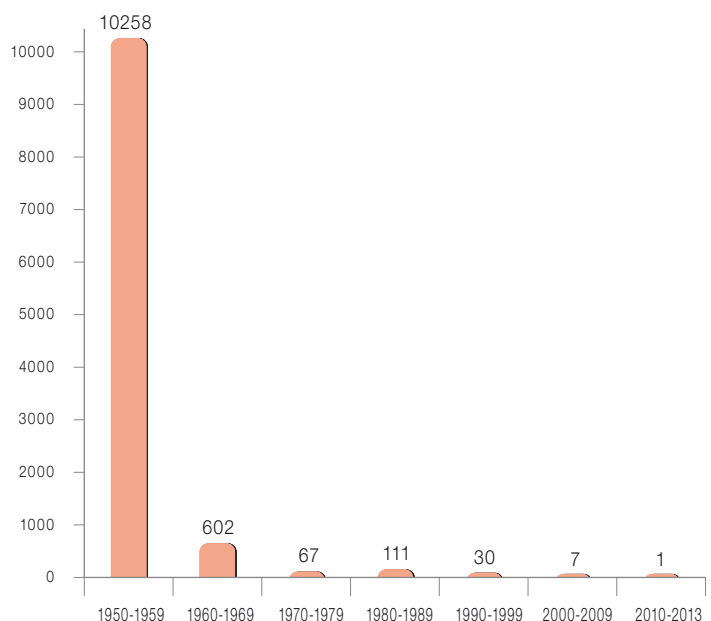
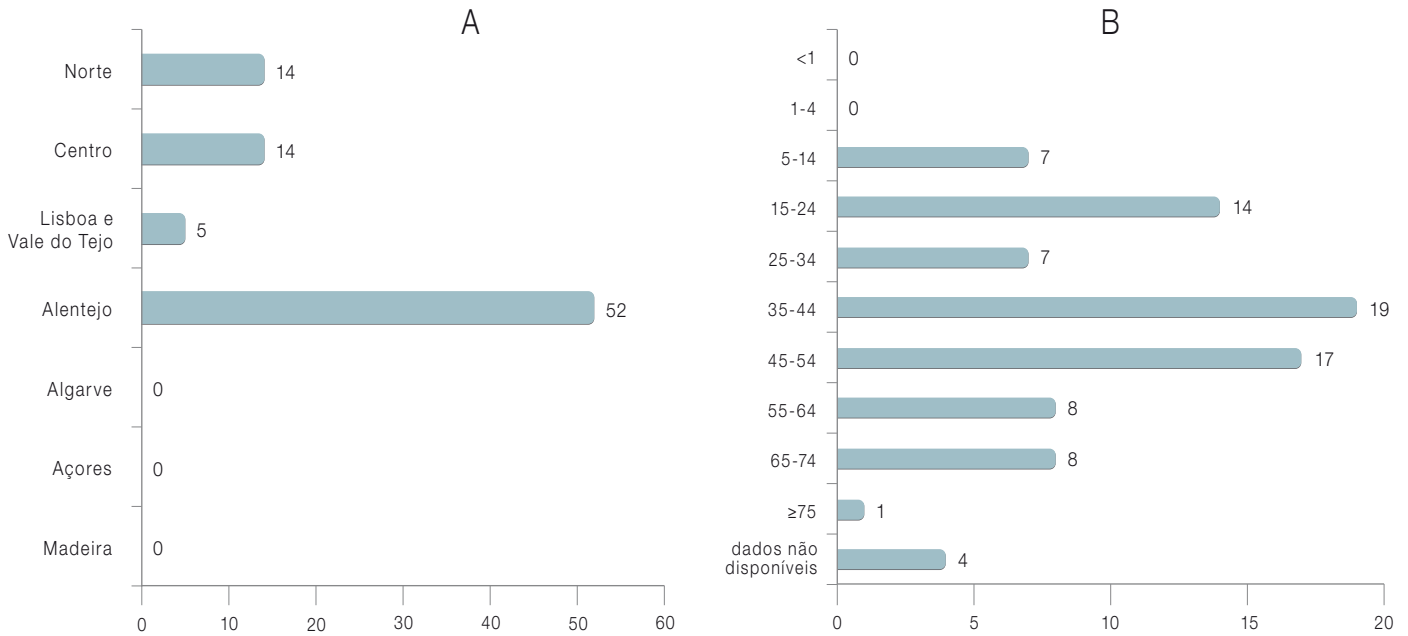


Gráfico 3: ↓ Distribuição dos 85 casos de carbúnculo em humanos notificados em Portugal por região (A) e grupo etário (B), 1986-2013 (6, 7, 8, 9, 10).



Desde setembro de 2001, que a Unidade de Resposta a Emergências e Biopreparação do INSA é o laboratório de referência em Portugal para a deteção e resposta rápida de agentes biológicos passíveis de serem utilizados como armas biológicas, nomeadamente, bactérias, vírus e toxinas. Até à data, foram analisadas 1.016 amostras (alimentares, ambientais e humanas) para detetar a presença de *B. anthracis*, cujos resultados foram negativos.

Em relação aos casos mais recentes confirmados em Portugal, e como mencionado anteriormente, o último caso de carbúnculo em animais ocorreu em 1985, não havendo informação disponível sobre a investigação realizada e as medidas de controlo e prevenção adotadas.

No que respeita aos casos de carbúnculo no Homem, foram notificados quatro casos em Portugal em 2002, sabendo-se que todos os doentes participavam em atividades que envolviam contacto próximo com animais.

O último caso humano em Portugal foi diagnosticado em 2012. O doente era pastor de um rebanho e recorreu ao Hospital com uma

ferida num braço, que apresentava exsudado seroso, tecido necrosado ao centro e edema volumoso com adenopatias cervicais associadas. Testes laboratoriais mostraram leucocitose neutrófila, proteína C-reativa elevada e uma ligeira retenção azotada. Dada a gravidade da situação clínica, o doente foi internado. Para confirmar a suspeita clínica da doença, foram realizados outros estudos laboratoriais que incluíram hemocultura e pesquisa molecular de *B. anthracis*. A hemocultura e a coloração de Gram mostraram um resultado presuntivo positivo para *B. anthracis*. A análise molecular por PCR em Tempo Real e sequenciação apoiou o diagnóstico de carbúnculo e mostrou que a estirpe continha os dois plasmídeos pXO1 e pXO2. Após terapia com metronidazol e penicilina, a doença evoluiu favoravelmente. Concomitantemente foi realizada uma investigação que mostrou que todos os animais do rebanho eram monitorizados por um veterinário. Os animais foram analisados para a presença de *B. anthracis* e os resultados obtidos foram todos negativos. Não foi possível identificar a fonte de contaminação do doente.



## artigos breves\_ n. 7

### \_Discussão e conclusão

A experiência laboratorial adquirida na investigação do último caso de carbúnculo aqui descrito e o isolamento, pela primeira vez em Portugal, da estirpe de *B. anthracis*, permitirá ao INSA realizar atividades adicionais num futuro próximo, como sejam a sequenciação do genoma completo da estirpe isolada, incluindo os dois plasmídeos, bem como estudos filogenéticos com estirpes portuguesas, isoladas de animais e humanos, com estirpes europeias. De facto, só o conhecimento das características de estirpes autóctones poderá contribuir para a deteção precoce de outras estirpes circulantes.

Em conclusão, e apesar de atualmente serem notificados casos esporádicos de carbúnculo, esta doença é uma realidade no nosso país. Esta evidência foi amplamente demonstrada com o último caso humano notificado em 2012, que prova que *B. anthracis* continua em circulação o que, por si só, justifica a necessidade de se manterem as atividades de vigilância em Portugal.

Se o carbúnculo é uma doença rara em Portugal, só o futuro dirá...

### \_Agradecimentos

Agradece-se à Dra. Felicidade Ortega, Dr. Jorge Rosário, Dr. Rui Escoval e Dr. Pedro Febra (Unidade Local de Saúde do Baixo Alentejo), à Dra. Fátima Loja e Dra. Teresa Albuquerque (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária), à Dra. Marina Ramos (Direção-Geral da Saúde) e à Dra. Maria Rita Amador (Direção-Geral de Alimentação e Veterinária) pela disponibilidade na obtenção de dados para a realização deste trabalho. Agradece-se também aos colegas Dr. João Carlos Rodrigues e Dr. Rui Matias (INSA), pela colaboração na realização deste trabalho, e à Doutora Cristina Furtado (INSA) pela revisão científica do artigo.

### Referências bibliográficas:

- (1) Schmid G, Kaufmann A. Anthrax in Europe: its epidemiology, clinical characteristics, and role in bioterrorism. *Clin Microbiol Infect.*2002;8(8):479-88.
- (2) World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Organisation for Animal Health. Anthrax in humans and animals. 4th ed. Geneva: WHO, 2008. [LINK](#)
- (3) Spencer RC. Bacillus anthracis. *J Clin Pathol.*2003;56(3):182-7. Review [LINK](#)
- (4) Velimirovic B. Anthrax in Europe. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 1984;3(3):527-59. [LINK](#)
- (5) World Organisation for Animal Health. World Animal Health Information Database (WAHID) Interface: Disease information [Em linha]. [consult. 20/7/2014]. [LINK](#)
- (6) Direção-Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória, 1996-2000. Lisboa: DGS, 2001. [1 LINK](#) [2 LINK](#) [3 LINK](#)
- (7) Direção-Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória 2000-2004. Lisboa: DGS, 2005. [LINK](#)
- (8) Direção-Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória 2002-2006. Lisboa: DGS, 2007. [LINK](#)
- (9) Direção-Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória 2004-2008. Lisboa: DGS, 2010. [LINK](#)
- (10) Direção-Geral da Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória 2009-2012. Lisboa: DGS, 2013. Vol. 1. [LINK](#)



## Subtipagem do vírus da Hepatite C por sequenciação: um contributo para o conhecimento da diversidade genética

Elizabeth Pádua, Ana Patrícia Avó, Ivone Água Doce, Catarina Almeida, Helena Cortes Martins

elizabeth.padua@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Infecções Sexualmente Transmissíveis.  
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

### Introdução

A hepatite C é reconhecida como uma doença de importância global em Saúde Pública atingindo tanto países desenvolvidos como países em vias de desenvolvimento. O seu agente etiológico – o vírus da hepatite C (VHC) – é endémico em todo o mundo e a taxa de prevalência da infeção pode variar significativamente, sendo influenciada, quer pelas principais vias de transmissão, quer pelas políticas de saúde implementadas nos diferentes países (1, 2). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 150 a 170 milhões de indivíduos estejam infetados pelo VHC (3). Embora a incidência da infeção tenha diminuído nos últimos anos, a sua prevalência permanece elevada devido à cronicidade da doença em cerca de 80% dos indivíduos infetados (2, 4).

Em Portugal, existem poucos estudos sobre a infeção pelo VHC, estimando-se uma prevalência entre 1% e 1,5% estando esta infeção associada a 45% dos casos de hepatite notificados no nosso país (5, 6). No entanto, é reconhecido que nem todos os casos são notificados e muitos dos casos não são diagnosticados. Entre os países europeus, Portugal apresenta a taxa de prevalência mais elevada por VHC em grupos populacionais Utilizadores de Drogas Injetáveis (UDI), podendo esta variar entre 60% e 80% (6, 7).

O VHC é caracterizado por uma elevada variabilidade genética, traduzida na sua classificação em 6 diferentes genótipos e em mais de 100 subtipos virais com distintos padrões de distribuição epidemiológica em todo o mundo. A taxa de evolução é rápida e o grau de diversificação dos vírus aumenta significativamente ao longo do tempo, resultando no desenvolvimento de *quasispecies* que são im-

portantes na história natural da infeção e permitem a evasão ao sistema imunitário do hospedeiro (8).

Apesar de não se ter conseguido ainda desenvolver uma vacina contra o VHC, têm sido alcançados avanços significativos na produção de fármacos de ação direta contra o vírus (9). Contudo, devido ao elevado custo destes antivirais, a terapia combinada de INF- $\alpha$ -PEG e RBV mantém-se como tratamento padrão da maioria dos doentes crónicos (10). Este regime terapêutico induz uma Resposta Viroológica Sustentada (RVS) que varia entre 42% e 82% e é dependente do genótipo do vírus em causa (10). Nas infeções pelo genótipo 1 são observadas as taxas de RVS mais baixas (40-50%). Em contraste, para os genótipos 2 ou 3 são obtidas as taxas de RVS mais elevadas, podendo atingir 80%. Taxas de RVS de valores intermédios (43-70%) foram associadas a infeções pelo genótipo 4 (10-12).

Uma vez que os vários genótipos de VHC estão associados a uma diferente evolução da infeção e doença, a genotipagem do vírus tornou-se na principal ferramenta que o clínico dispõe para a determinação da dosagem e duração do tratamento, bem como para o conhecimento do prognóstico da infeção. Porém, a resposta clínica diferenciada de doentes infetados com diferentes subtipos do mesmo genótipo de VHC, já descrita na literatura para os subtipos 1a e 1b, continua a colocar hipóteses de investigação sobre a importância do subtipo do vírus na resposta ao tratamento e na progressão da doença crónica pelo VHC (13).

O método de sondas em linha, baseado na hibridação reversa (designado por LiPA), é o ensaio comercial mais utilizado nos países europeus para a genotipagem do VHC. No entanto, apresenta um fraco desempenho para a subtipagem dos vírus (14). Em 2009, o Laboratório Nacional de Referência de Infecções Sexualmente Transmissíveis-VIH e vírus da Hepatite B e C do INSA desenvolveu um ensaio molecular *in house* para melhorar a classificação do VHC (14). Nos últimos 3 anos, este ensaio tem sido correntemente utilizado no laboratório e aplicado em amostras clínicas em que não foi possível determinar o subtipo de VHC quando previamente submetidas ao ensaio comercial LiPA.

## \_Objetivos

O presente estudo pretende dar a conhecer os resultados da caracterização molecular do VHC, realizada no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Sexualmente Transmissíveis - VIH e vírus da hepatite B e C do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre 2008 e 2013, e revelar o contributo de um ensaio *in house* para a determinação dos subtipos por análise de sequências virais do VHC.

## \_Material e métodos

Foi realizada uma análise retrospectiva dos resultados da genotipagem do VHC obtidos no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Sexualmente Transmissíveis - VIH e vírus da hepatite B e C entre 2008 a 2013. A caracterização molecular para a classificação do vírus foi realizada pelo ensaio comercial (VERSANT™ HCV Genotype 2.0 Assay-LiPA (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA). As amostras em que o subtipo não foi determinado foram submetidas a um ensaio molecular *in house*, baseado na amplificação, sequenciação e análise de duas regiões genómicas do VHC - as regiões C/E1 e NS5B (14).

## \_Resultados e discussão

### Caracterização da população estudada

Durante o período em análise foi realizada a genotipagem do VHC pelo ensaio comercial LiPA em 1004 amostras clínicas de indivíduos infetados por VHC, das quais 71,1% foram obtidas de reclusos, 13,4% de indivíduos da população em geral sem risco conhecido e 4,4% de UDI. Em relação ao género, 90,5% eram provenientes de homens e 9,5% de mulheres, sendo que a idade média da população analisada variou anualmente entre 35,3 e 42,4 anos (Tabela 1).

### Genotipagem do VHC

Os resultados de genotipagem ao longo do período em análise revelaram uma maior frequência de infeções pelo genótipo 1 (55%, variando entre 50,7% e 57,9%), seguida do genótipo 3 (28,2%, variando entre 21,0% e 35,5%) e do genótipo 4 (13,9%, variando entre 11,0% e 15,9%). O genótipo 2 foi o menos frequente (1,5%, variando entre 0% e 2,3%) e não foram detetados casos de infeção pelos genótipos 5 e 6. Verificou-se, ainda, que 1,4% (n=14) das amostras analisadas apresentaram um resultado inconclusivo pelo método LiPA, incluindo três casos que revelaram um perfil compatível com infeção mista por diferentes genótipos de VHC (Tabela 2).

O genótipo 1, seguido do genótipo 2 e do genótipo 3 têm sido descritos como os mais prevalentes a nível mundial, nomeadamente nos continentes Europeu e Americano. Neste estudo, os genótipos 1 e 3 foram os mais frequentes ao longo dos 6 anos em análise (Tabela 2). Por outro lado, foi observado que 13,9% das infeções correspondiam ao genótipo 4, que tem sido descrito na literatura como mais prevalente em países do Médio Oriente e no do norte de África, em particular no Egito (15, 16).

### Subtipagem do VHC

No presente estudo, observou-se que, do total dos casos classificados de genótipo 1, cerca de 78,3% (432/552) pertenciam ao subtipo 1a e 18,1% (100/552) ao subtipo 1b. Em 3,6% (20/552) dos casos não foi possível determinar o subtipo do vírus pelo ensaio comercial LiPA. Observou-se ainda, que a diferença proporcional entre a frequência do subtipo 1a e a do subtipo 1b foi constante em cada ano, e ao longo do período em análise, sendo sempre mais frequente para o subtipo 1a. Contudo, na literatura é descrito que o subtipo 1b é o subtipo mais prevalente a nível mundial, amplamente distribuído na Europa e em alguns países de África e do Sudoeste Asiático, encontrando-se associado a indivíduos de idade avançada e que adquiriram a infeção por transfusões sanguíneas no passado (16, 17). Neste estudo, a maioria dos casos identificados como subtipo 1b eram reclusos e de uma faixa etária mais jovem.

O segundo subtipo mais frequente na população estudada foi o subtipo 3a (28,2%), que à semelhança do que acontece para o subtipo 1a, foi descrito como comum em UDI em vários países Europeus (15-18). Neste trabalho e apesar do viés de seleção da população estudada, não pode ser excluído o eventual uso de drogas endovenosas pelos indivíduos que constituem o grupo de reclusos.

Das 1004 amostras clínicas submetidas ao ensaio comercial LiPA, não foi possível subtipar o VHC em 185 (18,4%) casos: em 126 (64,3%) o subtipo não foi discriminado e em 59 (30,1%) o subtipo não foi determinado. Em 11 casos a subtipagem foi inconclusiva. Assim, e no sentido de melhorar os resultados da classificação do VHC para estes casos, procedeu-se à sequenciação das regiões genómicas virais C/E1 e NS5B, utilizando um ensaio molecular *in-house*, desenvolvido no Laboratório Nacional de Referência IST-VIH e Hepatite B e C do INSA. Este novo método foi aplicado em 87 (44,4%) das amostras sem subtipo conhecido, nas restantes o volume disponível mostrou-se insuficiente. A sequenciação e análise das regiões genómicas amplificadas permitiram determinar com êxito o subtipo do VHC em 86 (98,9%) destas amostras. (Tabela 3).

Tabela 1: Caracterização da população estudada para genotipagem do VHC, 2008-2013.

ANO	Total (n)	Homens % (n)	Mulheres % (n)	Idade média (n)	Grupo populacional		
					Pop. em geral % (n)	<sup>1</sup> Reclusos	UDI % (n)
2013	140	85,7% (120)	14,3% (20)	41,2 (106)	23,6% (33)	76,4% (107)	0
2012	138	92,8% (128)	7,2% (10)	39,6 (116)	16,7% (23)	77,5% (107)	5,8% (8)
2011	71	83,1% (59)	16,9% (12)	42,4 (57)	25,4% (18)	38% (27)	36,6% (26)
2010	214	92,5% (198)	7,5% (16)	35,3 (71)	16,4% (35)	79,4% (170)	4,2% (9)
2009	226	93,4% (211)	6,6% (15)	36,5 (110)	10,6% (24)	88,9% (201)	0,4% (1)
2008	215	89,8% (193)	10,2% (22)	39,6 (146)	0,9% (2)	49,8% (105)	0
TOTAL	1004	90,5% (909)	9,5% (95)	38,6 (606)	13,4% (135)	71,1% (714)	4,4% (44)

<sup>1</sup> Não podem ser excluídos comportamentos de risco para a infeção VHC, nomeadamente o uso de drogas injetáveis (UDI)

Tabela 2: Resultados de genotipagem do VHC (ensaio LiPA 2.2), 2008-2013.

Ano	Genotipo 1 % (n)	Genotipo 2 % (n)	<sup>1</sup> Genotipo 3 % (n)	<sup>2</sup> Genotipo 4 % (n)	Inconclusivo % (n)
2013	50,7% (71)	0,71% (1)	33,6% (47)	14,3% (20)	0,7% (1)
2012	51,4% (71)	0	35,5% (49)	12,3% (17)	0,7% (1)
2011	57,7% (41)	0	21,1% (15)	15,5% (11)	5,6% (4)
2010	57,9% (124)	2,3% (5)	21,0% (45)	15,9% (34)	2,8% (6)
2009	52,3% (134)	1,8% (4)	27,4% (62)	11% (25)	0,4% (1)
2008	51,6% (111)	2,3% (5)	30,7% (66)	14,9% (32)	0,5% (1)
Total	55% (552)	1,5% (15)	28,2% (283)	13,9% (140)	1,4% (14)

<sup>1</sup> Todos os casos foram classificados de subtipo 3a

<sup>2</sup> Identificados casos não subtipados de genótipo 4 e casos de subtipo indiscriminado 4a/4c/4d

Tabela 3: Resultados da subtipagem do VHC pelo ensaio molecular in house em amostras clínicas não subtipadas e/ou inconclusivas no ensaio comercial LiPA 2.2.

ANO	Amostras analisadas por LiPA		Amostras analisadas pelo ensaio molecular in house (sequenciação da região CE1 e/ou NS5B do VHC) <sup>1</sup>		
	Total (n)	Não subtipadas e/ou inconclusivas (n)	Total (n)	Subtipadas (n)	Não subtipadas (n)
2013	140	23	23	23	0
2012	138	20	19	19	0
2011	71	16	14	14	0
2010	214	47	4	4	0
2009	226	43	6	5	1
2008	215	47	21	21	0
Total	1004	196	87	86	1

<sup>1</sup> Todas as amostras com volume suficiente para o ensaio molecular in house



## Conclusão

O elevado desempenho revelado pelo ensaio molecular *in house* na determinação dos subtipos virais, comparativamente ao ensaio comercial LIPA, possibilita uma melhoria na classificação do VHC e, deste modo, contribui para aumentar o conhecimento do papel da diversidade genética na progressão da doença.

Num futuro próximo, e de forma mais alargada, os antivirais aprovados para tratamento da infeção pelo VHC serão administrados a doentes crónicos, facto que tem implicações clínicas e virológicas a curto prazo (19). É por isso crucial implementar a melhor estratégia laboratorial para a classificação dos vírus e estar preparado para a nova era de tratamento e monitorização da infeção pelo VHC. Neste sentido, o Laboratório Nacional de Referência de Infeções Sexualmente Transmissíveis - VIH e vírus da hepatite B e C do INSA está já a desenvolver métodos laboratoriais que permitam a análise molecular de outras regiões genómicas do VHC alvo dos antivirais, nomeadamente dos inibidores da protease NS3/4A, bem como a pesquisa de mutações de resistência aos antivirais utilizados no tratamento da hepatite C.

### Referências bibliográficas:

- (1) Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* 2009;29(Suppl 1):74-81.
- (2) Jafari N, Farajzadegan Z, Ataei B. Surveillance system for hepatitis C infection: a practical approach. *Int J Prev Med.* 2012;3(Suppl 1):S48-57. [LINK](#)
- (3) Hepatitis C—global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec.* 2000; 75(3): 18-19.
- (4) Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(2):107-15.
- (5) Marinho R, Moura M, Gira J, et al. Epidemiological aspects of hepatitis C in Portugal. *J Gastroenterol Hepatol.* 2001;16(9):1076-7.
- (6) Marinho RT, Lavanchy D. Viral Hepatitis. *Meeting News* 2011;19(2): 1-24. [LINK](#)
- (7) Vieira AM, Freire R, Mangualde J, et al. Hepatite C - casuística da consulta de hepatologia de um hospital distrital. *J Port Gastroenterol.* 2007;14(3): 134-40. [LINK](#)
- (8) Bukh J, Miller R, Purcell R. Biology and genetic heterogeneity of hepatitis C virus. *Clin Exp Rheumatol.* 1995; 13(Suppl 13):S3-7.
- (9) Thomas DL. Advances in the treatment of Hepatitis C virus infection. *Top Antivir Med.* 2012;20(1):5-10. [LINK](#)
- (10) Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature.* 2005; 436(7053):967-72.
- (11) Kanda T, Yokosuka O, Omata M. Treatment of hepatitis C virus infection in the future. *Clin Transl Med.* 2013;2(1):9. doi: 10.1186/2001-1326-2-9. [LINK](#)
- (12) Antaki N, Craxi A, Kamal S, et al. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver Int.* 2010;30(3):342-55.
- (13) Zein N, Poterucha J, Gross JB Jr, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C genotype 1b. *Am J Gastroenterol.* 1996;91(12):2560-2.
- (14) Avó AP, Água-Doce I, Andrade A, et al. Hepatitis C Virus Subtyping Based on Sequencing of the C / E1 and NS5B Genomic Regions in Comparison to a Commercially Available Line Probe Assay. *J Med Virol.* 2013;85(5):815-22.
- (15) de Bruijne J, Schinkel J, Prins M, et al. Emergence of hepatitis C virus genotype 4: phylogenetic analysis reveals three distinct epidemiological profiles. *Journal of clinical microbiology* 2009; 47: 3832–8. *J Clin Microbiol.* 2009;47(12):3832-8. [LINK](#)
- (16) Esteban JI, Sauleda S, Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J Hepatol.* 2008;48(1):148-62.
- (17) Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *J Gen Virol.* 2004; 85(Pt 11):3173-88. [LINK](#)
- (18) van Asten L, Verhaest I, Lamzira S, et al; European and Italian Seroconverter Studies. Spread of hepatitis C virus among European injection drug users infected with HIV: a phylogenetic analysis. *J Infect Dis.* 2004;189(2):292-302. [LINK](#)
- (19) Pawlowsky JM. New antiviral agents for hepatitis C. *F1000 Biol Rep.* 2012;4:5. [LINK](#)



## ficha técnica

**\_ Título:** Boletim Epidemiológico Observações

**\_ Periodicidade:** Trimestral

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

**\_ Numeração:** 2ª série  
Volume 3, número 9  
Julho-setembro 2014

**\_ Diretor**  
José Pereira Miguel, Presidente do INSA

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

**\_ Conselho Editorial Científico**  
Carlos Matias Dias, Departamento de Epidemiologia  
Manuela Cano, Departamento de Saúde Ambiental  
Jorge Machado, Departamento de Doenças Infecciosas  
Manuela Caniça, Conselho Científico do INSA  
Peter Jordan, Departamento de Genética Humana  
Sílvia Viegas, Departamento de Alimentação e Nutrição  
Natércia Miranda, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis

**\_ Revisão Científica**  
Manuela Cano, Saúde Ambiental | Maria Antónia Calhau, Alimentação e Nutrição | Carlos Matias Dias; Natércia Miranda, Doenças Não Transmissíveis | Cristina Furtado, Doenças Infecciosas

**\_ Coordenação técnica; Composição e paginação**  
Elvira Silvestre; Francisco Tellechea, Biblioteca da Saúde

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

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

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

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

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