



Observações

— Boletim Epidemiológico

sumário

Editorial

- COVID-19 – A never ending story?** p02
António Silva Graça

Artigos breves

Doenças não transmissíveis: deficiência e incapacidade

- 1_ Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral: exequibilidade da reavaliação de adolescentes com paralisia cerebral nascidos em 2001-2003** p04
Portuguese Surveillance of Cerebral Palsy: feasibility of the reassessment of adolescents with cerebral palsy born in 2001-2003

Teresa Folha, Ana João Santos, José Joaquim Alvarelhão, Ana Cadete, Daniel Virella; Projeto de Reavaliação de Adolescentes do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral

- 2_ Evolução da incidência de diabetes entre 2016 e 2018: um estudo na Rede Médicos-Sentinelas** p10

Diabetes incidence from 2016 to 2018: a Portuguese General Practitioner's Network study

Mafalda Sousa-Uva, Liliana Mendes, Ana Rita Torres, Ana Paula Rodrigues

- 3_ Estudo molecular da diabetes tipo MODY: atualização de resultados (2011-2019)** p14

Molecular study of MODY Diabetes: results update (2011-2019)

Margarida Vaz, Gisela Gaspar, Ana Agapito, Ana Carolina Neves, Ana Paula Bogalho, Bruno Almeida, Carla Pereira, Fernando Fonseca, Goreti Lobarinhas, Henrique Vara Luiz, João Sequeira Duarte, Maria de Lurdes Sampaio, Paulo Dario, Mafalda Bourbon; Estudo Molecular de Diabetes Monogénicas

Doenças e agentes infecciosos

- 4_ Intoxicação animal por cianobactérias: um alerta para a saúde pública?** p18

Animal poisonings by cyanobacteria: a Public Health safety alert?

Rita Martins, Carlos Pinto, Elsa Dias, Tânia Rosado, Carina Menezes

- 5_ Malária: estudo retrospectivo de casos clínicos suspeitos de infeção por Plasmodium sp. (2010-2020)** p24

Malaria: retrospective study of suspected clinical cases of Plasmodium sp. infection (2010-2020)

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

- 6_ Diagnóstico laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção por Toxoplasma gondii, 2009-2020** p30

Laboratory diagnosis of suspected clinical cases of Toxoplasma gondii infection, 2009-2020

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

- 7_ A importância da monitorização da Rede de Vigilância de Vetores REVIVE: de novos mosquitos e velhas carraças a novas ameaças em saúde pública (2011-2020)** p37

The importance of monitoring by the Vector Surveillance Network REVIVE: from new mosquitoes and old ticks to new threats to Public Health (2011-2020)

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

Alimentação e nutrição

- 8_ Riscos e benefícios de beber chá verde: podemos potenciar os benefícios para a saúde aumentando o seu consumo em Portugal?** p47

Risks and benefits associated with green tea consumption: is it possible to potentiate the health benefits through increasing Portuguese consumption?

Ricardo Assunção, Magdalena Twarużek, Robert Kosicki, Carla Viegas, Susana Viegas

- 9_ Potencial alérgico do superalimento bagas goji** p52

Allergic potential of Goji berry superfood

Sandrina Teixeira, Inês M. Luís, M. Margarida Oliveira, Isabel A. Abreu, Rita Batista

- 10_ Efeito da sazonalidade no teor de selénio e outros micronutrientes na cavala da costa portuguesa** p57

Effect of seasonality on the content of selenium and other micronutrients in mackerel from the Portuguese Coast

Andreia Rego, Sandra Gueifão, Marta Ventura, Inês Delgado, Ana Cláudia Nascimento, Susana Santiago, Carla Motta, Inês Coelho, Isabel Castanheira



COVID-19 – A never ending story?

Há histórias que sabemos como começam, e como terminam. Mas outras existem, como a atual pandemia, que não sabemos (ainda) como começou, e não descortinamos como irá terminar.

Depois da recente investigação local conduzida em conjunto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela China, realizada mais de um ano após a identificação dos primeiros casos de COVID-19, ficámos a saber pelo relatório divulgado em 30 de março ser “extremamente improvável” que o vírus tenha escapado de um laboratório em Wuhan, cidade onde o primeiro grande surto ocorreu no final de 2019, e que não foi (ainda) possível identificar de forma segura a provável origem zoonótica do SARS-CoV-2, nem a sua via de introdução na população humana.

Excluída qualquer outra motivação, nomeadamente política, é relevante perceber como poderá ter ocorrido a emergência deste agente patogéneo, e procurar evitar, se possível, a formação de novos reservatórios zoonóticos. Sem a pretensão de prever quando novas estirpes pandémicas poderão surgir, ou sequer antecipar o seu impacto nas populações, talvez seja possível limitar a emergência e a transmissão de novos patogéneos.

O crescimento exponencial dos casos de infeção (que são já mais de 150 milhões) e a mortalidade associada (a atingir quase três milhões de óbitos), cedo tornaram perceptível que as medidas de saúde pública aplicadas isoladamente (embora eficazes no controlo do surto inicial), dificilmente conseguiriam resolver a pandemia.

Não tendo sido bem-sucedida a busca por fármacos antivirais eficazes no tratamento da COVID-19, o investimento em ciência foi orientado para a obtenção de vacinas que desejávamos eficazes, e intervenientes de forma positiva na mortalidade, na evolução da doença, e, se possível, na prevenção da transmissão.

Agora que já temos vacina(s), o que poderemos esperar no futuro? Ao certo, não sabemos... e atentemos nas razões.

Existem dados que confirmam a efetividade da vacina, evidente na diminuição dos casos clínicos mais graves, e na redução da mortalidade, mas não existe (ainda) indício que ela possa ser tão protetora que evite a reinfeção dos já vacinados, e o posterior contágio comunitário. Esta dúvida justifica, aliás, a necessidade de os vacinados manterem as precauções não médicas indispensáveis para evitar a transmissão do SARS-CoV-2 (máscara, afastamento físico, etiqueta respiratória, higiene das mãos).

Também o aparecimento de novas variantes virais (nomeadamente as variantes B.1.351 e P.1, que possuem a mutação E484K), que conseguem iludir a linha de defesa formada pelos anticorpos induzidos pela vacina, ou pela infeção inaugural, parece ser responsável pela redução significativa da eficácia protetora de algumas vacinas (por ex. Johnson & Johnson e Novavax), e por alguns casos de reinfeção, que começam a surgir.

Não sabemos se a administração da vacina irá conferir proteção absoluta relativamente ao SARS-CoV-2, e desconhecemos ainda se a imunidade (natural ou induzida) persistirá de forma duradoura (existem dados que o demonstram relativamente ao SARS), ou se, tal como acontece após a infeção pelos quatro Coronavírus, causa do resfriado comum, ela se irá desvanecer ao fim de poucos meses (seis? oito?)... Com ensaios clínicos desenhados para darem uma resposta célere sobre a eficácia e a segurança das diferentes vacinas, não existe uma fita do tempo suficientemente longa para nos esclarecer relativamente à duração da proteção, tal como em relação aos efeitos secundários não imediatos.

Se os níveis de vacinação e de infeção na comunidade, e a evolução do vírus, não permitirem a construção de uma imunidade consistente e persistente, é provável que nos próximos tempos (anos?) o SARS-CoV-2 se torne globalmente endémico. Poderá surgir limitado a uma região, eclodir apenas em contexto sazonal (apenas nos meses frios?), ou estar mais presente no território e até no tempo, mas irá fazê-lo principalmente através de infeções ligeiras, ou até assintomáticas.



Nos próximos tempos iremos com certeza ter casos menos graves e poucas vítimas mortais, mas até que as evidências nos “salvem”, teremos de manter uma atitude cautelosa e “reservada” (máscara, afastamento físico...) nas épocas do ano em que as infeções respiratórias virais são mais frequentes, sendo ainda uma incógnita a necessidade de serem feitos reforços à vacinação contra a COVID-19.

Tantas dúvidas, e eventualmente algumas semelhanças com a gripe, justificam a inquietação... *A never ending story?*

António Silva Graça

*Infecionista. Médico do Trabalho
Segurança e Saúde no Trabalho/DGRH
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*



Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral: exequibilidade da reavaliação de adolescentes com paralisia cerebral nascidos em 2001-2003

Portuguese National Surveillance of Cerebral Palsy: Feasibility of the reassessment of adolescents with cerebral palsy born in 2001-2003

Teresa Folha¹, Ana João Santos¹, José Joaquim Alvarelhão²⁻⁴, Ana Cadete^{5,6}, Daniel Virella^{7,8}; Projeto de Reavaliação de Adolescentes do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral*

m.teresa.folha@insa.min-saude.pt

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

(2) Escola Superior de Saúde, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

(3) Associação do Porto de Paralisia Cerebral, Porto, Portugal

(4) Federação das Associações Portuguesas de Paralisia Cerebral, Lisboa, Portugal

(5) Centro de Reabilitação de Paralisia Cerebral Calouste Gulbenkian, Santa Casa da Misericórdia de Lisboa, Lisboa, Portugal

(6) Secção de Reabilitação Pediátrica, Sociedade Portuguesa de Medicina Física e de Reabilitação, Lisboa, Portugal

(7) Unidade de Cuidados Intensivos Neonatais. Hospital Dona Estefânia, Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(8) Sociedade Portuguesa de Neonatologia, Sociedade Portuguesa de Pediatria, Lisboa, Portugal

* Equipa do Projeto de Reavaliação de Adolescentes do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral, no fim do artigo

_Resumo

O Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral em Portugal (PVNPC) tem registado com sucesso dados clínicos, epidemiológicos e funcionais das crianças com paralisia cerebral nascidas desde 2001, à idade recomendada de 5 anos. Para disponibilizar indicadores úteis e atualizados, é necessário obter dados evolutivos, pelo que foi equacionada a reavaliação na adolescência dos indivíduos registados na infância. Foi verificada a exequibilidade do Projeto de Reavaliação de Adolescentes numa abordagem de “melhor cenário”, convidando os notificadores regulares do PVNPC de duas das regiões de melhor adesão para a reavaliação em 2016-2019 dos indivíduos nascidos em 2001-2003, registados no PVNPC. A amostra-alvo corresponde a 34% da coorte de nascimento nacional em 2001-2003. Foi possível recolher informação sobre 77% das crianças nascidas em 2001-2003. Verificou-se maior possibilidade de reavaliação dos indivíduos com registo de condições mais complexas na infância, o que ressalta a necessidade de estabelecer estratégias de redução dos vieses de participação e de identificação. Conclui-se que a reavaliação na adolescência dos indivíduos registados na infância no PVNPC é exequível, mas implica a implementação de medidas de promoção da participação e de controlo de vieses.

_Abstract

The Portuguese National Surveillance of Cerebral Palsy (PVNPC) effectively registers clinic, epidemiologic and functionality data of children with cerebral palsy born since 2001, at the recommended age of 5-year-old. For PVNPC to provide useful, up-to-date indexes, data on the evolution of cerebral palsy later in life are required. Therefore, it was planned to reassess during adolescence those individuals registered as a child (Project for Reassessment of Adolescents) and a feasibility study was designed, on a “best scenario” approach. Regular notifiers for PVNPC in two of the regions with the best adherence were invited to reassess in 2016-2019 those subjects born in 2001-2003,

which had been registered to PVNPC. The target sample includes 34% of the national 2001-2003 birth-cohort. Information about 77% of the subjects born in 2001-2003 was obtained. The subjects with the best odds for reassessment in adolescence were those that had registered more complex conditions as a child. This fact highlights the need to design strategies to reduce participation and identification bias. We conclude that it is feasible to reassess adolescents registered as a child to PVNPC but actions to promote participation and to control bias are required.

_Introdução

A paralisia cerebral (PC), a deficiência motora mais comum na infância (1), é um conjunto amplo de condições clínicas permanentes, mas não inalteráveis, com afetação do tónus, movimento e/ou postura, devidas a interferência/lesão/anomalia não progressiva do desenvolvimento do cérebro imaturo (*Surveillance of Cerebral Palsy in Europe - SCPE*) (2).

Desde 2006, o Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral em Portugal (PVNPC) recolhe dados clínicos, epidemiológicos e funcionais das crianças com PC nascidas desde 2001, à idade recomendada de 5 anos (3), antes da idade recomendada para início do ensino básico (4).

Os níveis funcionais avaliados aos 5 anos em crianças com PC mantêm-se relativamente estáveis ao longo da infân-



cia (5,6) mas a progressão ou estabilidade nos 10 a 20 anos seguintes não está esclarecida (7-9). A PC persiste até à idade adulta, verificando-se um incremento progressivo da longevidade (10-12).

É necessário conhecer o seu desenvolvimento ao longo da vida, particularmente em idades-chave. A especial singularidade da adolescência, pelos processos de crescimento e de desenvolvimento neuromotor, identitários, relacionais, de participação social e de autonomização, torna-a especialmente complexa na pessoa com PC, comportando um conjunto muito vasto de riscos e de desafios muito específicos para as suas saúde e qualidade de vida (13).

O PVNPC iniciou em 2018 o desafio de implementar o Projeto de Reavaliação de Adolescentes, com o estudo da exequibilidade da reavaliação, 10 anos depois, de crianças notificadas ao PVNPC à idade aproximada de 5 a 8 anos.

_Objetivos

Avalia-se a exequibilidade da reavaliação na adolescência de crianças com PC notificadas ao PVNPC aos 5 anos, numa abordagem de “melhor cenário” e exploram-se indicadores na infância (socio-demográficos, clínicos ou funcionais) que condicionem a concretização da reavaliação.

_Métodos

Foi realizado um estudo analítico observacional, comparando dados de dois registos transversais: as crianças com PC nascidas entre 2001 e 2003, notificadas ao PVNPC com idade aproximada de 5 a 8 anos, e os dados obtidos através do preenchimento de um inquérito *ad-hoc*, em 2016-2019, sobre as condições presentes dos mesmos indivíduos.

O PVNPC desenvolve a vigilância voluntária, ativa e sistemática de casos de PC em Portugal, fazendo o seu registo na idade recomendada de 5 anos de idade, seguindo o protocolo comum da SCPE, que inclui a definição e a classificação da PC, instrumentos de avaliação funcional, imagiológica e de morbilidade associada (14). O PVNPC considera cinco níveis de complexidade de PC pela presença das se-

guintes condições: afetação moderada a grave da motricidade global (*Gross Motor Function Classification System* – níveis III, IV e V); défice cognitivo moderado a grave (QI <50); défice visual grave; epilepsia ativa (14,15). A base de dados do PVNPC é anónima, sendo a cada registo associado um código interno; a identificação dos casos e o consentimento para participação ficam na posse do clínico responsável pela notificação.

Foram selecionadas duas das regiões de Portugal continental com as melhores taxas de cobertura entre 2006 e 2010: Área Metropolitana de Lisboa (média da cobertura 108%) e Alto Minho (média da cobertura 118%); estas duas regiões abrangem 34,2% da coorte nacional de nascimento 2001-2003. Foram contactados 10 notificadores regulares do PVNPC, solicitando-se a aplicação, entre 2016 e 2019, de um formulário aos adolescentes nascidos em 2001-2003, registados em criança ao PVNPC, identificados entre os casos notificados. O formulário inclui os indicadores clínicos e funcionais do formulário de registo aos 5 anos, bem como questões sobre morbilidade após a infância, participação e apoios, e um questionário de qualidade de vida de crianças com paralisia cerebral (CP QOL-Child) (16). O CP QOL-Child foi aplicado ao próprio, sempre que possível, e/ou ao seu cuidador mais significativo.

Foi solicitado aos notificadores que classificassem os indivíduos a reavaliar na adolescência em quatro categorias: “Avaliados”, “Não avaliados por alteração de residência”, “Falecidos” e “Não contactáveis”.

Foi feita a análise descritiva dos indivíduos reavaliados e a análise de associações entre as categorias consideradas na adolescência e indicadores sociodemográficos, clínicos ou funcionais presentes no registo feito aos 5 anos de idade. Foram usados teste do Qui-Quadrado e Teste Exato de Fisher, conforme adequado, assim como testes de correlação de Spearman, para um nível de significância de 5%; foram estimados *Odds Ratio* com intervalos de confiança de 95%. Foram usados os programas SPSS.25 (17) e OpenEpi (18).



_Resultados

Foram identificados na base de dados do PVNPC 274 potenciais casos a reavaliar na adolescência, nascidos ou residentes nas regiões de interesse: 164 indivíduos foram reavaliados (77,7%); 25 indivíduos tinham falecido (11,9%) e 22 (8,0%) residiam fora das regiões de interesse; não foi possível obter informação de 63 indivíduos (23%), considerados “Não contactáveis” (figura 1).

Dos 22 adolescentes que passaram a residir fora das regiões em análise, 17 (77,3% deste grupo) residiam em outras regiões de Portugal (4 estavam institucionalizados) e 5 residiam noutros países. Não se verificaram associações significativas entre os indicadores aos 5 anos e a alteração da residência na adolescência.

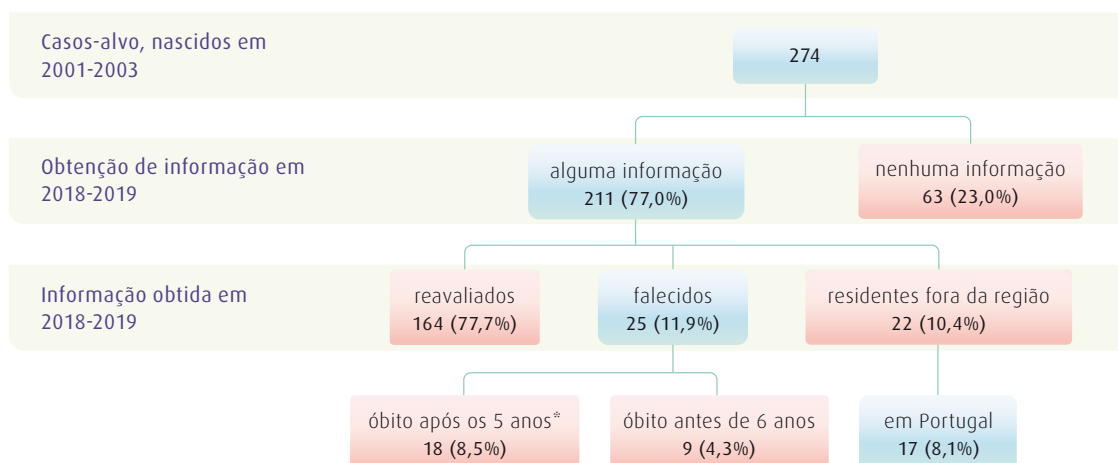
Identificaram-se 27 óbitos entre os 211 indivíduos com informação (12,8%). Tinha falecido antes de completar 6 anos de idade 9 crianças (4,3%), 16 (7,6%) tinham falecido com 6 ou mais anos de idade, 2 faleceram durante o período de recolha de dados, após a reavaliação, o que totaliza 8,5% de falecimentos na adolescência. O registo de óbito até à adolescência foi mais frequente nos indivíduos com índice de

Apgar <6 (35,0% vs. 9,8%; $p < 0,006$), tendencialmente maior se houve registo de convulsões nas primeiras 72 horas após nascer (25,0% vs. 13,5%; $p < 0,109$), e na presença aos 5 anos de maior morbidade associada ou maior afetação funcional, expressa também no nível de complexidade de PC: 0 indicadores 0 óbitos; 1 indicador 2,3%; 2 indicadores 3,7%; 3 indicadores 23,8%; 4 indicadores 57,1% ($r = 0,888$; $p < 0,001$).

Excluindo as categorias “Não avaliados por alteração de residência” e “Falecidos”, não se encontraram associações significativas entre o ter sido (164 indivíduos) ou não (63 indivíduos) reavaliado na adolescência e as variáveis socio-demográficas e perinatais. Quanto ao tipo clínico *major* de PC, a possibilidade de reavaliação foi cerca de 2, 5 vezes mais elevada nos casos de PC predominantemente disquinética do que na espástica (12,4% vs. 5,4%; *Odds Ratio* 2,5 [IC95% 0,77-10,94]; $p = 0,07$).

Não se encontraram associações significativas da reavaliação com as diferentes escalas funcionais, exceto a Função Motora Fina Bimanual (nível I 29,0% vs. 51,0%; $p = 0,017$) (gráfico 1). Quanto à morbidade *major* aos 5 anos, apenas se verificou uma tendência para maior possibilidade de reavaliação dos indivíduos com epilepsia (40,9% vs. 30,8%; $p = 0,127$).

Figura 1: ↓ Resultado da avaliação de exequibilidade do Projeto de Reavaliação de Adolescentes do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral em Portugal (PVNPC). Foram alvo de reavaliação os indivíduos com paralisia cerebral nascidos em 2001-2003, notificados ao PVNPC, nascidos ou residentes aos 5 anos de idade em duas regiões: Área Metropolitana de Lisboa e Alto Minho.



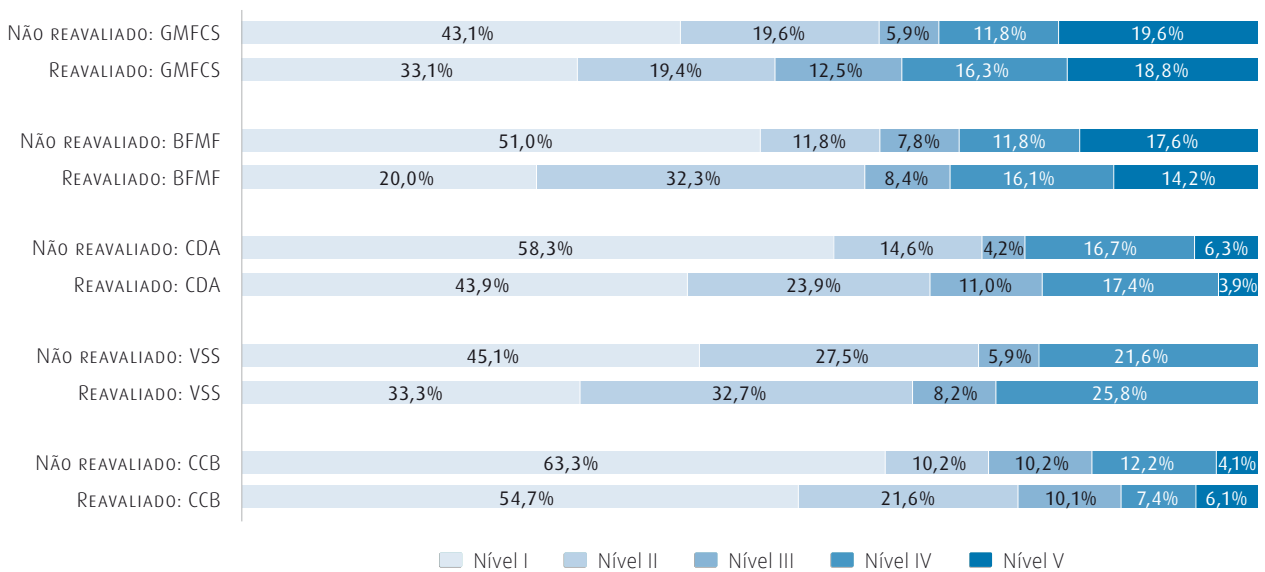
* 2 adolescentes faleceram no período de recolha de dados, após reavaliação, pelo que foram reagrupados.



Os indivíduos que aos 5 anos apresentavam menor nível de complexidade de PC (0 indicadores) tinham 2 vezes maior possibilidade (32,1% vs. 50,0%; *Odds Ratio* 2,15 [IC95%

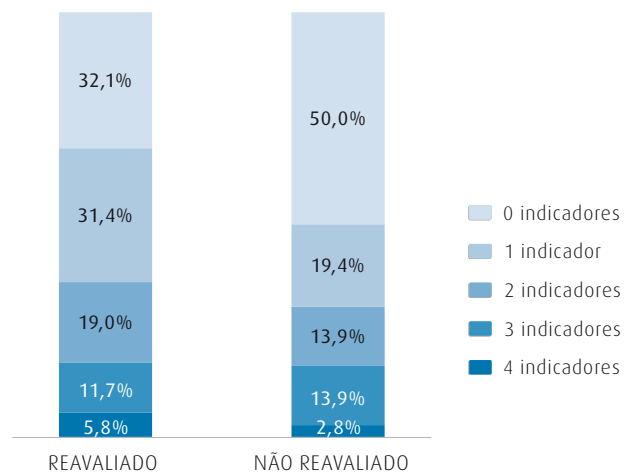
1,188-3,919]; $p=0,006$) de não serem reavaliados na adolescência do que os com níveis de complexidade superior (3 e 4 indicadores) (gráfico 2).

Gráfico 1: Distribuição por escalas de funcionalidade dos indivíduos-alvo do Projeto de Reavaliação de Adolescentes do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral em Portugal (PVNPC). Foram alvo de reavaliação os indivíduos com paralisia cerebral nascidos em 2001-2003, notificados ao PVNPC, nascidos ou residentes aos 5 anos de idade em duas regiões: Área Metropolitana de Lisboa e Alto Minho.



GMFCS – Gross Motor Function Classification System; BFMF – Bimanual Fine Motor Function Classification System; CDA – Classificação do Desempenho na Alimentação; VSS – Viking Speech Scale; CCB – Classificação da Capacidade de Controlo da Baba.

Gráfico 2: Efeito da complexidade da paralisia cerebral na exequibilidade do Projeto de Reavaliação de Adolescentes do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral em Portugal (PVNPC). Foram alvo de reavaliação os indivíduos com paralisia cerebral nascidos em 2001-2003, notificados ao PVNPC, nascidos ou residentes aos 5 anos de idade em duas regiões: Área Metropolitana de Lisboa e Alto Minho.



A escala de complexidade da paralisia cerebral considera quatro indicadores: afetação moderada a grave da motricidade global (Gross Motor Function Classification System – níveis III, IV e V); défice cognitivo moderado a grave (QI <50); défice visual grave; epilepsia ativa (Fonte: Relatório PVNPC 2018).



_Discussão

Foi constatada evidência da exequibilidade da reavaliação na adolescência das crianças com PC notificadas ao PVNPC na idade aproximada de 5 a 8 anos. Foi também verificado que é possível realizar de forma efetiva esta reavaliação mantendo o anonimato do fluxo de dados.

Numa amostra selecionada entre as regiões com maior adesão ao PVNPC, foi possível recolher informação sobre 77% das crianças nascidas em 2001-2003; apenas em 60% dos casos se obteve informação completa sobre a situação clínica, a funcionalidade e a qualidade de vida. Considerada a mesma proporção de recaptura nos adolescentes que mudaram de residência para outra região do País, estima-se que a taxa de recaptura para os adolescentes registados aos 5 anos nas duas regiões estudadas poderia chegar a 64%, se o Projeto de Reavaliação de Adolescentes estivesse implementado em todo o País.

Terão contribuído para estes resultados, a existência de uma rede estável de notificadores voluntários do PVNPC (15), dedicados ao acompanhamento de crianças, jovens e adultos com PC; bem como o empenhamento ativo das associadas da Federação das Associações Portuguesas de Paralisia Cerebral (15) e dos centros de reabilitação de PC. Por fim, é de salientar o interesse das pessoas que vivem com PC em aceder a mais e melhor conhecimento da sua condição, com dados específicos de Portugal.

O estudo de exequibilidade ressalta o desafio de obter um registo de adolescentes com PC representativo dos sobreviventes do registo feito na infância. Os dados obtidos sugerem uma maior probabilidade de serem reavaliadas na adolescência as crianças com maior complexidade da PC (funcionalidade e morbilidade associada, como epilepsia). Um viés de participação em direcção à maior gravidade, leva a descrever uma evolução pior do que a real. Estudos longitudinais realizados em âmbitos institucionais ou nacionais mostram que melhor funcionalidade e participação na infância se associam a melhor desempenho na adolescência e na idade adulta (19,20). Embora a obtenção de indicadores desfavoráveis possa contribuir a mobi-

lizar mais recursos para a prevenção e intervenção precoce da PC, o rigor científico é uma prioridade do PVNPC e dos seus parceiros. Por outro lado, a publicação de indicadores que não reflectem correctamente a realidade, pode alhear do PVNPC parte das pessoas que vivem com PC, por não se identificarem com eles, comprometendo a sua viabilidade.

Não é possível garantir que no alargamento a todo o País do Projeto de Reavaliação de Adolescentes venham a ser obtidas taxas de reavaliação semelhantes às obtidas com a abordagem de “melhor cenário”, pois a taxa de cobertura de casos esperados é díspar entre as diferentes regiões (15). Outras regiões com taxas de cobertura semelhantes, que expressaram inicialmente disponibilidade em participar neste estudo de exequibilidade, tiveram dificuldade em providenciar atempadamente dados. Entretanto estão já a ser recolhidos dados da Área Metropolitana do Porto, mostrando o interesse despertado pelo Projeto de Reavaliação de Adolescentes.

O estudo de exequibilidade mostra que o período de tempo necessário para obter boas taxas de reavaliação é longo (mais de 3 anos), pois a avaliação é feita por ocasião das visitas clínicas e não em visitas dedicadas. Esta observação é concordante com a experiência do PVNPC, para o qual são precisos mais de 5 anos para considerar completa uma coorte anual de nascimento (15). Por outro lado, assiste-se a um envelhecimento da rede de notificadores do PVNPC (15) e à redução dos corpos clínicos das instituições, um risco à sustentabilidade do PVNPC e à implementação do Projeto de Reavaliação de Adolescentes.

A experiência internacional de reavaliação na adolescência de crianças com PC inicialmente registadas na infância é extensa, mas restrita a instituições clínicas ou a áreas geográficas específicas (21,22). A extensão de um programa de registo e vigilância epidemiológica nacional de PC na infância à reavaliação sistemática na adolescência é pouco frequente (21,23). No entanto, o PVNPC foi o primeiro no Mundo com âmbito nacional (3), constituindo incentivo e padrão para outros (SCPE Network https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/scpe/scpe-network/members_en). O con-



sórcio do PVNPC confia que esta estratégia de crescimento também terá sucesso.

_Conclusões

A reavaliação sistemática na adolescência das crianças com PC notificadas ao PVNPC aos 5 anos é exequível mantendo o anonimato dos dados.

Equipa do Projeto de Reavaliação de Adolescentes do Programa de Vigilância Nacional da Paralisia Cerebral:

Teresa Folha (Coordenação; INSA); Ana Cadete (CRPCCG-S-CML), Conceição Correia (APCVC), Cristina Duarte (CDC-HGO), Filipa Melo (CMRA-SCML), Isabel Vieira (APCP); João Capelo (CMRA-SCML); Maria da Graça Andrada (CRPCCG-SCML); Susana Almeida (CDC-HGO); Teresa Gaia (CRPCCG-SCML); Joaquim Alvarelhão (FAPPC), Daniel Virella (Epidemiologia; INSA) e Ana João Santos (Análise de Dados; INSA). APCP: Associação de Paralisia Cerebral do Porto; APCVC: Associação de Paralisia Cerebral de Viana do Castelo; CDC-HGO: Centro de Desenvolvimento da Criança Professor Torrado da Silva, Hospitar Garcia de Orta; CMRA-SCML: Centro de Medicina de Reabilitação de Alcoitão, Santa Casa da Misericórdia de Lisboa; CRPCCG-SCML: Centro de Reabilitação de Paralisia Cerebral Calouste Gulbenkian, Santa Casa da Misericórdia de Lisboa; FAPPC: Federação das Associações Portuguesas de Paralisia Cerebral; INSA: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Referências bibliográficas:

- (1) Hirtz D, Thurman DJ, Gwinn-Hardy K, et al. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*. 2007 Jan 30;68(5):326-37. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000252807.38124.a3>
- (2) Surveillance of Cerebral Palsy in Europe. Surveillance of cerebral palsy in Europe: a collaboration of cerebral palsy surveys and registers. Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (SCPE). *Dev Med Child Neurol*. 2000 Dec;42(12):816-24. <https://doi.org/10.1017/s0012162200001511>
- (3) Andrada MG, Virella D, Gouveia R, Calado E, Folha T, et al. Paralisia cerebral aos 5 anos de idade em Portugal: crianças com paralisia cerebral nascidas em 2001. Lisboa: Federação das Associações Portuguesas de Paralisia Cerebral, 2009. https://www.spp.pt/UserFiles/file/UVV_SPP_Casos_Estudo_Paralisia_Cerebral/R elatorio_PVNPC5A_2001_obra_completa.pdf
- (4) Despacho Normativo n.º 6/2018, 10 de abril. Estabelece os procedimentos da matrícula e respetiva renovação e as normas a observar na distribuição de crianças e alunos. DR n.º 72/2018, 2ª Série 2018-04-12:10277-10282. <https://dre.pt/application/conteudo/115093805>
- (5) Rosenbaum P, Walter S, Hanna S, et al. Prognosis for gross motor function in cerebral palsy: creation of motor development curves. *JAMA*. 2002 Sep 18;288(11):1357-63. <https://doi.org/10.1001/jama.288.11.1357>
- (6) Park EY. Stability of the gross motor function classification system in children with cerebral palsy for two years. *BMC Neurol*. 2020 May 6;20(1):172. <https://doi.org/10.1186/s12883-020-01721-4>
- (7) Ando N, Ueda S. Functional deterioration in adults with cerebral palsy. *Clin Rehabil*. 2000 Jun;14(3):300-6. <https://doi.org/10.1191/026921500672826716>
- (8) Tieman B, Palisano RJ, Gracely EJ, et al. Changes in mobility of children with cerebral palsy over time and across environmental settings. *Phys Occup Ther Pediatr*. 2004;24(1-2):109-28. https://doi.org/10.1300/j006v24n01_05
- (9) Voorman JM, Dallmeijer AJ, Knol DL, et al. Prospective longitudinal study of gross motor function in children with cerebral palsy. *Arch Phys Med Rehabil*. 2007 Jul;88(7):871-6. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2007.04.002>
- (10) Hutton JL, Pharoah PO. Life expectancy in severe cerebral palsy. *Arch Dis Child*. 2006 Mar;91(3):254-8. <https://doi.org/10.1136/adc.2005.075002>
- (11) Himmelmann K, Sundh V. Survival with cerebral palsy over five decades in western Sweden. *Dev Med Child Neurol*. 2015 Aug;57(8):762-7. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12718>
- (12) Blair E, Langdon K, McIntyre S, et al. Survival and mortality in cerebral palsy: observations to the sixth decade from a data linkage study of a total population register and National Death Index. *BMC Neurol*. 2019 Jun 4;19(1):111. <https://doi.org/10.1186/s12883-019-1343-1>
- (13) Livingston MH, Rosenbaum PL, Russell DJ, et al. Quality of life among adolescents with cerebral palsy: what does the literature tell us? *Dev Med Child Neurol*. 2007 Mar;49(3):225-31. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2007.00225.x>
- (14) Virella D, Folha T, Andrada MG, et al. Vigilância Nacional da Paralisia cerebral aos 5 anos de idade: crianças nascidas entre 2001 e 2007. 2ª ed. Lisboa: Federação das Associações Portuguesas de Paralisia Cerebral, 2017. http://www.fappc.pt/wp-content/uploads/2018/02/FAPPC_PROJETO167_Livroll edicao_PVNPC5A.pdf
- (15) Virella D, Folha T, Andrada MG, et al. Paralisia Cerebral em Portugal no Século XXI – Indicadores regionais: crianças nascidas entre 2001 e 2010. Lisboa: Federação das Associações Portuguesas de Paralisia Cerebral, 2019. <https://www.fappc.pt/wp-content/uploads/2019/02/Livro-PVNPC5A-Final-2018-GCL.pdf>
- (16) Davis E, Mackinnon A, Davern M, et al. Description and psychometric properties of the CP QOL-Teen: a quality of life questionnaire for adolescents with cerebral palsy. *Res Dev Disabil*. 2013 Jan;34(1):344-52. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2012.08.018>
- (17) SPSS 25. IBM Corporation 1994, 2018.
- (18) Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versão 3.01 (atualiz. 6/4/2013). www.OpenEpi.com [acedido em 26/9/2020].
- (19) Colver A, Rapp M, Eisemann N, et al. Self-reported quality of life of adolescents with cerebral palsy: a cross-sectional and longitudinal analysis. *Lancet*. 2015 Feb 21;385(9969):705-16. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61229-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61229-0)
- (20) Waltersson L, Rodby-Bousquet E. Physical Activity in Adolescents and Young Adults with Cerebral Palsy. *Biomed Res Int*. 2017;2017:8080473. <https://doi.org/10.1155/2017/8080473>
- (21) Hurley DS, Sukal-Moulton T, Gaebler-Spira D, et al. Systematic Review of Cerebral Palsy Registries/Surveillance Groups: Relationships between Registry Characteristics and Knowledge Dissemination. *Int J Phys Med Rehabil*. 2015 Apr;3(2):266. <https://doi.org/10.4172/2329-9096.1000266>
- (22) Dang VM, Colver A, Dickinson HO, et al. Predictors of participation of adolescents with cerebral palsy: A European multi-centre longitudinal study. *Res Dev Disabil*. 2015 Jan;36C:551-564. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2014.10.043>
- (23) Boyd RN, Davies PS, Ziviani J, et al. PREDICT-CP: study protocol of implementation of comprehensive surveillance to predict outcomes for school-aged children with cerebral palsy. *BMJ Open*. 2017 Jul 12;7(7):e014950. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-014950>

Evolução da incidência de diabetes entre 2016 e 2018: um estudo na Rede Médicos-Sentinela

Diabetes incidence from 2016 to 2018: a Portuguese General Practitioner's Network study

Mafalda Sousa-Uva¹, Liliana Mendes², Ana Rita Torres¹, Ana Paula Rodrigues¹

mafalda.uva@insa.min-saude.pt

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

(2) Unidade de Saúde Familiar Tondela. Centro de Saúde Tondela, Agrupamento de Centros de Saúde do Dão-Lafões, Tondela, Viseu, Portugal

_Resumo

Portugal é o segundo país da União Europeia com maior prevalência de diabetes em adultos, tornando premente a monitorização desta doença no nosso país. O objetivo do presente estudo foi analisar a evolução da taxa de incidência anual de Diabetes Mellitus entre 2016 e 2018, utilizando dados da Rede Médicos-Sentinela. Observou-se uma tendência crescente nas estimativas totais da taxa de incidência de diabetes de 2016 (524/100.000) a 2018 (605/100.000). Essa tendência de aumento foi observada de forma mais acentuada no sexo feminino (520/100.000 em 2016 *versus* 627/100.000 em 2018) e verificou-se que o grupo etário dos 65 aos 74 anos foi na generalidade o mais afetado.

_Abstract

Portugal has one of the highest prevalence rates of diabetes in Europe among their adult population. Therefore, there is an urgent need for improved awareness, diagnostics and management of the disease. The aim of this work was to analyze trends in diabetes incidence rate, between 2016 and 2018, using data from the Portuguese General Practitioner's Network. We observed an increasing trend in diabetes incidence rate from 2016 (524 / 100,000) to 2018 (605 / 100,000). The upward trend was observed more sharply in females (520/ 100,000 in 2016 *versus* 627/ 100,000 in 2018) and the age group from 65 to 74 years old was in general the most affected.

_Introdução

A Diabetes Mellitus é uma das mais frequentes causas de morbilidade e mortalidade a nível global (1). Em 2019, representou globalmente a 9.ª causa de morte (2). Segundo a Federação Internacional da Diabetes, trata-se do desafio de saúde com um dos mais acentuados crescimentos do século XXI (3). Facto é que, a nível global, nos últimos 20 anos, o número de adultos com diabetes mais do que triplicou (3).

Portugal é o segundo país da União Europeia com maior prevalência de diabetes em adultos (9,8%) (3). A diabetes é, por isso, um problema de saúde prioritário no nosso país.

A Rede Médicos-Sentinela constitui a única fonte de dados que permite a obtenção de taxas de incidência de diabetes em Portugal. A incidência é uma medida epidemiológica de frequência que se revela fundamental por forma a monitorizar a ocorrência de eventos de saúde como a diabetes e orientar a formulação de estratégias de prevenção para o futuro numa perspetiva de saúde pública.

Um estudo anterior realizado pela nossa equipa de investigação verificou um aumento de 4,3% na taxa de incidência de diabetes entre 1992 e 2015 (4). Esse aumento revelou-se mais acentuado acima dos 55 anos de idade e as projeções até 2024 indicaram um aumento sustentado da incidência em ambos os sexos.

_Objetivo

O objetivo do presente estudo foi, dando continuidade ao trabalho anteriormente realizado, descrever a evolução da taxa de incidência anual de Diabetes Mellitus (DM) entre 2016 e 2018.

_Métodos

Desenvolveu-se um estudo ecológico de séries temporais com dados provenientes da Rede Médicos-Sentinela, entre 2016 e 2018.

A Rede Médicos-Sentinela, coordenada pelo Departamento de Epidemiologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, é um instrumento de observação e vigilância constituído por médicos de Medicina Geral e Familiar que notificam voluntariamente eventos de saúde ocorridos nas suas listas de utentes.

Entre 2016 e 2018, os médicos de Medicina Geral e Familiar da Rede Médicos-Sentinela notificaram de forma voluntária



todos os novos casos de DM ocorridos nos seus utentes, tal como tem vindo a realizar-se desde 1992.

Para cálculo das estimativas de incidência de DM foi utilizado como denominador a população sob observação efetiva pela Rede Médicos-Sentinela nos anos em estudo. A população sob observação efetiva (PSOE) corresponde à soma das listas de utentes dos Médicos-Sentinela ativos em cada semana. A PSOE anual é calculada pela média das PSOE semanais de cada ano.

As estimativas de incidência são apresentadas por 100.000 habitantes desagregadas por sexo e grupo etário.

_Resultados

Entre 2016 e 2018, a Rede Médicos-Sentinela contou com a colaboração de cerca de 120 médicos. No período em estudo, a PSOE anual variou entre 36.417 e 44.942 utentes.

No período temporal em análise, observou-se um aumento nas estimativas totais da taxa de incidência de diabetes, tendo variado entre 524/100.000 em 2016 e 605/100.000 em 2018 (gráfico 1).

A tendência de aumento no triénio em análise foi observada de forma mais acentuada no sexo feminino (520/100.000 em 2016 *versus* 627/100.000 em 2018) (gráfico 1). No sexo masculino, apenas se verificou um aumento entre 2016 e 2017,

tendo ocorrido um decréscimo na taxa de incidência de diabetes em 2018.


Considerando o conjunto dos dados no triénio em análise, a incidência de diabetes apresenta um gradiente crescente com a idade, sendo na generalidade o grupo etário dos 65-74 anos o mais afetado (tabela 1). Observou-se o seu surgimento mais cedo nas mulheres (25-34 anos), tratando-se, eventualmente, de casos de diabetes gestacional. Porém, a incidência aumentou de forma mais marcada acima dos 45 anos, em especial, no sexo masculino.

_Discussão e conclusões

O aumento da incidência anual de Diabetes Mellitus, entre 2016 e 2018, na população sob observação da Rede Médicos-Sentinela, poderá indicar um aumento do risco de diabetes na população portuguesa.

Apesar da Rede Médicos-Sentinela ser uma amostra de conveniência, apresenta vantagens precisamente pela possibilidade de deteção precoce do eventual aumento gradual de casos de um evento de saúde como a diabetes, apoiando assim a tomada de decisões céleres e atempadas em saúde pública.

Os resultados obtidos no presente estudo encontram-se concordantes com as previsões da evolução da taxa de inci-

Gráfico 1:  Incidência anual de Diabetes Mellitus (DM) (por 100.000 habitantes) na Rede Médicos-Sentinela, entre 2016 e 2018, por sexo.

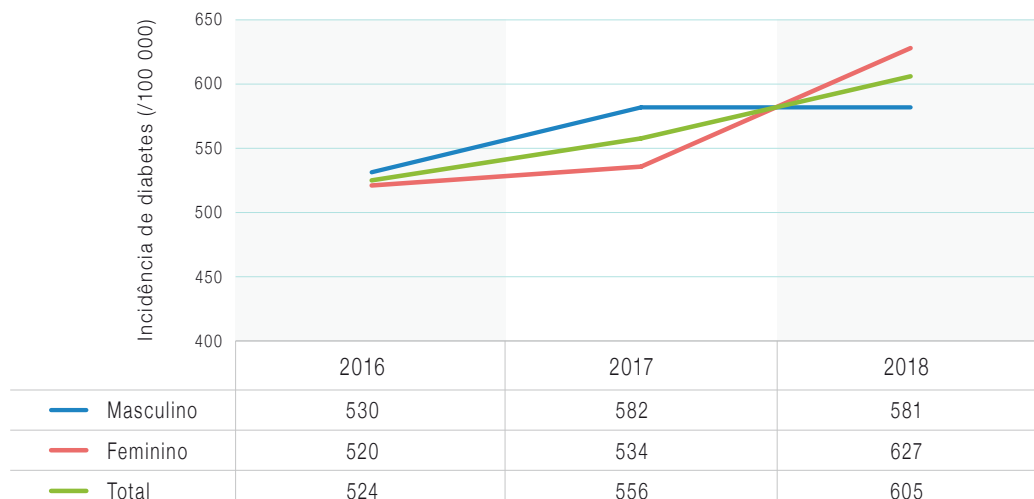




Tabela 1: Incidência anual de Diabetes Mellitus (DM) (por 100.000 habitantes) na Rede Médicos-Sentinela, entre 2016 e 2018, por sexo e grupo etário.

Grupo etário (anos)	Masculino			Feminino			Total		
	2016	2017	2018	2016	2017	2018	2016	2017	2018
00-24	**	*	*	**	*	**	**	*	**
25-34	**	**	39	**	**	183	133	119	114
35-44	623	193	154	623	309	295	401	255	229
45-54	876	564	880	876	467	704	763	512	788
55-64	595	1597	1249	595	850	1247	945	1198	1248
65-74	1529	1384	1556	1529	1135	1369	1172	1247	1454
≥75	728	1560	1356	728	1622	1240	858	1598	1286

* não foram notificados casos de DM; ** foram notificados menos de 5 casos de DM.

dência de diabetes preconizadas anteriormente pela nossa equipa de investigação (4), bem como em outros estudos (5).

O gradiente de incidência de DM crescente com a idade, observado na totalidade do período em análise, é concordante com o risco conhecido desta doença nos indivíduos mais velhos (6). As diferenças encontradas entre sexos, nomeadamente, a maior incidência no grupo etário entre os 25-44 anos nas mulheres, poderá encontrar-se relacionada com casos de diabetes gestacional, reforçando a importância de monitorização dos valores de glicémia nas gestantes (7).

O aumento marcado da incidência de DM acima dos 45 anos no sexo masculino encontra-se de acordo com um maior risco de desenvolver a doença nos homens e, provavelmente, estará relacionado com uma maior prevalência de fatores de risco no sexo masculino (6,8). Contudo, chama-se a atenção, para uma tendência crescente mais acentuada nas mulheres relativamente aos homens no triénio em análise. Tal aumento, contudo, poderá estar relacionado com um maior diagnóstico da doença relativamente ao sexo masculino, dado que o padrão de acesso a cuidados de saúde primários regista uma maior procura por parte do sexo feminino (9).

Em Portugal, a DM trata-se de um problema de saúde para o qual, tanto atualmente, bem como de futuro, se verifica a necessidade urgente de orientar esforços, designadamente, através da implementação de medidas de prevenção primária e primordial dirigidas aos seus principais fatores de

risco. Desses, salientam-se os fatores de risco modificáveis que incluem o consumo de tabaco; o sedentarismo; e uma dieta inadequada (e, conseqüentemente, a obesidade) (10).

Estudos futuros deverão monitorizar o risco de diabetes na população portuguesa, bem como avaliar o efeito das medidas preventivas que vão sendo implementadas ao longo do tempo.

Por último, importa referir a importância de estimar de futuro o impacto da atual epidemia COVID-19 na diabetes, quer pela alteração do padrão de acesso e utilização de cuidados de saúde, quer pela alteração de estilos e hábitos de vida.

Referências bibliográficas:

- (1) World Health Organization. Noncommunicable diseases progress monitor 2020. Geneva: WHO, 2020. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1267930/retrieve>
- (2) World Health Organization. The top 10 causes of death [online]. 9 December 2020. [consult.21/4/2021]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- (3) IDF Diabetes Atlas [online], 9th ed. Belgium: International Diabetes Federation, 2019. [consult.21/4/2021]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pcd.2016.05.003> <https://www.diabetesatlas.org/en/sections/worldwide-toll-of-diabetes.html>
- (4) Sousa-Uva M, Antunes L, Nunes B, et al. Trends in diabetes incidence from 1992 to 2015 and projections for 2024: A Portuguese General Practitioner's Network study. *Prim Care Diabetes*. 2016 Oct;10(5):329-33.
- (5) Magliano DJ, Islam RM, Barr ELM, et al. Trends in incidence of total or type 2 diabetes: systematic review. *BMJ*. 2019 Sep 11;366:l5003. <https://doi.org/10.1136/bmj.l5003>
- (6) Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Nov 8;8(4):228-36. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.183>



- (7) Johns EC, Denison FC, Norman JE, et al. Gestational Diabetes Mellitus: Mechanisms, Treatment, and Complications. *Trends Endocrinol Metab.* 2018 Nov;29(11):743-54. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.09.004>
- (8) Almdal T, Scharling H, Jensen JS, et al. Higher prevalence of risk factors for type 2 diabetes mellitus and subsequent higher incidence in men. *Eur J Intern Med.* 2008 Jan;19(1):40-5. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2007.05.011>
- (9) Wang Y, Hunt K, Nazareth I, et al. Do men consult less than women? An analysis of routinely collected UK general practice data. *BMJ Open.* 2013 Aug 19;3(8):e003320. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-003320>
- (10) Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, et al. Risk factors for type 2 diabetes mellitus: An exposure-wide umbrella review of meta-analyses. *PLoS One.* 2018 Mar 20; 13(3):e0194127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194127>



Estudo molecular da diabetes tipo MODY: atualização de resultados (2011-2019)

Molecular study of MODY Diabetes: results update (2011-2019)

Margarida Vaz¹, Gisela Gaspar¹, Ana Agapito², Ana Carolina Neves³, Ana Paula Bogalho⁴, Bruno Almeida³, Carla Pereira⁵, Fernando Fonseca², Goreti Lobarinhas⁶, Henrique Vara Luiz⁷, João Sequeira Duarte⁸, Maria de Lurdes Sampaio⁵, Paulo Dario¹, Mafalda Bourbon¹; *Estudo Molecular de Diabetes Monogénicas**

mafalda.bourbon@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Serviço de Endocrinologia, Hospital Curry Cabral, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(3) Associação Protetora dos Diabéticos de Portugal, Lisboa, Portugal

(4) Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central, Lisboa, Portugal

(5) Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Serviço de Pediatria Médica, Departamento de Pediatria, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

(6) Serviço de Pediatria, Hospital Santa Maria Maior, Barcelos, Portugal

(7) Serviço de Endocrinologia e Diabetes, Hospital Garcia de Orta, Almada, Portugal

(8) Serviço de Endocrinologia, Hospital Egas Moniz, Lisboa, Portugal

* Investigadores do estudo Molecular de Diabetes tipo MODY, no fim do artigo

_Resumo

A diabetes tipo MODY é uma doença monogénica que se estima que contribua para 1 a 5% de todos os casos de diabetes. Atualmente existem 14 genes associados a esta patologia cujos doentes apresentam características fenotípicas, metabólicas e genéticas muito heterogéneas. Em 2011, o Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge implementou o estudo molecular da diabetes tipo MODY com o objetivo de caracterizar geneticamente estes doentes e identificar precocemente familiares em risco, de forma a contribuir para a melhor gestão do doente. O rastreio destes doentes é difícil devido a critérios clínicos pouco sensíveis e inespecíficos e por não existir um biomarcador único que nos permita fazer a diferenciação entre os vários tipos de diabetes. O estudo genético permite a correta identificação destes doentes. Entre 2011 e 2019, foram estudados 76 casos índice nos quais foram identificadas alterações patogénicas ou provavelmente patogénicas em 35,5% (27). Através do estudo em cascata dos familiares, foi possível identificar adicionalmente 17 indivíduos com MODY. Para estes doentes, o conceito de medicina personalizada é uma realidade pois, com base no diagnóstico genético, os clínicos têm a capacidade de definir uma terapêutica adequada a cada caso, bem como de estabelecer o prognóstico, aconselhamento genético e o estudo de familiares.

_Abstract

MODY diabetes is a monogenic disease that is estimated to contribute to 1 to 5% of all diabetes cases. Currently, there are 14 genes associated with this condition whose patients present heterogeneous phenotypic, metabolic and genetic characteristics. In 2011, Department of Health Promotion and Prevention of non Communicable Diseases implemented the Molecular Study of MODY Diabetes with the aim of genetically characterizing these patients and early identify family members at risk, in order to contribute for the best management of these patients. The screening is difficult due to the low sensibility and specificity of clinical

criteria, because there is no single biomarker that allows to make the differentiation between the different types of diabetes. The genetic study allows the correct identification of these patients. Between 2011 and 2019, 76 index cases were studied and in 35.5% (27) a pathogenic or probably pathogenic variant was identified. Through cascade screening of family members, it was possible to additionally identify 17 individuals with MODY. For these patients, the concept of personalized medicine is a reality because based on the genetic diagnosis, the clinicians have the ability to define an appropriate therapy for each case and establish patient prognosis, genetic counselling as well as identification of other at risk family members.

_Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Diabetes Mellitus (DM) afeta 422 milhões de adultos em todo o mundo. Estima-se que, destes casos, 1 a 5% sejam resultado de variantes patogénicas num único gene, sendo por isso denominada de diabetes monogénica (1). Um dos tipos de diabetes monogénica é a denominada diabetes tipo MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*), uma vez que é frequente o aparecimento desta patologia numa fase precoce da vida (2). A primeira descrição desta doença surgiu nos anos 70 (2,3), quando foram identificadas pessoas com diabetes com características clínicas distintas da DM tipos 1 e 2: os sintomas manifestavam-se antes dos 25 anos, em indivíduos não obesos, com história familiar da doença, demonstrando transmissão autossómica dominante e, ge-



ralmente, não necessitando de terapêutica com insulina durante um período aproximado de 2 anos (4,5). Atualmente estão identificados 14 genes associados à diabetes tipo MODY (2,6), apesar da grande maioria destes casos resultar de alterações em 4 destes genes: *GCK*, *HNF1A*, *HNF1B* e *HNF4A* (2,5,7).

Estes doentes apresentam características fenotípicas, metabólicas e genéticas bastantes distintas entre si, dependendo quer do gene afetado, quer do tipo de variante genética associada (8). Cada subtipo de MODY exige uma monitorização e estratégia terapêutica, diferente, sendo essencial o diagnóstico genético para a escolha terapêutica, uma vez que estes doentes são frequentemente diagnosticados com DM tipo 1 ou 2, levando a que possam não receber tratamento adequado à sua real condição (8).

Apesar de existirem várias estimativas sobre a prevalência de diabetes tipo MODY, os dados epidemiológicos disponíveis são ambíguos e geograficamente variáveis, tendo em conta que diferentes países apresentam diferentes abordagens no que diz respeito ao recrutamento de doentes e a critérios de decisão clínica e, por isso, impera a necessidade de existir em Portugal um estudo populacional de larga escala e a possibilidade de rastreio genético para doentes diabéticos (8).

Em 2011, o Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis (DPSDNT) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge implementou o Estudo Molecular da Diabetes tipo MODY tendo como principais objetivos a caracterização genética destes doentes e a identificação precoce de familiares em risco, de forma a contribuir para a melhor gestão do doente. O rastreio destes doentes é difícil devido a critérios clínicos pouco sensíveis e inespecíficos e por não existir um biomarcador único que nos permita fazer a diferenciação entre os vários tipos de diabetes. O estudo genético permite a correta identificação destes doentes.

_Objetivos

Caracterizar geneticamente doentes com diagnóstico clínico de MODY entre 2011 e 2019 e identificar precocemente familiares em risco, de forma a contribuir para a melhor gestão clínica do doente e da família.

_Material e métodos

Entre 2011 e 2019 foram referenciados ao estudo 76 casos índice, com diagnóstico clínico de MODY, e 42 familiares com e sem diabetes. O DNA genómico foi extraído das amostras de sangue total colhido em tubos de EDTA. O DNA foi posteriormente sujeito a amplificação por PCR e sequenciado por sequenciação de Sanger. Foram estudadas a região promotora, regiões codificantes e regiões intrónicas adjacentes dos genes *GCK*, *HNF1A*, *HNF1B* e *HNF4A*. Foi realizada a pesquisa de grandes rearranjos por MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*). As variantes encontradas foram classificadas segundo as *guidelines* do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (9). Todos os doentes e familiares deram o seu consentimento escrito para participarem no projeto.

_Resultados e discussão

Dos 76 casos índice que participaram no Estudo, foi identificada uma variante genética patogénica ou provavelmente patogénica em 27 casos (cerca de 35,5% dos casos índice). Através do estudo em cascata dos familiares, foi possível identificar adicionalmente 17 indivíduos com diabetes tipo MODY, perfazendo um total de 44 indivíduos diagnosticados geneticamente.

Cerca de 48% das variantes identificadas localizavam-se no gene *GCK*, 32% no gene *HNF1A*, 16% no gene *HNF1B* e 4% no gene *HNF4A*. No [quadro 1](#) estão identificadas todas as variantes genéticas classificadas como patogénicas e provavelmente patogénicas encontradas na amostra do estudo.

Para os casos índice em que não foi possível identificar a causa genética que justifica o fenótipo apresentado são plausíveis duas explicações: estes doentes podem possuir alterações raras noutros genes associados à doença (no presente estudo só se estudaram 4 genes), ou estes doentes podem apresentar DM tipos 1 e 2, uma vez que os critérios existentes para rastrear casos de diabetes monogénica são pouco sensíveis, inespecíficos e mantêm-se inalterados desde os anos 70 (8). Para pesquisar outras variantes raras, o DPSDNT está a implementar um painel de NGS com todos os genes associados à diabetes monogénica e



Quadro 1: ↓ Variantes genéticas classificadas como patogénicas ou como provavelmente patogénicas, encontradas nos participantes do estudo da diabetes tipo MODY, entre 2011-2019.

Gene	Localização	Variante	Proteína	Indivíduos Afetados	Classificação ACMG
GCK	Exão 2	c.94_96del	p.(Cys32del)	1 (1 família)	Provavelmente patogénica
	Exão 3	c.214G>A	p.(Gly72Arg)	2 (1 família)	Provavelmente patogénica
	Exão 4	c.364C>T	p.(Leu122Phe)	5 (1 família)	Provavelmente patogénica
	Exão 5	c.544G>A	p.(Val182Met)	1 (1 família)	Provavelmente patogénica
	Intrão 5	c.579+1_579+33del	?	7 (3 famílias)	Patogénica
	Exão 7	c.766G>A	p.(Glu766Lys)	1 (1 família)	Provavelmente patogénica
		c.757G>C	p.(Val253Leu)	1 (1 família)	Provavelmente patogénica
	Exões 5 a 8	c.484-?_1019+?del ?	?	1 (1 família)	NA
Exão 10	c.1358C>T	p.(Ser453Leu)	2 (1 família)	Provavelmente patogénica	
HNF1A	Exão 2	c.391C>T	p.(Arg131Trp)	2 (1 família)	Provavelmente patogénica
	Exão 3	c.599G>A	p.(Arg200Gln)	2 (1 família)	Provavelmente patogénica
	Exão 4	c.788G>A	p.(Arg263His)	1 (1 família)	Patogénica
		c.814C>T	p.(Arg272Cys)	5 (3 famílias)	Provavelmente patogénica
		c.872dupC	p.(Gly292Argfs*25)	1 (1 família)	Patogénica
		c.872delC	p.(Pro291Glnfs*51)	2 (1 família)	Patogénica
	Exão 9	c.1745_1763dup	p.(Thr589Profs*66)	1 (1 família)	Patogénica
HNF1B	Exão 2	c.526C>T	p.(Gln176*)	2 (1 família)	Patogénica
	Deleção gene	c.1-?_1674+?del	?	5 (4 famílias)	NA
HNF4A	Exão 2	c.187C>T	p.(Arg63Trp)	1 (1 família)	Provavelmente patogénica
		c.211_212delAT	p.(Met71Valfs*6)	1 (1 família)	Patogénica

outras doenças associadas à diabetes, pelo que será possível dar resposta a alguns destes doentes que ainda não têm um diagnóstico definitivo. O estudo genético é a única forma de confirmar uma suspeita clínica de MODY. No entanto, uma vez que podem não ter sido identificados todos

os genes associados à MODY, o diagnóstico de MODY não pode ser excluído caso não se encontre uma alteração nos genes atualmente conhecidos como causadores desta patologia.



_Conclusões

Em 2011, o DPSDNT estabeleceu o Estudo de Diabetes tipo MODY, tendo sido estudados, até 2019, 76 casos índex. Nestes foram detetadas alterações patogénicas ou provavelmente patogénicas em 27 (35,5%) indivíduos e identificados mais 17 familiares com MODY. Para os 44 participantes a quem foi atribuído um diagnóstico definitivo de diabetes tipo MODY, o conceito de medicina personalizada é uma realidade. Com base neste resultado, os clínicos têm a capacidade de definir uma terapêutica adequada às necessidades específicas de cada um destes doentes.

Com a implementação, em curso, de um painel de NGS (*Next-Generation Sequencing*), julgamos que no futuro será possível dar resposta diagnóstica a um maior número de doentes. Contudo, eventualmente poderão surgir novos desafios relacionados com a quantidade de informação resultante do uso desta tecnologia.

Investigadores do estudo Molecular de Diabetes tipo MODY

Coordenação e equipa laboratorial – Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças não Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Coordenadores: Mafalda Bourbon e Paulo Dario; Equipa laboratorial: Margarida Vaz e Gisela Gaspar; Equipa clínica: Ana Agapito (Serviço de Endocrinologia – Hospital Curry Cabral, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central), Ana Carolina Neves (APDP – Associação Protetora dos Diabéticos de Portugal), Ana Paula Bugalho (Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo – Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central), Bruno Almeida (APDP – Associação Protetora dos Diabéticos de Portugal), Carla Pereira (Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Serviço de Pediatria Médica, Departamento de Pediatria – Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte), Carolina Moreno (Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra), Fernando Fonseca (Serviço de Endocrinologia – Hospital Curry Cabral, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central), Goreti Lobarinhas (Serviço de Pediatria – Hospital Santa Maria Maior), Henrique Vara Luiz (Serviço de Endocrinologia e Diabetes – Hospital Garcia de Orta), João Sequeira Duarte (Serviço de Endocrinologia – Hospital Egas Moniz), Maria de Lurdes Sampaio (Unidade de Endocri-

nologia Pediátrica, Serviço de Pediatria Médica, Departamento de Pediatria – Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central) e Sofia Gouveia (Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra).

Referências bibliográficas:

- (1) Yang Y, Chan L. Monogenic Diabetes: What It Teaches Us on the Common Forms of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Endocr Rev.* 2016 Jun;37(3):190-222. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1116>
- (2) Firdous P, Nissar K, Ali S, et al. Genetic Testing of Maturity-Onset Diabetes of the Young Current Status and Future Perspectives. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 May 17;9:253. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00253>
- (3) McDonald TJ, Ellard S. Maturity onset diabetes of the young: identification and diagnosis. *Ann Clin Biochem.* 2013 Sep;50(Pt 5):403-15. <https://doi.org/10.1177/0004563213483458>
- (4) Gaspar G, Seuanes F, Duarte JS, et al. Diagnóstico Genético da diabetes tipo MODY na população portuguesa. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2013;2(-Supl 2):30-32. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2134>
- (5) Hattersley AT, Patel KA. Precision diabetes: learning from monogenic diabetes. *Diabetologia.* 2017 May;60(5):769-777. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4226-2>
- (6) Vaxillaire M, Froguel P. Monogenic diabetes: Implementation of translational genomic research towards precision medicine. *J Diabetes.* 2016 Nov;8(6):782-795. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12446>
- (7) Misra S, Owen KR. Genetics of Monogenic Diabetes: Present Clinical Challenges. *Curr Diab Rep.* 2018 Oct 30;18(12):141. <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1111-4>
- (8) Althari S, Gloyn AL. When is it MODY? Challenges in the Interpretation of Sequence Variants in MODY Genes. *Rev Diabet Stud.* 2015 Fall-Winter;12(3-4):330-48. <https://doi.org/10.1900/RDS.2015.12.330>
- (9) Richards S, Aziz N, Bale S, et al; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

Intoxicação animal por cianobactérias: um alerta para a saúde pública?

Animal poisonings by cyanobacteria: a Public Health safety alert?

Rita Martins¹, Carlos Pinto², Elsa Dias³, Tânia Rosado³, Carina Menezes³

carina.menezes@insa.min-saude.pt

(1) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal

(2) Faculdade de Ciências Agrárias e do Ambiente, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, Portugal

(3) Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia. Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

Os perigos associados aos *blooms* de cianobactérias são conhecidos e percecionados, mas algumas lacunas analíticas e no conhecimento científico impedem, ainda, a devida avaliação do risco de exposição humana a toxinas de cianobactérias e, conseqüentemente, a adoção das medidas preventivas e de remediação mais adequadas. As cianotoxinas também induzem efeitos nocivos e mortandade em peixes, aves e mamíferos, pelo que os episódios de intoxicação de animais por cianotoxinas podem servir de alerta para potenciais efeitos nocivos para a saúde humana. O presente trabalho pretende sensibilizar para a importância da aplicação do conceito *One Health* à monitorização e vigilância de intoxicações por cianobactérias, na prevenção de riscos para a saúde pública, relacionados com a ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas. Assim, a aplicação de uma abordagem *One Health* aos *blooms* de cianobactérias poderá contribuir para prever riscos e implementar de forma precoce as medidas de gestão do risco associado à ocorrência de cianotoxinas nos recursos hídricos.

_Abstract

The risks associated with the occurrence of cyanobacterial blooms are widely recognized. However, gaps in analytic and scientific knowledge are still an impediment for the appropriate human risk assessment of cyanotoxins and the adoption of suitable preventive and remediation measures. Cyanotoxins have also a toxic effect in fish, birds and mammals, and cases of animal intoxication by cyanotoxins can provide an alert to the potential toxic effects in human health. The present work aims to raise awareness of the importance of applying the One Health concept to the monitoring and surveillance of cyanobacterial poisoning, in the prevention of risks to public health, related to the occurrence of cyanobacteria and cyanotoxins. Therefore, the application of a One Health approach to cyanobacterial blooms can contribute to risk prevention and implementation of early management measures of the risk associated with the occurrence of cyanotoxins in aquatic resources.

Cianobactérias, florescências e toxinas

As cianobactérias são microalgas, constituintes naturais dos ecossistemas aquáticos, que em condições ambientais favoráveis têm a capacidade de crescer massivamente (1). Durante este fenómeno, designado de florescência ou *bloom*, a água torna-se esverdeada (com uma aparência de sopa de ervilhas) e muitas vezes apresenta espuma ou acumulações verdes à superfície (figura 1). A eutrofização das massas de água e as alterações climáticas são os principais fatores que potenciam a formação dos *blooms* e a sua ocorrência e expansão está a intensificar-se (1,2,3). Inclusivamente, os *blooms* têm vindo a perder o seu carácter sazonal, deixando de ocorrer sobretudo nos meses mais quentes (verão e outono) e passando a ocorrer ao longo do ano.

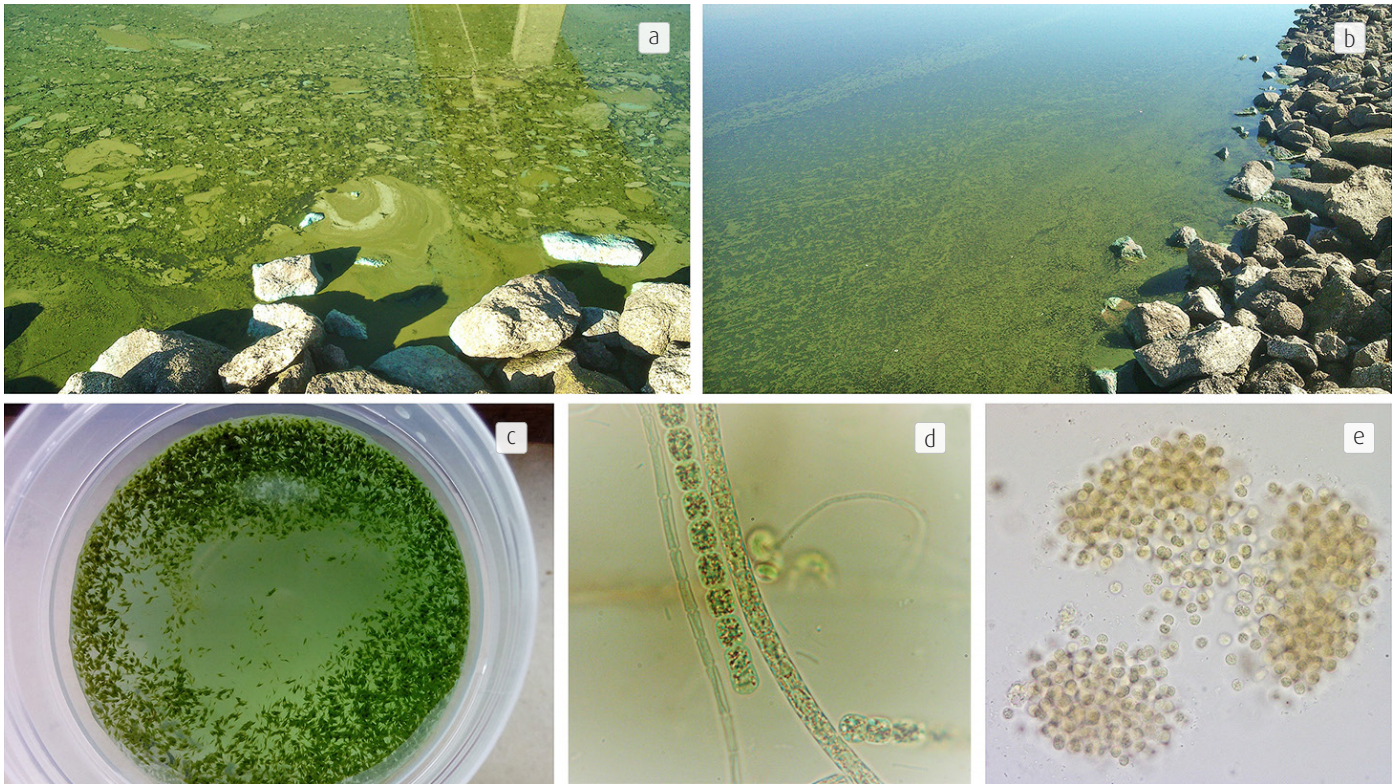
Os *blooms* têm impactos ambientais negativos, tais como a desoxigenação da água, a conseqüente mortandade de peixes e o desequilíbrio da comunidade fitoplanctónica. Por outro lado, podem produzir compostos secundários que diminuem a qualidade da água, quer pela alteração das suas características organoléticas (por exemplo geosmina, um composto não tóxico, com cheiro a terra), quer pela indução de risco para a saúde humana e animal, devido à produção de cianotoxinas (1,2).

As cianotoxinas são produzidas por algumas espécies de cianobactérias e libertadas aquando da morte celular, durante a senescência dos *blooms* ou pela aplicação de compostos algicidas nas massas de água (1). Estima-se que 25 a 75% dos *blooms* são tóxicos (4).

As cianotoxinas podem ter efeitos neurotóxicos, hepatotóxicos ou dermatotóxicos (1). As neurotoxinas (como por exemplo a anatoxina-a e a saxitoxina) atuam ao nível da



Figura 1: ⬇️ Aspeto macroscópico (*bloom*, a-c) e microscópico (d, e) de cianobactérias.



transmissão dos impulsos nervosos, e podem provocar a morte por paragem respiratória, devido a paralisia muscular. As hepatotoxinas (microcistinas, cilindrospermopsina, nodularinas) induzem lesões ao nível do fígado, podendo culminar em morte por hemorragia intra-hepática e choque hipovolémico. As principais vias de exposição a cianotoxinas incluem a ingestão de água contaminada, contacto dérmico em atividades recreativas, inalação de aerossóis de água contaminada e contaminação por via parentérica em unidades de hemodiálise (1). As cianotoxinas mais comuns a nível mundial são as microcistinas (hepatotoxinas potencialmente cancerígenas) (1) e em Portugal está também descrita a ocorrência de neurotoxinas como a anatoxina (5) e a saxitoxina e derivados (6,7).

Intoxicações animais

Para além dos efeitos adversos na saúde humana, as cianotoxinas têm sido descritas como a causa de doença e de morte em animais domésticos e silvestres (8). A utilização de fontes de água contaminada pode afetar os animais levando a distúrbios do foro hepático, gastrointestinal, neurológico e alérgico, que podem conduzir à morte. A sintomatologia é diversa, dependendo sempre da intensidade do *bloom*, da concentração e tipo de toxina e da quantidade de água ingerida (8,9).

A primeira descrição de intoxicações por cianobactérias remonta a 1878, na Austrália, resultando na morte de animais (ovelhas, cavalos, cães e porcos) após a ingestão de água com um *bloom* de cianobactérias produtoras de nodularina (10). Desde então, o número de descrições de intoxicações em animais tem vindo a aumentar ao longo das últimas décadas (11). Recentemente, por exemplo, foi reportada a morte



de mais de 300 elefantes no Botswana com sintomas neurológicos e hemorragias massivas, associada à contaminação de fontes de água (pequenos lagos) com blooms densos de cianobactérias, onde foram detetadas neurotoxinas (12).

Quase 80% das intoxicações mencionadas na literatura estão associadas a animais, sendo os cães e os animais de produção os mais afetados (12). No entanto, o número de casos reportados deverá estar largamente subestimado.

Em Portugal, a descrição de casos de intoxicação e/ou morte animal atribuída a cianotoxinas não é ainda devidamente considerada nos diagnósticos diferenciais efetuados pelos médicos veterinários. Em 2017, foi reportado um caso de intoxicação por ingestão de água de uma ribeira contaminada com microcistinas que resultou na morte de 25 bovinos (cerca de 50% dos animais presentes) (13). Adicionalmente, foi também alvo de estudo a mortalidade de várias aves, num lago, associada à ocorrência de blooms de cianobactérias do género *Microcystis* (14). Neste caso, como no anterior, foram detetadas microcistinas na água e no rim/fígado de alguns animais, sendo a análise histopatológica compatível com a descrição da literatura relativamente à intoxicação por estas toxinas.

_Objetivo

O presente trabalho pretende sensibilizar para a importância da aplicação do conceito *One Health* à monitorização e vigilância de intoxicações por cianobactérias, na prevenção de riscos para a saúde pública, relacionados com a ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas.

_Monitorização, saúde pública e abordagem *One Health*

A proteção da saúde pública relativamente aos blooms tóxicos é assegurada através da monitorização de cianobactérias e cianotoxinas em águas naturais superficiais destinadas à produção de água para consumo humano (15) e em águas balneares (16).

Porém, o programa de monitorização nem sempre assegura a correta avaliação e gestão do risco de exposição a estas toxinas. Por exemplo, as estirpes tóxicas não se distinguem

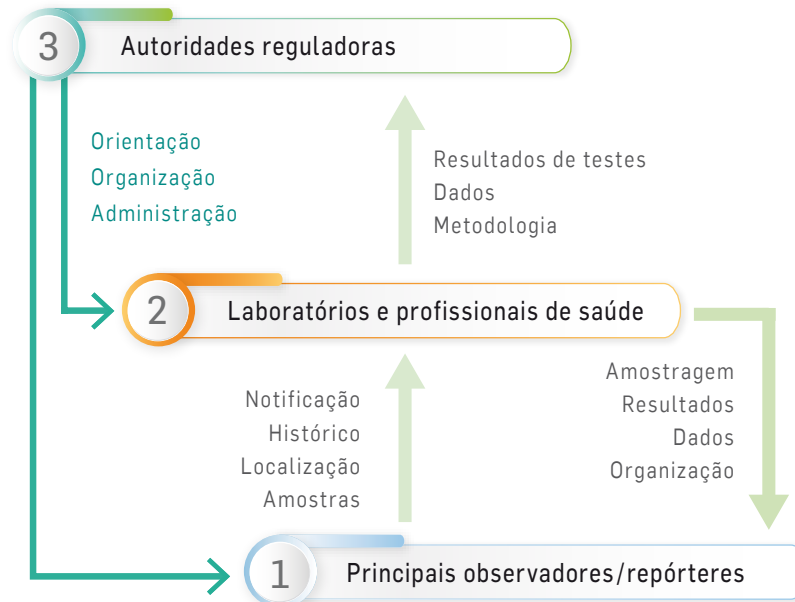
das não tóxicas, pelo que a observação microscópica das amostras de água não permite inferir de forma rápida a toxicidade dos blooms (1). Para além disso, métodos rápidos e facilmente aplicáveis como o ELISA não abrangem todos os tipos e variantes respetivas de cianotoxinas, nem de matrizes (ambientais e biológicas, como tecidos e órgãos), sendo a sua deteção apenas possível através de metodologias sofisticadas e que exigem pessoal altamente especializado (HPLC, LC-MS, qPCR), o que nem sempre é possível em laboratórios de análises de rotina. Por outro lado, a composição, densidade e toxicidade dos blooms pode alterar-se rapidamente, até em função das condições climáticas, pelo que nem sempre a situação no momento da amostragem corresponde à condição de exposição prevalente.

Salienta-se ainda, que o registo de intoxicações associadas a cianotoxinas é escasso e que não existe uma abordagem nacional sistemática relativamente a este tipo de episódios. De facto, o estabelecimento da relação causa-efeito, entre a exposição às toxinas e as suas consequências é muito difícil visto que a sintomatologia induzida pelas cianotoxinas é inespecífica e similar a outro tipo de intoxicações, como por exemplo, com fungos, plantas venenosas, paracetamol, estricnina, chocolate e até cafeína (9). Esta dificuldade tem impedido a obtenção de evidência epidemiológica o que, por sua vez, tem causado limitações à avaliação qualitativa e quantitativa do risco de exposição a cianotoxinas e à implementação de medidas regulamentares adicionais.

Recentemente tem sido considerado que a monitorização eficiente do ambiente e da saúde animal numa rede colaborativa *One Health* pode fornecer avisos de importância vital para prevenção de riscos para a saúde pública, relacionados com a ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas (8). De facto, a utilização e a aplicação do conceito *One Health* possibilita uma abordagem inclusiva, integrada e holística à problemática das intoxicações por cianobactérias (figura 2). Promove a cooperação interprofissional e interdisciplinar, integrando a informação produzida por cada entidade e a colaboração entre os profissionais das diferentes áreas: saúde humana, animal e ambiental (8).



Figura 2: Aplicação do conceito *One Health* à monitorização e vigilância de intoxicações por cianobactérias (adaptado de: (8))



Assim, a identificação das causas de mortalidade e de doença nos animais de produção pecuária, animais de companhia, aves e peixes, relacionadas com a ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas, pode servir de sentinela para riscos potenciais para a saúde humana (8).

_Desafios da abordagem *One Health* aplicada à problemática das cianobactérias tóxicas

Um dos principais desafios da abordagem atrás referida é a demonstração de que a presença de animais mortos ou com sintomatologia de doença nas imediações das massas de água se deve, efetivamente, a cianobactérias tóxicas. Os inúmeros avanços dos últimos anos nas abordagens moleculares impulsionaram o desenvolvimento de tecnologias e plataformas de sequenciação, possibilitando, por um lado, a caracterização do microbiota presente num determinado ambiente e, por outro lado, discriminar o papel dos agentes biológicos aí identificados (17,18). A sequenciação de nova geração (NGS) é uma mais-valia para a vigilância e diagnóstico de amostras ambientais, uma vez que complementa e preenche lacunas associadas aos métodos tradicionais

(ELISA, HPLC, LC-MS, PCR convencional, qPCR e *microarray*) (19).

No caso particular dos *blooms* cianobacterianos, a aplicação desta metodologia, recorrendo às plataformas Illumina® ou Oxford Nanopore, possibilitaria a deteção e identificação de cianobactérias e cianotoxinas ingeridas pelos animais, através da análise genómica do DNA extraído do conteúdo gástrico dos animais afetados (20). De acordo com o objetivo, diferentes abordagens podem ser usadas: (i) metagenómica 16S, utilizando *primers* gerais para procariotas ou específicos para cianobactérias, de forma a avaliar a comunidade microbiana ou apenas a diversidade cianobacteriana, respetivamente, (ii) sequenciação do genoma total (*whole genome sequencing* – WGS) que permite, simultaneamente, a identificação taxonómica da comunidade microbiana bem como a sinalização de cianobactérias produtoras de toxinas e a identificação destes metabolitos secundários (MC, ATX, CYN, STX) (21-23). Apesar das vantagens inerentes a estas abordagens, e do vasto conhecimento que permitem obter, estas ainda não permitem a quantificação das toxinas, sendo por isso necessário recorrer a técnicas analíticas para



determinar a concentração de toxinas. No entanto, as inúmeras respostas de áreas como a genômica, metagenômica, transcriptômica, metatranscriptômica (24,25), são alguns dos exemplos do potencial da sequenciação de nova geração e que podem ser implementados nos planos de monitorização e vigilância ambiental.

Estas metodologias têm sido aplicadas na caracterização do microbiota presente no trato gastrointestinal de animais (26), tendo sido inclusive identificadas cianobactérias, o que reforça o uso desta abordagem na monitorização. De ressaltar que os animais alvo destas metodologias devem estar num estado de conservação aceitável relativamente à degradação de tecidos e consequentemente de DNA. Esta tecnologia inovadora permite a sequenciação simultânea de um elevado número de amostras e a possibilidade de inúmeras abordagens, gerando assim uma enorme quantidade de informação, cuja interpretação e análise é executada com recurso a ferramentas de bioinformática, constituindo o passo mais crítico desta metodologia (27).

Não obstante a sequenciação de nova geração não ter sido ainda explorada nesta perspetiva, trata-se de uma ferramenta útil e promissora para identificar a presença de cianobactérias potencialmente tóxicas. Poderá assim auxiliar a um diagnóstico mais rápido e completo em casos de intoxicação animal por cianobactérias, o que poderá contribuir para prevenir riscos para a saúde pública.

Outro desafio importante na aplicação do conceito *One Health* aos *blooms* tóxicos de cianobactérias é a sensibilização dos médicos veterinários para a utilidade do diagnóstico de casos de intoxicação por cianobactérias nos animais como sinal de alerta num sistema de avaliação de risco. Martins (2021) (14) propôs recentemente um guia prático para auxiliar os profissionais de saúde animal em casos de suspeita de intoxicação por cianobactérias. Neste guia são referidas orientações, decisões e procedimentos laboratoriais de forma a facilitar a preparação de amostras para confirmação da presença de cianobactérias e/ou cianotoxinas na água de abeberamento dos animais de produção pecuária. É assim um primeiro passo de uma abordagem que julgamos inevitável num futuro próximo.

Referências bibliográficas:

- (1) Chorus I, Welker M (eds). Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. 2nd ed. London: CRC Press, 2021, p. 858. <https://doi.org/10.1201/9781003081449>
- (2) Huisman J, Codd GA, Paerl HW, et al. Cyanobacterial blooms. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Aug;16(8):471-83. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0040-1>
- (3) Moura AN, Aragão-Tavares NK, Amorim CA. Cyanobacterial blooms in freshwater bodies from a semiarid region, Northeast Brazil: a review. *J Limnol*. 2018;77(2):179-88. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2017.1646>
- (4) Bláha L, Babica P, Maršálek B. Toxins produced in cyanobacterial water blooms: toxicity and risks. *Interdiscip Toxicol*. 2009 Jun;2(2):36-41. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0006-2>
- (5) Osswald J, Rellán S, Gago-Martinez A, et al. Production of anatoxin-a by cyanobacterial strains isolated from Portuguese fresh water systems. *Ecotoxicology*. 2009 Nov;18(8):1110-5. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0375-5>
- (6) Pereira P, Li R, Carmichael W, et al. Taxonomy and production of paralytic shellfish toxins by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* LMECYA40. *Eur J Phycol*. 2004;39(4):361-8. <https://doi.org/10.1080/09670260410001714723>
- (7) Dias E, Pereira P, Franca S. Production of paralytic shellfish toxins by *Aphanizomenon* sp. LMECYA 31 (cyanobacteria). *J Phycol*. 2002;38(4):705-12. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01146.x>
- (8) Hilborn ED, Beasley VR. One health and cyanobacteria in freshwater systems: animal illnesses and deaths are sentinel events for human health risks. *Toxins (Basel)*. 2015 Apr 20;7(4):1374-95. <https://doi.org/10.3390/toxins7041374>
- (9) Bates N. Cyanobacteria (blue-green algae) exposure in dogs. *Companion Animal*. 2018;23(5):256-63. <https://doi.org/10.12968/coan.2018.23.5.256>
- (10) Stewart I, Seawright AA, Shaw GR. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds - an overview. *Adv Exp Med Biol*. 2008;619:613-37. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75865-7_28
- (11) Wood R. Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature. *Environ Int*. 2016 May;91:276-82. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.026>
- (12) Wang H, Xu C, Liu Y, et al. From unusual suspect to serial killer: Cyanotoxins boosted by climate change may jeopardize African megafauna. *The Innovation*. 2021;2(2):100092. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100092>
- (13) Menezes C, Nova R, Vale M, et al. First description of an outbreak of cattle intoxication by cyanobacteria (blue-green algae) in the South of Portugal. *The Bovine Practitioner*. 2019;53(1):66-70. <https://doi.org/10.21423/bovine-vol53no1p66-70>
- (14) Martins R. Contribuição para o Estudo do Impacto de Cianobactérias na Saúde Animal. (Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária/Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2021).
- (15) Decreto Lei nº 152/2017 de 7 de dezembro. DR n.º 235/2017, 1ª Série 2017-12-07:6555-76. <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/152/2017/12/07/p/dre/pt/html>. Altera o regime da qualidade da água para consumo humano, transpondo as Diretivas n.os 2013/51/EURATOM e 2015/1787.
- (16) Decreto Lei nº 135/2009 de 3 de junho. DR n.º 107/2009, 1ª Série 2009-06-03:3460-68 <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/135/2009/06/03/p/dre/pt/html>. Estabelece o regime de identificação, gestão, monitorização e classificação da qualidade das águas balneares e de prestação de informação ao público sobre as mesmas, transpondo para a ordem jurídica interna a Directiva n.º 2006/7/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de Fevereiro, relativa à gestão da qualidade das águas balneares.
- (17) Walter JM, Coutinho FH, Dutilh BE, et al. Ecogenomics and Taxonomy of Cyanobacteria Phylum. *Front Microbiol*. 2017 Nov 14;8:2132. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02132>
- (18) Tromas N, Fortin N, Bedrani L, et al. Characterising and predicting cyanobacterial blooms in an 8-year amplicon sequencing time course. *ISME J*. 2017 Aug;11(8):1746-63. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.58>
- (19) Sanseverino I, António DC, Loos R, et al. Cyanotoxins: methods and approaches for their analysis and detection. Luxembourg, Publications Office of the European Union, 2017. <https://doi.org/10.2760/63073610.2760/36186>



- (20) Alvarenga DO, Fiore MF, Varani AM. A Metagenomic Approach to Cyanobacterial Genomics. *Front Microbiol.* 2017 May 9;8:809. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00809>
- (21) Casero MC, Velázquez D, Medina-Cobo M, et al. Unmasking the identity of toxigenic cyanobacteria driving a multi-toxin bloom by high-throughput sequencing of cyanotoxins genes and 16S rRNA metabarcoding. *Sci Total Environ.* 2019 May 15;665:367-378. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.083>
- (22) Kim KH, Yoon Y, Hong WY, et al. Application of metagenome analysis to characterize the molecular diversity and saxitoxin-producing potentials of a cyanobacterial community: a case study in the North Han River, Korea. *Appl Biol Chem.* 2018;61(2):153-61. <https://doi.org/10.1007/s13765-017-0342-4>
- (23) Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, et al. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology.* 2015 Apr;47(3):199-210. <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000235>
- (24) Galperin MY, Kristensen DM, Makarova KS, et al. Microbial genome analysis: the COG approach. *Brief Bioinform.* 2019 Jul 19;20(4):1063-70. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx117>
- (25) Tran PN, Yen MR, Chiang CY, et al. Detecting and prioritizing biosynthetic gene clusters for bioactive compounds in bacteria and fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019 Apr;103(8):3277-87. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09708-z>
- (26) Mao S, Zhang M, Liu J, et al. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. *Sci Rep.* 2015 Nov 3;5:16116. <https://doi.org/10.1038/srep16116>
- (27) Oliveira MC, Repetti SI, Iha C, et al. High-throughput sequencing for algal systematics. *Eur J Phycol.* 2018;53(3):256-72. <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1441446>

Malária: estudo retrospectivo de casos clínicos suspeitos de infeção por *Plasmodium* sp. (2010-2020)

Malaria: retrospective study of suspected clinical cases of Plasmodium sp. infection (2010-2020)

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

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

Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A malária, é uma infeção parasitária causada por um protozoário intracelular obrigatório (género *Plasmodium*), cuja transmissão é assegurada quando uma fêmea de mosquito género *Anopheles* infetada efetua a sua refeição de sangue num indivíduo. Estão descritas mais de 150 espécies, mas apenas cinco infetam o Homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e mais recentemente, *P. knowlesi*, uma espécie que causa malária em macacos no sudeste asiático. É a doença parasitária mais importante para o Homem, encontrando-se infetada cerca de 5% da população mundial, sendo o *P. falciparum* o agente mais disseminado, responsável por mais de 80% dos casos mundiais e o que apresenta uma patogenia mais agressiva. O objetivo deste estudo foi efetuar o diagnóstico laboratorial em doentes com quadro clínico compatível com malária e descrever as características demográficas nos casos confirmados. As metodologias de diagnóstico utilizadas foram, serológicas (IFI), moleculares (PCR em tempo real, adaptada de Swan *et al.* e a pesquisa direta em gota espessa e esfregaço. Foram analisadas 802 amostras, 15 das quais provenientes do surto de ébola (África ocidental, 2014). Detetaram-se 124 (15,5%; 124/802) casos positivos. Todos os casos positivos de malária são importados. A maioria dos casos ocorreu em de viajantes, indivíduos adultos. Pelo facto de a transmissão local continuar a ser possível na Europa e pela quantidade de viagens efetuadas entre a Europa e os países endémicos salienta-se a necessidade de vigilância, e prevenção desta parasitose.

_Abstract

Malaria is a human disease caused by a protozoan infection of red blood cells transmitted by the bite of a female anopheline mosquito. There are described more than 150 species of Plasmodium but only five infected humans, P. falciparum, P. vivax, P. malariae, P. ovale and more recently P. knowlesi, a specie that causes malaria in monkeys in Southeast Asia. Malaria is the most important parasitic disease of man; approximately 5% of the world's population is infected. P. falciparum is the most widespread specie responsible for over 80% of cases worldwide and which has a more aggressive pathogenesis. The aim of the study was to perform laboratory diagnosis in patients with clinical symptoms compatible with malaria and describe the demographic characteristics in confirmed cases. The methods of diagnosis used were serological (IIF), molecular (real-time PCR, adapted Swan et al.) and direct visualization of thick and thin blood smears. We analysed 802 specimens, 15 of which belonging to Ebola outbreak (West Africa, 2014). 124 (15.5%; 124/802) were positive cases. All positive cases of malaria are imported. Most cases occurred in adults travellers. Since local transmission continues to be possible in Europe

and the big number of trips between Europe and endemic countries are a reality underlines the need of surveillance and prevention of this disease.

_Introdução

A malária, também designada por paludismo, é uma infeção parasitária causada por um protozoário intracelular obrigatório do género *Plasmodium*, cuja transmissão é assegurada quando uma fêmea de mosquito, pertencente ao género *Anopheles*, infetada efetua a sua refeição de sangue no Homem. O *Plasmodium* sp. pertence ao Filo Apicomplexa, constituído por seres eucariotas unicelulares, que possuem um complexo apical que desempenha um papel fundamental na entrada nas células hospedeiras e à Família *Plasmodiidae* caracterizada por apresentar dois tipos de multiplicação no seu ciclo de vida: uma assexuada (Homem) e outra sexuada (mosquito) (1). O ciclo de vida do *Plasmodium* pode ser dividido em três estádios, a fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado – mosquito – (ciclo esporogónico) e duas fases assexuadas que ocorrem no Homem: o ciclo exoeritrocítico ou hepático (fígado) e o ciclo eritrocítico (glóbulos vermelhos) (2).

Estão atualmente identificadas cerca de 150 espécies de *Plasmodium*, mas apenas cinco infetam o Homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Esta última é uma espécie causadora de malária em macacos no sudeste asiático e foi identificada com sendo patogénica para humanos (1).

A malária constitui, atualmente, um dos principais problemas de saúde a nível mundial, sendo uma doença endémica em mais de 100 países e ocorre geralmente em áreas onde as



condições ambientais permitem a multiplicação do parasita no vetor. Atualmente encontra-se restrita às áreas tropicais e subtropicais, embora no passado tenha sido uma doença endêmica em muitos locais do Norte da América, Europa e até em zonas do noroeste Asiático, estando ainda hoje presente na península da Coreia. Contudo, esta distribuição pode ser afetada por alterações climáticas e movimentos populacionais (1). O *Plasmodium falciparum* é a espécie predominante no mundo, *P. vivax* e *P. ovale* ocupam nichos complementares com *P. ovale* a predominar na África Sub-Sahariana e *P. vivax* nas outras áreas, embora as suas localizações geográficas se sobreponham, *P. malariae* apresenta uma distribuição mundial, encontrando-se na América do sul, Ásia e África (2).

A sintomatologia da malária é muitas vezes inespecífica e comum a outras doenças infecciosas. A doença se não for tratada, pode evoluir para formas severas que podem ser fatais muito rapidamente (<24 horas) e deve ser sempre considerada em doentes com historial de exposição (residência ou viagem recente em áreas endêmicas). Os sintomas mais frequentes incluem febre e arrepios de frio, que podem ser acompanhados de dores de cabeça, mialgias, artralguas, fraqueza generalizada, vômitos e diarreia. Os casos mais graves incluem esplenomegalia, anemia, falência renal ou pulmonar e alterações neurológicas. As manifestações clínicas variam substancialmente, dependendo da espécie infectante, da parasitémia e do estado imunitário do paciente (2).

As infeções causadas por *P. falciparum* são as que têm maior probabilidade de progredir para formas severas, potencialmente fatais com envolvimento do sistema nervoso central (malária cerebral), falência renal, anemia grave ou síndrome de stress respiratório do adulto (1).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2018 ocorreram 228 milhões de casos de malária em todo o mundo, essencialmente em África (213 milhões), seguida do sudeste asiático com 3,4% dos casos. Cerca de 405.000 pessoas morreram com a doença, sendo as crianças com idade inferior a 5 anos o grupo que apresenta maior vulnerabilidade. Segundo a OMS, a cada 45 segundos, morre uma criança com malária em África (3).

De acordo com o *Relatório Epidemiológico Anual* de 2018 publicado pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), o número de casos notificados na Europa permanece estável, de aproximadamente 1,2 por 100.000 habitantes, foram reportados 8349 casos suspeitos de malária na União Europeia dos quais foram confirmados 8347. A maioria dos casos são importados, à exceção de 14 casos referenciados como adquiridos na UE (10 casos *P. vivax* na Grécia, um caso *Plasmodium* sp. em França, um caso *P. falciparum* e um de infeção mista de *P. malariae* e *P. ovale* em Espanha e um caso *P. falciparum* em Itália) (4).

Em Portugal, os últimos casos de malária autóctone foram diagnosticados em 1959, desde então só têm sido identificados casos importados de países tropicais onde a doença é endêmica. De acordo com o último Relatório das Doenças de Declaração Obrigatória da Direção-Geral da Saúde (DGS) referente ao período 2013-2016, Portugal notificou um total de 669 casos importados: 123 casos em 2013, 128 casos em 2014, 221 casos em 2015 e 197 casos em 2016 (5).

O controlo da malária é um dos objetivos da *WHO Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030*, que tem como objetivos estratégicos até 2025, reduzir a taxa de mortalidade de malária até 75% e prevenir o reaparecimento da doença em todos os países que são considerados “malaria-free” (6).

Atualmente ainda não existe uma vacina eficaz para a prevenção da infeção nos humanos, no sentido de reduzir a intensidade da doença e da sua letalidade, existindo apenas um tratamento farmacológico. Os procedimentos da profilaxia e do tratamento desta doença, consistem na medicação de antifolatos, como a pirimetamina e a sulfadoxina, compostos de quingosu, como a artemisina e derivados de quinolina, como a quinina, a mefloquina, a cloroquina e a primaquina (7).

Estão disponíveis uma variedade de ferramentas efetivas para a prevenção da malária: a utilização em larga escala de redes mosquiteiras impregnadas em inseticidas de ação prolongada; a pulverização intradomiciliária com inseticidas de efeito residual que tem efeito no controlo do vetor tem assumido uma importância significativa na redução das



taxas de morbilidade, ao promover a diminuição do contacto vetor-hospedeiro vertebrado, tal como o uso de larvicidas e a drenagem de águas paradas onde os mosquitos depositam os seus ovos (8). Recomenda-se a utilização da terapia combinada com derivados da artemisinina para a doença aguda, principalmente em crianças. A OMS recomenda tratamento profilático para todas as grávidas em áreas endémicas, embora na prática menos de 20% das mulheres tenham efetivamente adotado esta profilaxia (8).

O diagnóstico laboratorial é absolutamente necessário, visto a sintomatologia da malária ser pouco específica. A metodologia considerada de referência ou “gold standard” continua a ser a observação direta do esfregaço sanguíneo e gota espessa após coloração de Giemsa, pois permite a identificação e diferenciação da espécie e a determinação da parasitemia. Existem outras metodologias para o diagnóstico da malária nomeadamente os testes rápidos (imunodeteção da proteína plasmodial), muito utilizados em saídas de campo nas zonas endémicas, mas que apresentam uma baixa sensibilidade, a deteção de anticorpos, que não diagnostica uma infeção ativa, e, desde a década de 80, as técnicas de biologia molecular, como a PCR, que têm sido desenvolvidas com sucesso (9).

_Objetivo

Efetuar o diagnóstico laboratorial em doentes com quadro clínico compatível com malária cujas amostras biológicas foram recebidas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 2010 e dezembro de 2020 e descrever respetivos os dados clínicos, laboratoriais e demográficos.

_Metodologia

Estudaram-se um total de 802 amostras de indivíduos com suspeita clínica de malária, que recorreram ao Laboratório Nacional de Referência (LNR) de Infeções Parasitárias e Fúngicas do INSA para confirmação ou exclusão do diagnóstico, entre 2010 e 2020, tendo sido também analisados os dados demográficos de cada doente elegível para o estudo.

As metodologias de diagnóstico laboratorial utilizadas no presente estudo foram: serológicas – determinação de anticorpos IgG para *Plasmodium falciparum* – IFI (Euroimmun); moleculares – PCR em tempo real com a amplificação específica de uma região conservada que permite a amplificação e deteção de 4 espécies de *Plasmodium* sp. através de um conjunto de primers e sondas para o gene 18S (*FTD Malaria differentiation Kit*) e PCR em tempo real que permite a amplificação e deteção de 4 espécies de *Plasmodium* sp. através de um conjunto de primers e sondas para o gene 18S, adaptada de Swan *et al.*), e a pesquisa direta em gota espessa e esfregaço.

_Resultados

Entre janeiro de 2010 e dezembro de 2020, foram analisados 802 produtos biológicos para pesquisa de *Plasmodium* sp., 15 dos quais provenientes do surto de ébola que ocorreu na África Ocidental em 2014/2015. Detetaram-se um total de 124 (15,5%; 124/802) casos positivos: 79 (63,7%) diagnosticados por métodos serológicos; 40 (32,2%) por técnica de PCR e 5 (4,1%) por pesquisa direta em gota espessa e esfregaço após coloração de Giemsa. A distribuição dos casos ao longo dos anos mostra um aumento de casos analisados até 2015, notando-se a partir daí uma diminuição do número de amostras testadas no LNR Infeções Parasitárias e Fúngicas (tabela 1).

No que se refere aos 79 casos com serologia positiva, 43 foram parturientes nascidas ou que tenham viajado nos últimos 3 anos para regiões endémicas de malária. A média de idade destas mulheres é de 30 anos. Os restantes 36 casos com serologia positiva (24 do sexo masculino e 12 do sexo feminino) foram viajantes, residentes maioritariamente na zona centro de Portugal, com uma média de idade de 44 anos.

Quanto aos 40 casos positivos por PCR, 6 casos (5 *Plasmodium falciparum* e 1 *Plasmodium vivax*) suspeitos de infeção pelo vírus Ébola (surto 2014), cujo diagnóstico diferencial incluiu a pesquisa de *Plasmodium* sp. Todos em indivíduos eram adultos do sexo masculino provenientes da Nigéria, Guiné Conacri e Guiné Bissau com diagnóstico compatível



Tabela 1: ↓ Distribuição do número de casos positivos e negativos entre 2010 e 2020.

Ano	Casos positivos		Casos negativos		Total	
	n	%	n	%	n	%
2010	3	2.4	4	0.6	7	0.9
2011	2	1.6	14	2.1	16	2.0
2012	0	0	9	1.3	9	1.1
2013	11	8.9	131	19.3	142	17.7
2014	39	31.5	258	39.6	297	37.0
2015	23	18.5	125	18.4	148	18.5
2016	13	10.5	26	3.8	39	4.9
2017	12	9.7	30	4.4	42	5.2
2018	15	12.1	26	3.8	41	5.1
2019	3	2.4	28	4.1	31	3.9
2020	3	2.4	27	4.0	30	3.7
Total	124	100	678	100	802	100

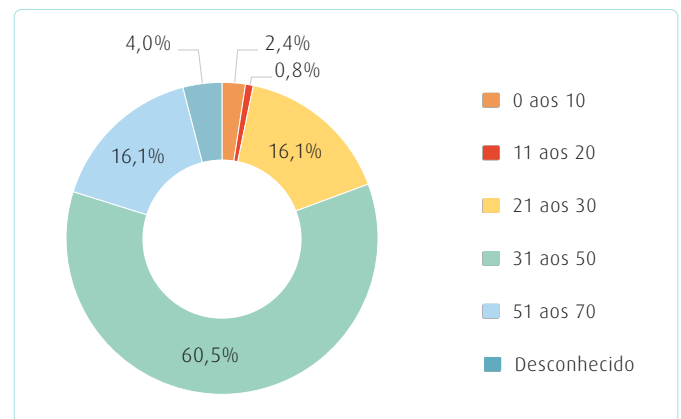
com malária (febre, mialgias cefaleias, diarreias); Os 4 casos importados provenientes da Madeira, eram doentes do sexo masculino emigrantes em Moçambique, Angola e Guiné Equatorial com quadro clínico suspeito de paludismo, tendo sido detetado em dois casos DNA referente à espécie *P. ovale*; uma coinfeção de *P. falciparum* com *P. malariae* e um caso de *P. falciparum*. Os restantes casos são indivíduos residentes no norte e centro de Portugal e as espécies identificadas foram *P. falciparum*, *P. ovale* e *P. vivax*, em doentes que também referem ter efetuado viagens recentes para zonas endémicas de malária e em duas crianças de 6 e 10 anos, a primeira das quais positiva para *P. vivax* e na segunda não foi possível identificar a espécie. Em ambas, desconhece-se o historial clínico e de viagens.

Distribuição de casos positivos por sexo e grupo etário

Dos 124 doentes com infeção confirmada, 61 (49,2%) eram do sexo masculino e 63 casos (50,8%) do género feminino. Nos 10 anos em avaliação observou-se que 75,8% (94/124) dos casos ocorreram em adultos com idade igual ou superior a 31 anos, sendo o grupo etário entre 31 e 50 anos o que revelou um maior número de infeções por *Plasmodium* sp.

(60,5% (75/124)). No **gráfico 1** apresenta-se a distribuição dos casos positivos de infeções por *Plasmodium* sp por grupo etário.

Gráfico 1: ↓ Distribuição por grupo etário dos casos positivos de infeção por *Plasmodium* sp. analisados no INSA entre 2010-2020.



De acordo com os resultados obtidos ao longo dos 10 anos em estudo e no que respeita à sazonalidade, verificou-se sempre um aumento do número de casos positivos nos meses de novembro (24%) e dezembro (16%), em comparação com os restantes meses dos 10 anos estudados (**gráfico 2**).

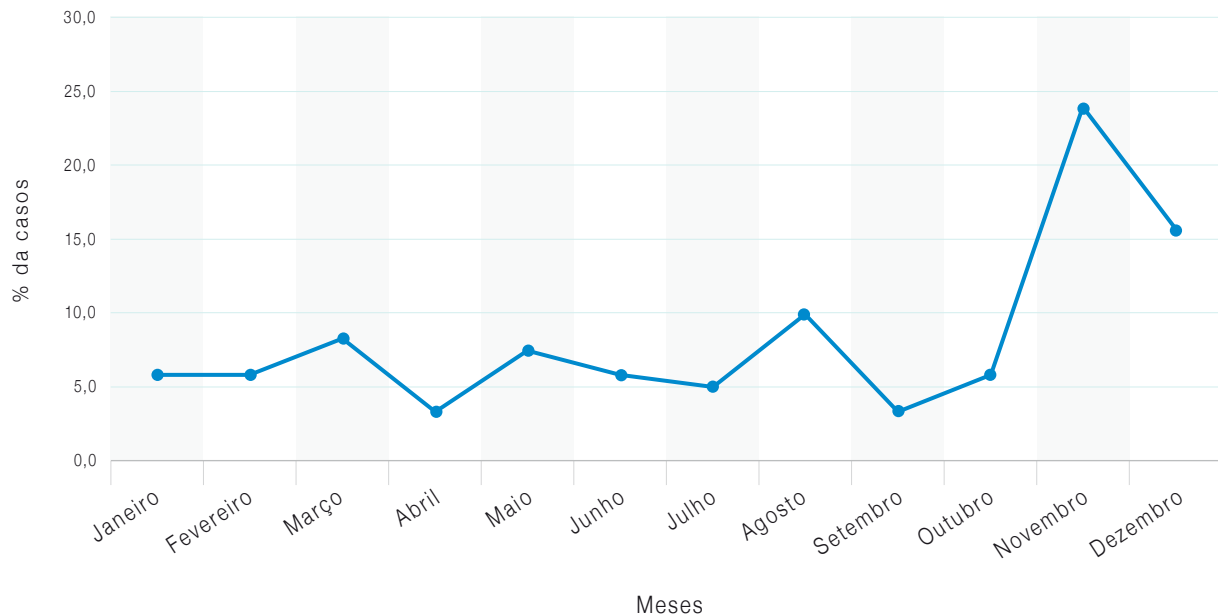
_Discussão e conclusões

No período dos 10 anos em estudo, verificou-se um acréscimo do número de amostras recebidas para pesquisa de malária no INSA durante os anos de 2014 e 2015, o que está provavelmente relacionado com o aumento do número de viagens neste período, tendo vindo a decrescer nos anos subsequentes, possivelmente devido a um retrocesso na emigração para países onde a malária é endémica. Todos os casos de malária são importados e implicam viagens para países endémicos para esta doença.

A maioria dos notificados pelos países da União Europeia (UE) em 2018 foram importados. Os países que reportam os números mais elevados de casos têm ligações históricas, económicas, linguísticas e culturais com áreas endémicas, particularmente em África e América. A sazonalidade e a



Gráfico 2: ↓ Distribuição dos casos positivos para *Plasmodium* sp. por mês de diagnóstico laboratorial, 2010-2020.



distribuição etária dos casos na Europa refletem os padrões dos países onde a doença é endémica. A literatura sugere que uma proporção substancial dos casos importados de malária na UE ocorre entre imigrantes recentes e imigrantes já estabelecidos e as suas famílias que viajaram para visitar amigos e familiares em zonas endémicas (4).

Na Europa, em 2018, a maioria dos casos confirmados foram do sexo masculino. O grupo etário com maior taxa de incidência foi dos 25-44 anos, seguido dos 45-64 anos nos homens e dos 15-24 anos nas mulheres (4). De acordo com os resultados obtidos no INSA e no período em estudo observou-se que os mesmos são consistentes com os dados europeus no que respeita à distribuição por grupo etário, tendo ocorrido uma maior incidência de casos em adultos entre os 31 e 50 anos de idade. No que se refere à distribuição por sexo, os nossos resultados revelaram uma distribuição equitativa, uma vez que o sexo masculino reflete o padrão de viajantes portugueses que desenvolvem a sua atividade profissional entre a Europa e África, e também porque Portugal recebe parturientes, de nacionalidade portuguesa ou estrangeira, residentes nos países de língua oficial portuguesa.

Verifica-se uma sazonalidade marcante entre os 26 países que reportaram casos de malária de 2014 a 2018, com um aumento de casos durante e imediatamente após os meses das férias de verão (julho-setembro) (4). Em Portugal, o mesmo não se observou, apesar de não se conhecer os motivos concretos das viagens (férias, trabalho, épocas festivas ou visita a amigos/familiares, entre outros) dos casos em estudo. Contudo, a distribuição de casos positivos obtidos neste estudo teve um aumento nos meses de novembro e dezembro, facto que parece refletir deslocações relacionadas com a época natalícia dada a forte ligação histórica do nosso país com os países africanos, ex-colónias portuguesas.

A malária é uma doença evitável através da utilização de terapêuticas profiláticas. A escolha da terapêutica e das medidas preventivas dependem maioritariamente do perfil epidemiológico local da malária, da duração da exposição aos vetores, dos padrões de resistência aos antiparasitários, da sazonalidade, do grau de transmissibilidade, da idade e da gestação (3).



Face às alterações climáticas que estão a ocorrer à escala planetária e à presença do vetor na Europa, estudos com modelos preditivos sobre a hipótese de reintrodução da malária neste continente têm mostrado a possibilidade de esta parasitose poder vir a tornar-se endémica no final deste século (9). Quanto a Portugal, um estudo com base num modelo potencial de risco de transmissão da malária, concluiu que a possibilidade de reemergência de malária, em Portugal continental é relativamente baixa, não se pode descurar essa possibilidade sob a forma de focos autóctones esporádicos, sendo esta uma realidade recentemente verificada em alguns países do sul da Europa, onde foram reportados como adquiridos localmente sete casos, cinco dos quais confirmados na Grécia como *Plasmodium vivax* em áreas rurais. Esta constatação torna indispensável que se efetue um correto e atempado diagnóstico laboratorial, que se mantenha uma vigilância ativa na prevenção e monitorização de eventuais surtos epidémicos de malária em Portugal (10).

Uma vez que é possível na Europa a transmissão local e que há um grande número de viajantes entre o continente europeu e os países onde esta parasitose é endémica, importa, pois, manter vigilância epidemiológica e medidas preventivas sobre a afluência de indivíduos infetados com paludismo, quer se trate de portugueses, quer de imigrantes que habitam ou transitam por Portugal, sem esquecer, obviamente, o número crescente de turistas, nacionais e estrangeiros. O INSA participa na vigilância epidemiológica da malária através da Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE) nos portos e aeroportos, tanto no controlo do vetor como na posterior identificação da presença do parasita nos insetos. Assim sendo, e relacionando o aumento das referidas viagens com as alterações climáticas, nomeadamente o aquecimento global, fatores que contribuem para disseminação da malária para a Europa, torna-se absolutamente necessária a vigilância epidemiológica do parasita de modo a controlar/impedir este acontecimento.

Agradecimento:

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) White NJ. Malaria. IN: Alimuddin I, Zumla AI (eds.) *Manson's Tropical Diseases*. 22nd ed. Philadelphia: Saunders, 2009, pp. 1201-1300. 2. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
- (2) Centers for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern - Malaria [Internet] (consult. 10/5/2021). Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
- (3) World Health Organization. *World malaria report 2019*. Geneva: WHO, 2019. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330011>
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. *Malaria - Annual epidemiological report 2018*. Stockholm: ECDC, 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2018>
- (5) Direção-Geral da Saúde. *Doenças de Declaração Obrigatória, 2011-2014 - Volume I Portugal*. Lisboa: DGS, 2014. <https://www.dgs.pt/estatisticas-de-saude/estatisticas-de-saude/publicacoes/doencas-de-declaracao-obrigatoria-2011-2014-volume-i-pdf.aspx>
- (6) RBM Partnership to End Malaria Vision [Internet]. [consult. 10/5/2021]. Disponível em: <https://endmalaria.org/about-us/vision>
- (7) Baldari M, Tamburro A, Sabatinelli G, et al. Malaria in Maremma, Italy. *Lancet*. 1998 Apr 25;351(9111):1246-7. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)10312-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)10312-9)
- (8) Rolling back malaria. IN: World Health Organization. *The World Health Report 1999*. Geneva: WHO, 1999. Pp. 49-63. https://www.who.int/whr/1999/en/whr99_ch4_en.pdf?ua=1
- (9) Gargate MJ. Doenças associadas a mosquitos: malária. IN: Núncio MS, Alves MJ (eds). *Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores*. 2ª ed (rev. e atualiz.). Lisboa: INSA, 2019, pp.63-8. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2232>
- (10) David de Morais J. Malária em Portugal: passado, presente e perspectivas futuras - II parte. *RPDI*.2014 set-dez;10(3):113-121. http://spdimc.org/wp/wp-content/uploads/2014/11/RPDI_10-3_Internet.pdf
- (11) Gomes, EJC. Risco potencial de transmissão de malária em Portugal Continental. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Sociais e humanas, Universidade Nova de Lisboa, 2010. <https://run.unl.pt/handle/10362/4156>

Diagnóstico laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção por *Toxoplasma gondii*, 2009-2020

*Laboratory diagnosis of suspected clinical cases of *Toxoplasma gondii* infection, 2009-2020*

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

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

Laboratório Nacional de Referência de Infeções Parasitárias e Fúngicas. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

O estudo foi realizado com o objetivo de descrever as características demográficas de pacientes com quadro clínico suspeito de toxoplasmose. O diagnóstico laboratorial destes casos foi confirmado no Laboratório Nacional de Referência em Infeções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, entre janeiro de 2009 e dezembro de 2020. *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório e o agente etiológico da toxoplasmose, que pode infetar a grande maioria dos vertebrados, incluindo humanos. A transmissão da infeção toxoplasmática ocorre pela ingestão de qualquer uma das formas de resistência (sejam os cistos contidos na carne de animais infetados ou os oocistos expelidos nas fezes de felinos que, no solo e após a esporulação, tornam-se infecciosos e contaminam os alimentos e a água), bem como a transmissão placentária, por meio da passagem dos taquizoítos da mãe para o feto. Para o diagnóstico laboratorial da infeção adquirida, foram utilizados métodos sorológicos (Aglutinação Direta (AD), Ensaio Fluorescente Enzimático (ELFA), Ensaio de Aglutinação Imunoabsorvente com Imunoglobulina (ISAGA), e Immunoblot (IB) e métodos moleculares (PCR em tempo real) amplificação da região repetida do REP-529pb. Para o diagnóstico laboratorial da infeção congênita (pré e pós-natal), foram realizadas as mesmas metodologias descritas anteriormente, bem como a inoculação em camundongos utilizando diferentes produtos biológicos, nomeadamente sangue materno e recém-nascido, líquido amniótico e placenta. Durante o período de estudo de 12 anos, foram analisadas amostras biológicas de 6.658 casos suspeitos de toxoplasmose, dos quais 1.663 casos positivos foram confirmados (25%). Destes, 1.638 (98,5%) correspondem a pacientes com infeção toxoplasmática adquirida e 25 (1,5%) a pacientes com infeção toxoplasmática congênita. Os resultados indicam que a identificação dos casos de toxoplasmose no estudo corrobora os resultados referenciados em estudos anteriores e demonstra a importância do diagnóstico laboratorial e da vigilância sistemática desta infeção. Essa vigilância é particularmente importante em gestantes e em indivíduos imunocomprometidos, por se tratar de grupos populacionais onde essa parasitose é responsável por elevados índices de morbidade e letalidade.

_Abstract

The study was carried out with the objective to describe the demographic characteristics of patients with a suspected clinical picture of toxoplasmosis. The laboratory diagnosis of these cases was confirmed at the National Reference Laboratory for Parasitic and Fungal Infections of the National Institute of Health Doctor Ricardo Jorge, between January 2009 and December 2020. *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellu-

lar protozoan and the etiologic agent of toxoplasmosis, which can infect the vast majority of vertebrates, including humans. The transmission of toxoplasmic infection occurs by ingesting any of the forms of resistance (whether the cysts contained in the meat of infected animals or the oocysts expelled in the feces of felines that, in the soil and after sporulation, become infectious and contaminate food and water), as well as placental transmission, through the passage of the mother's tachyzoites to the fetus. For the laboratory diagnosis of acquired infection, serological methods were used (Direct Agglutination (AD), Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA), Immunoglobulin Immunosorbent Agglutination Assay (ISAGA), and Immunoblot (IB) and molecular methods (real-time PCR) amplification of the REP-529bp repeated region. For the laboratory diagnosis of congenital infection (pre and postnatal), the same methodologies described previously were carried out, as well as the inoculation in mice using different biological products, namely maternal and new-born blood, amniotic fluid and placenta. During the 12-year study period, biological samples from 6658 suspected cases of toxoplasmosis were analysed, of which 1663 positive cases were confirmed (25%). Of these, 1638 (98.5%) correspond to patients with acquired toxoplasmic infection and 25 (1.5%) to patients with congenital toxoplasmic infection. The results indicate that the identification of toxoplasmosis cases in the study corroborates the results referenced in previous studies and demonstrates the importance of the laboratorial diagnosis and the systematic surveillance of this infection. This surveillance is particularly important in pregnant women and in immunocompromised individuals, as they are population groups where this parasitosis is responsible for high rates of morbidity and lethality.

_Introdução

O *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, e um dos parasitas com maior distribuição geográfica à escala mundial, dada a sua capacidade de infetar a grande maioria dos vertebrados, incluindo a espécie humana (1,2). Estima-se que um terço da população mundial tenha já sido infetada com *T. gondii* pelo que a prevenção, o diagnóstico e o tratamento desta parasitose é de grande importân-



cia clínica e veterinária (2,3). O protozoário *T. gondii* apresenta um ciclo de vida de reprodução assexuada, que ocorre em diversos tecidos dos hospedeiros intermediários-mamíferos (Homem incluído) e aves, e de reprodução sexuada na mucosa intestinal dos gatos que são os hospedeiros definitivos deste protozoário (4).

A infecção nos humanos pode ser adquirida, por ingestão de carne malcozinhada contaminada com quistos de *T. gondii*, por ingestão de oócitos a partir de alimentos, solo ou águas contaminadas com fezes de gato, através de transfusões de sangue ou transplante de órgãos contaminados; por transmissão transplacentária e por inoculação acidental de taquizoítos (1).

Esta parasitose é quase sempre assintomática no caso dos pacientes imunocompetentes (4). Ainda assim, em algumas situações a infecção pode apresentar sintomas ligeiros tais como febre, fraqueza muscular e linfadenopatias (5). Nos indivíduos imunocomprometidos pode ocorrer a reativação de uma infecção latente por *Toxoplasma gondii*. Indivíduos com infecção por VIH e transplantados são exemplos em que a toxoplasmose é a causa mais comum de lesões cerebrais e uma das infecções oportunistas mais frequentes nos indivíduos imunocomprometidos podendo causar a morte. A coriorretinite surge também frequentemente nestes pacientes por reativação ocular (6).

A infecção por *T. gondii* pode ser transmitida congenitamente se a grávida adquirir a infecção durante a gestação, pois o parasita atravessa a placenta e pode infetar o feto. O risco de transmissão ao feto aumenta à medida que a gravidez progride, sendo que a gravidade da doença diminui (7,8). As principais manifestações clínicas da toxoplasmose congénita incluem: aborto espontâneo, prematuridade, recém-nascidos com hidrocefalia ou microcefalia, calcificações cerebrais, atraso mental e coriorretinites (9). Na maioria dos recém-nascidos a infecção é assintomática, mas muitos podem desenvolver sintomatologia neurológica ou ocular durante a infância ou adolescência.

Em Portugal, os últimos dados epidemiológicos relativos à seroprevalência da infecção por *T. gondii* datavam de 1979 e

apresentavam uma seroprevalência de 47% (10). Dado o défice de conhecimento da situação epidemiológica da toxoplasmose em Portugal reconhecido pela Direção-Geral da Saúde, na norma n.º 37/2011, de 30/09/11, foi efetuado um estudo sobre a evolução da prevalência dos anticorpos anti-*T. gondii* na população portuguesa desde 1979 até 2013, tendo se observado em 2013 uma prevalência de 22% na população em geral e de 18% nas mulheres em idade fértil.

Esta constatação indicia que cerca de 80% das mulheres em idade fértil são suscetíveis à infecção primária, correndo o risco de contrair toxoplasmose e consequentes sequelas. A inexistência de vacina para prevenir a toxoplasmose humana implica que a prevenção primária constitua a ferramenta fundamental para evitar a infecção neste grupo suscetível (11).

Na Europa, de acordo com o *Relatório Epidemiológico Anual de 2017* publicado em 2019 pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) respeitante à toxoplasmose congénita foram confirmados 194 casos na União Europeia, sendo França responsável por 79% do total de casos devido ao programa ativo de vigilância implementado na gravidez. O número de casos notificados é de 5.3 por cada 100 000 nascimentos (12).

_Objetivo

Foi efetuada uma análise retrospectiva dos casos clínicos suspeitos de infecção por *T. gondii* recebidos no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Parasitárias e Fúngicas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre janeiro de 2009 e dezembro de 2020, correlacionando os respetivos dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos, tendo sido avaliada a frequência de casos positivos.

_Material e métodos

Entre 2009 e 2020, o INSA realizou o diagnóstico laboratorial de 6658 amostras referentes casos clínicos suspeitos de infecção por *T. gondii*.



Para o diagnóstico laboratorial da infeção adquirida foram utilizados métodos serológicos (Aglutinação Direta (AD), *Enzyme-Linked Fluorescent Assay* (ELFA), *Immunoglobulin Immunosorbent Agglutination Assay* (ISAGA), e *Immunoblot* (IB) e métodos moleculares (PCR em tempo real) para amplificação da região repetida REP-529bp (13). Para o diagnóstico laboratorial da infeção congénita (pré e pós-natal) foram efetuadas as mesmas metodologias descritas anteriormente e, ainda, a inoculação em ratinhos utilizando diferentes produtos biológicos, nomeadamente sangue materno e do recém-nascido, líquido amniótico e placenta. Para a análise descritiva dos dados demográficos dos casos confirmados recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas.

_Resultados

Durante o período de 12 anos em estudo foram analisadas amostras biológicas de 6.658 casos suspeitos de toxoplasmose, dos quais se confirmaram 1663 casos positivos (25%).

Destes, 1.638 (98,5%) correspondem a pacientes com infeção toxoplásmica adquirida e 25 (1,5%) a pacientes com infeção toxoplásmica congénita (gráfico 1).

Nos doentes com infeção adquirida verificou-se que 91,9% (1505/1638) pertenciam ao sexo feminino, 7,1% (117/1638) ao masculino e em 1,0% (16/1638) dos casos o sexo não foi conhecido (gráfico 2).

Gráfico 1: ▾ Distribuição anual dos casos de infeção toxoplásmica adquirida e congénita, 2009-2020.

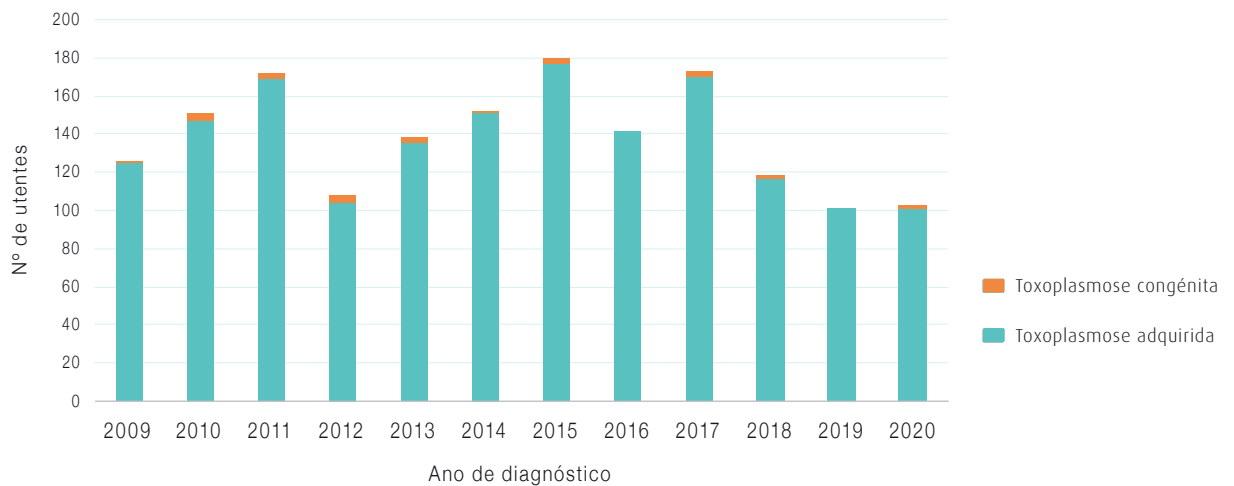
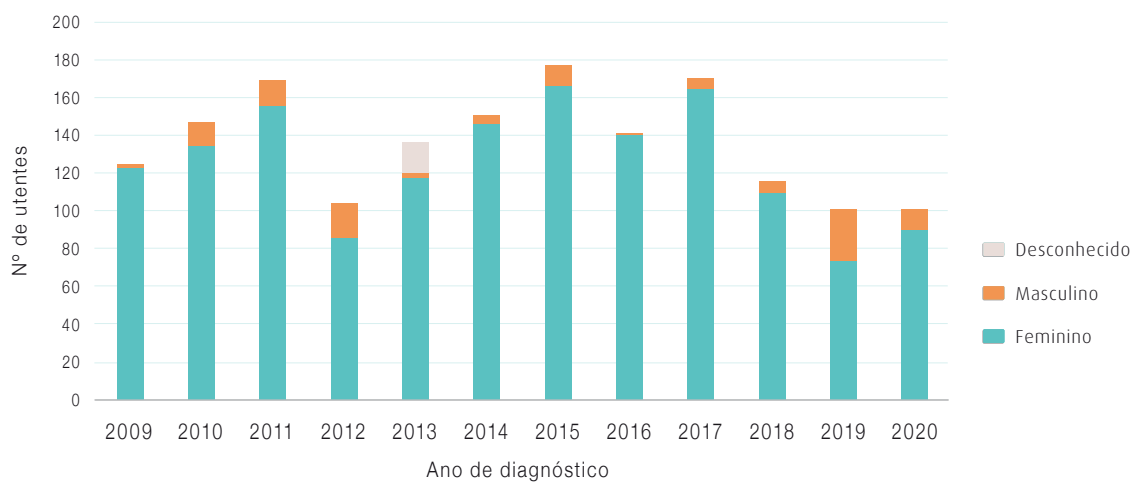


Gráfico 2: ▾ Distribuição anual dos casos de infeção toxoplásmica adquirida por sexo, 2009-2020.





No que se refere à toxoplasmose congénita, a frequência de casos foi de 1,5%, (25/1663), sendo 14 crianças pertencentes ao sexo masculino (gráfico 3).

Em relação à distribuição dos casos de infeção toxoplásmica por grupo etário, observou-se que 71,6% (1190/1663) pertencia à faixa etária dos 25-44 anos de idade seguido do grupo etário dos 15-24 anos com 16,4% (273/1663) (gráfico 4).

Em relação à distribuição dos casos de infeção toxoplásmica adquirida por grupo etário, observou-se que a maioria 75,3% (1141/1505) das mulheres pertencia à faixa etária dos 25-44 anos de idade seguido do grupo etário dos 15-24 anos com 16,8% (253/1505). A maioria dos homens com infeção toxoplásmica adquirida são pertencentes ao grupo etário entre os 25 e os 64 anos (gráfico 5).

Gráfico 3: Distribuição anual dos casos de infeção toxoplásmica congénita por sexo, 2009-2020.

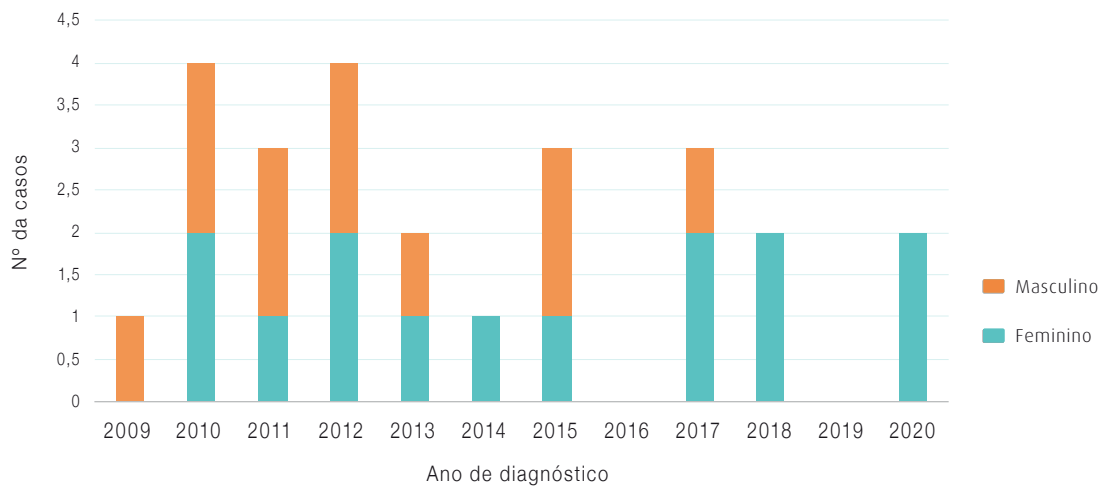


Gráfico 4: Distribuição anual da infeção toxoplásmica total por grupo etário, 2009-2020.

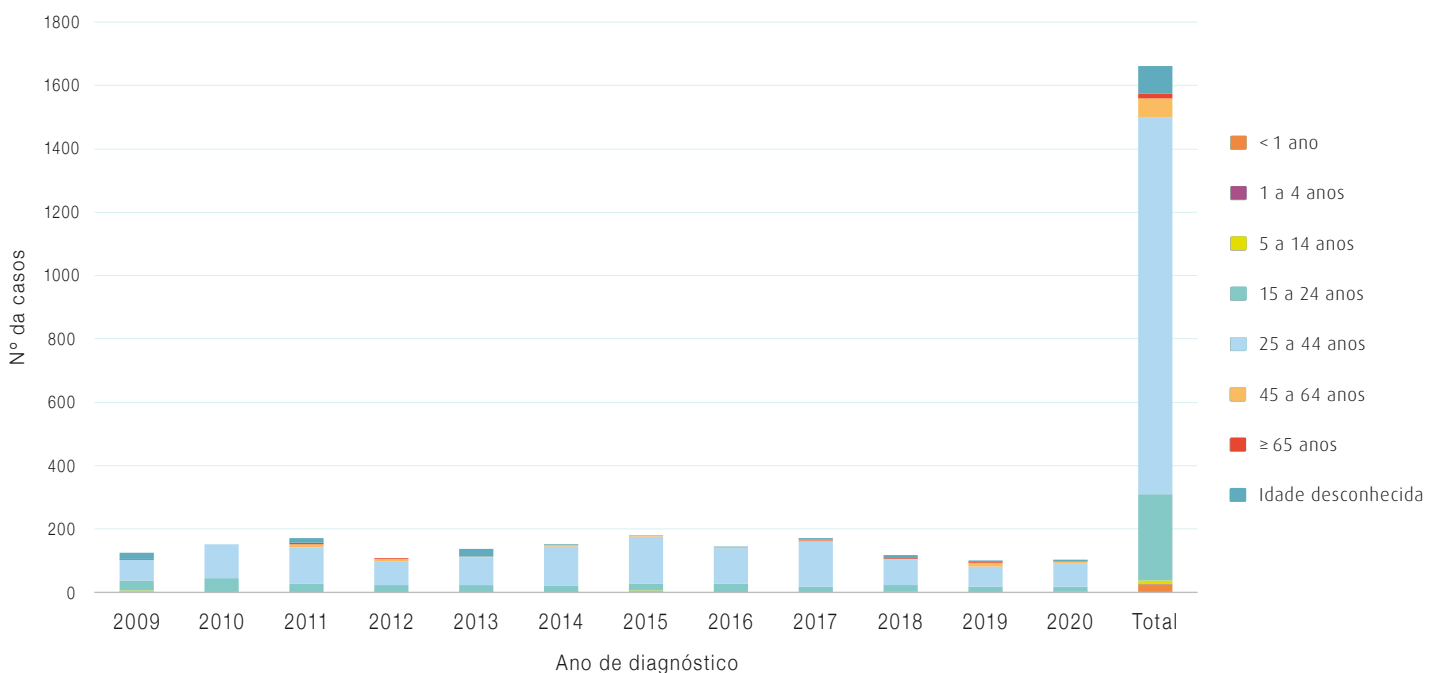
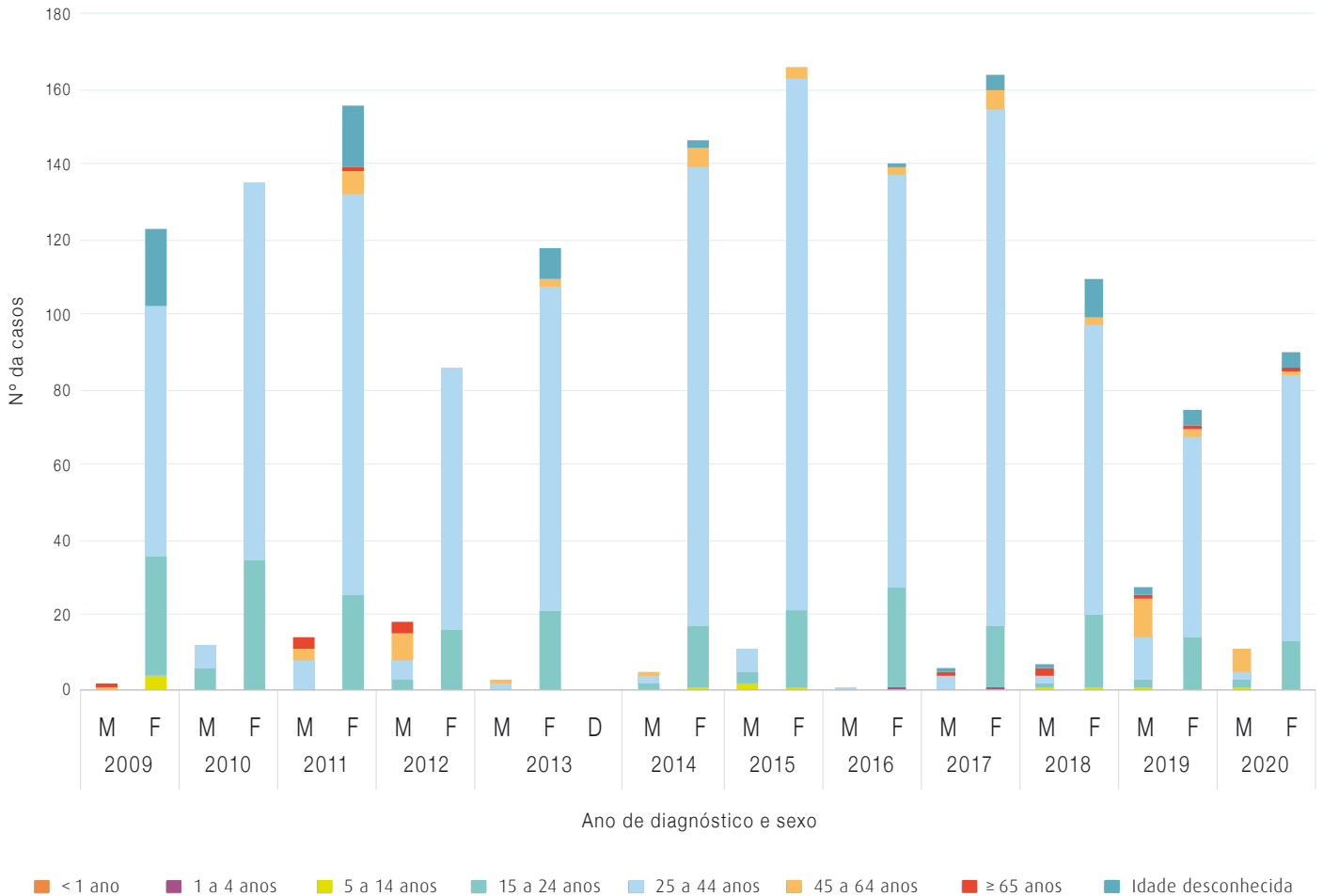




Gráfico 5: Distribuição anual da infeção toxoplásmica adquirida sexo e grupo etário, 2009-2020.



Dos 25 casos de toxoplasmose congénita diagnosticados durante os 12 anos em análise verificou-se que 24 eram crian-

ças com idade inferior a um ano e um correspondia a uma criança entre 1-4 anos (tabela 1).

Tabela 1: Número de casos por ano de diagnóstico.

Grupo etário	Ano de diagnóstico												Total
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	
<1 ano	1	4	3	4	2	0	3	0	3	2	0	2	24
1 a 4 anos	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5 a 14 anos	4	0	0	0	0	1	3	0	0	2	1	1	12
15 a 24 anos	32	41	25	19	21	18	23	26	18	19	16	15	273
25 a 44 anos	66	106	115	75	88	124	147	112	140	80	64	73	1190
45 a 64 anos	1	0	9	7	3	6	4	2	6	2	12	7	59
>65 anos	1	0	4	3	0	0	0	0	1	3	6	1	15
Idade desconhecida	21	0	16	0	24	2	0	1	5	10	6	4	89
Total	126	151	172	108	138	152	180	141	173	118	101	103	1663



_Discussão e conclusão

À semelhança de outros países europeus, este estudo demonstra que a grande maioria de casos de toxoplasmose adquirida ocorreu no sexo feminino e na faixa etária dos 25 aos 44 anos, o que seria expetável, pois Portugal é um dos países da União Europeia onde é preconizado o rastreio laboratorial da toxoplasmose em todas as mulheres grávidas ou que pretendem engravidar (14).

Observou-se ao longo dos 12 anos em estudo que as infeções adquiridas são numericamente muito superiores às congénitas, 1,5% (25/1663), tendo ocorrido maioritariamente em mulheres grávidas que podem dar origem a casos de toxoplasmose congénita, devido à transmissão mãe/filho. Este facto reforça a enorme importância da vigilância laboratorial quer no período pré-concepcional, quer durante o decorrer da gravidez.

Para se considerar que estamos na presença de um caso de toxoplasmose congénita o feto, recém nascido ou criança com idade inferior a um ano deve obedecer a pelo menos um dos quatro critérios: a) Confirmação da presença de *Toxoplasma gondii* em tecidos ou fluidos corporais (recém-nascido); b) Detecção de ácido nucleico de *Toxoplasma gondii* numa amostra biológica (fluidos corporais do recém-nascido); c) Resposta de anticorpos específicos para *Toxoplasma gondii* (Ig M, IgG e IgA) num recém-nascido; d) Títulos sempre estáveis de IgG de *Toxoplasma gondii* em crianças com menos de 12 meses (15). Os 25 casos detetados de toxoplasmose congénita foram positivos quer por técnicas serológicas, por técnicas moleculares e ainda por inoculação nos ratinhos, obedecendo assim aos critérios anteriormente descritos. O número de novos casos de infeção congénita obtidos é similar aos observados nos restantes países da Europa, com uma média de 0-4 casos por ano, com exceção da França, Polónia e Alemanha que registam números mais elevadas, entre 7 e 153 casos reportados em 2017 (12).

De acordo com os dados obtidos no mais recente estudo realizado em Portugal, a taxa de 18% de seroprevalência obtida nas mulheres em idade fértil indicou que cerca de 80% das mulheres portuguesas entre os 15 e os 45 anos não estão imunes à infeção por *Toxoplasma gondii*, ficando

estas assim suscetíveis à infeção primária durante a gravidez e ao elevado risco de toxoplasmose congénita (11).

O decréscimo que se tem observado na seroprevalência de anticorpos de *Toxoplasma gondii* na população portuguesa também se verifica em outros países desenvolvidos. A ingestão de carne crua ou mal cozinhada é o principal fator de risco na Europa para esta infeção. É possível que este decréscimo possa estar associado com vários fatores tais como: o hábito de congelar a carne, as alterações de hábitos alimentares em Portugal e na Europa nos últimos anos com o fácil acesso a refeições processadas e pré-cozinhadas assim como fatores inerentes a maior informação em saúde pública quer dos profissionais de saúde, quer da população em geral possam também ser um fator crucial na diminuição do risco de infeção por esta parasitose (16).

Em conclusão, este estudo vem demonstrar a importância da vigilância ativa e do diagnóstico sistemático desta parasitose, em particular do diagnóstico pré-natal na mulher grávida e pós-natal no recém-nascido, assim com nos indivíduos imunocomprometidos onde esta parasitose pode causar complicações clínicas graves e elevadas taxas de morbilidade. A não existência de vacina para prevenir a toxoplasmose, reforça a importância das medidas de prevenção primária continua como ferramenta crucial para evitar a infeção em particular nos grupos suscetíveis.

Agradecimento:

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000 Nov;30(12-13):1217-58. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00124-7). Erratum in: Int J Parasitol 2001 Feb;31(2):217-20. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00124-7)
- (2) Innes EA. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. Zoonoses Public Health. 2010 Feb;57(1):1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2009.01276.x>
- (3) Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol. 2009 Jul 1;39(8):895-901. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>
- (4) Holliman RE. Toxoplasmosis. In: Cook GC, Zumla AI (eds). Manson's tropical diseases. 21st ed. Philadelphia: WB. Saunders, 2003:1365-71.
- (5) Ho-Yen DO. Toxoplasmosis. Medicine. 2009 Dec 1;37(12):665-67. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.09.006>
- (6) Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis. 1992 Aug;15(2):211-22. <https://doi.org/10.1093/clinids/15.2.211>



- (7) Dunn D, Wallon M, Peyron F, et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet*. 1999 May 29;353(9167):1829-33. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)08220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)08220-8)
- (8) Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ*. 2000 Jul 15;321(7254):142-7. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7254.142>
- (9) Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 2002 Oct;8(10):634-40. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00485.x>
- (10) Ângelo MH. Inquérito Serológico Nacional, Portugal continental, 1979/80: prevalência dos anticorpos anti-toxoplasmose. *Arq Ins Nac Saúde*. 1983;8:105-11.
- (11) Gargaté MJ, Ferreira I, Vilares A, et al. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in the Portuguese population: comparison of three cross-sectional studies spanning three decades. *BMJ Open*. 2016 Oct 5;6(10):e011648. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011648>
- (12) European Centre for Disease Prevention and Control. Congenital toxoplasmosis. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC, 2019. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/toxoplasmosis-annual-epidemiological-report-2017.pdf>
- (13) Kasper DC, Sadeghi K, Prusa AR, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the accurate detection of *Toxoplasma gondii* in amniotic fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Jan;63(1):10-5. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.09.009>
- (14) Direção-Geral da Saúde. Norma nº 037/2011, de 30/09/2011 (atualiz. a 20/12/2013). Exames laboratoriais na Gravidez de Baixo Risco. <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0372011-de-30092011-jpg.aspx>
- (15) Despacho n.º 5681-A/2014, 21 de abril. DR 2º série (1ºsupl.), n.º 82 (29/4/20149:11374-(2-20). Notificação obrigatória de doenças transmissíveis e outros riscos em saúde pública. <https://dre.pt/application/file/25697650>
- (16) Nowakowska D, Stray-Pedersen B, Spiewak E, et al. Prevalence and estimated incidence of *Toxoplasma* infection among pregnant women in Poland: a decreasing trend in the younger population. *Clin Microbiol Infect*. 2006 Sep;12(9):913-7. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01513.x>

A importância da monitorização da Rede de Vigilância de Vetores REVIVE: de novos mosquitos e velhas carraças a novas ameaças em saúde pública (2011-2020)

The importance of monitoring by the Vector Surveillance Network REVIVE: from new mosquitoes and old ticks to new threats to public health (2011-2020)

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

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

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

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

_Resumo

O programa REVIVE (Rede de Vigilância de Vetores) resulta de colaboração entre a Direção-Geral da Saúde, as Administrações Regionais de Saúde do Algarve, Alentejo, Centro, Lisboa e Vale do Tejo e Norte, a Direção Regional da Saúde da Madeira, a Direção Regional da Saúde dos Açores e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. No âmbito do REVIVE é realizada a vigilância entomológica de mosquitos (Culicidae), carraças (Ixodidae) e flebotomos (Psychodidae) a nível nacional. O ano de 2020 representou o 13.º ano do programa REVIVE (2008-2020). Nesta publicação apresentam-se, de uma forma resumida, os resultados da vigilância de mosquitos e carraças realizada em 2020, e no período 2011-2019, em todas as regiões do país, dando ênfase aos principais riscos em saúde pública em Portugal. Relativamente aos mosquitos destaca-se a presença dos mosquitos exóticos/invasores *Aedes aegypti* na Madeira e *Aedes albopictus* no norte e sul do continente e o risco da ocorrência de casos autóctones de dengue, Zika e chikungunya transmitidos por estes vetores. Na vigilância de ixodídeos, salienta-se o risco de casos de febre escaro-nodular e borreliose de Lyme e, a cada vez mais provável, ocorrência de casos de febre hemorrágica Crimeia Congo transmitida por carraças e descrita nos últimos anos em Espanha junto da fronteira com Portugal.

_Abstract

The REVIVE program (Vector Surveillance Network) results from collaboration between the Directorate-General for Health, the Regional Health Administrations of Algarve, Alentejo, Center, Lisbon and Tagus valley and North, the Regional Directorate of Health of Madeira, Regional Directorate of Health of Azores and the National Health Institute Doutor Ricardo Jorge. Within REVIVE, entomological surveillance at the national level is carried out on mosquitoes (Culicidae), ticks (Ixodidae) and sandflies (Psychodidae). The year 2020 represented the 13th year of existence of the REVIVE program (2008-2020). In this publication, the results of mosquito and tick surveillance carried out in 2020, and in 2011-2019, in all regions of the country are briefly presented, emphasizing the main public health risks in Portugal. Among these, we refer the presence of *Aedes aegypti* mosquitoes in Madeira and *Aedes albopictus* in the North and South of the continent and the probable occurrence of autochthonous cases of dengue, Zika and chikungunya transmitted by these vectors, represent the main reason of concern. In tick surveillance, the keynote threats relate

to the risk of cases of Mediterranean spotted fever and Lyme borreliosis and, the more and more likely occurrence of cases of Crimean Congo Hemorrhagic Fever transmitted by *Hyalomma sp.* ticks, which has been described in recent years in Spain along the border with Portugal.

_Introdução

Mosquitos

Os mosquitos são insetos que pertencem à família Culicidae, uma das mais primitivas famílias da ordem Diptera, na qual se reconhecem mais de 3500 espécies e subespécies distribuídas por todo o mundo (1).

As espécies com importância em saúde pública pertencem às subfamílias Anophelinae e Culicinae.

Algumas espécies de mosquito são invasoras e a sua ocorrência está associada ao fenómeno da globalização, com o aumento da frequência e volume dos transportes comerciais e deslocamentos humanos, e favorecimento ambiental para o estabelecimento destas espécies pelas alterações climáticas.

Mosquitos invasores em determinadas localizações geográficas podem representar uma ameaça à saúde pública. As espécies do género *Aedes* são as mais frequentes e importantes dadas as suas características bioecológicas e a sua competência vetorial para vários agentes com importância em saúde pública e veterinária, destacando-se os vírus dengue, Zika, chikungunya e febre-amarela. Cinco espécies deste género encontram-se já estabelecidas e em proliferação na



Europa, nomeadamente *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. japonicus*, *Ae. koreicus* e *Ae. atropalpus* (2).

Aedes aegypti é uma espécie de climas tropicais e subtropicais e o vetor primário de vírus como o da febre-amarela, dengue, Zika e chikungunya. No território nacional, este mosquito foi identificado pela primeira vez em 2005 na Madeira (3) onde em 2012, oito anos após a sua introdução, foi o vetor primário de um surto de dengue com 2168 casos (4).

A espécie invasora *Ae. albopictus*, com origem no Sudeste Asiático, tem vindo a dispersar-se globalmente através do transporte passivo de ovos em atividades comerciais, nomeadamente o comércio global de pneus usados e plantas ornamentais (5). Na Europa a primeira deteção deste mosquito ocorreu na Albânia em 1979 e atualmente encontra-se em dispersão em vários países europeus tendo sido detetado pela primeira vez em Portugal no âmbito do REVIVE em 2017 (6) no Norte e em 2018 no Algarve.

Na Europa já foram registados em França, Itália e Espanha casos de chikungunya e dengue associadas ao mosquito *Ae. albopictus* (7-9).

Carraças

As carraças, ou ixodídeos, são artrópodes vetores, que parasitam um vasto número de animais. A sua perpetuação na natureza depende da alimentação (refeições sanguíneas) que realizam para manter o seu ciclo de vida enquanto parasitas. As carraças podem parasitar o Homem acidentalmente e, se estiverem infetadas, transmitir agentes infecciosos enquanto efetuam a refeição sanguínea.

Atualmente, conhecem-se 889 espécies de carraças que se subdividem em duas famílias principais: Ixodidae e Argasidae. A família mais importante, no que diz respeito à transmissão de agentes infecciosos, é a família Ixodidae. Em Portugal conhecem-se 22 espécies de carraças desta família e as doenças mais importantes causadas por agentes transmitidos por estas são a febre escarar-nodular e a borreliose de Lyme.

Em Portugal as duas espécies de carraças mais importantes em termos de saúde pública são *Rhipicephalus sanguineus*,

vetor de *Rickettsia conorii* e *Ixodes ricinus*, vetor de *Borrelia burgdorferi* s.l.

Hyalomma sp. é o vetor primário do vírus da febre hemorrágica Crimeia Congo (FHCC) que causa em humanos uma doença hemorrágica grave e com mortalidade que oscila entre os 10 e os 40%. A ocorrência em humanos está associada a picada de carraças no campo, ou com animais infetados em atividades associadas a caça ou matadouros, ou, muito importante, a infeções nosocomiais. Seis casos, três destes fatais, de FHCC foram reportados recentemente em Espanha em 2016 em Ávila (10), em 2018 em Badajoz (11) e em 2020 em Salamanca (12), depois de terem sido, pela primeira vez, identificadas carraças positivas sobretudo *Hyalomma lusitanicum* e *H. marginatum* em 2010 muito próximo da fronteira com Portugal no Tejo internacional (13).

_Objetivo

É objetivo deste artigo apresentar de uma forma resumida, os resultados da vigilância de mosquitos e carraças realizada em 2020, e no período 2011-2019, em todas as regiões do país, dando ênfase aos principais riscos em saúde pública em Portugal.

_Material e métodos

Mosquitos

No âmbito do REVIVE mosquitos adultos foram colhidos pelas equipas nas regiões recorrendo a armadilhas tipo CDC e BG, ou similar, iscadas, ou não, com CO₂ ou outro tipo de atrativo. Os mosquitos imaturos foram recolhidos em criadouros aquáticos e armadilhas de ovos (*ovitrap*s) utilizando caços ou semelhante.

Nas colheitas foram registados os dados ambientais, nomeadamente temperaturas mínimas e máximas, humidade relativa e dados de georreferência.

As colheitas de mosquitos no continente ocorreram de maio a outubro, não excluindo a probabilidade de ocorrência de mosquitos noutros períodos do ano devido às alterações climáticas. Na Madeira as atividades de monitorização decorreram durante todo o ano.



As amostras foram enviadas ao laboratório, acondicionadas em caixas refrigeradas e até três dias depois do início do trabalho de campo.

Os mosquitos no estágio adulto recebidos no laboratório foram identificados à espécie e a determinação da atividade viral (flavivírus – *West Nile*, dengue, febre-amarela, Zika e encefalites virais, e alfavírus – *chikungunya*) foi realizada em *pools* até um máximo de 50 espécimes, de acordo com a espécie, género, data e local de colheita, por extração de RNA total e pesquisa direta da presença de RNA viral por RT-PCR (14).

Carraças

No âmbito do REVIVE as carraças foram colhidas de janeiro a dezembro, uma vez que existem carraças que estão ativas nos meses de inverno (p. ex. *I. ricinus*) e outras que estão ativas sobretudo nos meses de verão (p. ex. *R. sanguineus*). As colheitas foram realizadas na fase de vida livre (sobre a vegetação) pelo método de arrastamento da bandeira e na fase parasitária (sobre o hospedeiro). Foram igualmente registadas as temperaturas mínimas e máximas, humidade relativa e dados de georreferência nas colheitas realizadas na fase de vida livre.

As amostras foram enviadas ao laboratório, acondicionadas em caixas refrigeradas e até três dias depois do início do trabalho de campo.

As carraças recebidas no laboratório foram identificadas à espécie. A presença de *Rickettsia* sp. e *Borrelia* sp. foi pesquisada por PCR em todos os espécimes detetados a parasitar humanos, onde as carraças foram estudadas individualmente, e em 10% dos espécimes colhidos a parasitar animais e/ou na fase de vida livre, onde foram realizados *pools* de DNA com uma a cinco carraças da mesma colheita, espécie e estado evolutivo (15).

Foram também testadas as amostras de carraças identificadas como *Hyalomma* sp. para a presença do vírus da febre hemorrágica Crimeia Congo por *real time* RT-PCR (16).

_Resultados

A pandemia COVID-19 afetou significativamente as atividades do REVIVE, tanto ao nível do planeamento e realização de trabalho de campo nas regiões, como no laboratório, em comparação com os anos anteriores.

Mosquitos

Em 2020 foi realizado esforço de captura de mosquitos adultos e/ou imaturos em 157 concelhos. O esforço de captura por concelho (número de colheitas) de mosquitos adultos foi em média de 10,3 [1-411] e de mosquitos imaturos de 14,7 [1-135] colheitas/concelho.

Em 1288 colheitas de mosquitos adultos (armadilhas/noite) efetuadas em 2020 foram capturados 1997 mosquitos e em 1516 colheitas de imaturos (boletins) foram recolhidos 39712 larvas e pupas de mosquito.

No período de 2011-2019 foram feitas colheitas de mosquitos adultos e/ou imaturos num total de 277 concelhos de Portugal continental e Madeira (figura 1).

No período 2011-2019, o esforço de captura de mosquitos adultos foi em média 17,8 [1-601] e de mosquitos imaturos de 49,4 [1-717] colheitas/concelho. No mesmo período, em 12868 colheitas de mosquitos adultos foram capturados 108577 mosquitos e em 16644 colheitas de imaturos foram recolhidos 227523 larvas e pupas de mosquito.

Em 2020 foram identificados mosquitos adultos e imaturos de 16 espécies nos laboratórios do Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosa do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

De 2011 a 2020 foram identificadas 28 espécies do total das 40 espécies referenciadas para o território português.

A espécie exótica/invasora *Ae. aegypti* foi identificada na ilha da Madeira onde está registada a sua presença desde 2005 (3) (figura 2).

A espécie de mosquito invasora *Ae. albopictus* foi detetada no norte e no sul do continente, onde foram registados pela primeira vez em 2017 e 2018, respetivamente (figura 3).



Figura 1: ↓ Concelhos onde foram realizadas colheitas de mosquitos em 2020 e em 2011-2019.

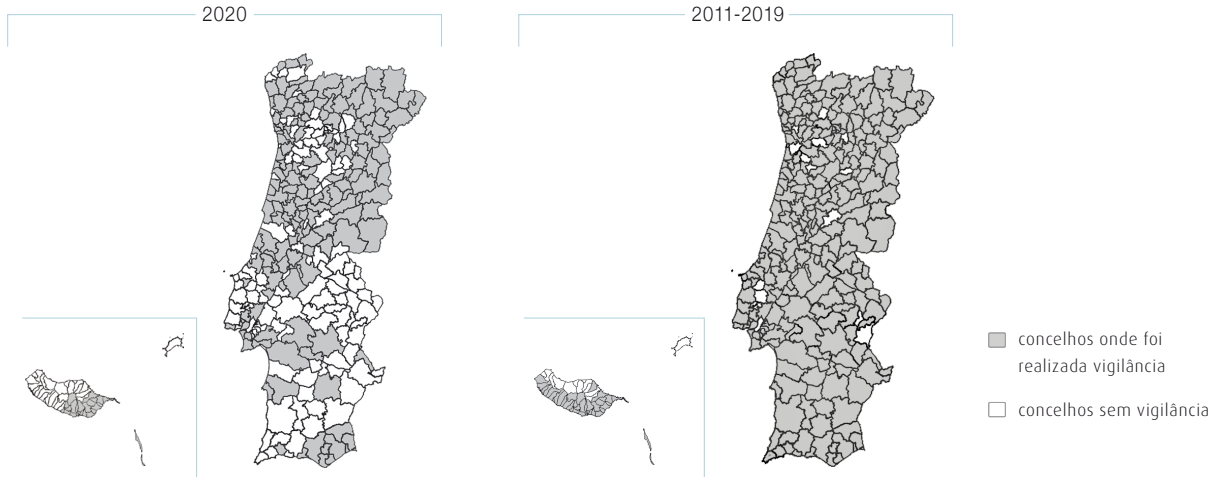


Figura 2: ↓ Distribuição geográfica de *Aedes aegypti* em 2020 e em 2011-2019.

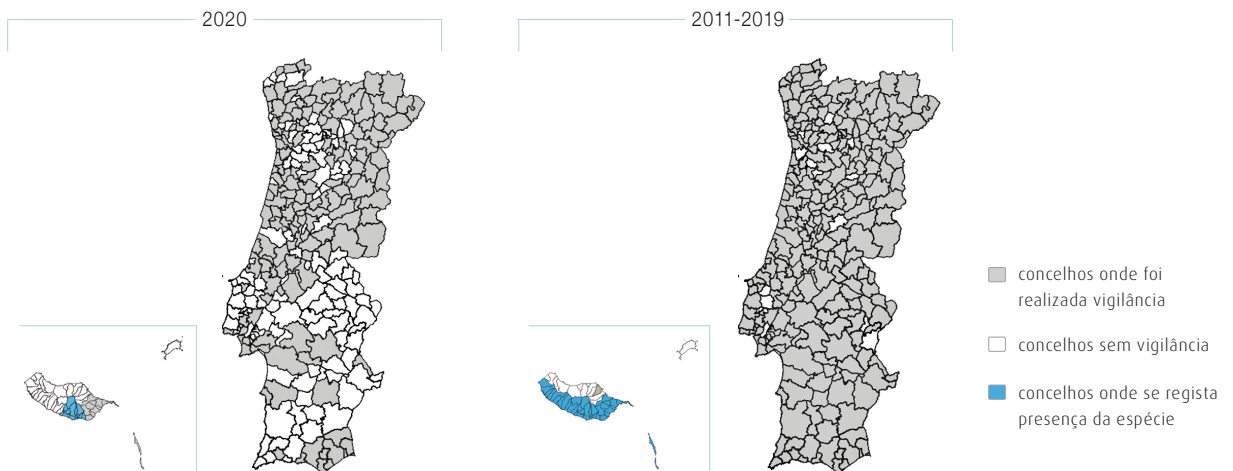
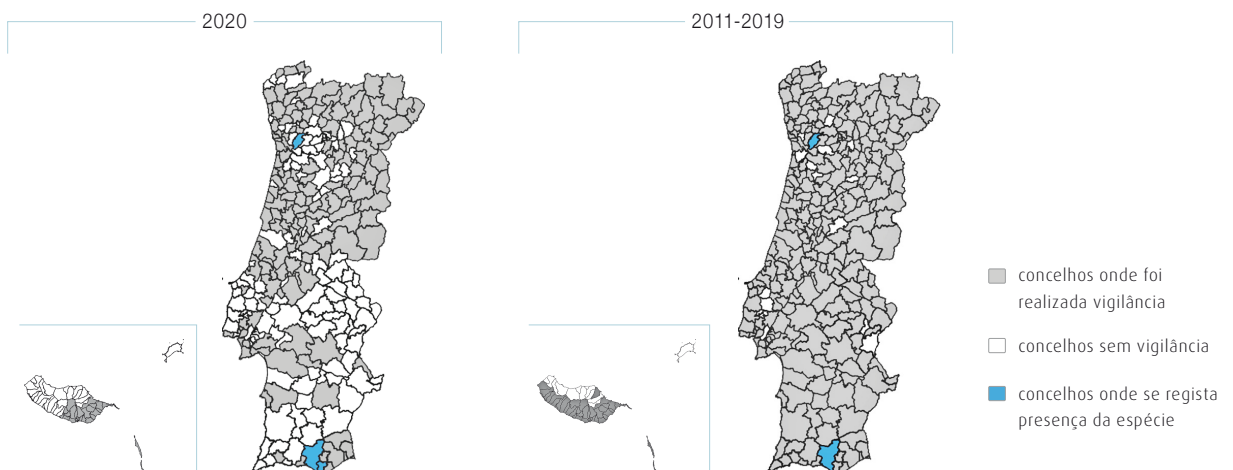


Figura 3: ↓ Distribuição geográfica de *Aedes albopictus* em 2020 e em 2011-2019.





Carraças

Em 2020 foi realizado esforço de captura de carraças em 117 concelhos. O esforço de captura por concelho (número de colheitas) de mosquitos adultos foi em média de 5,2 [1-43] (figura 4).

Das 604 colheitas realizadas, 367 foram feitas no Homem, 106 no cão, 36 em outros animais e 95 na fase de vida livre. Como colheita efetuada na fase de vida livre da carraça consideraram-se todas as efetuadas na vegetação, vestuário, residências, paredes, habitações, solo, etc.

No total foram capturadas e identificadas 1048 carraças de 12 espécies, nomeadamente, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *H. marginatum*, *Ixodes canisuga*, *I. frontalis*, *I. hexagonus*, *I. ricinus*, *I. ventalloi*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus pusillus* e *R. sanguineus*. *Rhipicephalus sanguineus*, vetor importante da febre escarar-nodular em Portugal, foi identificado em 56,4% (n=66) dos concelhos onde foram realizadas capturas (figura 5).

Ixodes ricinus, vetor da borreliose de Lyme, foi identificado em 40,2% (n=47) dos concelhos onde foram realizadas capturas (figura 6).

Para a pesquisa de borrélias e rickettsias foram analisados 558 ixodídeos do total de exemplares capturados, distribuídos por 11 espécies e provenientes de 105 concelhos de norte a sul do País.

Aproximadamente 10% dos exemplares colhidos em animais ou em fase de vida livre foram selecionados para pesquisa de agentes etiológicos, com base na capacidade vetorial que determinadas espécies têm para transmitir borrélias e rickettsias.

Dos ixodídeos em estudo, 133 (23,8%) foram positivos na deteção de DNA de *Rickettsia* e 14 (2,5%) positivos para a presença de DNA de *Borrelia*.

Relativamente à deteção de Borrélia, foi detetada *B. lusitaniae* (n=13), espécie associada a doença no Homem, e *Borrelia* spp., numa amostra que devido à baixa concentração das bactérias na amostra não foi possível concluir sobre identificação específica.

Relativamente à deteção de *Rickettsia*, foram detetadas sete espécies. *R. monacensis* foi a espécie mais prevalente (n=59; 44,4%), seguida de *R. massiliae* (n=24). *R. conorii* e *R. slovaca*, patogénicas para o Homem, foram detetadas apenas em duas (1,5%) e em sete (5,3%) amostras, respetivamente.

Foram ainda assinaladas coinfeções com *B. lusitaniae* e *R. helvetica* (n=3) e com *B. lusitaniae* e *R. monacensis* (n=6). Estas coinfeções já foram detetadas em anos anteriores e o seu impacto na transmissão ao Homem continua por esclarecer.

Figura 4:  Concelhos onde foram realizadas colheitas de carraças em 2020 e em 2011-2019.

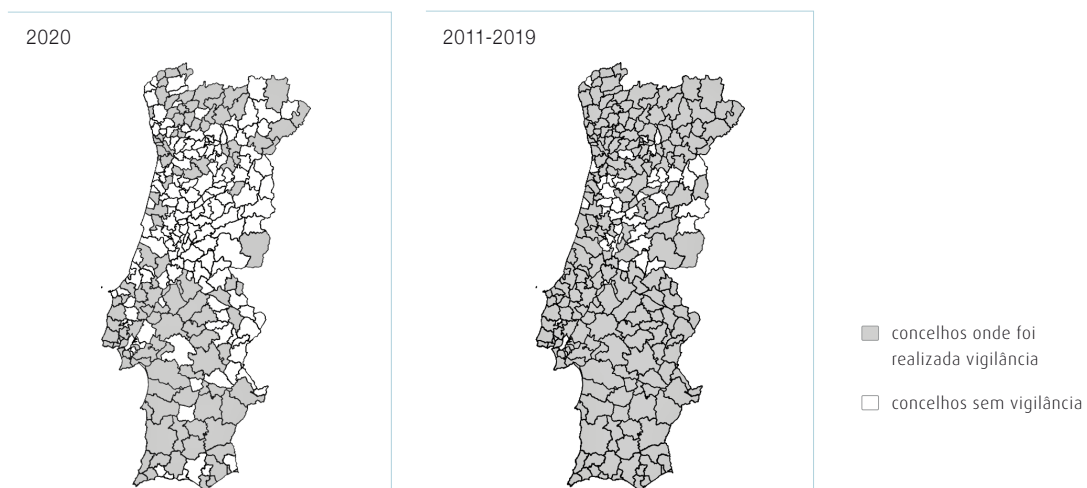




Figura 5: ↘ Distribuição geográfica de *Rhipicephalus sanguineus* em 2020 e em 2011-2019.

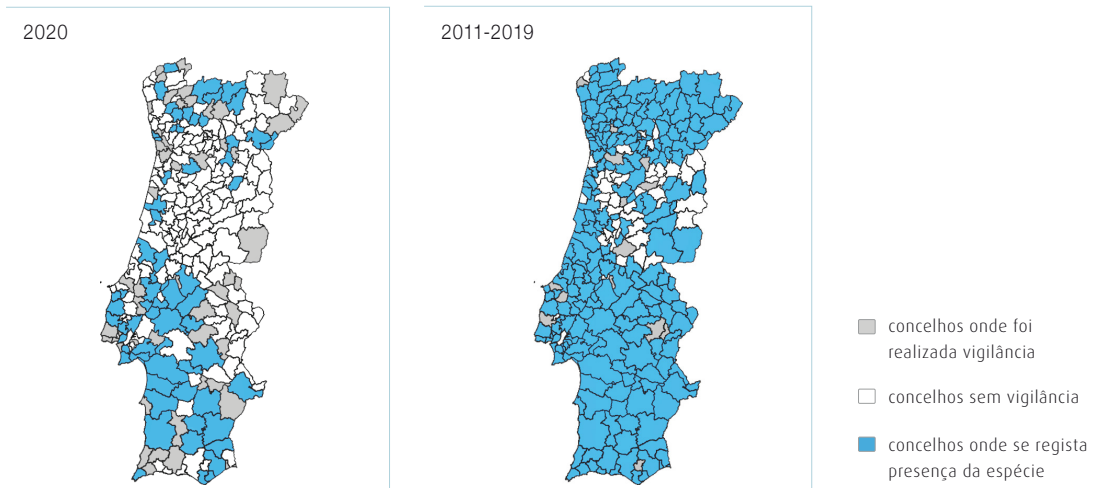
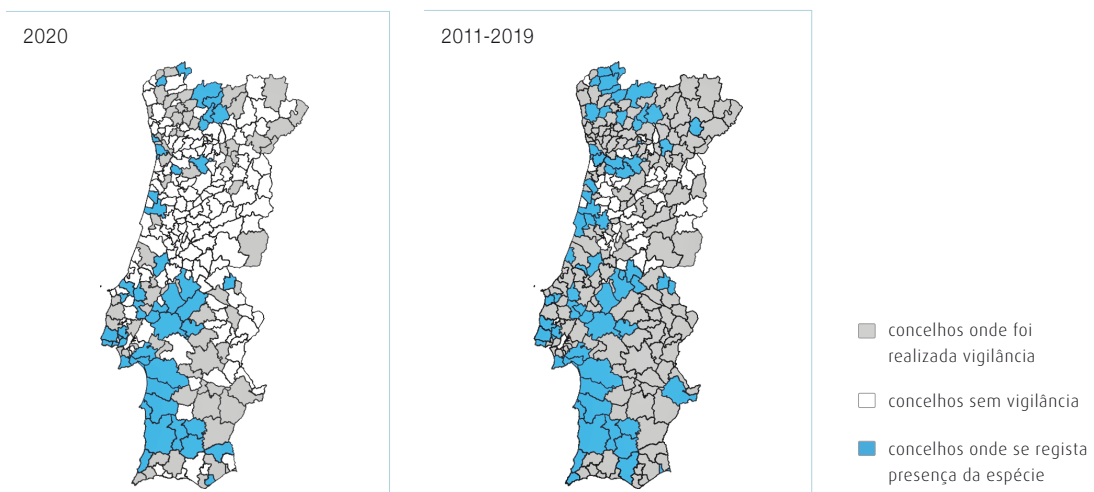


Figura 6: ↘ Distribuição geográfica de *Ixodes ricinus* em 2020 e em 2011-2019.



Hyalomma marginatum e *Hyalomma lusitanicum* podem ser vetores de febre hemorrágica Crimeia Congo. As carrças destas espécies têm sido identificadas em zonas pontuais, estando os imaturos associados a aves e pequenos mamíferos e os adultos a ungulados domésticos e silvestres (figura 7).

Desde 2019 que todas as carrças do género *Hyalomma* (n=24) colhidas no âmbito do REVIVE têm sido testadas para a presença do vírus da febre hemorrágica Crimeia Congo com resultados negativos.

Discussão e conclusões

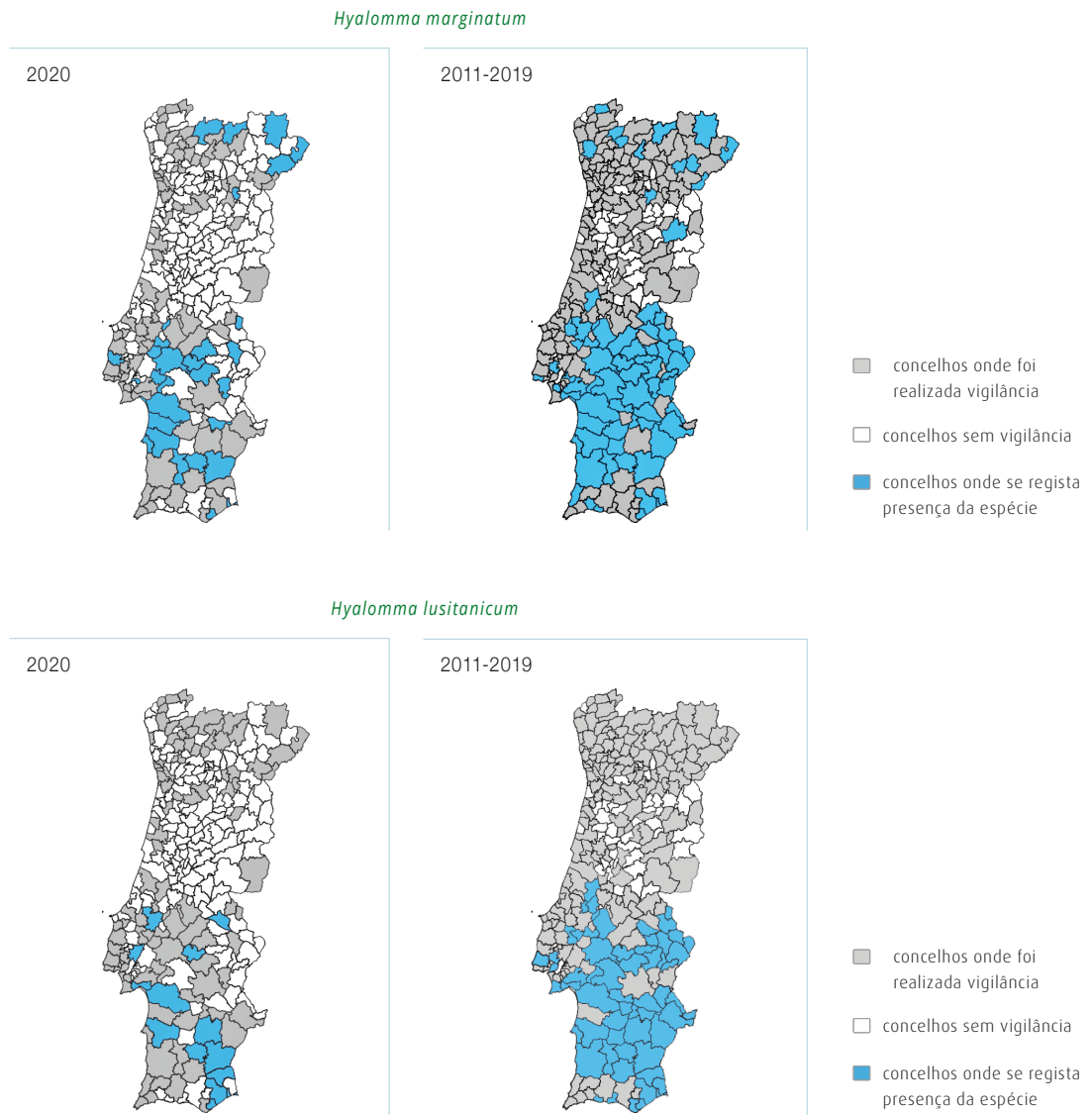
Mosquitos

Em 2020 foram realizadas, entre maio e outubro, 1288 colheitas de culicídeos adultos e 1516 de imaturos em 157 concelhos de Portugal continental e Madeira.

Em 2020 o esforço de captura de mosquitos adultos e imaturos foi reduzido, em relação a 2019, em 55% e 62%, respetivamente, devido à pandemia COVID-19. O número de concelhos em estudo também foi 29% inferior ao do ano anterior.



Figura 7: ↘ Distribuição geográfica de *Hyalomma marginatum* e *Hyalomma lusitanicum* em 2020 e em 2011-2019.



Em 41709 mosquitos coletados, 1997 adultos e 39712 imaturos, foram identificadas 16 espécies de mosquitos, entre elas duas espécies exóticas/invasoras, nomeadamente *Aedes aegypti* identificado na Madeira pela primeira vez em 2005, e *Ae. albopictus* identificado, no âmbito do REVIVE, pela primeira vez em 2017 no Norte e em 2018 no Algarve.

A espécie *Ae. aegypti*, presente desde 2005, encontra-se estabelecida na ilha da Madeira com valores de abundância relativa elevados, à semelhança de anos anteriores. A presença deste mosquito na região da Madeira continua a

representar um risco para a transmissão de agentes com importância em saúde pública, nomeadamente arbovírus, como já aconteceu em 2012, ano em que foi registado o primeiro surto de dengue.

A espécie *Ae. albopictus*, detetada na região norte do país em 2017 e no Algarve em 2018, representa outro fator de risco. A vigilância desta espécie deve ser mantida de modo a compreender o fenómeno de estabelecimento e dispersão.



Apesar das medidas de controlo em curso, que incluem a gestão de criadouros naturais e eliminação de criadouros artificiais/domésticos que promovem a proliferação desta espécie, tem-se verificado a presença contínua e o alargamento da sua área de distribuição.

Em ambas as regiões tem sido promovida a educação comunitária com recurso a meios de divulgação para evitar a picada e reduzir os criadouros domésticos.

No entanto, novas estratégias e metodologias de controlo poderão vir a ser consideradas, de acordo com as orientações internacionais, para tornar mais efetiva a supressão das populações adultas, reduzir a abundância e capacidade de dispersão, reduzindo o risco de ocorrência de doenças associadas.

Na pesquisa de arbovírus não foram identificados vírus patogénicos. No entanto, o vírus *West Nile* (WN) (flavivírus transmitido por mosquitos do género *Culex* e agente etiológico de febre e de doença neuroinvasiva) conhecido desde os anos 60 em Portugal (17), tem sido responsável por casos clínicos, sobretudo a sul, em 2004, 2010 e 2015 (18-20).

A presença do mosquito vetor *Ae. albopictus*, espécie exótica com características invasoras, na região norte e no Algarve apontam para uma situação de estabelecimento e dispersão geográfica, representando uma situação de risco acrescido para a saúde pública que vai exigir um esforço de monitorização constante, bem como medidas de controlo eficazes com vista à erradicação das populações detetadas e que impeçam a dispersão deste mosquito para outras regiões.

Estudos prévios indicam que os primeiros surtos associados aos vetores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* ocorrem entre cinco a 15 anos após a sua introdução numa nova região geográfica (21). Por outro lado, face ao grande número de viajantes entre Portugal e o Brasil (e entre outros Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa – PALOP) onde muitos dos vírus transmitidos por estes vetores são endémicos, Portugal é considerado um dos países europeus em maior risco de entrada de viajantes virémicos com arbovírus transmitidos por mosquitos (22).

A população em risco de contrair uma doença transmitida por mosquitos tem vindo a aumentar em todo o Mundo a níveis nunca antes observados devido às alterações na distribuição geográfica destas duas espécies – *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* – o que alerta para a necessidade da deteção atempada da sua introdução e da determinação da atividade viral, isto é, para quando a identificação de casos humanos de dengue, Zika ou chikungunya em Portugal?

Carraças

Em 2020, entre janeiro e dezembro, realizaram-se 607 colheitas de ixodídeos em 117 concelhos de Portugal continental. Em 2020, o número total de colheitas diminuiu 44,5% comparativamente com 2019.

As colheitas realizadas no Homem diminuíram 16,4% relativamente a 2019. No cão e em outros animais diminuíram 60,3% e 57,6%, respetivamente. Na fase de vida livre diminuíram 68%.

No laboratório foram identificados 1048 ixodídeos pertencentes a 12 espécies, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *H. marginatum*, *Ixodes canisuga*, *I. frontalis*, *I. hexagonus*, *I. ricinus*, *I. ventralloi*, *Rhipicephalus bursa*, *R. pusillus* e *R. sanguineus*.

A pesquisa de borrélias e rickettsias permitiu de 2011 a 2019 a identificação de agentes patogénicos para o Homem como, *R. conorii*, *R. mongolitimonae*, *R. slovaca*, *B. lusitaniae* e *B. afzelii*.

Em Portugal, até à data, estão apenas descritos casos de infeção no Homem por *R. conorii*, *R. slovaca* e *R. sibirica mongolitimonae*.

Quanto à infeção por rickettsias, como *R. massiliae*, *R. helvetica* e *R. monacensis* o seu grau de patogenia parece estar mais condicionado pelo estado imunitário do indivíduo picado estando apenas descritos casos pontuais de doença.

A identificação dos principais fatores ecológicos que condicionam a presença/ausência de determinada espécie de carraça num dado local ou época do ano também têm sido analisados e agora, passados dez anos, começam a



ser suficientemente robustos para permitirem a sua análise estatística e o desenvolvimento de modelos de preditivos em termos de presença/ausência.

O reforço das capturas realizadas em humanos, que se deve à colaboração dos profissionais de saúde dos centros de saúde e hospitais, foi relevante para a confirmação que o contacto do Homem com os ixodídeos é mais frequente do que habitualmente referido em estudos realizados em Portugal. Este facto também está de acordo com as referências bibliográficas que mencionam o aumento da incidência das doenças transmitidas por carraças, não só em Portugal, como em toda a Europa.

Desde o início que este programa tem contribuído para o conhecimento ecoepidemiológico de espécies de vetores, a sua distribuição geográfica, período de atividade e abundância, assim como para o esclarecimento do seu papel como vetor de agentes de doença para o Homem.

Desde 2019, que é feita vigilância sistemática em carraças do género *Hyalomma* do vírus da febre hemorrágica Crimeia Congo. Já detetada em Espanha, próximo da fronteira com Portugal, a presença deste vírus, classificado com o nível de biossegurança quatro, o mais elevado, a mortalidade associada e a capacidade de provocar infeções nosocomiais pode significar um desafio importante em saúde pública em Portugal.

O programa REVIVE resulta da cooperação interinstitucional e tem contribuído para um conhecimento sistemático da fauna de culicídeos e de ixodídeos de Portugal e do seu potencial papel de vetor, constituindo uma componente dos programas de vigilância epidemiológica indispensável à avaliação do risco de transmissão de agentes patogénicos transmitidos por vetores.

Agradecimento:

A todos os profissionais do País envolvidos no projeto REVIVE, pela colaboração no trabalho de campo e de registo. Lista completa da equipa em: REVIVE – Culicídeos e Ixodídeos: relatório 2020, pp. 55-59. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7711>.

Referências bibliográficas:

- (1) Edwards FW. Diptera, Family Culicidae. IN: Wytzman P. Genera Insectorum. Brussels: Desmet Verteneuil, 1932, pp. 1-258.
- (2) Medlock JM, Hansford KM, Versteirt V, et al. An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. Bull Entomol Res. 2015 Dec;105(6):637-63. <https://doi.org/10.1017/S0007485315000103>
- (3) Margarita Y, Santos Grácio AJ, Lencastre I, et al. First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) in Madeira Island – Portugal. Acta Parasitol Port. 2006;13:59-61.
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. Epidemiological update: Outbreak of dengue in Madeira, Portugal, 13 February 2013[internet]. [consult.11/5/2021]. Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-outbreak-dengue-madeira-portugal-13-february-2013>
- (5) Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, et al. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. Vector Borne Zoonotic Dis. 2007 Spring;7(1):76-85. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0562>
- (6) Osório HC, Zê-Zê L, Neto M, et al. Detection of the Invasive Mosquito Species *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Portugal. Int J Environ Res Public Health. 2018 Apr 21;15(4):820. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040820>
- (7) Calba C, Guerbois-Galla M, Franke F, et al. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. Euro Surveill. 2017 Sep;22(39):17-00647. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00647>
- (8) Manica M, Guzzetta G, Poletti P, et al. Transmission dynamics of the ongoing chikungunya outbreak in Central Italy: from coastal areas to the metropolitan city of Rome, summer 2017. Euro Surveill. 2017 Nov;22(44):17-00685. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.44.17-00685>
- (9) European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Local transmission of dengue fever in France and Spain, Oct 2018. Solna, Sw: ECDC, 2018. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-local-transmission-dengue-fever-france-and-spain>
- (10) Negro A, de la Calle-Prieto F, Palencia-Herrejón E, et al.; Crimean Congo Hemorrhagic Fever@Madrid Working Group. Autochthonous Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Spain. N Engl J Med. 2017 Jul 13;377(2):154-161. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1615162>
- (11) Negro A, Sánchez-Arroyo R, Díez-Fuertes F, et al. Fatal Case of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Caused by Reassortant Virus, Spain, 2018. Emerg Infect Dis. 2021 Apr;27(4):1211-15. <https://doi.org/10.3201/eid2704.203462>
- (12) Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. Evaluación Rápida de Riesgo: Detección de casos de Fiebre hemorrágica de Crimeia-Congo en Salamanca, agosto 2020. Madrid: Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, 2020. https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/Crimea_Congo/docs/20200827_ERR_Crimea_Congo_Salamanca.pdf
- (13) Estrada-Peña A, Palomar AM, Santibáñez P, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. Emerg Infect Dis. 2012 Jan;18(1):179-80. <https://doi.org/10.3201/eid1801.111040>
- (14) Osório HC, Zê-Zê L, Amaro F, et al. Mosquito surveillance for prevention and control of emerging mosquito-borne diseases in Portugal - 2008-2014. Int J Environ Res Public Health. 2014 Nov 12;11(11):11583-96. <https://doi.org/10.3390/ijerph111111583>
- (15) de Carvalho IL, Milhano N, Santos AS, et al. Detection of *Borrelia lusitaniae*, *Rickettsia* sp. IRS3, *Rickettsia monacensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* collected in Madeira Island, Portugal. Vector Borne Zoonotic Dis. 2008 Aug;8(4):575-9. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0245>
- (16) Atkinson B, Chamberlain J, Logue CH, et al. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012 Sep;12(9):786-93. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0770>
- (17) Filipe AR. Isolation in Portugal of West Nile virus from *Anopheles maculipennis* mosquitoes. Acta Virol. 1972 Jul;16(4):361.



- (18) Connell J, McKeown P, Garvey, P, et al. Two linked cases of West Nile virus (WNV) acquired by Irish tourists in the Algarve, Portugal. *Euro Surveill.* 2004;8(32):pii=2517. <https://doi.org/10.2807/esw.08.32.02517-en>
- (19) Alves MJ, Poças JMD, Luz T, et al. Infecção por vírus West Nile (Flavivirus) em Portugal: considerações acerca de um caso clínico de síndrome febril com exantema. *RPDI.* 2012;8(1):46-51.
- (20) Zé-Zé L, Proença P, Osório HC, et al. Human case of West Nile neuroinvasive disease in Portugal, summer 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(38). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.38.30024>
- (21) Kraemer MUG, Reiner RC Jr, Brady OJ, et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol.* 2019 May;4(5):854-63. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>. Erratum in: *Nat Microbiol.* 2019 Mar 21; Erratum in: *Nat Microbiol.* 2019 Apr 8
- (22) Massad E, Amaku M, Coutinho FAB, et al. Estimating the probability of dengue virus introduction and secondary autochthonous cases in Europe. *Sci Rep.* 2018 Mar 15;8(1):4629. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22590-5>



_Riscos e benefícios de beber chá verde: podemos potenciar os benefícios para a saúde aumentando o seu consumo em Portugal?

Risks and benefits associated with green tea consumption: is it possible to potentiate the health benefits through increasing Portuguese consumption?

Ricardo Assunção^{1,2,3}, Magdalena Twarużek⁴, Robert Kosicki⁴, Carla Viegas^{3,5,6}, Susana Viegas^{3,5,6}

ricardo.assuncao@insa.min-saude.pt

(1) Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

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

(3) Centro de Investigação em Saúde Pública. Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

(4) Department of Physiology and Toxicology. Faculty of Biological Sciences, Kazimierz Wielki University, Bydgoszcz, Poland

(5) Health and Technology Research Center. Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisbon, Portugal

(6) Comprehensive Health Research Center. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

O chá é consumido há anos, tendo o chá verde recebido particular destaque, atendendo principalmente aos potenciais efeitos benéficos para a saúde que o seu consumo regular poderá potenciar. Alguns destes efeitos são atribuídos aos polifenóis, nomeadamente à epigallocatequina-3-galato (EGCG). Por outro lado, o chá pode também encontrar-se contaminado por micotoxinas, i.e., metabolitos secundários produzidos por fungos que poderão afetar negativamente a saúde. Neste estudo, pretendeu-se integrar os riscos (devidos à exposição a micotoxinas e à ingestão de níveis elevados de EGCG) e benefícios (pela ingestão moderada de EGCG) associados ao consumo de chá verde. Os dados respeitantes à contaminação do chá verde por micotoxinas foram obtidos através da análise de 38 micotoxinas, e seus metabolitos, em 20 amostras de chá verde (10 obtidas em granel e 10 em saquetas) disponíveis nas superfícies comerciais da região de Lisboa, através de metodologias cromatográficas. Oito das vinte amostras apresentaram valores quantificáveis de micotoxinas. Relativamente aos teores em EGCG, bem como aos dados de consumo de chá verde pela população adulta, foram considerados aqueles reportados pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA). Concluímos que o consumo atual de chá verde não foi associado a uma preocupação para a saúde, atenta a ingestão de micotoxinas e EGCG nas amostras analisadas. Os cenários hipotéticos considerados, estabelecendo um consumo crescente de chá verde em Portugal, revelaram que o consumo de até sete chávenas por dia deverá maximizar os potenciais efeitos benéficos para a saúde. Este estudo pretende contribuir para o estabelecimento futuro de recomendações de consumo de chá verde em Portugal.

_Abstract

Tea has been consumed for thousands of years, however, particular interest has been dedicated to green tea. This interest has been motivated by the associated health benefits following its regular consumption, some of which are due to its polyphenol constituents, such as epigallocatechin-3-gallate (EGCG). Contrarily, tea could be contaminated by mycotoxins, secondary metabolites of fungi, negatively affecting the human health. Here, we aimed to assess the balance between risks (due to myco-

toxins and intake of high levels of EGCG) and benefits (due to moderate intake of EGCG) associated with the consumption of green tea. For the evaluation of potential mycotoxin contamination in green tea, 20 samples (10 in bulk and 10 in bags) available in different Lisbon markets were analyzed for 38 mycotoxins and their metabolites, through a chromatographic method. The used EGCG levels, as well as green tea consumption data were those reported by the European Food Safety Authority (EFSA). Eight samples out of 20 presented quantifiable values of the considered toxins. We conclude that the current levels of mycotoxins and EGCG intake in the analyzed green tea samples were not associated with health concerns. Scenarios considering an increasing consumption of green tea in Portugal revealed that drinking up to seven cups per day should maximize the associated health benefits. The present study contributes to the future establishment of green tea consumption recommendations in Portugal.

_Introdução

O consumo de chá, e a sua produção, fazem parte da cultura de vários países, em particular do continente asiático. Na Europa, os portugueses terão sido, muito provavelmente, os primeiros europeus a contactarem com o chá, em meados do século XVI, como consequência das ligações com as culturas asiáticas, em particular da China e do Japão. Sendo considerada uma bebida rara e medicinal, é no seio da aristocracia portuguesa que o chá ganhou maior popularidade, acreditando-se que terá sido por intermédio de uma infanta portuguesa que o hábito de tomar chá a meio da tarde ganhou corpo em Inglaterra ⁽¹⁾. Em Portugal, apesar de haver uma produção modesta, o consumo de chá tem vindo a assumir uma tendência crescente. A produção nacional de chá está localizada principalmente nos Açores, na ilha de São Miguel ⁽¹⁾.



De entre os principais tipos de chá consumidos destacam-se os chás preto, branco, oolong, puerh e verde (2). Contudo, e como consequência das tendências dos últimos anos de promoção de hábitos saudáveis, o consumo de chá verde tem adquirido particular destaque, devendo-se essencialmente aos seus potenciais efeitos benéficos para a saúde (3). De entre estes efeitos, encontram-se a redução da ocorrência de doença cardiovascular (4), utilização enquanto estimulante, regulação da temperatura corporal e atividade antimicrobiana (5), regulação da glicémia e promoção da digestão (6). Estes efeitos foram associados a alguns dos componentes do chá verde como as vitaminas, microelementos, óleos essenciais e polifenóis (7). Os polifenóis têm despertado particular interesse dado o seu potencial benéfico para a saúde (e.g. capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antimutagénica, antibacteriana), sendo que as catequinas e os flavonóides são os que apresentam maior relevância (8,9).

Apesar de poderem ser encontradas em diferentes alimentos, a principal fonte alimentar de catequinas é o chá verde (10). Considerando as suas propriedades antioxidantes, estes compostos poderão desempenhar um papel importante na prevenção de doenças cuja patogénese esteja associada a stress oxidativo (11). Contudo, nos extratos de chá verde, a principal catequina habitualmente presente, epigallocatequina-3-galato (EGCG), tem sido associada a efeitos hepatotóxicos. A este respeito, a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, na sigla em inglês) reportou evidência científica de que uma ingestão igual ou superior a 800 mg/dia produziu um aumento estatisticamente significativo nas transaminases séricas num grupo de intervenção, quando comparado com o grupo controlo (12). Assim, apesar de todos os potenciais benefícios associados à ingestão destes compostos pelo consumo de chá verde, alguma moderação deverá ser considerada por forma a evitar as potenciais consequências adversas associadas a um elevado consumo.

Por outro lado, e considerando a forma como é produzido, o chá poderá ser contaminado por fungos habitualmente presentes no ambiente e, caso existam condições propícias, i.e. temperatura e humidade, poderão produzir micotoxinas

(toxinas produzidas por fungos). A produção de micotoxinas poderá ocorrer em qualquer fase da produção, desde o seu cultivo, colheita, processamento ou armazenamento (13). De entre as micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas e a ocratoxina A são as mais comumente encontradas em chás, apesar de outras micotoxinas também já terem sido identificadas, designadamente as fumonisinas, deoxinivalenol e as eniانتinas (14).

Neste contexto, o consumo de chá verde poderá estar associado a potenciais efeitos benéficos e adversos para a saúde, o que dificultará o estabelecimento de recomendações relativas ao seu consumo. Assim, a avaliação do risco-benefício, i.e., a avaliação combinada dos riscos e dos benefícios associados aos diferentes componentes do chá verde em análise, constitui uma ferramenta com significativa importância (15,16).

_Objetivos

O presente estudo teve como objetivo avaliar os riscos (devidos à ingestão de micotoxinas e níveis elevados de catequinas) e benefícios (pela ingestão moderada de catequinas) associados ao consumo de chá verde, por forma a sustentar futuras recomendações de consumo desta bebida em Portugal.

_Material e métodos

Um total de 20 amostras de chá verde (10 amostras de chá em saquetas, 10 amostras de chá a granel) foram adquiridas nas superfícies comerciais da região de Lisboa. As amostras consideradas apresentavam diferentes proveniências (China, Portugal (Açores), Inglaterra, Japão, Indonésia, Sri Lanka e Nepal). Os níveis de contaminação por micotoxinas foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, na sigla em inglês) com deteção por espectrometria de massa. Esta determinação considerou 38 micotoxinas e os seus metabolitos (15-Acetildeoxinivalenol, 3-Acetildeoxinivalenol, Aflatoxina B1 (AFB1), Aflatoxina B2, Aflatoxina G1, Aflatoxina G2, Aflatoxina M1, α -Zearalanol, α -Zearalenol, β -Zearalanol, β -Zearalenol, Deepoxideoxinivalenol, Deoxinivalenol, Diacetoxiscirpenol, DON-3- Gluco-



sídeo, Fumonisina B1 (FB1), Fumonisina B2, Fumonisina B3, Fusarenona-X, Gliotoxina, Griseofulvina, Toxina HT-2, Mevinolina, Moniliformina, Monoacetoxiscirpenol, Ácido micofenólico, Neosolaniol, Nivalenol, Ocratoxina A, Ocratoxina B, Patulina, Roquefortina C, Esterigmatocistina (STER), T-2 Tetraol, Toxina T-2, T-2 Triol, Zearalanona, Zearalenona), conforme descrito em Assunção *et al.* (17).

A ingestão atual de micotoxinas e de catequinas (particularmente EGCG) em Portugal através do consumo de chá verde foi estimada considerando: i) os dados de contaminação do chá verde por micotoxinas resultantes da análise das amostras colhidas na região de Lisboa (foram considerados apenas os resultados com valores quantificáveis); ii) os níveis de EGCG presentes no chá verde (de acordo com os valores reportados pela EFSA (12)); e iii) os dados de consumo de chá verde pela população adulta (de acordo com os valores reportados pela EFSA (12)).

De forma a avaliar potenciais cenários alternativos que possam sustentar o estabelecimento de recomendação futuras de consumo de chá verde, foram considerados diferentes cenários hipotéticos de consumo diário crescente de chá verde (de 1 a 10 chávenas por dia).

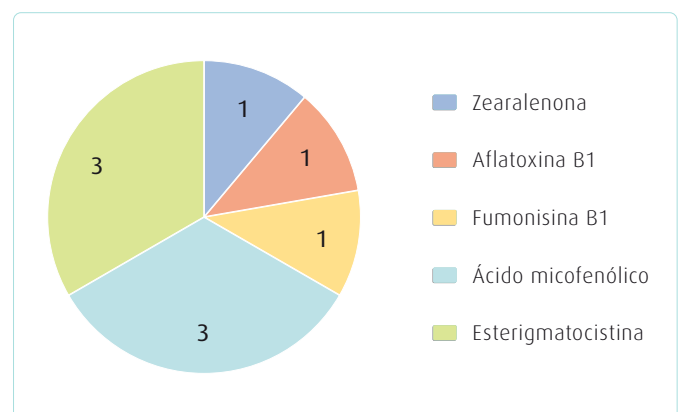
Para determinar se cada cenário apresenta risco ou benefício para o consumidor, foram consideradas três abordagens diferentes: i) para o EGCG, os valores de ingestão estimados foram comparados com o valor estabelecido para o qual não é expectável hepatotoxicidade (<800 mg de EGCG por dia) (12); ii) para as micotoxinas carcinogénicas, foi considerada a margem de exposição (MOE, *i.e.* rácio entre o valor inferior do intervalo de confiança da dose necessária para aumentar o efeito de interesse em 10% (BMDL10) e a exposição); e iii) para as micotoxinas não carcinogénicas, o quociente de perigo (HQ, *i.e.* rácio entre a exposição estimada e a dose diária tolerável (TDI)). Todos os cálculos foram realizados utilizando o software Microsoft® Excel 2016.

_Resultados

Contaminação das amostras de chá verde por micotoxinas

As amostras de chá verde consideradas (n=20) foram analisadas para a presença e quantificação dos níveis de contaminação por micotoxinas. Nas amostras de chá obtidas a granel, cinco das 10 amostras apresentaram níveis detetáveis (acima do limite de deteção) de micotoxinas (50%), e destas, três amostras apresentaram valores quantificáveis (acima do limite de quantificação) das micotoxinas analisadas. O gráfico 1 apresenta a frequência com que as diferentes micotoxinas foram detetadas nas amostras a granel. A esterigmatocistina e o ácido micofenólico foram as micotoxinas mais frequentemente detetadas, e no máximo foram identificadas três micotoxinas simultaneamente na mesma amostra. Nas amostras de chá em saquetas, apenas o ácido micofenólico foi detetado em seis amostras (60%), sendo que esta micotoxina foi quantificável em cinco delas.

Gráfico 1: ▽ Frequência de deteção (acima do limite de deteção) de micotoxinas em amostras de chá verde obtidas a granel.



Determinação da ingestão estimada de micotoxinas e catequinas

A tabela 1 apresenta, de forma sumária, a ingestão estimada das micotoxinas quantificadas nas amostras de chá consideradas e de EGCG através do consumo de chá verde. Os valores apresentados correspondem à situação atual (ou seja, correspondendo ao consumo atual de chá em Portugal) e aos cenários alternativos (de 1 chávena até 10 chávenas por dia).



Tabela 1: ↓ Ingestão estimada de micotoxinas e catequinas e o risco associado.

Consumo de chá verde (g/dia)		Ingestão estimada de micotoxinas (ng/kg peso/dia) e catequinas (mg/dia)					Risco estimado associado à exposição a micotoxinas e catequinas				
Atual ^a		AFB1	FB1	ZEA	STER	EGCG ^c	AFB1 ^d	FB1 ^e	ZEA ^e	STER ^d	EGCG ^f
Mínimo	122,8	0,00002	0,0005	0,0003	0,00002	86,0	17445715	0,000005	0,000001	6978285900	11
Máximo	458,9	0,00009	0,0019	0,0011	0,00009	321,2	4669857	0,000019	0,000004	1867942679	40
Hipotético ^b											
1 cháv./dia	150	0,00003	0,0006	0,0004	0,00003	105	14285714	0,000006	0,000001	5714285714	13
2 cháv./dia	300	0,00006	0,0013	0,0007	0,00006	210	7142857	0,000013	0,000003	2857142857	26
3 cháv./dia	450	0,00008	0,0019	0,0011	0,00008	315	4761905	0,000019	0,000004	1904761905	39
4 cháv./dia	600	0,00011	0,0025	0,0014	0,00011	420	3571429	0,000025	0,000006	1428571429	53
5 cháv./dia	750	0,00014	0,0032	0,0018	0,00014	525	2857143	0,000032	0,000007	1142857143	66
6 cháv./dia	900	0,00017	0,0038	0,0022	0,00017	630	2380952	0,000038	0,000009	952380952	79
7 cháv./dia	1050	0,00020	0,0044	0,0025	0,00020	735	2040816	0,000044	0,000010	816326531	92
8 cháv./dia	1200	0,00022	0,0050	0,0029	0,00022	840	1785714	0,000050	0,000011	714285714	105
9 cháv./dia	1350	0,00025	0,0057	0,0032	0,00025	945	1587302	0,000057	0,000013	634920635	118
10 cháv./dia	1500	0,00028	0,0063	0,0036	0,00028	1050	1428571	0,000063	0,000014	571428571	131

Os valores identificados a negrito correspondem a valores de ingestão acima dos limites considerados seguros. O código de cores utilizado evidencia o nível de preocupação relativamente a potenciais efeitos para a saúde (verde = sem risco significativo; vermelho = com risco significativo). Não foi efetuada a avaliação do risco associado à exposição ao ácido micofenólico por inexistência de dados toxicológicos.

^a EFSA, 2018 ⁽¹²⁾; ^b Cenários de consumo hipotéticos. 1 cháv./dia = 1 chávina por dia = 150 g; ^c Níveis de EGCG de acordo com EFSA, 2018 ⁽¹²⁾; ^d Margem de Exposição (MOE) = BMDL10/Exposição; ^e Quociente de perigo (HQ) = Ingestão/Valores de referência; ^f Percentagem de ingestão de EGCG comparada com o nível considerado de hepatotoxicidade ⁽¹²⁾; AFB1 = aflatoxina B1; FB1 = fumonisins B1; ZEA = zearalenona; STER = esterigmatocistina; EGCG = epigalocatequina-3-galato.

Na situação atual, verificou-se uma ingestão de micotoxinas estimada entre 0,00002 (para a AFB1 e STER) e 0,0019 (FB1) ng/kg peso/dia. Para os cenários alternativos, a ingestão estimada mais elevada foi determinada para a FB1. Relativamente ao risco associado, nenhum dos níveis de exposição associados aos cenários considerados demonstrou risco considerável para a saúde.

Relativamente às catequinas, a ingestão de EGCG na situação atual foi estimada entre 86,0 e 321,2 mg/dia. Nos cenários alternativos, o consumo de sete chávenas de chá verde por dia corresponde a uma ingestão de EGCG superior ao limite estabelecido pela EFSA e considerado como potencial indutor de hepatotoxicidade.

_Discussão

No presente estudo, o balanço entre os riscos (associados à ingestão de micotoxinas e elevados níveis de EGCG) e benefícios (relacionados com uma ingestão moderada de EGCG) devidos ao consumo de chá verde foram avaliados, num exercício de contribuir para o futuro estabelecimento de recomendações de consumo, maximizando os potenciais efeitos benéficos.

De acordo com os resultados obtidos, o fator limitante do aumento do consumo de chá verde em Portugal relaciona-se com os potenciais efeitos adversos associados à ingestão elevada de EGCG (>800 mg/dia) ⁽¹²⁾. Ainda assim,



considerando o consumo atual de chá verde, há margem para aumentar o seu consumo em Portugal, de forma segura e maximizando os potenciais efeitos benéficos para a saúde, até sete chávenas por dia.

_Conclusões

Considerando os potenciais efeitos benéficos para a saúde associados ao consumo de chá verde, os resultados obtidos no presente estudo estabelecem a base para investigação futura que suporte a definição de recomendações de consumo de chá verde. Assim, iniciativas de investigação futura neste domínio deverão dedicar-se a providenciar evidência científica, através do desenvolvimento de uma avaliação do risco-benefício completa, e desta forma, robustecendo futuras ações que salvaguem a saúde da população.

Financiamento:

Os autores gostariam de agradecer ao Instituto Politécnico de Lisboa, Portugal, pelo financiamento ao projeto “*Resistant mycobiota and mycotoxigenic profile of tea and medicinal plants*” (IPL/2020/TEAResMyc_ESTeSL); ao *Polish Minister of Science and Higher Education*, através do programa “*Regional Initiative of Excellence*” em 2019-2022 (Grant No. 008/RID/2018/19); à FCT/MCTES pelo financiamento com fundos nacionais ao H&TRC (UIDB/05608/2020+UIDP/05608/2020) e ao CESAM (UIDP/50017/2020+UIDB/50017/2020). R.A. agradece pelo *FCT Individual CEEC 2018 Assistant Researcher Grant* CEECIND/01570/2018.

Referências bibliográficas:

- (1) Silva RME. O Chá em Portugal: História e Hábitos de Consumo Universidade do Minho, Braga; 2014. <http://hdl.handle.net/1822/33070>
- (2) Sedova I, Kiseleva M, Tutelyan V. Mycotoxins in Tea: Occurrence, Methods of Determination and Risk Evaluation. *Toxins (Basel)*. 2018 Oct 30;10(11):444. <http://www.mdpi.com/2072-6651/10/11/444>
- (3) Dufresne CJ, Farnworth ER. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem*. 2001 Jul;12(7):404-21. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955286301001553>
- (4) Dogra D, Ahuja S, Krishnan S, et al. In vitro cardioprotective effect of Indian *Camellia sinensis* extract against hydrogen peroxide induced hypertrophy. *J Pharm Res*. 2011;4(6):1877-9. <http://jprsolutions.info/newfiles/journal-file-56ded45e69b786.56476720.pdf>
- (5) Kubo I, Muroi H, Himejima M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. *J Agric Food Chem*. 1992 Feb 1;40(2):245-8. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00014a015>
- (6) A. Samali. Qualitative and quantitative evaluation of some herbal teas commonly consumed in Nigeria. *African J Pharm Pharmacol*. 2012 Feb 15;6(6):384-88. <http://dx.doi.org/10.5897/AJPP11.658>
- (7) Sereshti H, Samadi S, Jalali-Heravi M. Determination of volatile components of green, black, oolong and white tea by optimized ultrasound-assisted extraction-dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2013 Mar 8;1280:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.029>
- (8) Abd El-Aty AM, Choi J-H, Rahman MM, et al. Residues and contaminants in tea and tea infusions: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2014;31(11):1794-804. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.958575>
- (9) Zhang L, Zhang Z, Zhou Y, et al. Chinese dark teas: Postfermentation, chemistry and biological activities. *Food Res Int*. 2013 Oct;53(2):600-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.016>
- (10) Bernatoniene J, Kopustinskiene D. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molecules*. 2018 Apr 20;23(4):965. <https://doi.org/10.3390/molecules23040965>
- (11) Braicu C, Ladomery MR, Chedea VS, et al. The relationship between the structure and biological actions of green tea catechins. *Food Chem*. 2013 Dec;141(3):3282-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.122>
- (12) Younes M, Aggett P, Aguilar F, et al. Scientific opinion on the safety of green tea catechins. *EFSA J*. 2018 Apr;16(4): e05239. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5239>
- (13) Viegas C, Sá F, Mateus M, et al. Commercial green tea from Portugal: Comprehensive microbiologic analyses. *Int J Food Microbiol*. 2020 Nov;333:108795. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108795>
- (14) Haas D, Pfeifer B, Reiterich C, et al. Identification and quantification of fungi and mycotoxins from Pu-erh tea. *Int J Food Microbiol*. 2013 Sep;166(2):316-22. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.024>
- (15) Assunção R, Pires S, Nauta M. Risk-Benefit Assessment of Foods. *EFSA J*. 2019 Sep;17(S2): e170917. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.e170917>
- (16) Assunção R, Alvim P, Brazão R, et al. Building capacity in risk-benefit assessment of foods: Lessons learned from the RB4EU project. *Trends Food Sci Technol*. 2019 Sep;91:541-8. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.028>
- (17) Assunção R, Twaruzek M, Kosicki R, et al. Drinking Green Tea: Despite the Risks Due to Mycotoxins, Is It Possible to Increase the Associated Health Benefits? *Toxins (Basel)*. 2021 Feb 5;13(2):119. <https://doi.org/10.3390/toxins13020119>



__Potencial alérgico do superalimento bagas goji

Allergic potential of Goji berry superfood

Sandrina Teixeira^{1,3}, Inês M. Luís^{2,4}, M. Margarida Oliveira^{2,4}, Isabel A. Abreu^{2,4}, Rita Batista^{1,4}

rita.batista@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Instituto de Tecnologia Química e Biológica António Xavier, Universidade NOVA de Lisboa, Oeiras, Portugal

(3) Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

(4) GREEN-IT Bioresources for Sustainability Research Unit

__Resumo

A classificação das bagas goji como superalimento, devido essencialmente à sua composição em compostos bioativos, levou a um enorme aumento do seu consumo nos países ocidentais. Apesar de todos os seus benefícios, as bagas goji comportam alguns riscos, nomeadamente o de alergia. Neste estudo pretendemos caracterizar as proteínas (proteoma) das bagas goji (*Lycium barbarum*) e identificar aquelas envolvidas na reação alérgica (aquelas que se ligam às imunoglobulinas de tipo E- IgE). Assim, primeiramente procedemos à separação das proteínas das bagas goji por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, seguida da sua identificação por espectrometria de massa. Subsequentemente, testámos a reatividade de indivíduos alérgicos ao tomate e batata (alimentos da mesma família das bagas goji, *Solanaceae*) contra as proteínas das bagas goji realizando para tal um ensaio de *Western blot*. Realizámos também um ensaio de inibição onde a reatividade cruzada entre as bagas goji e o tomate e a batata foi avaliada. Finalmente, caracterizámos as proteínas de ligação às IgE realizando para tal um ensaio de *Western blot* com plasmas de indivíduos alérgicos à batata e tomate, após separação das proteínas das bagas goji por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida. Foram identificados por espectrometria de massa 93, dos 180, spots retirados do gel, correspondendo a 29 funções proteicas. Destas, 11 corresponderam a proteínas de ligação às IgE. Demonstrámos igualmente, neste estudo, existir reatividade cruzada entre as bagas goji, o tomate e a batata.

__Abstract

Goji berries' bioactive compounds, which allowed classifying them as superfruits, led to an enormous increase of its consumption in western countries. However, the potential risk of allergy is a concern. In this study, we aimed to characterize the proteome of goji berries (*Lycium barbarum*) and identify proteins with putative role in the allergic reaction (IgE-binding proteins). We firstly used two dimensional (2D) gel electrophoresis followed by mass spectrometry (MS) to characterize goji berries' proteome, and then Immunoblot reactivity with plasma from tomato and potato (same botanical family, *Solanaceae*) allergic individuals was assessed to characterize goji berries IgE-binding proteins. An inhibition assay was further performed to evaluate cross-reactivity among potato, tomato and goji berries. We significantly identified 93 out of the 180 MS analyzed spots, corresponding to 29 protein functions. From these, 11 could be identified as goji berries IgE-binding proteins. We further demonstrated cross-reactivity between goji berries, tomato and potato.

__Introdução

Os frutos da planta *Lycium barbarum*, também conhecidos como bagas goji, são consumidos em toda a Ásia e utilizados na medicina tradicional chinesa há mais de 2000 anos. As alterações nos hábitos alimentares das populações dos países ocidentais com um cada vez maior número de pessoas a procurarem alimentos tradicionais exóticos, levou à sua introdução, e aumento do seu consumo, nestes países.

Existem vários estudos que comprovam as propriedades benéficas das bagas goji, nomeadamente hipoglicemiantes, antilipídicas, protetoras das células da retina, imunostimuladoras, anticarcinogénicas e antioxidantes (1-5). Estas propriedades têm sido atribuídas a uma elevada concentração de nutrientes com uma alta atividade biológica tais como polissacáridos complexos, carotenoides e fenilpropenoides (6). As bagas goji contêm também outros nutrientes importantes, tais como vitaminas C, B1 e B2 e pelo menos 16 aminoácidos diferentes (7). São também muito ricas em minerais como o potássio, sódio, fósforo, magnésio (8) e, embora em quantidades mais pequenas, também contêm cobre e ferro (9). As suas propriedades promotoras de saúde levaram a que muitos as classificassem de superalimento. No entanto, o consumo destas bagas também acarreta alguns riscos, nomeadamente a potencial interação com anticoagulantes (10), a hepatotoxicidade (11), a promoção de fotossensibilidade sistémica (12) e a potencial alergenicidade (13). Embora não existam muitos estudos acerca da potencial alergenicidade das bagas goji, alguns autores relatam reações positivas após testes cutâneos com extratos proteicos de bagas goji, reatividade cruzada entre as proteínas das bagas goji e anticorpos de indivíduos alérgi-



cos a pêsego, tomate, tabaco e ao pólen de *Artemisia* sp., e uma proteína de transporte de lípidos (lipid transfer protein - LTP) como o alergénio principal envolvido na sensibilização e reatividade cruzada (14,15).

_Objetivo

Este estudo teve como objetivo não só caracterizar o proteoma das bagas goji (*Lycium barbarum*), mas também contribuir para o conhecimento das proteínas que estão envolvidas na reação alérgica a este superalimento.

_Materiais e métodos

Este trabalho comportou diferentes fases:

1ª fase – Otimização da extração proteica

Nesta fase testámos 6 métodos diferentes para a extração das proteínas das bagas goji.

2ª fase – Caracterização do proteoma das bagas goji

Utilizámos o método de extração proteica escolhido na primeira fase (precipitação direta em ácido tricloroacético/acetona, seguida de uma extração fenólica e limpeza do extrato obtido com o “2D clean-up kit” da GE Healthcare), separámos, as proteínas extraídas, por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida e caracterizámos o proteoma das bagas goji por espectrometria de massa (180 spots analisados).

3ª fase – Prova da reatividade cruzada entre o tomate e a batata, e as bagas goji

Como não existem, em comercialização, plasmas de indivíduos com alergia comprovada às bagas goji, nesta fase, pretendemos saber se indivíduos alérgicos a alimentos da mesma família (tomate e batata- família das *Solanaceae*) reagiriam também contra as bagas goji. Só assim poderíamos avançar para a fase seguinte. Realizámos assim um ensaio de *Western blot*, após separação das proteínas das bagas goji por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida, com plasmas de 4 indivíduos com alergia comprovada ao tomate e batata. Nesta fase fizemos também um ensaio de inibição para comprovar a reatividade cruzada entre o tomate e a batata, e as bagas goji.

4ª fase – Caracterização das proteínas envolvidas na reação alérgica às bagas goji

Realizámos um ensaio de *western blot* após separação das proteínas das bagas goji por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida com os mesmos plasmas utilizados na fase anterior. As proteínas que se ligaram às Imunoglobulinas de tipo E (IgE) dos indivíduos em teste foram identificadas por espectrometria de massa.

_Resultados e discussão

Caracterização do proteoma das bagas goji

Tanto no caso da separação proteica por electroforese unidimensional em gel de poliacrilamida, como no caso da electroforese bidimensional verifica-se uma distribuição das proteínas ao longo dos vários pesos moleculares. No entanto, as bandas (gel unidimensional)/ spots (gel bidimensional) mais intensos estão concentrados maioritariamente nas regiões de 20, 34, 42-48 e 54-70 kDa.

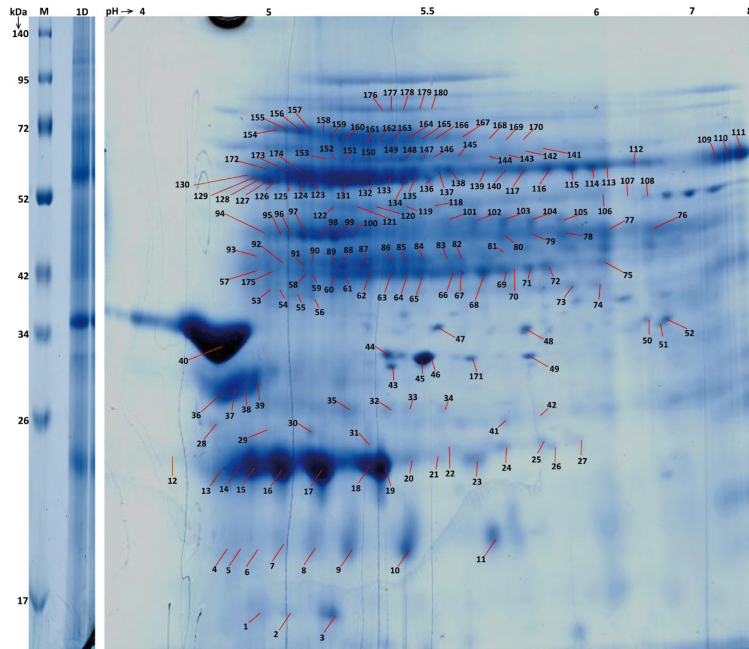
Dos 180 spots analisados por espectrometria de massa (figura 1), 93 apresentaram identificação significativa, correspondendo a 29 funções proteicas diferentes.

Reatividade cruzada entre o tomate e a batata, e as bagas goji

Todos os plasmas em teste, correspondentes a indivíduos com alergia comprovada ao tomate e batata apresentaram IgE contra proteínas das bagas goji. A inibição da ligação entre as IgE existentes no plasma do indivíduo 1 e as proteínas das bagas goji transferidas para uma membrana de nitrocelulose, após pré incubação com extratos proteicos de tomate ou batata contendo 1mg de proteínas, provou a existência de reatividade cruzada entre as bagas goji e estes alimentos. Isto significa que existem proteínas nas bagas goji com estrutura e/ou conformação semelhantes àquelas existentes no tomate e batata que são responsáveis pela reação alérgica dos indivíduos em teste (contra as quais os indivíduos em teste produziram IgE específicas) (figura 2).

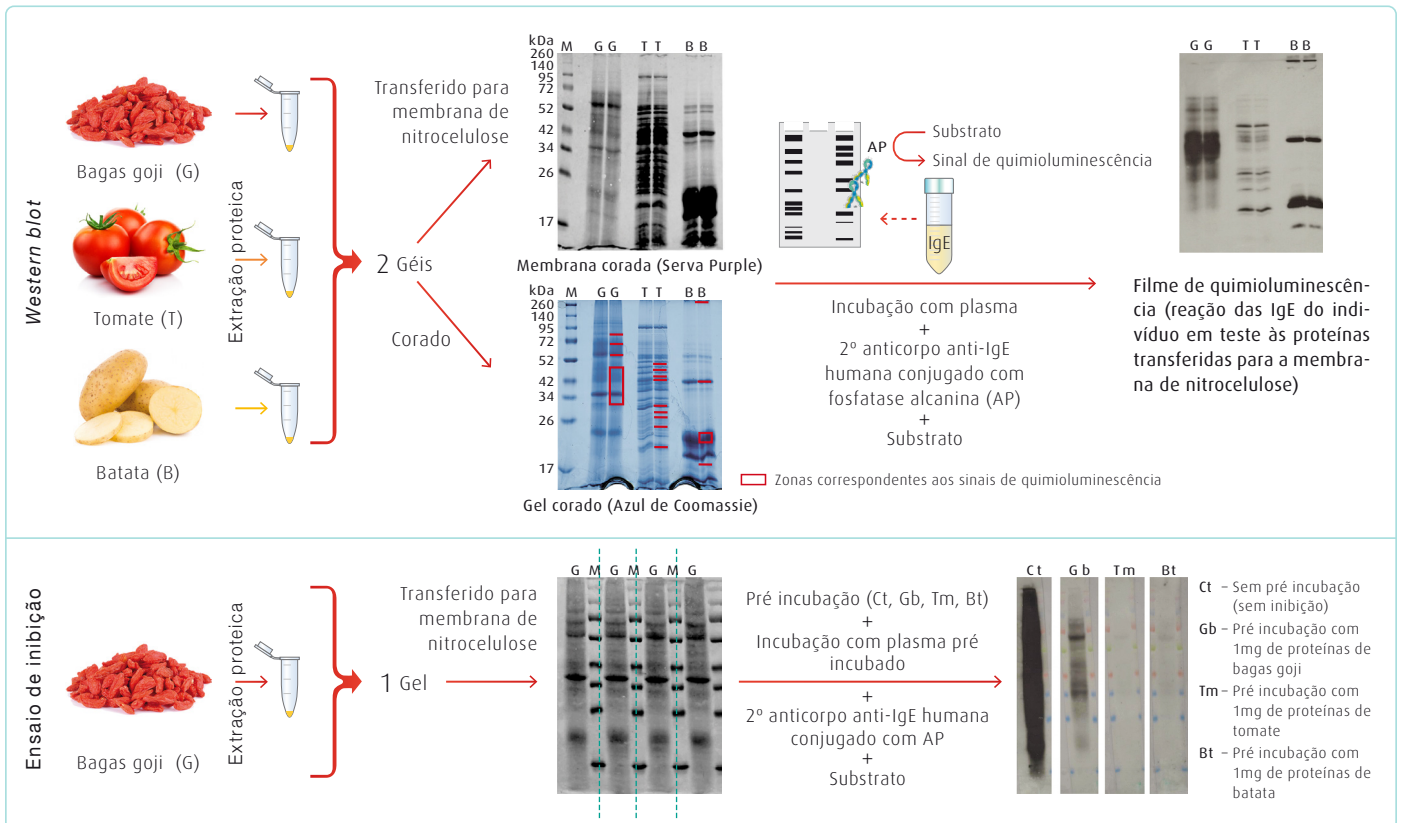


Figura 1: ⬇ Eletroforese unidimensional (1D) e bidimensional das proteínas das bagas goji.



No gel bidimensional estão identificados os spots enviados para identificação por espectrometria de massa (180 spots).
kDa – Quilodaltons; M – Marcador de pesos moleculares. Géis com 11% de poliacrilamida.

Figura 2: ⬇ Western blot e Ensaio de inibição que provam existir reatividade cruzada entre as bagas goji e o tomate e batata (exemplo para o indivíduo 1, com alergia comprovada ao tomate (33,2 kU IgE/L) e batata (30,8 kU IgE/L)).



M – Marcador de pesos moleculares; G – Extrato proteico de bagas goji; T – Extrato proteico de tomate; B – Extrato proteico de batata; kDa – Quilodaltons.



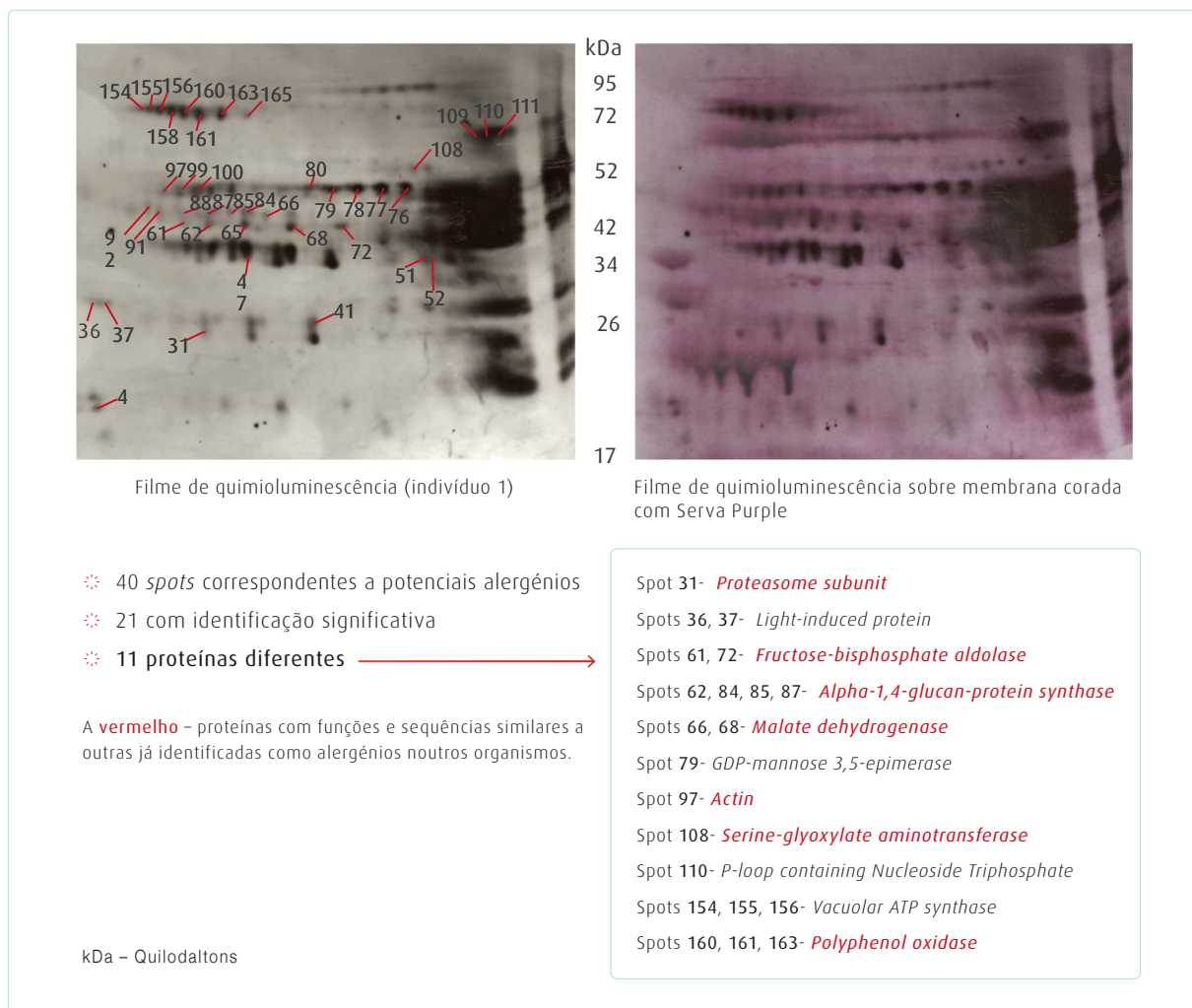
Caracterização das proteínas envolvidas na reação alérgica às bagas goji

No ensaio de *Western Blot* realizado para a caracterização das proteínas das bagas goji foi possível relacionar os sinais de quimioluminescência obtidos, com 40 spots do gel, 21 dos quais com identificação significativa por espectrometria de massa. As identificações significativas obtidas correspondem a proteínas com 11 funções diferentes, sete das quais já identificadas como potenciais alergênicos noutros organismos (base de dados *Allergome*) e quatro pela primeira vez reportadas como potenciais alergênicos (figura 3). Relativamente aos alergênicos com seqüências proteicas semelhantes àquelas já reportadas na base de dados *Allergome*, verificámos

que alguns foram identificados no pólen e no látex, o que poderá indicar uma possível reatividade cruzada entre as proteínas das bagas goji e anticorpos presentes no plasma de indivíduos com alergia ao látex (síndrome látex-alimento) (16) e/ou com alergia ao pólen (Síndrome de alergia oral) (17). A possível reatividade cruzada entre os alergênicos das bagas goji e anticorpos presentes no plasma de indivíduos alérgicos ao látex já foi reportada por outros (18).

De realçar que nenhuma das 11 proteínas que se ligaram às IgE dos indivíduos em teste, foi, até à data, reportada como potencial alergénio na família das *Solanaceae* e, consequentemente, nenhuma foi alguma vez reportada como potencial alergénio de *Lycium barbarum*. Na base de dados *Allergome*

Figura 3: ⬇ Ensaio de *Western blot* para caracterização das proteínas envolvidas na reação alérgica (exemplo para o indivíduo 1).





estão, no entanto, reportados 37 potenciais alergénios para a família das *Solanaceae*, 3 dos quais de *Lycium barbarum*: uma proteína de transporte de lípidos (Lyc ba 3); uma enolase (Lyc ba Enolase) e uma glucosidase (Lyc ba Glucosidase). Como já referido o alergénio Lyc ba 3, que corresponde a uma proteína de transporte de lípidos (LTP- lipid transfer protein) com 7-9 kDa de peso molecular foi descrita como o alergénio principal de *Lycium barbarum*, (13-15) no entanto nenhum dos indivíduos testados neste estudo reagiu contra esta proteína. Como utilizámos neste estudo géis com 11% de acrilamida, por verificarmos serem os mais indicados para a visualização dos spots na área de pesos moleculares onde os alergénios estão mais concentrados (30-52 kDa), pensámos que provavelmente teríamos perdido esta proteína durante a separação por eletroforese. No entanto repetimos o ensaio de *Western* apresentado na figura 2, utilizando géis com 15% de acrilamida e continuámos a não detetar qualquer tipo de sinal na zona dos 7-9 kDa, o que mostrou que, ou os indivíduos em teste não reagiram contra esta proteína ou o método de extração utilizado não foi eficiente para a sua extração.

Conclusão

Este estudo contribuiu para a caracterização do proteoma das bagas goji, com a identificação de 93 dos 180 spots separados por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, correspondendo a 29 funções proteicas. Para além disso, foram identificados, na família das *Solanaceae*, pela primeira vez, 11 novos potenciais alergénios, quatro dos quais nunca reportados na base de dados *Allergome*. Provámos também, com este estudo, existir reatividade cruzada entre os alergénios das bagas goji e anticorpos existentes no plasma de indivíduos com alergia ao tomate e/ou batata.

Os resultados pormenorizados deste trabalho estão compilados num artigo publicado em 2019 (19).

Referências bibliográficas:

- (1) Luo Q, Cai Y, Yan J, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sci*. 2004 Nov 26;76(2):137-49. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.04.056>
- (2) Hu CK, Lee YJ, Colitz CM, et al. The protective effects of *Lycium barbarum* and *Chrysanthemum morifolium* on diabetic retinopathies in rats. *Vet Ophthalmol*. 2012 Sep;15 Suppl 2:65-71. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2012.01018.x>
- (3) Deng X, Li Q, Fu Y, et al. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharides with different molecular weights on function of RAW264.7 macrophages. *Food Agric Immunol*. 2018;29(1):808-20. <https://doi.org/10.1080/09540105.2018.1457628>
- (4) Tang WM, Chan E, Kwok CY, et al. A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit. *Inflammopharmacology*. 2012 Dec;20(6):307-14. <https://doi.org/10.1007/s10787-011-0107-3>
- (5) Xiao J, Liong EC, Ching YP, et al. *Lycium barbarum* polysaccharides protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and necroinflammation. *J Ethnopharmacol*. 2012 Jan 31;139(2):462-70. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.033>
- (6) Qian D, Zhao Y, Yang G et al. Systematic Review of Chemical Constituents in the Genus *Lycium* (Solanaceae). *Molecules*. 2017 Jun 8;22(6):911. <https://doi.org/10.3390/molecules22060911>
- (7) Guo M, Shi T, Duan Y, et al. Investigation of amino acids in wolfberry fruit (*Lycium barbarum*) by solid-phase extraction and liquid chromatography with precolumn derivatization. *J Food Compos Anal*. 2015;42:84-90. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.03.004>
- (8) Llorent-Martínez EJ, de Córdova MLF, Ortega-Barrales P, et al. Characterization and comparison of the chemical composition of exotic superfoods. *Microchem J*. 2013;110:444-51. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.05.016>
- (9) Nascimento NA, Silvestre DM, Leme FO, et al. Elemental analysis of goji berries using axially and radially viewed inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Spectroscopy*. 2015;30(1):36-41. <https://www.spectroscopyonline.com/view/elemental-analysis-goji-berries-using-axially-and-radially-viewed-inductively-coupled-plasma-optical>
- (10) Leung H, Hung A, Hui AC et al. Warfarin overdose due to the possible effects of *Lycium barbarum* L. *Food Chem Toxicol*. 2008 May;46(5):1860-2. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.008>
- (11) Arroyo-Martínez Q, Sáenz MJ, Arquélles Arias F, et al. *Lycium barbarum*: A new hepatotoxic "natural" agent? *Dig Liver Dis*. 2011 Sep;43(9):749. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2011.04.010>
- (12) Gómez-Bernal S, Rodríguez-Pazos L, Martínez FJ, et al. Systemic photosensitivity due to goji berries. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2011 Oct;27(5):245-7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2011.00603.x>
- (13) Ballarín SM, López-Matas MA, Sáenz Abad D, et al. Anaphylaxis Associated with the Ingestion of goji berries (*Lycium barbarum*). *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2011;21(7):567-70. <http://www.jiaci.org/issues/vol21issue7/12.pdf>
- (14) Carnés J, Larramendi CH, Ferrer A, et al. Recently introduced foods as new allergenic sources: Sensitisation to goji berries (*Lycium barbarum*). *Food Chem*. 2013 Apr 15;137(1-4):130-5. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.00>
- (15) Larramendi CH, García-Abujeta JL, Vicario S, et al. Goji berries (*Lycium barbarum*): Risk of allergic reactions in individuals with food allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2012;22(5):345-50. <http://www.jiaci.org/issues/vol22issue5/4.pdf>
- (16) Blanco C. Latex – fruit syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2003 Jan;3(1):47-53. <https://doi.org/10.1007/s11882-003-0012-y>
- (17) Price A, Ramachandran S, Smith GP, et al. Oral allergy syndrome (pollen-food allergy syndrome). *Dermatitis*. 2015;26(2):78-88. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000087>
- (18) Gámez C, Marchán E, Miguel L, et al. Goji berry: A potential new player in latex-food syndrome *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013 Mar;110(3):206-7. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2012.12.012>
- (19) Teixeira S, Luís IM, Oliveira MM, et al. Goji berries superfood – contributions for the characterization of proteome and IgE binding proteins. *Food Agric Immunol*. 2019;30(1):262-80. <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1577364>



Efeito da sazonalidade no teor de selénio e outros micronutrientes na cavala da costa portuguesa

Effect of seasonality on the content of selenium and other micronutrients in mackerel from the Portuguese Coast

Andreia Rego, Sandra Gueifão, Marta Ventura, Inês Delgado, Ana Cláudia Nascimento, Susana Santiago, Carla Motta, Inês Coelho, Isabel Castanheira

andreia.rego@insa.min-saude.pt

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

_Resumo

A cavala é uma das espécies de peixe mais abundantes em Portugal, sendo muito rica em diversas vitaminas e micronutrientes. Entre os micronutrientes existentes neste alimento destaca-se o selénio (Se), essencial para o ser humano, mas que se pode tornar tóxico quando ingerido acima da dose diária recomendada. Sendo parte integrante de um conjunto de proteínas com ação antioxidante (as selenoproteínas) um aporte adequado de Se conduz a um melhor desempenho do sistema imunitário, com repercussões positivas no tratamento e/ou prevenção do cancro ou no retardar do desenvolvimento de doenças degenerativas, como o Alzheimer. O organismo humano não sintetiza o selénio sendo a alimentação a fonte que mais contribui para o aporte diário deste elemento. Neste estudo, pretendeu-se estudar o teor de selénio, e de outros micronutrientes, em cavalas da costa portuguesa. Esta análise foi realizada mensalmente, entre março de 2019 e fevereiro de 2020, sendo o Se determinado por espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS), e os restantes micronutrientes (Zn, Fe, Mg, Cu, K, P) por espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Concluiu-se que a ordem de concentração dos elementos estudados foi estabelecida como $K > P > Na > Mg > Fe > Zn$. Relativamente à concentração de Se, e por utilização do teste LSD, foram identificadas algumas diferenças significativas ao longo do ano, variando esta entre 451 e 606 $\mu\text{g/ml}$, excluindo o mês de maio que foi considerado um *outlier*. Contudo, este resultado poderá dever-se aos hábitos alimentares da cavala e época de desova, pelo que serão necessários mais anos de estudo, de modo, a se verificarem estas conclusões preliminares.

_Abstract

Mackerel is one of Portugal's most abundant fish species, being very rich in several vitamins and micronutrients. Among the micronutrients in this food, selenium (Se) stands out, essential for humans, but can become toxic when ingested above the recommended daily dose. As an integral part of a set of proteins with antioxidants action (selenoproteins), an adequate intake of Se leads to a better performance of the immune system, with positive repercussions in the treatment and/or prevention of cancer or in delaying the development of degenerative diseases, such as Alzheimer's. The human organism does not synthesize selenium, so the source that most contributes to this element's daily supply is food. This study intended to evaluate the content of selenium and other micronutrients in mackerel from the Portuguese coast. This analysis was carried out monthly, between March 2019 and February 2020, with the

Se being determined by mass spectrometry coupled to inductive plasma (ICP-MS), and the remaining micronutrients (Zn, Fe, Mg, Cu, K, P) by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). It was concluded that the order of concentration of the studied elements was established as $K > P > Na > Mg > Fe > Zn$. Regarding Se content, by the LSD test, some significant differences were identified throughout the year, varying between 451 and 606 $\mu\text{g} / \text{ml}$, excluding May, which was considered an outlier. However, this result may be due to the mackerel's eating habits and spawning season. More years have to be evaluated to verify these preliminary conclusions.

_Introdução

A cavala é uma das espécies de peixe mais abundante em Portugal, estando disponível todo o ano. Alguns estudos realizados deixam antever a importância da cavala a nível nutricional (1,2). Este peixe é rico em diversas vitaminas e micronutrientes, entre os quais o selénio (Se) e outros minerais. Contudo, apesar do seu alto valor nutricional e da sua abundância no oceano ainda é uma espécie pouco consumida pela população portuguesa.

Os minerais são uma das categorias de micronutrientes inorgânicos necessárias para a manutenção do organismo humano. Intervêm em diversas funções, incluindo na formação de dentes e ossos e no funcionamento do sistema nervoso, e são constituintes essenciais de fluidos biológicos e tecidos, bem como de componentes do sistema enzimático. As necessidades diárias variam consoante os elementos sendo alguns necessários em maiores quantidades, como por exemplo, o magnésio (Mg), o potássio (K), o fósforo (P) e o sódio (Na). Por outro lado, os oligoelementos, ou elementos traço, têm doses diárias recomendadas mais baixas, como é o caso do ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), e selénio (Se).



Embora estes últimos sejam necessários em menor quantidade, não são, por isso, menos importantes (3).

Os métodos mais adequados à determinação simultânea de minerais e oligoelementos são (4,5):

- ICP-MS – espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente, esta é a técnica instrumental ideal para estimar e quantificar elementos traço em matrizes alimentares;
- ICP-OES – espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente, esta técnica é usada para quantificar elementos que estão presentes em maior quantidade em matrizes alimentares;

Estes métodos destacam-se de outros por serem técnicas multielementares (deteção rápida e simultânea de vários elementos) e com elevada sensibilidade, refletida por baixos limites de deteção e quantificação.

Antes da análise instrumental é necessário um tratamento da amostra que assegure a sua solubilização e destruição completa da matéria orgânica presente, evitando interferências e bloqueios no sistema de introdução das amostras. Os métodos mais utilizados para esta etapa são a digestão húmida e a digestão assistida por micro-ondas (4).

O Se é um micronutriente essencial, tendo um papel essencial na ação antioxidante, protegendo o corpo contra o dano oxidativo. Este nutriente pode estar presente em diversas formas químicas, o que determina os seus efeitos biológicos. Pode ser encontrado nas suas espécies orgânicas, a selenocisteína e selenometionina, e espécies inorgânicas, o selenato e o selenito. No organismo humano o Se encontra-se maioritariamente incorporado em proteínas, principalmente através do aminoácido selenocisteína.

A dose de Se pode afetar diferentes funções biológicas associadas à imunidade, metabolismo energético, entre outras, que por sua vez podem conduzir ao aparecimento de algumas doenças por excesso de Se, como a Selenose, ou por deficiência de Se (Doença Kashin-Beck, doenças na tiroide) (6,7).

Um aporte adequado de Se pode conduzir a um melhor desempenho do sistema imunitário e a uma mais eficiente manutenção do equilíbrio redox, com implicações positivas por exemplo no tratamento e/ou prevenção do cancro ou no retardar do desenvolvimento de doenças do foro mental, como o Alzheimer, entre outras. O Se é também necessário para o sistema reprodutor (8,9).

Devido à proteína glutathiona peroxidase (GPx) e a muitas outras selenoproteínas, o Se é capaz de interagir com outros nutrientes que afetam o equilíbrio redox das células. Para além disso, o Se tem a capacidade de proteger determinados organismos contra a toxicidade provocada pelo mercúrio (10), cádmio, prata, chumbo e arsénio (11).

_Objetivo

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito da sazonalidade no teor de diversos micronutrientes na cavala. Sendo a cavala uma espécie predadora, o seu aporte nutricional poderá alterar, não só pelo seu desenvolvimento e biologia, como também pela dieta que tem disponível ao longo do tempo, sendo importante avaliar as diferenças que possam ocorrer.

_Materiais e métodos

As cavalas foram adquiridas em diversos estabelecimentos, de março de 2019 a fevereiro de 2020, e preparadas em 12 *pools* de 10 indivíduos, cada uma correspondendo a um mês de pesca.

O Se foi determinado por ICP-MS, e os restantes micronutrientes (Zn, Fe, Mg, Cu, K, P) por ICP-OES, após digestão ácida em bloco de grafite (Digiprep) (12).

Foi utilizada água ultrapura em todos os ensaios, produzida a partir de um sistema de purificação Milli-Q. Foram utilizados padrões e reagentes com grau analítico adequado para a determinação de elementos traço. Para garantir a qualidade dos resultados, por cada digestão foi analisada uma amostra e um branco tendo todas as amostras sido digeridas em triplicado. As curvas de calibração foram preparadas com cinco padrões de diferentes concentrações,



sendo aceites apenas curvas com um coeficiente de correlação superior a 0,9995. Para assegurar a exatidão dos resultados foram usadas amostras fortificadas e um material de referência certificado de músculo de peixe (ERM – BB422). Todas as análises realizadas cumprem os requisitos da norma ISO 17025:2017 (13).

De modo a completar o estudo e a se ter uma visão mais ampla na análise dos resultados, foi calculada a variabilidade que ocorreu em cada mês e a variabilidade do grupo de dados no elemento da seguinte forma, respetivamente:

$$\text{Variação entre meses (\%)} = \frac{\text{Mês B} - \text{Mês A}}{\text{Mês A}} \times 100$$

e

$$\text{Variação geral (\%)} = \text{Coeficiente de variação do grupo de dados}$$

A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância com um fator a vários níveis (One-way ANOVA) e o teste da menor diferença significativa (LSD) para um nível de significância igual a 5% ($\alpha=0,05$). Foram também realizadas análises de correlação entre os diferentes elementos, utilizando o coeficiente de correlação de *Pearson*. Os dados foram considerados significativos para $\rho < 0,05$ e $\rho < 0,01$. Para a identificação de possíveis *outliers* foram aplicados os métodos de Interquartil (gráfico de *Box-Plot*), *Grubbs* e do z-score conforme descrito na norma ISO 5725-2:2019. Todos os testes foram realizados com recurso ao software IBM SPSS Statistics, versão 25.

Resultados

Na [tabela 1](#) apresentam-se os resultados obtidos para os elementos em estudo ao longo de 12 meses. O resultado da correlação de *Pearson* encontram-se na [tabela 2](#).

Tabela 1: Resultados dos micronutrientes nas cavalas portuguesas ao longo de um ano.

	Se ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Zn ($\text{mg}/100\text{g}$)	Na ($\text{mg}/100\text{g}$)	Fe ($\text{mg}/100\text{g}$)	Mg ($\text{mg}/100\text{g}$)	K ($\text{mg}/100\text{g}$)	P ($\text{mg}/100\text{g}$)
Mar/19	538,6 ^{a,b} ± 1,8	0,6430 ^{a,b,g} ± 0,0064	57,00 ^a ± 0,34	1,009 ^{a,b} ± 0,013	32,58 ^{a,b} ± 0,16	464,52 ^a ± 0,16	282,0 ^a ± 1,8
Abr/19	534 ^{a,b} ± 18	0,770 ^{c,d} ± 0,028	61,76 ^b ± 0,29	1,1048 ^c ± 0,0064	32,77 ^b ± 0,16	460,49 ^a ± 0,16	290,6 ^a ± 2,1
Mai/19	715 ^e ± 26	1,0600 ⁱ ± 0,0023	75,1 ^c ± 1,4	1,35 ^g ± 0,12	35,4 ^h ± 3,6	462,5 ^a ± 3,6	286 ^a ± 11
Jun/19	554 ^a ± 27	0,749 ^{c,e} ± 0,015	89,3 ^d ± 1,3	1,038 ^a ± 0,011	28,83 ^c ± 0,30	385,69 ^{b,c} ± 0,30	266,7 ^b ± 1,5
Jul/19	606 ^c ± 11	0,664 ^{a,f,g} ± 0,020	77,3 ^e ± 0,92	1,0366 ^a ± 0,0098	29,50 ^{c,d} ± 0,32	376,06 ^b ± 0,32	254,2 ^{c,d} ± 7,7
Ago/19	606 ^c ± 10	0,680 ^{a,f} ± 0,038	72,5 ^f ± 2,4	1,047 ^{a,c} ± 0,027	31,64 ^{a,b,e} ± 0,82	416,49 ^e ± 0,82	269,0 ^b ± 2,2
Set/19	536 ^{a,b} ± 21	0,728 ^{c,h} ± 0,024	80,34 ^g ± 0,12	0,9674 ^{b,d} ± 0,0058	28,56 ^c ± 0,20	361,85 ^f ± 0,20	245,0 ^{d,e} ± 5,9
Out/19	527,6 ^{a,b} ± 9,0	0,6440 ^{a,b} ± 0,0072	147,02 ^h ± 0,98	0,869 ^e ± 0,016	29,35 ^{c,f} ± 0,15	272,55 ^g ± 0,15	222,3 ^f ± 9,1
Nov/19	511 ^b ± 19	0,812 ^d ± 0,065	69,9 ⁱ ± 1,2	0,924 ^{d,e} ± 0,021	29,41 ^{c,f} ± 0,56	397,04 ^{c,d} ± 0,56	238,8 ^e ± 1,9
Dez/19	451 ^d ± 14	0,598 ^b ± 0,022	99,113 ^j ± 0,057	0,6245 ^f ± 0,0079	30,02 ^{c,f,g} ± 0,46	385,78 ^{b,d} ± 0,46	227,2 ^f ± 9,7
Jan/20	475 ^d ± 23	0,708 ^{e,f,h} ± 0,032	85,3 ⁱ ± 1,2	0,807 ^h ± 0,011	30,85 ^{a,d,e,f} ± 0,72	330,55 ^h ± 0,72	225,3 ^f ± 1,1
Fev/20	460,72 ^d ± 0,93	0,550 ^j ± 0,021	51,06 ^m ± 0,67	0,650 ^f ± 0,022	31,67 ^{a,g} ± 0,51	498,95 ⁱ ± 0,51	259,3 ^{b,c} ± 6,0

a,b,c Médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste LSD, $\rho < 0,05$.

Os resultados estão expressos em Médias ± Desvio padrão, n=3.

Outlier

Mínimo

Máximo



Tabela 2: ↓ Resultado da Correlação de Pearson.

	Se	Zn	Na	Fe	Mg	K	P
Se	1						
Zn	0,296	1					
Na	-0,076	0,136	1				
Fe	0,816**	0,615**	-0,117	1			
Mg	-0,069	-0,192	-0,388*	0,490**	1		
K	-0,063	-0,160	-0,770**	0,216	0,607**	1	
P	0,439*	0,142	-0,556**	0,683**	0,615***	0,764**	1

** Correlação significativa $\alpha=0,01$.

* Correlação significativa $\alpha=0,05$.

Correlação fraca ($|0,3| > \rho < |0,5|$)

Correlação moderada ($|0,5| > \rho < |0,7|$)

Correlação forte ($|0,7| > \rho < |0,9|$)

_Discussão

Pela análise da [tabela 1](#) e com auxílio do teste LSD existem alguns resultados que se destacam dos restantes. Foi feita uma identificação e verificação de valores suspeitos, aberrantes ou anómalos pelos três testes acima mencionados. Os gráficos de *Box-plot* (não incluídos) identificaram três *outliers*, que se encontram assinalados a vermelho na [tabela 1](#). Para confirmar e apoiar estes resultados foram executados outros testes nomeadamente o método do z-score e o teste de *Grubbs*. À semelhança dos resultados obtidos com os gráficos *Box-plot*, o teste de *Grubbs* identifica como resultados aberrantes os obtidos no mês de outubro para o elemento Na, e no mês de maio para o elemento Zn. Por outro lado, identifica os valores de Se e Fe do mês de maio como suspeitos. Já o método do z-score identifica como *outliers* apenas os valores do mês de maio para o Zn e do mês de outubro para o Na ($z\text{-scores} \geq |2,5|$).

Os resultados apresentados na [tabela 1](#) mostram variações estatisticamente significativas do conteúdo de Se entre os diferentes meses, variando este de 451 $\mu\text{g/Kg}$ a 606 $\mu\text{g/Kg}$,

com uma média de aproximadamente 527 $\mu\text{g/Kg}$. Cabral *et al.* mostraram que a dieta da cavala consiste principalmente em zooplâncton (rico em Se e vitaminas) na primavera e verão, peixes e decápodes no outono e larvas de decápodes no inverno ⁽¹⁴⁾. Martins *et al.* referiram que na costa continental portuguesa a época de desova da cavala espanhola decorre entre fevereiro e maio ^(15,16). Como tal, as variações entre meses e o facto do conteúdo em Se respeitante ao mês de maio ter sido considerado *outlier* poder-se-ão dever a efeitos de sazonalidade relacionados com diferenças na alimentação dos peixes e com a época da desova. É assim fundamental prolongar o estudo permitindo continuar a avaliar o conteúdo do Se em cavalas portuguesas ao longo do tempo.

O Zn apresenta uma tendência idêntica e moderadamente correlacionável com o Fe ao longo dos meses conforme se pode verificar pela correlação de *Pearson* na [tabela 2](#). Tal como para o caso do Se, o valor de Zn obtido para o mês de maio foi identificado como um *outlier*. Verifica-se para o Zn uma variabilidade média ao longo do ano (11,2%) face à variabilidade alta do Fe (20,9%). Estas variabilidades são devidas ao decréscimo acentuado do mês de novembro para



dezembro, com uma variação de 26,3% no Zn e 32,4% no caso do Fe. O Fe apresenta uma correlação fortemente positiva com o Se ($\rho=0,816$, $\alpha=0,01$), [tabela 2](#).

O Na é o segundo elemento com maior variabilidade (19,1%) ao longo do ano, não tendo sido encontradas semelhanças entre recolhas pelo teste LSD, $p<0,05$. A correlação entre este elemento e o K é evidenciada não só na literatura científica (17), mas também pela correlação de *Pearson* fortemente negativa ($\rho=-0,770$, $\alpha=0,01$). O K também apresenta uma variação média ao longo do ano (16%), com um valor máximo em fevereiro e mínimo em outubro. Este elemento também é fortemente correlacionado com o P ($\rho=-0,764$, $\alpha=0,01$).

O P apresenta uma variação de aproximadamente 9,49% ao longo do ano, destacando-se um aumento de 15,1% de janeiro para fevereiro. abril foi o mês com um teor de P mais abundante e outubro o menor.

No que respeita ao Mg, este elemento apresenta correlações significativas segundo a correlação de *Pearson*, apresentada na [tabela 2](#), com o Na, Fe, P e K. As correlações com o Na e o Fe são correlações fracas e com o P e K são correlações moderadas. Este é o elemento que apresenta uma variação mensal menor (6,54%), tendo-se verificado a maior diferença de maio para junho onde se obteve um decréscimo de 18,6%. O mês de maio não apresentou semelhanças, segundo o teste LSD, com nenhum dos restantes meses, $p<0,05$.

_Conclusões

A variabilidade entre o teor de Se (e restantes minerais) nos vários meses poderá estar relacionada com os hábitos alimentares da cavala e o alto valor encontrado no mês de maio poderá estar ainda correlacionado com a época de desova.

Relativamente aos restantes minerais, o K foi o elemento mais abundante com um teor a variar entre os 273 mg/100g e os 499 mg/100g. A ordem de concentração dos outros elementos estudados ficou estabelecida como $P > Na > Mg > Fe > Zn$.

Foram encontradas no total 11 correlações entre elementos, destacando-se 5 correlações moderadas e 3 fortes. A correlação mais forte encontrada foi entre o Se e o Fe ($\rho=0,816$).

Os testes estatísticos foram fundamentais para interpretação destes resultados, tendo ajudado a perceber que são necessários mais estudos para confirmar estas conclusões preliminares, nomeadamente estudar o conteúdo de Se e dos restantes nutrientes mensalmente durante vários anos.

Financiamento:

Os autores agradecem o apoio financeiro do Projeto NewFood4 Thought – PTDC/ASP-PLA/28350/2017.

Referências bibliográficas:

- (1) Ferreira I, Gomes-Bispo A, Lourenço H, et al.. The chemical composition and lipid profile of the chub mackerel (*Scomber colias*) show a strong seasonal dependence: Contribution to a nutritional evaluation. *Biochimie*. 2020 Nov;178:181-189. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.022>
- (2) Raimundo J, Vale C, Caetano M, et al. Natural trace element enrichment in fishes from a volcanic and tectonically active region (Azores archipelago). *Deep Res. Part II Top Stud Oceanogr*. 2013 Dec 15;98(Part A):137-47. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2013.02.009>
- (3) Ferreira FAG. *Nutrição Humana*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1983.
- (4) Castanheira I, Saraiva M, Rego A, et al. EuroFIR guidelines for assessment of methods of analysis: GAMA. *Food Chem*. 2016 Feb 15;193:82-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.104>
- (5) Nardi EP, Evangelista FS, Tormen L, et al. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chem*. 2009;112(3):727-32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.010>
- (6) Chen N, Zhao C, Zhang T. Selenium transformation and selenium-rich foods. *Food Biosci*. 2021 Apr;40:100875. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100875>
- (7) Yao Y, Pei F, Kang P. Selenium, iodine, and the relation with Kashin-Beck disease. *Nutrition*. 2011 Nov-Dec;27(11-12):1095-100. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.03.002>
- (8) British Nutrition Foundation. Minerals and trace elements [online]. [consult. 2021-3-25]. Disponível em: <https://www.nutrition.org.uk/nutritionscience/nutrients-food-and-ingredients/minerals-and-trace-elements.html>
- (9) Şlencu B, Ciobanu C, Cuciureanu R. Selenium content in foodstuffs and its nutritional requirement for humans. *Clujul Med*. 2012;85(2):139-45. <https://medpharmareports.com/index.php/mp/article/download/206/173>
- (10) Raymond LJ, Ralston NVC. Mercury: selenium interactions and health implications. *Neurotoxicology*. 2020 Dec;81(1):294-99. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2020.09.020>
- (11) Rahman MM, Hossain KFB, Banik S, et al. Selenium and zinc protections against metal-(loids)-induced toxicity and disease manifestations: A review. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019 Jan 30;168:146-163. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.05>
- (12) Coelho I, Matos AS, Teixeira R, et al. Combining multielement analysis and chemometrics to trace the geographical origin of Rocha pear." *J Food Compos Anal*. 2019 Apr;77:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.12.005>



- (13) NP EN ISO/IEC 17025:2018. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração; (ISO/IEC 17025:2017)
- (14) Cabral HN, Murta AG. The diet of blue whiting, hake, horse mackerel and mackerel off Portugal. *J Appl Ichthyol.* 2002 Feb;18(1):14–23. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2002.00297.x>
- (15) Martins MM. Growth variability in Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) and Spanish mackerel (*Scomber japonicus*) off Portugal. *ICES J Mar Sci.* 2007;64(9):1785–90. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsm163>
- (16) Daley TT. Growth and Reproduction of Atlantic Chub Mackerel (*Scomber colias*) in the Northwest Atlantic. Master's Theses 364, University of Southern Mississippi, 2018. https://aquila.usm.edu/masters_theses/364
- (17) Morris RC Jr, Schmidlin O, Frassetto LA, et al. Relationship and interaction between sodium and potassium. *J Am Coll Nutr.* 2006 Jun;25(3 Suppl):262S-270S. <https://doi.org/10.1080/07315724.2006.107195761577364>

ficha técnica_

_Título: Boletim Epidemiológico Observações

_Periodicidade: Quadrimestral

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

_Numeração: 2.ª série

Volume 10, número 29, 2021
janeiro – abril 2021

_Diretor

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

_Editores

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

_Conselho Editorial Científico

Carlos **Matias Dias**, Departamento de Epidemiologia
Luciana **Costa**, Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis
Jorge **Machado**, Departamento de Doenças Infecciosas
Manuela **Cano**, Departamento de Saúde Ambiental
Maria João **Silva**, Departamento de Genética Humana
Rita **Batista**, Departamento de Alimentação e Nutrição
Peter **Jordan**, Conselho Científico do INSA

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

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

© Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP 2021.

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.min-saude.pt