

2015
número

12

2ª série

Lisboa_INSA, IP

publicação trimestral_abril - junho

ISSN: 2183-8873 (em linha)

Observações

Boletim Epidemiológico

editorial

Políticas de saúde baseadas em evidência: contributo do INSA, IP

No quadro normativo comunitário e nacional, a adoção de políticas públicas saudáveis, entendidas como o conjunto de decisões, que, tomadas nos diferentes níveis de governo, consideram os impactos na saúde e bem-estar dos indivíduos, contribuindo para que estes adotem um estilo de vida mais saudável, surge como um imperativo (1).

O sucesso destas abordagens depende da capacidade de decisores e investigadores criarem um campo consensual que permita às diferentes culturas e linguagens, a construção de um quadro conceptual e léxico comuns que facilite a inclusão da evidência disponível nos processos de tomada de decisão (2).

A questão da tradução da evidência decorrente da investigação, da vigilância e da observação em políticas e práticas é considerada, pela generalidade dos autores (3-6), essencial quer quanto à atuação sobre os determinantes de saúde, quer no que se refere à alocação e redução do desperdício de recursos (4).

Sendo reconhecido o papel que a investigação em saúde tem desempenhado nos mais diversos sectores, contribuindo para o desenvolvimento económico, para a melhoria das condições de vida, para a obtenção de ganhos em saúde, e para a forma de governo das sociedades (7), a não inclusão dos seus resultados de forma compreensiva e sistemática na generalidade das iniciativas políticas adotadas (8), corroboram a necessidade de se dinamizarem iniciativas com vista a facilitar o processo de tradução e translação do conhecimento em evidência.

neste número

Editorial

- Políticas de saúde baseadas em evidência: contributo do INSA, IP** p 01
Rita Carvalho Fonseca, Carlos Matias Dias
(Unidade de Investigação em Serviços e Políticas de Saúde, Departamento de Epidemiologia do INSA)

Artigos Breves

Doenças do Neurodesenvolvimento

- 1. Redes de interação proteica revelam fatores de risco associados à perturbação do espectro do autismo** p 03
Catarina Correia, Guiomar Oliveira, Astrid Moura Vicente

Saúde Ambiental

- 2. Avaliação do risco para a saúde pública resultante do contacto com águas recreativas e ornamentais** p 07
Vera Fernandes, Sérgio Paulino, Clélia Costa, João Carlos Rodrigues, Lúcia Reis, Isabel Nogueira, Patricia Carvalho, Aida Duarte, Luísa Jordão
- 3. Monitorização da presença de hidrocarbonetos halogenados aromáticos policíclicos, resultantes dos processos de desinfecção de águas** p 12
Sílvia S. José, Alexandra M. M. Antunes, Ana Sofia Cardoso, Luísa Jordão

Doenças Infecciosas

- 4. Diagnóstico laboratorial da infeção por *Chlamydia trachomatis*, 1991-2014** p 16
Margarida Dinis, Dora Cordeiro, Irene Santo, Jacinta Azevedo, João Paulo Gomes, Maria José Borrego
- 5. Vigilância laboratorial da infeção a Enterovirus entre 2010 e 2013** p 19
Paula Palmilha, Carlos Ribeiro, Carla Roque, Elsa Vinagre
- 6. A gripe em Portugal: análise preliminar da atividade gripal 2014/2015** p 22
Pedro Pechirra, Paula Cristóvão, Inês Costa, Carla Roque, Paula Barreiro, Sílvia Duarte, Ausenda Machado, Ana Paula Rodrigues, Baltazar Nunes, Raquel Guiomar

Composição de Alimentos

- 7. Doseamento de vitamina D em produtos lácteos consumidos em Portugal** p 27
Diana Parreira, Maria Celeste Serra, Maria Graça Dias

Qualidade Laboratorial

- 8. Aplicação do Seis Sigma na avaliação da inexatidão (Bias) dos resultados laboratoriais do parâmetro cortisol sérico, 2012-2014** p 29
Ana Gaspar, Ana Faria, José Requeijo, Helena Correia, Ana Cardoso, Cristina Brito, Deolinda Madureira, Ana Paula Faria, Maria Antónia Calhau

Notícias

- 4º Congresso Ibérico de Cianotoxinas - alteração de local**
2ª Reunião do Projeto europeu JA CHRODIS - 2015 p 31
2ª Reunião da Rede Nacional TORCHnet

Segundo Cohen G, *et al.* (2014) (5), no que respeita à saúde em todas as suas dimensões, os avanços verificados e a globalização, vieram criar uma expectativa crescente no que se refere aos impactes económicos, sociais, políticos decorrentes da inúmera investigação realizada, contribuindo para a convicção de que os resultados obtidos podem influenciar e melhorar os processos de tomada de decisão, e para o reconhecimento crescente de que o elevado investimento realizado em investigação em saúde, deve contribuir efetivamente para melhorar as políticas, práticas, alocação e recursos, em como a saúde dos indivíduos e das populações (9).

É neste campo que os institutos nacionais de saúde, e os institutos nacionais de saúde pública são chamados a desempenhar um papel central, enquanto entidades que produzem e disponibilizam conhecimento científico (10), contribuído para o encontro entre a agenda de investigação e a agenda política, por força das suas atribuições.

Entre o conjunto das suas atribuições e competências, compete a estes institutos, conhecer e caracterizar os principais problemas de saúde do país, identificar e desenvolver investigação em áreas consideradas determinantes ou prioritárias, desenvolver investigação que permita avaliar a eficácia das intervenções propostas, desenvolver investigação sobre a organização e funcionamento dos serviços de saúde, e como reconhece e reforça a IANPHI, aos institutos nacionais de saúde, compete certificarem-se que os resultados da investigação disponibilizados “sejam traduzidos em decisões, políticas e programas”, contribuindo para que cada vez mais as decisões sejam fundadas na melhor evidência disponível (Muir Gray, 1998 citado por Viehbeck, Petticrew, Cummins, 2015) (11, 12).

No âmbito das suas atribuições, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), através dos seus departamentos técnico-científicos, desenvolve um conjunto de atividades de natureza científica fundamentais para o conhecimento do estado de saúde e de doença da população, em áreas diversificadas que vão desde o indivíduo e das populações, aos serviços e políticas de saúde.

Os resultados da investigação desenvolvida, são regularmente disseminados através de um conjunto diversificado de atividades de comunicação e de divulgação científica, como sejam a publicação de relatórios, artigos científicos, *newsletters*, comunicações em reuniões científicas, organização de *workshops* e ações de formação, concorrendo deste modo para a capacitação de decisores e profissionais, e para a obtenção de ganhos em Saúde Pública (13).

Rita Carvalho Fonseca, Carlos Matias Dias

Unidade de Investigação em Serviços e Políticas de Saúde,
Departamento de Epidemiologia do INSA

Referências bibliográficas:

- (1) Svensson PG. The 2nd International Conference on Health Promotion: Healthy Public Policy, 5-9 April 1988, Adelaide, Australia [editorial]. *Health Promot. Int.* 1988;3(3): 237-39.
- (2) Leppo K, Ollila E, Peña S, et al. (eds.). *Health in all policies: seizing opportunities, implementing policies.* Finland: Ministry of Social Affairs and Health, Finland, 2013. [LINK](#)
- (3) Woolf SH, Purnell JQ, Simon SM, et al. Translating evidence into population health improvement: strategies and barriers. *Annu Rev Public Health.* 2015;36:463-82.
- (4) Ward V, House A, Hamer S. Knowledge Brokering: The missing link in the evidence to action chain? *Evid Policy.* 2009;5(3):267-79. [LINK](#)
- (5) Cohen G, Schroeder J, Newson R, et al. Does health intervention research have real world policy and practice impacts: testing a new impact assessment tool. *Health Res Policy Syst.* 2015;13:3. [LINK](#)
- (6) Oliver K, Innvar S, Lorenc T, et al. A systematic review of barriers to and facilitators of the use of evidence by policymakers. *BMC Health Serv Res.* 2014;14:2. [LINK](#)
- (7) Erno-Kjølhed E, Hansson F. Measuring research performance during a changing relationship between science and society. *Res Eval.* 2011;20(2):131-43.
- (8) Leppo K, Ollila E, Peña S, et al. Lessons for policy-makers. In: Leppo K, Ollila E, Peña S, et al. (eds.). *Health in all policies: seizing opportunities, implementing policies.* Finland: Ministry of Social Affairs and Health, Finland, 2013, pp. 325-37. [LINK](#)
- (9) Milat AJ, Bauman AE, Redman SA. A narrative review of research impact assessment models and methods. *Health Res Policy Syst.* 2015;13(1):18. [LINK](#)
- (10) International Association of National Public Health Institutes: Framework [Em linha]. [consult. 25/5/2015] [LINK](#)
- (11) Muir Gray, JA. *Evidence-based Health Care: How to Make Health Policy and Management Decisions.* London: Churchill Livingstone, 1997.
- (12) Viehbeck SM, Petticrew M, Cummins S. Old myths, new myths: challenging myths in public health. *Am J Public Health.* 2015;105(4):665-9.
- (13) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. *Saúde e Difusão da Cultura Científica, do Conhecimento para a Comunidade: reflexão sobre as atribuições, atividades e perspectivas futuras: Dia do INSA 3 Outubro 2011.* Lisboa: INSA IP, 2012. [LINK](#)



Redes de interação proteica revelam fatores de risco associados à perturbação do espectro do autismo

Catarina Correia^{1,2,3}, Guiomar Oliveira^{4,5,6}, Astrid Moura Vicente^{1,2}

astrid.vicente@insa.min-saude.pt

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

(2) Center for Biodiversity, Functional & Integrative Genomics.

(3) Instituto Gulbenkian de Ciência.

(4) Unidade Neurodesenvolvimento e Autismo. Centro de Desenvolvimento. Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

(5) Centro de Investigação e Formação Clínica. Hospital Pediátrico, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

(6) Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra.

Introdução

A Perturbação do Espectro do Autismo (PEA) é uma patologia do neurodesenvolvimento caracterizada por problemas de socialização e por padrões de comportamento repetitivos e estereotipados (1). A sua apresentação clínica é muito heterogénea, em termos de gravidade, nível cognitivo e co-morbilidades presentes, tais como epilepsia, défice intelectual e défice de atenção e hiperatividade (2). Fatores genéticos contribuem substancialmente para o risco de PEA, sendo possível definir uma etiologia genética em cerca de 20% dos casos (3). No entanto, as causas genéticas conhecidas são também muito variáveis, incluindo alterações estruturais nos cromossomas (deleções, amplificações ou translocações) ou variantes na sequência de múltiplos genes (4). No geral, cada uma destas alterações genéticas é rara (presente em menos de 1% da população), embora em conjunto expliquem uma proporção significativa da variância no risco genético. Presume-se que, para os cerca de 80% dos doentes que são idiopáticos, existam outros fatores de risco, incluindo variantes genéticas comuns, fatores epigenéticos e ambiente. As bases neurobiológicas deste cenário complexo estão longe de completamente explicadas, impedindo até agora o desenvolvimento de terapia farmacológica que permita um tratamento eficaz da doença (4).

Em oposição às variantes raras, variantes genéticas comuns são alterações na sequência de genes que são frequentes na população geral e que contribuem individualmente com um pequeno efeito sobre o risco total de PEA (5). O seu efeito sobre o risco para esta

patologia é cumulativo, isto é, múltiplas variantes comuns têm que estar presentes, num dado paciente, para se atingir um limite patofisiológico a partir do qual surgem sintomas. Rastreios de associação genómica (*Genome Wide Association Studies*, GWAS), que têm como objetivo a identificação de variantes genéticas comuns associadas à PEA (4), têm tido um sucesso muito limitado. A dificuldade em obter resultados de associação coerentes em GWAS é consistente com a noção de que variantes genéticas comuns dificilmente podem ser detetadas em rastreios genómicos de associação, porque a dimensão das amostras populacionais até agora utilizadas não tem poder estatístico para tal (4,5). Estratégias alternativas são por isso necessárias para a identificação deste tipo de variantes, que permitam ultrapassar as limitações dos desenhos de estudo atuais.

Objetivo

No presente estudo foi colocada a hipótese de que fatores de risco comuns para a PEA convergem em vias fisiológicas específicas, e cumulativamente levam ao aparecimento de sintomas (6). Para identificar estas vias fisiológicas foi desenvolvido um método de análise de redes de interação proteína-proteína (*protein-protein interaction*, PPI), o qual envolve a sobreposição dos resultados de associação genómica obtidos em GWAS com redes de interação proteica previamente definidas. Esta abordagem pretende assim capturar informação de relevância biológica mesmo nos resultados negativos dos estudos de associação genómicos, e definir uma rede de interações proteicas (PPI) específica para a PEA.

Abordagem e resultados

A análise de redes de interação proteína-proteína foi aplicada ao conjunto de dados gerados num rastreio genómico para a PEA em que participámos (incluindo 2818 pacientes), no contexto do estudo internacional *Autism Genome Project* (AGP) (7). Os resultados foram confirmados com dados de um outro estudo levado a cabo pelo *Autism Genetic Resource Exchange* (AGRE) (8) (com 943 pacientes), disponíveis em base de dados para análise da comunidade científica. Os rastreios de associação genómica envolvem a genotipagem de marcadores polimórficos, designados *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), que constituem alterações de uma base dispersas por todo o genoma, intra- e intergenes, e cuja localização é

artigos breves_ n. 1

exatamente conhecida. Estas alterações de uma base são polimórficas na população humana, e constituem marcadores de posição no genoma. Tipicamente, em rastreios mais recentes, são genotipados cerca de 1 milhão de SNPs. É depois efetuado um teste de associação das frequências alélicas de cada SNP com a patologia em questão, utilizando grupos de doentes e de controlos, ou um formato de estudo baseado na frequência de transmissão alélica em famílias constituídas por paciente e ambos os pais (formato utilizado no AGP e AGRE).

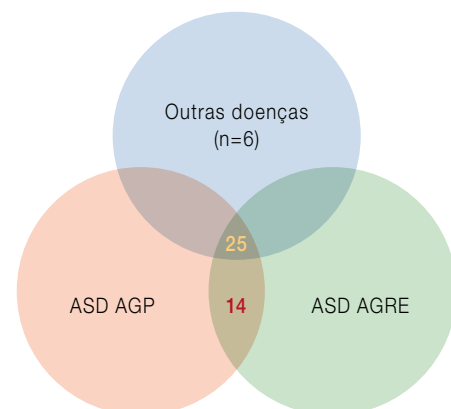
A primeira fase do presente estudo envolveu a ordenação crescente dos resultados dos testes de associação para cada SNP, obtidos no trabalho do AGP, até um limite (neste caso definimos $P < 0,1$) acima da significância estatística definida para rastreios genómicos ($P < 10^{-8}$). Todos os SNPs acima deste valor foram mapeados nos respetivos genes, e os genes convertidos nas proteínas que codificam. Este grupo de proteínas foi usado para a construção de uma rede de interações proteicas baseada na sobreposição dos resultados do rastreio genómico para a PEA com uma rede PPI humana pré-definida, incluindo 12372 proteínas e 58365 interações proteicas. Foram depois examinadas as propriedades topológicas da rede de interação proteica assim construída, indicativas de conectividade de vários níveis de associação genética, para confirmar a hipótese de que genes associados à PEA, a um nível normalmente considerado de "ruído estatístico", estão funcionalmente ligados para além da expectativa aleatória. Para tal, a rede PPI gerada para a PEA, com 416 proteínas, foi comparada com uma rede PPI de igual dimensão, construída a partir de grupos de proteínas selecionadas aleatoriamente da rede PPI humana pré-definida, em 1000 iterações.

As propriedades topológicas examinadas foram a percentagem de interações proteicas diretas, a percentagem de *nodes* isolados, e a dimensão da rede PPI formada. A análise topológica da rede proteica mostrou que as proteínas associadas à PEA, a níveis ($P < 0,1$) acima dos convencionalmente definidos como com significância estatística em GWAS, interagem diretamente mais do que a expectativa aleatória e formam redes de maiores dimensões e com menor número de *nodes* isolados. Estes resultados indicam que as proteínas definidas pelos rastreios genómicos, acima da significância estatística, estão envolvidas num número limitado de processos biológicos interligados, e estão relacionadas funcionalmente.

Verificou-se ainda que a precisão e especificidade com que os genes que codificam este grupo de proteínas são identificados numa lista de genes reconhecidamente envolvidos na PEA são significativamente superiores à do grupo de genes com maior evidência de associação (até $P < 0,1$) no GWAS, indicando que a rede proteica funcionalmente coerente gerada por esta abordagem contém mais informação biológica relevante para a PEA do que os resultados dos testes de associação.

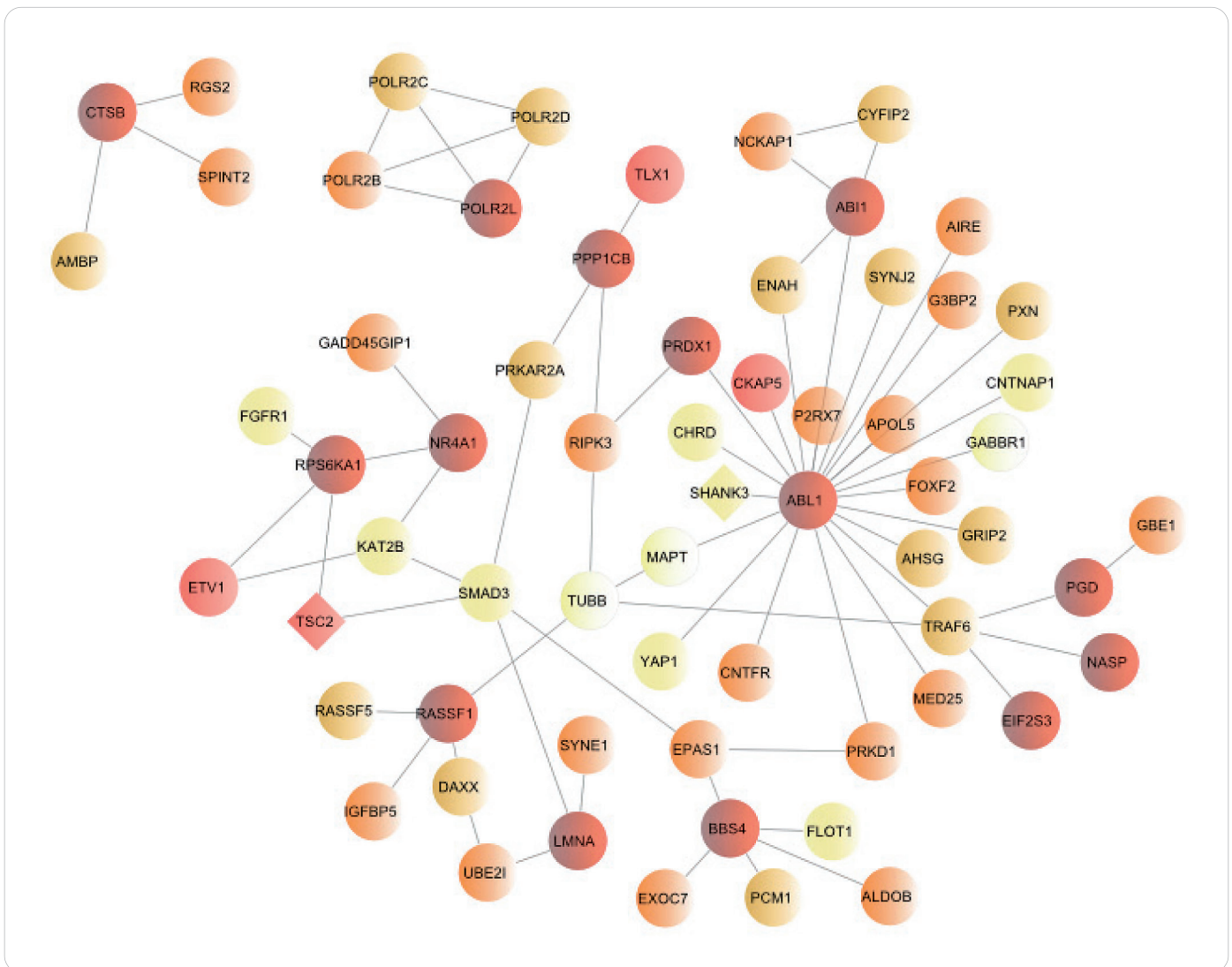
Finalmente, efetuou-se uma análise da intersecção entre as redes PPI obtidas a partir dos dois GWAS para a PEA analisados (AGP e AGRE), e seis conjuntos de dados de GWAS para doenças não relacionadas com a PEA (*Lupus Erythematosus*, Diabetes tipo 1, Neuroblastoma, Esclerose múltipla, Cancro da mama e Doença de Parkinson) (6), representada na **figura 1**. Esta análise identificou 14 proteínas exclusivamente presentes nas redes PPI para a PEA (**figura 2**). Os genes que codificam estas 14 proteínas são expressos no cérebro, e estão envolvidos em processos biológicos fundamentais anteriormente implicados na PEA, como a adesão celular, a organização do citoesqueleto e a migração dos neurónios durante a formação do cérebro.

Figura 1: Intersecção entre as redes obtidas a partir dos dois GWAS para PEA analisados (AGP e AGRE), e seis conjuntos de dados de GWAS para doenças não relacionadas com a PEA (*Lupus Erythematosus*, Diabetes tipo 1, Neuroblastoma, Esclerose múltipla, Cancro da mama e Doença de Parkinson).



artigos breves_ n. 1

Figura 2: **Network** de interações proteicas na Perturbação do Espectro do Autismo (PEA), com base nas 14 proteínas identificadas em comum entre os estudos AGP e AGRE, e as suas interações direta. *Nodes* são coloridos de acordo com um esquema de cores baseado num sistema de pontuação que reflete a sua presença nos dois conjuntos de dados de PEA (AGP e AGRE) e ausência nas 6 patologias não relacionadas com PEA; uma coloração mais forte é indicativa de uma pontuação mais elevada, isto é, maior especificidade.



Para vários dos genes que codificam estas proteínas foram anteriormente reportadas alterações em pacientes com PEA: mutações identificadas por sequenciação exómic, incluindo 50 pacientes da nossa amostra populacional (genes *PGD*, *NASP*, *LMNA*, *PPP1CB*, *RASSF1*, *ABL1*, *ABI1*, *BBS4*), genes deletados ou amplificados em

Copy Number Variants (genes *ABL1*, *RPS6KA1*, *PPP1CB*, *NASP*), alterações de expressão em tecido *post-mortem* ou linfoblastos (genes *NASP*, *NR4A1*, *ABI1*, *BBS4*, *LMNA*, *ABL1*) e fenótipos anómalos no sistema nervoso central em modelos animais (genes *CTSB*, *BBS4*, *LMNA* e *ABL1*).

_Conclusão

Em conclusão, a análise de redes de interações proteína-proteína aplicada a dados de rastreios genómicos para a PEA confirmou resultados de estudos por outras abordagens, e destacou novos fatores de risco para esta patologia, envolvidos no funcionamento do sistema nervoso central e com significado biológico para esta patologia. Nos rastreios genómicos analisados, estes genes encontravam-se ao nível do “ruído estatístico”, e não foram valorizados. Sequenciação dos genes agora identificados está em curso num grupo de pacientes com PEA, como *proof-of-concept* experimental desta nova metodologia de análise. Este trabalho releva o valor de estratégias alternativas que permitam uma análise mais profunda da informação gerada em rastreios genómicos de associação, nomeadamente através da exploração de redes de interações proteicas.

Referências bibliográficas:

- (1) Lord C, Jones RM. Annual research review: re-thinking the classification of autism spectrum disorders. *J Child Psychol Psychiatry*. 2012;53(5):490-509. [LINK](#)
- (2) Fakhoury M. Autistic spectrum disorders: a review of clinical features, theories and diagnosis. *Int J Dev Neurosci*. 2015;43:70-7
- (3) Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res*. 2011;1380:42-77. Epub 2010 Dec 1.
- (4) Geschwind DH. Genetics of autism spectrum disorders. *Trends Cogn Sci*. 2011;15(9):409-16. [LINK](#)
- (5) Anney R, Klei L, Pinto D, et al. Individual common variants exert weak effects on the risk for autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet*. 2012;21(21):4781-92. [LINK](#)
- (6) Correia C, Oliveira G, Vicente AM. Protein interaction networks reveal novel autism risk genes within GWAS statistical noise. *PLoS One*. 2014;9(11):e112399. [LINK](#)
- (7) Anney R, Klei L, Pinto D, et al. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet*. 2010;19(20):4072-82. [LINK](#)
- (8) Wang K, Zhang H, Ma D, et al. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature*. 2009;459(7246):528-33. [LINK](#)



Avaliação do risco para a saúde pública resultante do contacto com águas recreativas e ornamentais

Vera Fernandes¹, Sérgio Paulino², Clélia Costa², João Carlos Rodrigues³, Lúcia Reis³, Isabel Nogueira⁴, Patricia Carvalho⁴, Aida Duarte⁵, Luísa Jordão²

maria.jordao@insa.min-saude.pt

(1) Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

(2) Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

(3) Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(4) Avaliação Externa da Qualidade, Departamento de Epidemiologia, INSA.

(5) Departamento de Microbiologia e Imunologia/ iMed.UL. Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa.

Introdução

A água é fundamental para a vida. Contudo, esta fonte de vida, quando não é devidamente tratada, pode veicular microrganismos responsáveis por doenças potencialmente letais como a cólera e a febre tifoide (1). Os perigos decorrentes do contacto com microrganismos patogénicos não estão limitados às águas de consumo. O contacto com águas recreativas no ambiente natural (rios, praias) e humanizado (piscinas) também apresenta riscos.

Nos últimos anos o número de casos de infeções relacionadas com este tipo de águas tem aumentado. Não se sabe contudo se tal deriva dum melhor sistema de comunicação dos casos ocorridos ou dum aumento da virulência dos microrganismos ambientais. A este último aspeto está intimamente associado o aumento do uso de antibióticos no tratamento de animais e na agricultura com a consequente disseminação no meio ambiente (2). Este processo permite a seleção de estirpes resistentes a antibióticos. Por outro lado, a capacidade dos microrganismos se associarem em comunidades denominadas por biofilmes poderá potenciar este processo. A caracterização da flora bacteriana e fitoplantónica existente em águas recreativas e ornamentais é por estas razões importante.

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo caracterizar a população de microrganismos presente em águas recreativas (piscinas) e ornamentais (lagos), bem como avaliar o risco para a saúde pública do contacto com as mesmas.

Metodologia

Amostragem: as amostragens decorreram na região de Lisboa em 7 piscinas e 4 lagos dum parque entre dezembro 2014 e fevereiro de 2015. As amostras foram recolhidas em frascos esterilizados de 1 L de capacidade, na ausência (lagos) ou presença de tiosulfato de sódio (piscinas). Para a pesquisa de biofilmes foram efetuadas amostras numa área de 10 cm² com o auxílio duma zaragatoa estéril em dez superfícies de piscinas e de dois lagos. A zaragatoa foi transportada em tubo estéril contendo 10 mL de tampão fosfato. As amostras foram transportadas ao abrigo da luz e conservadas a 5 °C até serem processadas. O tempo de armazenagem nunca foi superior a 24 h.

Isolamento e identificação de bactérias: as amostras foram processadas pelo método de filtração através duma membrana com poro de 0,45 µm. O volume filtrado variou de acordo com o tipo de amostra e microrganismo pesquisado. Nas águas de piscinas e lagos foram filtrados 1000 mL e 100 mL, respetivamente, para a pesquisa de micobactérias não tuberculosas (MNT). Para os restantes microrganismos, independentemente da amostra, foram filtrados 10 mL.

No caso das MNTs as membranas foram transferidas para tubos falcon contendo 10 mL de PBS. A dispersão dos microorganismos presentes na membrana e/ou zaragatoa (biofilme) foi assegurada por agitação num vortex e sonicação num banho de ultra-sons. A amostra foi descontaminada por adição de Mycoprep de acordo com as indicações do fabricante. Os sedimentos obtidos após centrifugação a 3800 g durante 30 minutos foram suspensos em PBS, semeados em duplicado em meio de Lowenstein Jensen e incubados a 30, 37 e 42 °C durante pelo menos 3 semanas.

Para o isolamento dos restantes microrganismos, as membranas filtrantes foram colocadas à superfície de meios gelosados não seletivos como Plate Count Agar (PCA) e meios gelosados seletivos para as leveduras e fungos filamentosos como Sabouraud; para bacilos de Gram negativo Drigalsky, Violet Red Bile Agar (VRBA), Cetrimida (*Pseudomonas* spp.) e Mannitol salt agar (*Staphylococcus* spp.) Os meios de cultura foram incubados a diferentes temperaturas de 30, 37 e 44 °C durante 24 e 48 horas para as bactérias e leveduras e até 5 dias para os fungos.

A identificação dos isolados foi efetuada por sistemas automatizados API20E para as enterobactérias e VITEK para as bactérias não fermentadoras.



artigos breves_ n. 2

Estudo da susceptibilidade aos antibióticos: este ensaio foi efetuado pelo método de difusão em meio Mueller Hinton agar com discos dos seguintes antibióticos: associação de amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), imipenemo (IPM), gentamicin (GM) e ciprofloxacina (CIP). Após incubação a 37 °C durante 24 h, a leitura e a interpretação dos halos foi feita de acordo com as normas EUCAST (3).

Determinação da concentração mínima inibitória das formas planctónicas e biofilmes de *K. pneumoniae*: este ensaio foi realizado apenas para a amoxicilina. A gama de concentrações usadas variou entre 0,98 e 500 µg/mL. Os ensaios foram realizados como descrito anteriormente (4).

Ensaio de formação de biofilmes: o ensaio foi realizado para as quatro estirpes de *K. pneumoniae* isoladas conforme descrito por Bandeira e colegas (4). As temperaturas de incubação usadas foram 25 °C e 37 °C.

Preparação de amostras para microscopia eletrónica de varrimento: a formação dos biofilmes foi seguida em dois materiais diferentes, vidro e massa de cimento, previamente esterilizados, e colocados numa placa de cultura de células com 24 poços. A suspensão bacteriana foi preparada a partir de culturas em meio Mueller-Hinton agar após incubação durante 18 h a 37 °C, inoculada nos poços contendo Mueller-Hinton líquido e a placa foi incubada a 25 ou 37 °C durante 48 h. Após incubação, a lamela de vidro e o pedaço de massa de cimento foram lavados com água destilada estéril para remover as bactérias não aderentes. Os biofilmes foram transferidos para uma solução de PBS contendo 2,5 % de glutaraldeído e 0,05 % de vermelho de ruténio (solução de fixador) e conservados a 5 °C durante 18 h. O tratamento com ósmio e a restante preparação foram realizados como descrito anteriormente (4). As amostras foram observadas num microscópio eletrónico de varrimento JSM-7100F JEOL.

Análise da composição e abundância da comunidade fitoplancónica dos lagos: as amostras foram fixadas com uma solução de lugol de 0,5 % (v/v) e colocadas em câmaras de sedimentação, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, durante 24 h (5). Após esse período procedeu-se à sua análise quantitativa num microscópio invertido, de acordo com o método descrito por Utermöhl (6).

_Resultados e discussão

O primeiro passo deste estudo consistiu na caracterização da flora bacteriana presente nas piscinas e lagos. Em nenhuma das amostras analisadas foi detetada a presença de MNT. Nas piscinas, quer na água quer nas superfícies, não foram encontradas unidades formadoras de colónias (UFC) tanto para bactérias como leveduras/fungos. No caso dos lagos também não foram encontradas UFC para leveduras/fungos; no entanto, no meio não seletivo para bactérias (PCA) foi encontrado um número incontável de UFC (> 300/10 mL). Nos meios seletivos para *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. não foram detetadas colónias. Nos restantes meios, tanto nos incubados a 37 como a 44 °C, foram detetadas colónias identificadas maioritariamente entre as espécies da família das Enterobactérias, nomeadamente: *Klebsiella pneumoniae*, *K. pneumoniae* variedade *ozaenae*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *S. rubidea* e *S. odorífera*. Entre as bactérias não fermentadoras e oxidase positiva foram identificadas as espécies *Elizabethkingia meningoseptica*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Vibrio metschnikovii*.

A presença de *K. pneumoniae* reteve a nossa atenção por esta bactéria ser considerada um dos principais agentes etiológicos de infeções nosocomiais, e apresentar elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos (7). A capacidade de formar biofilmes foi descrita pela primeira vez para a *K. pneumoniae* na década de 1980, tendo sido posteriormente associada à persistência em determinados ambientes, como o hospitalar, e à resistência aos antimicrobianos (4, 8, 9). Por estas razões a capacidade de formar biofilmes é atualmente considerada como um fator de virulência. Assim, nos lagos onde foi isolada *K. pneumoniae* foi realizada a colheita de amostras de biofilme. Tal como se verificou para as águas dos lagos as enterobactérias estavam presentes em maioria. A *K. pneumoniae* (Kp4) foi identificada apenas no biofilme do lago 2.

O próximo passo consistiu na caracterização das 4 estirpes de *K. pneumoniae* isoladas do ambiente na forma planctónica (Kp 1, Kp2 e Kp3) e em biofilme (Kp4). Os resultados obtidos são apresentados na **tabela 1**. A avaliação da capacidade de formação de biofilmes foi um dos primeiros parâmetros avaliados. Uma vez que estas bactérias foram isoladas de amostras ambientais e se pretende inferir a sua capacidade de colonizar o Homem, os ensaios foram conduzidos a 25 °C e 37 °C,

Tabela 1: ↓ Estirpes de *K. pneumoniae* isoladas de lagos.

ID	Local de isolamento	Formação de biofilme (OD570nm)		Antibiograma (mm)							CMI AMX (µg/ml)	
		25°C	37°C	AMC	FOX	CAZ	CTX	IPM	GM	CIP	Plant	Biof
Kp1	Lago 1	0,240	0,153	18	28	>30	>30	>30	24	>30	7,81	62,5
Kp2	Lago 2	0,076	–	6	20	25	30	25	18	28	0,98	125
Kp3	Lago 2	0,740	0,256	6	24	>30	>30	22	18	>30	500	>500
Kp4	Biofilme Lago 2	1,159	0,285	6	6	25	29	25	18	28	500	>500

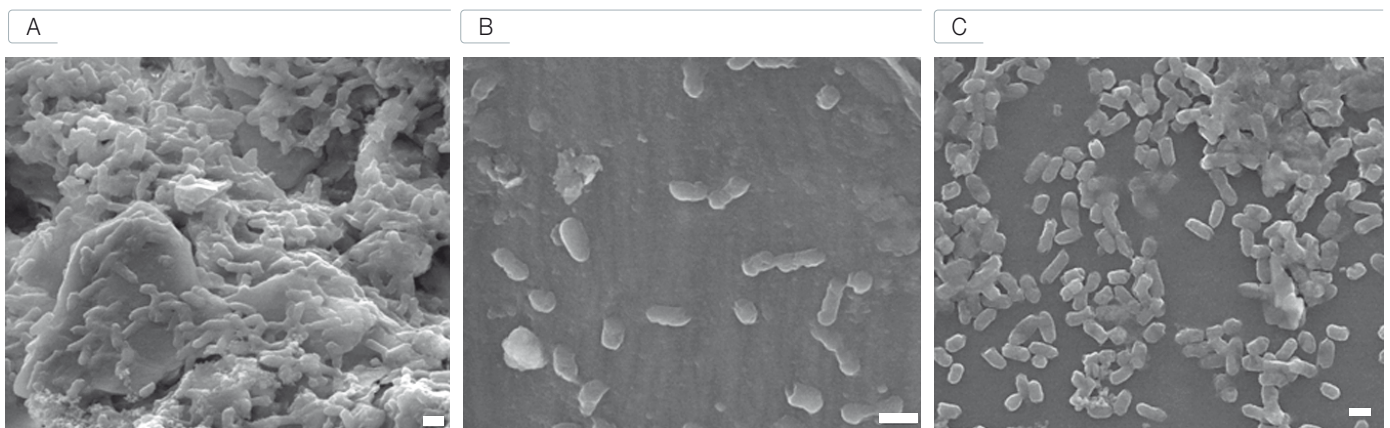
As abreviaturas Plant e Biof referem-se às formas planctónicas e associadas em biofilmes, respetivamente, dos isolados bacterianos. Os antibióticos testados foram a associação de amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), imipenemo (IPM), gentamicina (GM), AMX (amoxicilina) e ciprofloxacina (CIP).

respetivamente. Embora todos os isolados tenham demonstrado capacidade de formar biofilmes a 25 °C, a estirpe Kp4 destacou-se das restantes. A 37 °C, a formação de biofilmes é menor para todos os isolados estando mesmo ausente na Kp2. Este resultado demonstra uma adaptação dos isolados às condições ambientais e simultaneamente uma baixa apetência para persistir a 37 °C, o que pode indicar uma menor capacidade de colonização no Homem.

A adaptação às condições ambientais foi ainda realçada pela observação dos biofilmes da Kp4 formados em diferentes condições por microscopia eletrónica de varrimento (figura 1). Os biofilmes mais exuberantes e bem organizados foram observados no material de revestimento do Lago 2 (massa de cimento) a 25 °C (figura 1A).

No entanto, o número de bactérias aderentes à superfície diminuiu drasticamente (figura 1 B), para a mesma superfície, incubada a 37 °C. Esta observação sugere que embora a bactéria retenha a capacidade de formar biofilme (tabela 1) o processo decorre mais lentamente, sendo necessário um período de adaptação mais longo. O biofilme formado sobre a lamela de vidro a 25 °C (figura 1C) está num estado de desenvolvimento superior ao formado no material da superfície do lago a 37 °C. A comparação dos biofilmes formados sobre lamelas de vidro a 25 e 37 °C demonstrou que os primeiros são mais maduros que os segundos. Podemos concluir que a temperatura de incubação parece desempenhar um papel mais relevante do que a superfície à qual as bactérias aderem, como se pode constatar por comparação das figuras 1B e C.

Figura 1: ↓ Biofilmes de *K. pneumoniae*.



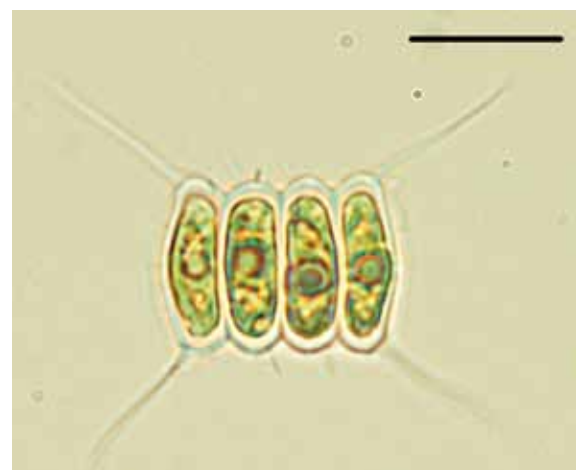
A capacidade da Kp4 isolada sob a forma de biofilme do lago 2 foi avaliada *in vitro* em diferentes superfícies e temperaturas de incubação. As condições que melhor mimetizam as encontradas no ambiente em termos de superfície (revestimento do lago) e temperatura (25 °C) correspondem às que permitem observar um biofilme mais diferenciado ao fim de 48 h (A). A manutenção da superfície com alteração da temperatura para 37 °C (B) ou a manutenção da temperatura com alteração da superfície (C) provocaram uma significativa alteração da formação de biofilmes. A barra de escala corresponde em todas as imagens a 1 µm.

Sendo a resistência aos antibióticos um problema preocupante em saúde pública, ainda mais quando associado à formação de biofilmes, resolvemos determinar a susceptibilidade aos antibióticos das estirpes de Kp. Contrariamente ao que ocorre nas estirpes clínicas, normalmente multirresistentes, as estirpes ambientais eram sensíveis às três classes de antibióticos: β -lactâmicos (cefalosporinas e carbapenemos), aminoglicosídeos (gentamicina) e quinolonas (ciprofloxacina). Este resultado não nos permite classificar estas bactérias como multirresistentes. Como tal, foi apenas avaliado o efeito da formação de biofilmes na resistência à amoxicilina. Os resultados obtidos para a concentração mínima inibitória (CMI) das formas planctónicas e organizadas em biofilme são apresentadas na **tabela 1**. Os isolados Kp3 e 4 apresentam valores de CMI (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significativamente mais elevados do que os apresentados por Kp2 (0,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Kp3 (7,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Estes resultados permitiram-nos formular a hipótese de que Kp3 e Kp4 poderão corresponder a bactérias derivadas dum mesmo biofilme, inclusive poderá ter sido libertada por dispersão do biofilme, onde se encontrava a Kp4, uma vez que ambos foram isolados do mesmo lago. Este aspecto está atualmente a ser explorado no laboratório. A comparação das CMI obtidas para a forma planctónica e respetivo biofilme permitem-nos concluir que a formação de biofilmes aumenta significativamente a resistência aos antibióticos. Este resultado está em concordância com um estudo recente realizado pelo nosso grupo com estirpes de *K. pneumoniae* responsáveis por infeções nosocomiais (4). Como tal podemos concluir que este fenómeno é transversal às estirpes de *K. pneumoniae*, independentemente da sua origem.

A análise da comunidade biológica existente no ecossistema destes dois lagos ficaria contudo incompleta se não fosse analisada a comunidade de organismos fitoplanctónicos. O fitoplâncton é um componente da comunidade planctónica composto por microrganismos unicelulares, solitários ou coloniais, com capacidade fotosintética, que vivem em suspensão na zona eufótica da coluna de água. Nesta comunidade existem alguns membros com reconhecida capacidade para provocarem patologias em humanos. As cianobactérias são as mais conhecidas, devido à capacidade de algumas espécies poderem formar densas florescências potencialmente tóxicas para o Homem (10), contudo algumas clorófitas do género

Desmodesmus (figura 2) podem também provocar infeções oportunistas associadas a traumatismos (11, 12). No último caso, estes incidentes ocorreram em associação a infeções por *Staphylococcus* e *Klebsiella*, o que sugere uma estreita relação entre estes microrganismos. A população fitoplanctónica encontrada nos dois lagos é apresentada na **tabela 2**. Embora os dois lagos tenham valores de biovolume fitoplanctónico típicos de massas de água fortemente eutrofizadas, a abundância e diversidade da comunidade fitoplanctónica do lago 2 é claramente superior à do lago 1. Por outras palavras, a comunidade residente no lago onde foram isoladas estirpes de *Klebsiella* em biofilme é consideravelmente mais rica. Outro aspeto interessante foi a presença em ambos os lagos de microalgas, como por exemplo *Chlamydomonas reinhardtii* e *Oocystis* spp, para as quais está descrita a capacidade de produzirem substâncias com propriedades antibacteriana e antifúngicas (13). Tal poderá, explicar, pelo menos parcialmente, a ausência de fungos nas amostras recolhidas. A relação entre estas duas comunidades, microalgas e bactérias, não se limita a ser antagónica. Uma simbiose também é possível devido, por exemplo, à capacidade de bactérias como a *Klebsiella* fixarem azoto atmosférico e facultarem-no às microalgas sob a forma de compostos azotados. Adicionalmente, a mucilagem das microalgas poderá funcionar como reservatório destas bactérias.

Figura 2:  Colónia de *Desmodesmus armatus*.



Microfotografia de uma colónia de *Desmodesmus armatus* observada na amostra colhida no lago 2. A barra de escala corresponde a 10 μm .

Tabela 2: ↓ Densidade e biovolume da comunidade fitoplanctónica.

Grupos fitoplanctónicos	Lago 1		Lago 2	
	Densidade (células/mL)	Biovolume (mm ³ /L)	Densidade (células/mL)	Biovolume (mm ³ /L)
Cianobactérias	287381	1,68	1357	0,04
Carófitas	595	1,11	95	0,02
Clorófitas	212738	22,28	2286	0,98
Criptófitas	2500	5,43	–	–
Crisófitas	1667	0,78	–	–
Diatomáceas	6071	2,27	4143	3,45
Dinoflagelados	119	0,26	71	0,23
Haptófitas	–	–	24	4,09 x 10 ⁴
Totais	511071	33,81	7976	4,72

Conclusões

Este estudo efetuado em isolados ambientais permitiu a confirmação de dados reportados em isolados clínicos, em que a formação de biofilmes aumenta significativamente a resistência aos antibióticos.

A ausência de leveduras e fungos filamentosos assim como a presença de bactérias implicadas em patologias infecciosas para o Homem, em águas com uma densidade microbiana tão elevada, permite inferir das interações entre os microrganismos e dos malefícios que podem advir quando se intervém no meio ambiente de um modo desordenado.

Em temas ambientais, a simbiose entre os microrganismos e o Homem deverá ser respeitada e os benefícios para a saúde do contacto com a natureza e a prática de atividade desportiva superam todos os riscos.

Referências bibliográficas:

- (1) Cabral JP. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(10):3657-703. [LINK](#)
- (2) Martinez JL. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ Pollut*. 2009;157(11):2893-902.
- (3) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. [LINK](#)
- (4) Bandeira M, Carvalho PA, Duarte A, et al. Exploring Dangerous Connections between *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections. *Pathogens*. 2014;3(3):720-31. [LINK](#)
- (5) Lund JWG, Kipling C, Le Cren ED. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*. 1958;11(2):143-170.
- (6) Utermöhl H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt in Ver theor angew Limnol*. 1958;9:1-38.
- (7) European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC, 2013. [LINK](#)
- (8) LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl Environ Microbiol*. 1988;54(3):649-54. [LINK](#)
- (9) Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(7):1818-24. [LINK](#)
- (10) Cheung MY, Liang S, Lee J. Toxin-producing cyanobacteria in freshwater: a review of the problems, impact on drinking water safety, and efforts for protecting public health. *J Microbiol*. 2013;51(1):1-10.
- (11) Westblade LF, Ranganath S, Dunne WM Jr, et al. Infection with a chlorophyllous eukaryote after a traumatic freshwater injury. *N Engl J Med*. 2015;372(10):982-4. [LINK](#)
- (12) Yu J, Li Z, Brand JJ. Characterization of a green alga isolated from infected human external tissue. *Phycological Res*. 2009; 57: 251–258
- (13) Amaro HM, Guedes AC, Malcata FX. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. In: Méndez-Vilas A (ed). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz: FORMATEX, 2011, Vol 2, pp. 1272-80. [LINK](#)



Monitorização da presença de hidrocarbonetos halogenados aromáticos policíclicos, resultantes dos processos de desinfeção de águas

Sílvia S. José¹, Alexandra M. M. Antunes², Ana Sofia Cardoso¹,
Luísa Jordão¹

silvia.jose@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Saúde Ambiental, INSA.

(2) Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa.

Introdução

Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) são um dos principais grupos de contaminantes persistentes na água, sendo classificados como mutagénicos e cancerígenos para o Homem pela Organização Mundial de Saúde.

Diversos estudos científicos demonstram que os processos de desinfeção de águas contaminadas com HAPs podem promover formação de derivados clorados ou bromados destes compostos, consoante o agente de desinfeção usado (1,2,3). Estes derivados halogenados, de uma forma geral, apresentam uma toxicidade superior à do composto que lhe deu origem (4).

A contaminação de águas superficiais com HAPs pode resultar de descargas de efluentes industriais e urbanos e/ou da deposição de compostos existentes na atmosfera. No último caso embora os HAPs possam ter origem em gases de exaustão automóvel ou outras fontes de poluição, a principal fonte são os compostos libertados durante os incêndios (5).

O interesse pelo estudo destes poluentes ambientais reside no facto de estar demonstrada a sua capacidade de causar graves problemas de saúde após longos períodos de exposição, destacando-se o aumento da incidência de vários tipos de cancro como o da pele, pulmão, bexiga e estômago (6,7).

Objetivo

Este trabalho teve como objetivo monitorizar a presença de derivados clorados e bromados do Pireno (Pir) e do Benzo(a)antraceno (BaA) na água.

Materiais e métodos

Derivados halogenados de HAPs: os derivados clorados do Pir e BaA foram obtidos como descrito abaixo. O derivado bromado do pireno foi obtido comercialmente.

Síntese e caracterização de derivados clorados de HAPs: os compostos halogenados foram sintetizados como descrito anteriormente para alguns compostos aromáticos (8). Resumidamente, promoveu-se a substituição eletrofílica de um átomo de hidrogénio por um halogéneo (cloro ou bromo) no anel aromático, na presença de dimetilformamida (DMF), em atmosfera de azoto. O composto foi purificado por cromatografia em coluna com fase estacionária de sílica gel 70-230 mesh) e uma fase móvel (n-hexano) seguida de cromatografia preparativa em camada fina (sílica gel, 0,5 mm, 60F, 254 nm). O composto purificado foi identificado por ressonância magnética nuclear (RMN) de carbono (¹³C-RMN) e protão (¹H-RMN).

Quantificação de derivados halogenados: as amostras foram preparadas por uma técnica de micro-extração em fase sólida (SPME), utilizando como fase estacionária uma fibra de revestimento polar de polidimetilsiloxano (PDMS). Para a extração dos compostos, foi utilizado um volume de amostra de 15 mL, com tempo de extração de 50 min a uma temperatura de 70 °C. A quantificação foi efetuada num cromatografo gasoso acoplado a um detetor de massa (GC-MS), sendo a fase estacionária uma coluna Factor Four VF-5 ms (0,25 µm; L (m) 30xID (mm) 0,25xOD (mm) 0,39) percorrida por um fluxo de 1mL/min de Hélio. A desorção dos analitos foi através da injeção a fibra no injetor do cromatografo a 280 °C, durante 7 min. As condições da corrida cromatográfica foram as seguintes relativamente ao gradiente térmico da coluna, foi de 80 °C - 220 °C (20 °C/min, 2 min); 220 °C-300 °C (5 °C/min, 4 min), perfazendo um tempo total de corrida de 30 min. A identificação dos compostos foi feita através dos cromatogramas e respetivos espetros de massas.

artigos breves_ n. 3

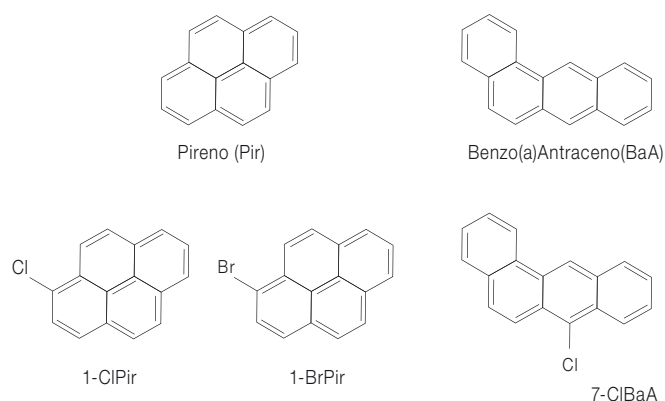
Validação do método: os parâmetros analíticos de selectividade, linearidade, exactidão e precisão, bem como, os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados de forma a validar o método de quantificação.

Simulação da formação de derivados halogenados HAPs: para simular as condições de desinfeção por cloragem ou bromagem utilizou-se o procedimento seguinte: a uma solução aquosa de concentração conhecida em pireno e BaA foi adicionado hipoclorito de sódio (NaOCl) para a reação de cloragem, e o hipoclorito de sódio (NaOCl) e brometo de potássio (KBr) para a reação de bromagem. O sistema reacional foi mantido em agitação durante 3 h a pH ácido. Decorrido este tempo a solução foi neutralizada com sulfito de sódio. Posteriormente as amostras foram processadas, utilizando o procedimento anteriormente otimizado para a determinação destes compostos em amostras de água.

_Resultados e discussão

Os compostos parentais (pireno e benzo(a)antraceno) e os seus derivados apresentados na **figura 1** foram utilizados neste estudo.

Figura 1: Estruturas do Pir, 1-ClPir, 1-BrPir, BaA e 7-ClBaA.



Uma vez que a presença destes compostos nas águas está documentada e representa um perigo para a saúde pública é premente desenvolver um método para monitorizar a sua presença nestas amostras ambientais. O primeiro passo deste trabalho consistiu no desenvolvimento e validação dum método para este efeito.

Inicialmente efetuou-se a síntese dos derivados halogenados dos compostos Pireno e Benzo(a)antraceno. No entanto, ainda que tenha sido possível sintetizar todos os derivados, no decurso do processo de separação e purificação os compostos bromados degradaram-se, possivelmente devido à sua elevada reatividade. Por esta razão o único derivado bromado incluído no estudo foi o 1-BrPir por estar disponível comercialmente.

Posteriormente foi desenvolvida e otimizada uma metodologia para quantificação destes compostos, em amostras de água, através da técnica de cromatografia gasosa (GC) com detetor de espectrometria de massa. As condições de preparação da amostra, através da técnica de microextração em fase sólida (SPME), foram optimizadas. O estudo realizado permitiu seleccionar o tempo 50 mim e a temperatura 70 °C como as melhores condições de extracção, e 280 °C e 7min no injetor como melhores condições de dessorção.

Como resultado da otimização foi definido um método cujos parâmetros são apresentados na **figura 2A**. Este método permite separação e identificar 5 compostos distintos numa única corrida cromatográfica. Na **figura 2B** é apresentado um cromatograma representativo dos resultados obtidos. A validação do método consistiu na avaliação dos parâmetros de selectividade, linearidade, exactidão e precisão numa gama de trabalho 0,025-0,22 µg/L, para todos os compostos. Os limiares analíticos (LD e LQ) foram também validados por forma a verificar que a gama de trabalho estava bem definida. Os resultados obtidos para os diferentes parâmetros analíticos avaliados são apresentados na **figura 2A**.

A formação dos derivados clorados e bromado em soluções aquosas tratadas com o agente de desinfeção hipoclorito de sódio foi depois avaliada utilizando a o método cromatografico desenvolvido e validado. Foi verificada a formação dos derivados halogenados 1-ClPir e 7-ClPir por adição do desinfectante hipoclorito de sódio à solução que continha os HAPs Pir e BaA. No caso da reação da bromação a adição de KBr à solução contendo os HAPs e o hipoclorito de sódio, promoveu a formação do ácido hipobromoso, que potenciou a formação do derivado bromado, tal como aconteceu de modo análogo com o ácido hipocloroso formado na reação de cloragem (**figura 3**).

artigos breves_ n. 3

Figura 2: A) Condições optimizadas para metodologia de cromatografia gasosa; B) Cromatograma obtido no sistema de GC/MS, para uma solução mistura de pireno, 1-Clpireno, 1-Brpireno, benzo(a)antraceno, 7-Clbenzo(a)antraceno com a concentração de 0,22 µg/L⁻¹.

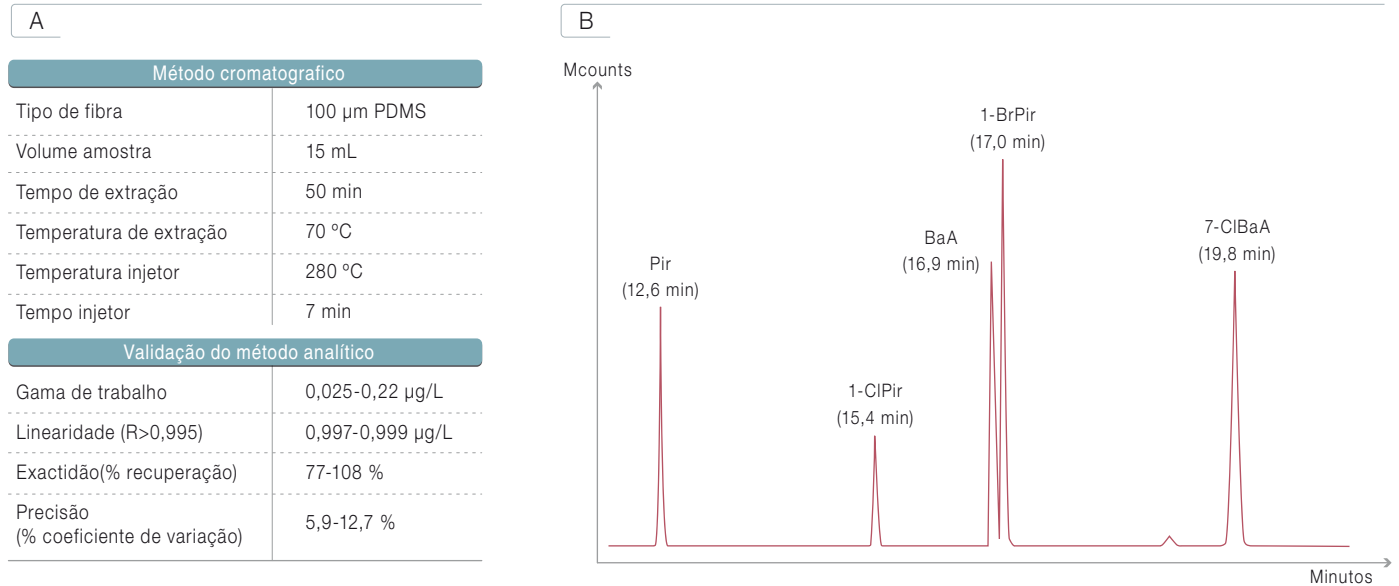
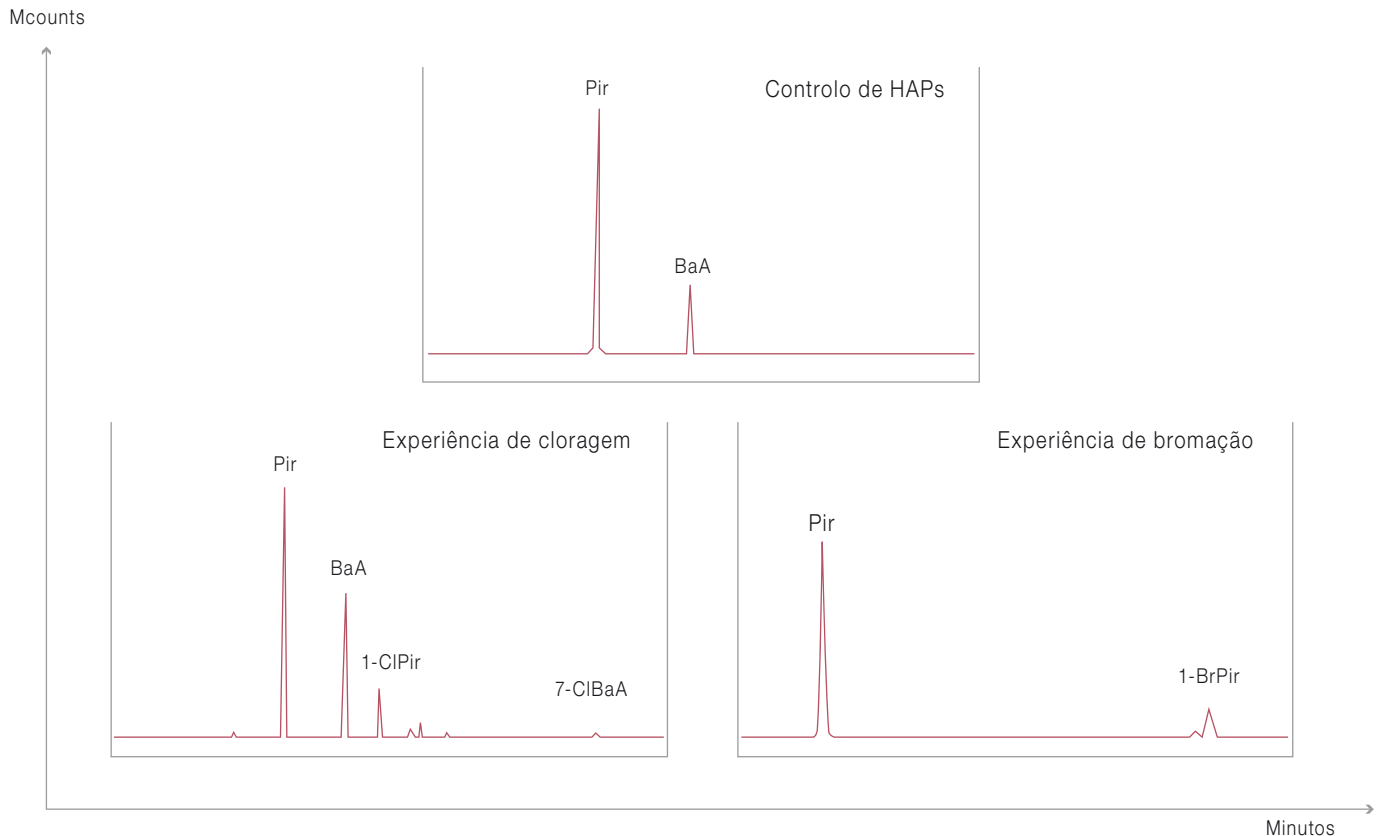


Figura 3: Cromatogramas referentes às experiências de cloragem e bromagem. Solução contendo os dois compostos parentais (Pir e BaA), Reação de cloragem e bromagem dos HAPs a 10 µg/L, 3h agitação, na presença de hipoclorito de sódio e brometo de potássio.



**artigos breves_ n. 3**

Este ensaio permitiu demonstrar simultaneamente a formação dos derivados halogenados em condições que mimetizam a desinfeção de águas e a capacidade do método desenvolvido para os quantificar.

Neste momento estamos a analisar amostras reais recolhidas em locais potencialmente contaminados com HAPs. Até ao momento a sua presença não foi detetada o que devido aos efeitos nocivos para a saúde constitui um bom indicador.

_Conclusão

Em conclusão, os resultados obtidos para as experiências de cloragem e bromagem, confirmam a possível formação das espécies halogenadas em água após os processos de desinfeção e foi possível desenvolver e validar uma metodologia para a monitorização da presença de espécies halogenadas dos compostos Pir e BaA em amostras de águas reais.

Referências bibliográficas:

- (1) Oyler AR, Liukkonen RJ, Lukasewycz MK, et al. Implications of treating water containing polynuclear aromatic hydrocarbons with chlorine: a gas chromatographic-mass spectrometric study. *Environ Health Perspect.* 1982;46:73-86. [LINK](#)
- (2) Shiraiishi H, Pilkington NH, Otsuki A, et al. Occurrence of chlorinated polynuclear aromatic hydrocarbons in tap water. *Environ Sci Technol.* 1985;19(7):585-90.
- (3) Ohura T, Kamiya Y, Ikemori F, et al. Analysis of Halogenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Air. In: Lopez Badilla G, Valdez B, Schorr M (eds). *Air Quality: New Perspective.* InTech, 2012, Chapter 15: 313-326. [LINK](#)
- (4) Pinto M, Rebola M, Louro H, et al. Chlorinated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Drinking Water Disinfection: synthesis, formation under Aqueous Chlorination conditions and genotoxic effects. *Polycyclic Aromatic Compounds.* 2014; 34(4): 356-71.
- (5) Silva, JPSSG. Efeito dos fogos florestais sobre a presença de HAPs na água subterrânea e a hidrofobicidade do solo. [S.l.: s.n.], 2013. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- (6) Wu B, Zhang Y, Zhang XX, et al. Health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the source water and drinking water of China: Quantitative analysis based on published monitoring data. *Sci Total Environ.* 2011;410-411:112-8.
- (7) Armstrong B, Hutchinson E, Unwin J, et al. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ Health Perspect.* 2004;112(9):970-8. [LINK](#)
- (8) Mitchell RH, Lai Y-H, Williams RV. N-Bromosuccinimide-dimethylformamide: a mild, selective nuclear monobromination reagent for reactive aromatic compounds. *J Org Chem.* 1979; 44(25): 4733-35.



Diagnóstico laboratorial da infeção por *Chlamydia trachomatis*, 1991-2014

Margarida Dinis¹, Dora Cordeiro¹, Irene Santo², Jacinta Azevedo², João Paulo Gomes¹, Maria José Borrego¹

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

(1) Departamento Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Consulta de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST), Centro de Saúde da Lapa, Lisboa.

Introdução

Chlamydia trachomatis é uma bactéria intracelular obrigatória, caracterizada pelo seu ciclo de desenvolvimento bifásico, durante o qual a bactéria alterna entre duas formas morfológicas diferentes, das quais o corpo elementar constitui a forma infecciosa. *C. trachomatis* tem como hospedeiro o Homem e transmite-se de uma pessoa para outra por contacto direto.

Com base na estrutura do principal componente da membrana externa, a proteína MOMP, foram definidas 15 serovarietades (A a L) de *C. trachomatis* associadas a diferentes patologias. As estirpes A, B e C causam tracoma. O tracoma constitui a principal causa de cegueira suscetível de prevenção a nível mundial, incidindo os casos sobretudo nos países em que os cuidados básicos de higiene são deficitários, nomeadamente por escassez de água e falhas no saneamento básico. As estirpes de D a K são transmitidas por contacto sexual, sendo responsáveis por infeções anais, genitais, faríngeas, oculares e articulares. Na mulher, tais estirpes podem causar cervicite, com ocorrência de um corrimento purulento, ou doença inflamatória pélvica (DIP) cujos sintomas, sobretudo dor pélvica, derivam do processo inflamatório associado à infeção das trompas de Falópio (salpingite). Contudo, três quartos dos casos de infeção são assintomáticos, favorecendo a evolução do processo infeccioso para formas clínicas graves e sequelas, como são exemplo a gravidez ectópica e a infertilidade tubária. Acresce que, na mulher grávida, a infeção por *C. trachomatis* pode ser transmitida ao recém-nascido no momento do parto, causando-lhe conjuntivite ou mesmo pneumonia grave. No homem, as estirpes D a K podem dar origem a uretrite ou mesmo epididimite e prostatite, sendo que cerca de metade dos casos são assintomáticos. A ausência ou escassez de sintomas em ambos os sexos justifica que os indivíduos infetados não

procurem cuidados médicos e, conseqüentemente, não sejam diagnosticados e tratados, favorecendo, assim, a transmissão da infeção por *C. trachomatis* de pessoa a pessoa. Finalmente, as estirpes L de *C. trachomatis* são igualmente transmitidas por contacto sexual e causam linfogranuloma venéreo (LGV), uma patologia caracterizada pelo desenvolvimento de úlceras anogenitais, proctite e infeção dos gânglios inguinais. Desde 2004, o LGV tem-se revelado como uma doença emergente, principalmente nos homens que têm sexo com homens, constituindo o contacto sexual anal recetivo o principal modo de aquisição/transmissão da infeção e manifestando-se clinicamente como proctite (1).

Em 2008, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou em 105.7 milhões o número de novos casos de infeção por *C. trachomatis* na população adulta em todo o mundo (2), constituindo esta a principal causa bacteriana de infeção sexualmente transmissível (IST) a nível mundial. Em 2012, em 26 países da União Europeia ou da zona económica europeia, foram notificados 385307 casos de infeção por *C. trachomatis* com uma taxa de incidência global de 184/100000 habitantes (3). A infeção por *C. trachomatis* foi mais frequente nas mulheres do que nos homens, tendo-se verificado taxas de incidência de 211/100000 e 153/100000, respetivamente. Mais de dois terços (68%) dos casos foram identificados em jovens com idades entre os 15 e os 24 anos. No entanto, estima-se que a incidência global seja mais elevada, tendo em conta a diversidade da cobertura laboratorial e, até mesmo, da validade das técnicas laboratoriais utilizadas, bem como a heterogeneidade dos programas de rastreio e de vigilância implementados nos diferentes países europeus. De facto, 84% dos casos referidos no relatório de 2012 do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) foram declarados por apenas quatro países: Dinamarca, Noruega, Suécia e Reino Unido (3).

Portugal não dispõe de um programa de rastreio para as infeções por *C. trachomatis*, mas a sua notificação tornou-se obrigatória a partir de abril de 2014 (Despacho n.º 5681-A/2014 de 21 de abril) (4).

Objetivo

O presente trabalho tem por objetivo apresentar os resultados do diagnóstico laboratorial das infeções por *C. trachomatis* realizado no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) entre 1991 e 2014.

artigos breves_ n. 4

Material e métodos

Foi realizada uma análise retrospectiva dos resultados laboratoriais da pesquisa de *C. trachomatis* no Laboratório Nacional de Referência das Infecções Sexualmente Transmissíveis do INSA, entre janeiro de 1991 e dezembro de 2014. Neste período foram analisadas amostras clínicas (urina, exsudados endocervicais, uretrais, anais ou conjuntivais) de 36621 utentes (13885 homens e 22736 mulheres), provenientes de consultas de clínica geral, de adolescentes ou de planeamento familiar dos cuidados de saúde primários e de consultas privadas de ginecologia e urologia, sobretudo da região de Lisboa, com particular relevo para a consulta de doenças sexualmente transmissíveis (DST) do Centro de Saúde da Lapa. Foi possível obter dados sobre a idade a partir de 2004. Dos 20076 indivíduos estudados entre 2004 e 2014, 5626 (28%) tinham menos de 25 anos e 14450 (72%) tinham 25 ou mais anos.

Os métodos utilizados no diagnóstico laboratorial alteraram-se ao longo dos últimos 23 anos. No início dos anos 90, a cultura em linhas celulares (McCoy) e a imunofluorescência direta eram os mais

usados, passando para metodologias moleculares, nomeadamente o PCR convencional, em meados dos anos 1990, com recurso aos métodos comerciais Amplicor e Cobas-Amplicor (Roche). A partir de 2010 passou a utilizar-se um equipamento robotizado que inclui uma tecnologia PCR em tempo real, Cobas 4800 (Roche). Todos os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

Resultados

Globalmente, a pesquisa de *C. trachomatis* revelou-se positiva em 2817 (7,7%) dos 36621 indivíduos estudados: 8,9% (1242/13885) nos homens e 6,9% (1575/22736) nas mulheres.

O gráfico 1 apresenta a frequência de casos positivos de infeção por *C. trachomatis* por sexo entre 1991 e 2014.

O gráfico 2 apresenta o número de pesquisas efetuadas e a frequência de casos positivos de infeção por *C. trachomatis* nos dois grupos etários anteriormente definidos.

Gráfico 1 : ▾ Casos de infeção por *C. trachomatis*, 1991-2014.

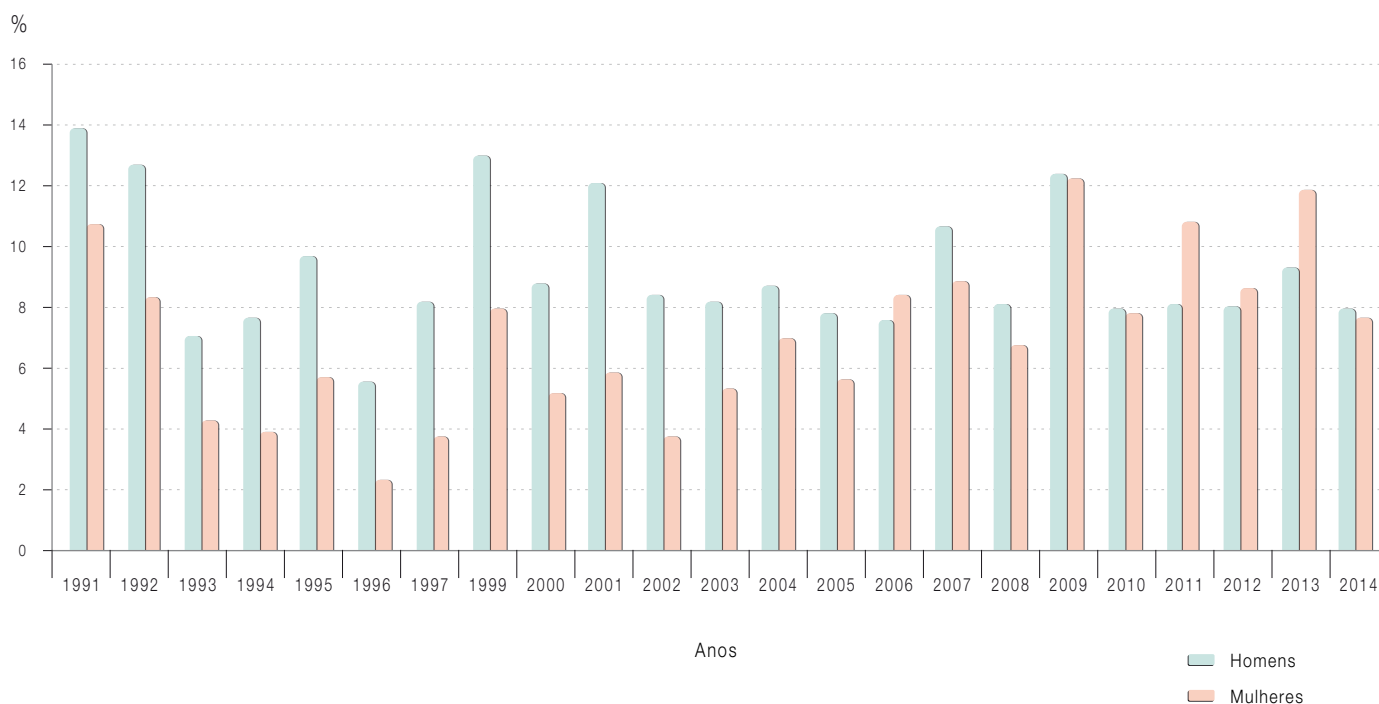
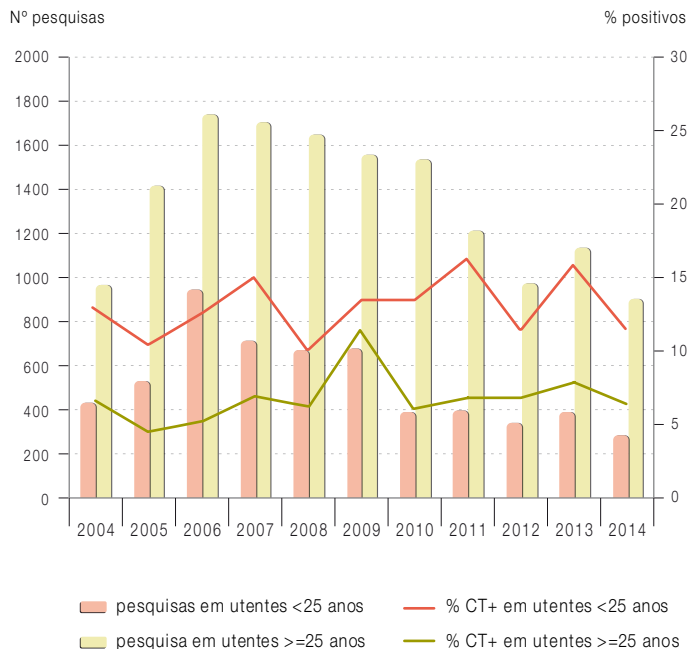


Gráfico 2 : ↓ Casos de infeção por *C. trachomatis* em utentes <25 anos e ≥ 25 anos, 2004-2014.



Discussão e conclusões

Os resultados apresentados no presente trabalho não têm expressão do ponto de vista epidemiológico, uma vez que apenas refletem os resultados do diagnóstico laboratorial realizado no INSA.

A positividade global de 7,7% é mais elevada do que as obtidas em estudos de rastreio (3). Esse facto pode ser considerado como expectável uma vez que cerca de dois terços dos utentes foram provenientes de uma consulta de DST, à qual potencialmente terão recorrido indivíduos com comportamentos de maior risco para a aquisição de IST.

Observou-se um decréscimo em meados da década de 1990, um fenómeno conhecido na epidemiologia das IST e relacionável com a alteração de comportamentos, na sequência do aparecimento do vírus da imunodeficiência humana no final da década de 1980. Tal como tem sido referido em estudos de rastreio (3) é possível constatar um aumento da frequência de casos de infeção por *C. trachomatis* a partir do início do novo milénio e é de realçar a maior frequência na população jovem com menos de 25 anos.

Espera-se que a notificação obrigatória de casos de infeção por *C. trachomatis*, introduzida pelo Despacho n.º 5681-A/2014 (4), venha a constituir um instrumento útil na vigilância desta IST em Portugal. No entanto, alerta-se para o facto da pesquisa laboratorial de *C. trachomatis* não estar incluída na tabela da Administração Central para os Cuidados de Saúde (ACSS) “ET.ACSS 4:2011 - Produto de Software para requisição electrónica de meios complementares de diagnóstico e actos terapêuticos” e disponibilizada para os cuidados de saúde primários. Consta-se, assim, que a pesquisa de *C. trachomatis* não está a ser realizada por rotina em Portugal desde o final de 2011. Este facto, aumenta o risco de progressão da infeção para sequelas graves, com especial impacto para a saúde reprodutiva (infertilidade) e neonatal (transmissão e infeção do recém-nascido) da IST bacteriana mais frequente em todo o mundo.

Agradecimentos

Agradecemos muito particularmente à Doutora Maria dos Anjos Catry, pioneira no estudo das clamidioses em Portugal, tendo sido responsável pelo laboratório de *Chlamydia* do INSA durante largos anos, igualmente a Maria Arminda Ferreira que efetuou as técnicas de diagnóstico laboratorial de *Chlamydia trachomatis* no INSA durante vários anos e a todos os profissionais que ao longo destes anos colaboraram em projetos que envolveram *C. trachomatis*, em particular: Mestre Inês João, Dra. Maria de São José; Dra. Manuela Sousa; Dra. Maria José Verdasca; Dra. Ana Andrade; Dra. Sílvia Pimenta; Dra. Ana Maria Rodrigues; Dra. Cândida Fernandes; Dra. Raquel Vieira, Dra. Alexandra Chaveiro, Dra. Madalena Barata, Professora Graça Rocha; Dra. Isilda Peixoto; Professor Armando Brito de Sá; Dr. Paulo Lamarão; Dr. Jorge Cardoso; Dr. José Luís Viana; Professor Calhaz Jorge e Dr. Pedro Sá e Melo. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Borrego MJ, Martins-Pereira F. Chlamydia e Chlamydia. In: Barroso H, Meliço-Silvestre, Taveira N (eds.). Microbiologia Médica. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, Lda., 2014, pp. 488-97.
- (2) World Health Organization. Department of Reproductive Health and Research. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008. Geneva: WHO, 2012. [LINK](#)
- (3) European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually Transmitted Infections in Europe 2012. Stockholm: ECDC, 2014. (Surveillance Report). [LINK](#)
- (4) Ministério da Saúde. Direção-Geral da Saúde. Despacho n.º 5681-A/2014, de 21 de abril - Notificação obrigatória de doenças transmissíveis e outros riscos em saúde pública. DR n.º 82/2014, de 29 de abril, 2ª Série (Supl.1), pp. 11374-(2)-(20). [LINK](#)



Vigilância laboratorial da infeção a Enterovirus entre 2010 e 2013

Paula Palminha, Carlos Ribeiro, Carla Roque, Elsa Vinagre

paula.palminha@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de Doenças Evitáveis pela Vacinação.
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

Introdução

Os Enterovirus pertencem à família *Picornaviridae* e são vírus de ARN de cadeia simples e linear (1).

A sua transmissão é predominantemente por via fecal-oral, embora a via respiratória-oral, bem como o contacto com objetos contaminados também esteja descrito (1).

Estes vírus encontram-se divididos em 3 grupos, os vírus *Polio*, os *Coxsackievirus* (grupos A e B), e os *Echovirus*. Estão identificados 68 serotipos pertencendo, 3 serotipos aos vírus da Poliomielite, 23 aos *Coxsackievirus* do grupo A, 6 aos *Coxsackievirus* do grupo B e 29 aos *Echovirus*. Os Enterovirus identificados mais recentemente não são incluídos nesta classificação, sendo designados como Enterovirus 38, 68 e 71 (2).

As infeções a Enterovirus podem ser assintomáticas ou causar sintomatologia que pode variar de ligeira a grave. Os vírus da Poliomielite podem provocar infeções subclínicas, doença ligeira, meningite asséptica ou doença parálitica permanente e até mesmo fatal (poliomielite). Os *Coxsackievirus* são o agente etiológico mais comum na doença cardíaca viral e os *Echovirus* podem provocar desde febre, a meningite asséptica ou conjuntivite hemorrágica aguda (1).

Em 1988, a 41ª Assembleia Mundial de Saúde tomou a resolução de erradicar, a nível mundial, a poliomielite, tendo em 1995 Portugal iniciado o programa de erradicação (3). Em 1999, a OMS estabeleceu na região europeia uma rede de laboratórios de referência, em que participa o Laboratório Nacional de Referência da Poliomielite do Instituto Nacional de Saúde do Doutor Ricardo Jorge (INSA), que

passou a realizar a investigação laboratorial de todos os casos de paralisia flácida aguda (PFA) em crianças com menos de 15 anos e de todos os casos suspeitos de poliomielite em qualquer idade. Em 2002, a OMS declarou a Região Europeia livre de Poliomielite.

Em Portugal, em 2010, e como complemento ao sistema de vigilância da PFA (4) já existente, foi desenvolvido pelo Laboratório Nacional de Referência da Poliomielite do INSA, em colaboração com alguns hospitais, um sistema de vigilância laboratorial de Enterovirus, uma vez que o número de casos de PFA notificados anualmente foi sempre inferior ao preconizado pela OMS (≥ 1 caso PFA/100.000), sendo por isso, necessário complementar o sistema de vigilância da PFA vigente.

Objetivo

Analisar os resultados do diagnóstico laboratorial de casos suspeitos de infeção a Enterovirus recebidos no INSA ao abrigo do Programa de Erradicação da Poliomielite (Vigilância Laboratorial da PFA e de Enterovirus) entre 2010 e 2013.

Material e métodos

Para efeitos do presente trabalho, constituíram fonte de dados todos os hospitais que participaram na vigilância laboratorial da PFA e de Enterovirus, no âmbito do Programa de Erradicação da Poliomielite, e que no período em estudo enviaram ao INSA amostras clínicas de casos suspeitos de infeção a Enterovirus para confirmação laboratorial.

O diagnóstico laboratorial foi realizado por isolamento viral em cultura celular com posterior tipificação pela técnica de neutralização ou sequenciação genómica (5,6).

Preparação das amostras: as amostras fecais foram tratadas com clorofórmio de acordo com as indicações da OMS.

Isolamento viral: o isolamento viral foi realizado em tubo por inoculação de 200 μ l de fezes tratadas (extrato de fezes) em células Hep-2, RD, MRC-5 e L20B. A incubação processa-se a 37°C com 5% de CO₂. O efeito citopático (CPE) característico da multiplicação dos Enterovirus foi observado diariamente.



artigos breves_ n. 5

Identificação viral: a identificação viral foi efetuada por reação de neutralização. Para o efeito, utilizou-se *pools* de antissoros preparadas no *National Institute of Public Health and Environment (RIVM)*, em Bilthoven de acordo com os procedimentos da OMS (5). Nos casos em que não foi possível por reação de neutralização efectuar a identificação dos Enterovirus isolados esta foi realizada por sequenciação genómica.

Quando não foi possível identificar os Enterovirus isolados pela técnica de neutralização ou por sequenciação genómica, estes foram designados por Enterovirus não Polio (EVNP).

_Resultados

Entre 2010 e 2013 foram analisadas 651 fezes de 625 casos suspeitos de infeção por Enterovirus, dos quais 28 eram casos de PFA. Foram igualmente analisadas fezes de 7 casos de meningite asséptica, provenientes de 3 surtos sem ligação epidemiológica no espaço, no tempo e entre indivíduos conhecida que ocorreram em Portugal.

Entre 2010 e 2013 foram identificados 143 (143/625; 22,9%) casos de infeção a Enterovirus com a seguinte distribuição temporal: 46 casos em 2010; 47 em 2011; 24 em 2012 e 26 casos em 2013 (tabela 1).

Tabela 1: Distribuição do número de casos de infeção a Enterovirus por ano de diagnóstico, 2010-2013.

Ano	Casos positivos		Casos negativos		Total	
	n	%	n	%	n	%
2010	46	29	108	71	154	100
2011	47	32	100	68	147	100
2012	24	16	124	84	148	100
2013	26	15	150	85	176	100
Total	143		482		625	

Em 2010, os Enterovirus mais frequentemente isolados no INSA foram o *Echovirus 6* (34,8%) e o *Echovirus 30* (23,9%). Em 2011, o *Echovirus 6* e o *Echovirus 11* constituíram respetivamente 14,9% e 19,1% do total de casos diagnosticados nesse ano. Em 2012, o *Echovirus 21* (29,2%) e em 2013 o *Echovirus 5* (11,5%) foram os mais frequentes. Em 2013 foram igualmente isolados 2 vírus da Poliomielite tipo 1 e tipo 3 *Sabin like* numa criança residente em Angola sem suspeita de poliomielite (tabela 2).

Dos 143 casos positivos para Enterovirus, a grande maioria (n=105; 73,4%) não referiu o diagnóstico clínico suspeito da infeção. Os restantes 38 casos positivos (26,6%) possuíam diagnóstico clínico de meningite.

_Discussão e conclusões

Em 2010, o *Echovirus 6* e o *Echovirus 30* foram os Enterovirus predominantemente identificados, correspondendo a cerca de 60% dos casos positivos diagnosticados no INSA.

Da análise da distribuição do número de casos de infeção por Enterovirus entre 2010 e 2013 verificou-se que o *Echovirus 6* foi o vírus mais frequente, seguido dos EVNPs. Acrescenta-se que se verificou uma acentuada diminuição de casos de infeção por *Echovirus 30* entre 2010 e 2012 e que nenhum caso foi identificado no INSA em 2013. É igualmente de realçar que em 2012 foram isolados, pela primeira vez em Portugal, três vírus *Enterovirus 71* cujo genótipo (C2) é circulante na Europa.

Saliente-se que em 2013 os EVNPs corresponderam a 30,9% dos vírus isolados, sendo o *Echovirus 5* o segundo vírus mais frequente (11,5%). Neste mesmo ano foram igualmente isolados 2 vírus da Poliomielite tipo 1 e tipo 3 estirpe *Sabin like* numa criança residente em Angola sem quadro clínico de poliomielite.

Tabela 2: ↓ Distribuição do número de casos de infeção a Enterovirus por ano de diagnóstico, 2010-2013.

Vírus	Ano de diagnóstico							
	2010		2011		2012		2013	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Coxsackie B2	1	2,2	3	6,4	-	-	-	-
Coxsackie B3	2	4,3	1	2,1	-	-	-	-
Coxsackie B4	-	-	-	-	1	4,2	-	-
Coxsackie B5	1	2,2	1	2,1	1	4,2	2	7,7
Coxsackie A2	-	-	-	-	1	4,2	-	-
Coxsackie A4	-	-	2	4,3	1	4,2	-	-
Coxsackie A6	1	2,2	-	-	-	-	1	3,8
Coxsackie A8	-	-	1	2,1	-	-	1	3,8
Coxsackie A9	3	6,5	4	8,5	-	-	-	-
Coxsackie A11	2	4,3	-	-	-	-	-	-
Coxsackie A16	-	-	2	4,3	-	-	-	-
Echovirus 3	-	-	-	-	-	-	1	3,8
Echovirus 4	-	-	-	-	-	-	1	3,8
Echovirus 5	-	-	-	-	1	4,2	3	11,5
Echovirus 6	16	34,8	7	14,9	3	12,5	2	7,7
Echovirus 7	2	4,3	4	8,5	-	-	-	-
Echovirus 9	-	-	-	-	-	-	-	-
Echovirus 11	2	4,3	9	19,1	-	-	-	-
Echovirus 13	-	-	-	-	-	-	2	7,7
Echovirus 18	-	-	1	2,1	4	16,7	-	-
Echovirus 21	-	-	-	-	7	29,2	1	3,8
Echovirus 25	4	8,8	1	2,1	1	4,2	2	7,7
Echovirus 30	11	23,9	4	8,5	1	4,2	-	-
Enterovirus 71	-	-	3	6,4	1	4,2	-	-
Poliovirus tipo 1	-	-	0	-	-	-	1	7,7
Poliovirus tipo 3	-	-	0	-	-	-	1	7,7
EVNP *	1	2,2	4	8,5	2	8,3	8	30,9
Total	46	100	47	100	24	100	26	100

* Enterovirus não Polio

A distribuição dos casos positivos por diagnóstico clínico carece de apreciação, uma vez que a maior parte dos instrumentos de notação que acompanharam os produtos biológicos não mencionavam esta informação.

Apesar dos 3 surtos de meningite asséptica não terem ligação epidemiológica no espaço, no tempo e entre indivíduos conhecida, o *Echovirus 6* foi o agente etiológico responsável por estes surtos.

Por último, saliente-se que a vigilância laboratorial de Enterovirus parece ser um instrumento útil ao sistema de vigilância da PFA, pois não só possibilita conhecer os Enterovirus em circulação em Portugal como permite identificar vírus da poliomielite, demonstrando assim a sua sensibilidade na identificação destes vírus importados.

Agradecimento

À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Edited by Knippe DM, Howley PM Fields Virology. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2001:723-75.
- (2) Stanway G, Brown F, Christian P, et al. Picornaviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. (eds). Virus taxonomy-classification and nomenclature of viroses: eight report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Academic Press, 2005, pp. 757-78.
- (3) Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa nº15/DSSP de 03/10/1995. Programa de erradicação da poliomielite: vigilância clínica, epidemiológica e laboratorial da paralisia flácida aguda. (Revogada pela Circular Normativa nº 7/DSPS, de 08/06/1999, que reforçou a operacionalidade do Programa de vigilância clínica, epidemiológica e laboratorial da Paralisia Flácida Aguda (PFA).
- (4) Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa nº 08/DSPS de 04/05/2004 - Programa Nacional de Erradicação da Poliomielite - Plano de Acção Pós-Eliminação. [LINK](#)
- (5) World Health Organization. Polio laboratory manual. 4th ed. Geneva: WHO, 2004. [LINK](#)
- (6) Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1288-93. [LINK](#)



A gripe em Portugal: análise preliminar da atividade gripal 2014/2015

Pedro Pechirra¹, Paula Cristóvão¹, Inês Costa¹, Carla Roque²,
Paula Barreiro³, Sílvia Duarte³, Ausenda Machado⁴,
Ana Paula Rodrigues⁴, Baltazar Nunes⁴, Raquel Guiomar¹

raquel.guiomar@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Laboratório de Cultura de Tecidos. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(3) Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Genética Humana, INSA.

(4) Departamento de Epidemiologia, INSA.

Introdução

O Programa Nacional de Vigilância da Gripe (PNVG) integra as componentes clínica e laboratorial, permitindo a descrição da atividade gripal na população portuguesa através da determinação semanal da taxa de incidência de síndrome gripal (SG) e da identificação e caracterização das estirpes do vírus da gripe que circulam em cada inverno. A operacionalização da componente clínica do programa de vigilância conta com a colaboração de médicos de família da Rede Médicos-Sentinela que notificam casos de SG da sua lista de doentes, possibilitando o cálculo da taxa de incidência. A componente laboratorial é assegurada pelas redes Médicos-Sentinela, Serviços de Urgência, Serviços de Obstetria, bem como os médicos participantes no projeto EuroEVA, que enviam amostras biológicas ao Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios (LNRVG) para a pesquisa do vírus influenza.

Os laboratórios da Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe (RPLDG) realizam também o diagnóstico laboratorial da gripe e contribuem para a caracterização antigénica e genética dos vírus detetados em colaboração com o LNRVG.

A deteção de surtos e identificação de vírus menos frequentes e emergentes, com potencial pandémico e de elevado risco para a saúde pública constituem igualmente áreas de atuação do PNVG.

A vigilância da gripe é realizada durante todo o ano, estando especialmente ativa entre os meses de outubro e maio, atualizando

e disponibilizando semanalmente a informação relacionada com a atividade gripal, por forma a possibilitar orientações para as medidas de intervenção que conduzam à redução da morbilidade e mortalidade e prevenção da doença respiratória.

Objetivo

Pretende-se com a presente publicação, divulgar a análise preliminar da atividade gripal em Portugal na época de 2014/2015 (entre 15 de setembro de 2014 e 20 de março de 2015).

Material e métodos

Durante o período em estudo foram notificados casos de SG de acordo com a definição de SG do ECDC (1), i.e. início súbito dos sintomas e com a presença de pelo menos um sinal/sintoma sistémico e respiratório. As taxas de incidência semanais de SG foram calculadas com base nas notificações de SG enviadas ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) pela Rede Médicos-Sentinela, no âmbito da componente clínica do PNVG.

O diagnóstico laboratorial do vírus da gripe pela metodologia RT-PCR em tempo real (2,3) permitiu a pesquisa dos vírus influenza do tipo A (subtipos H1pdm09 e H3) e do tipo B (linhagens Yamagata e Victoria).

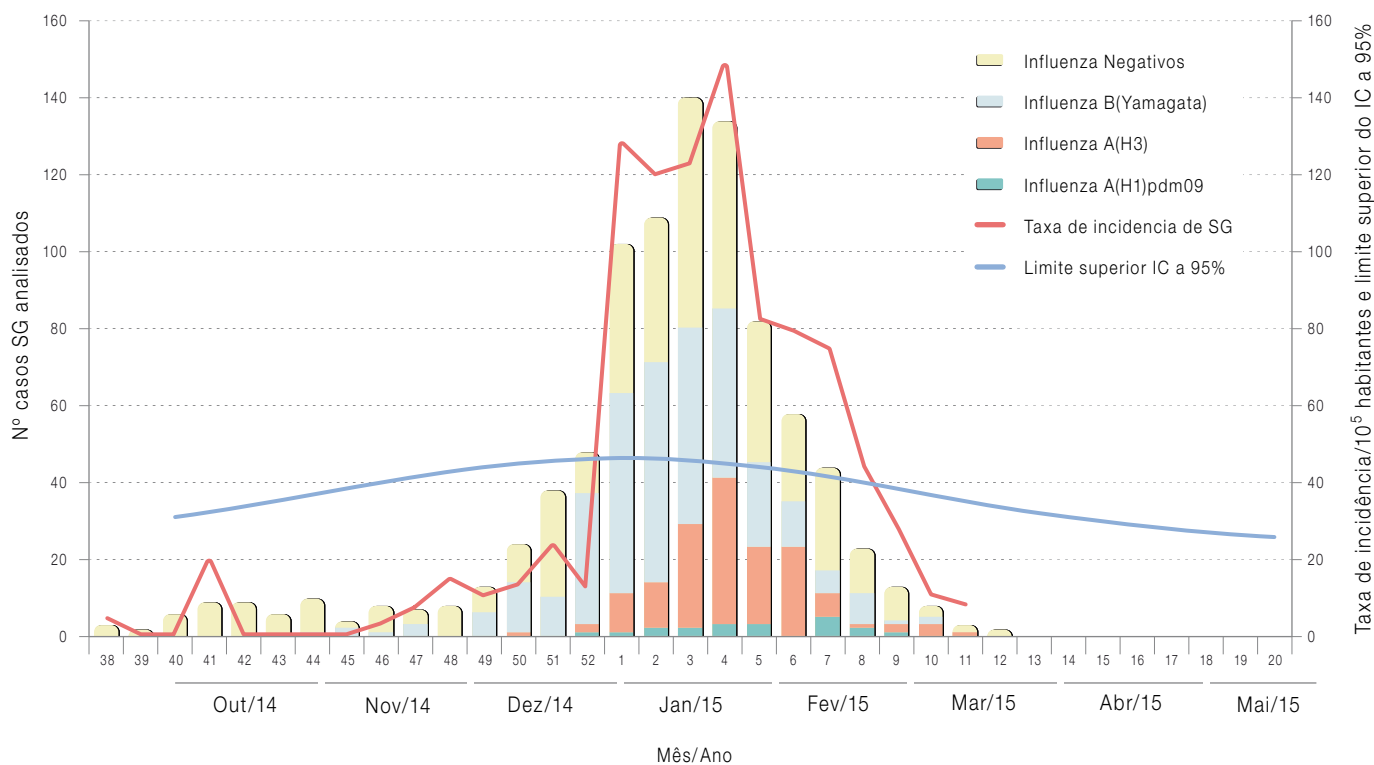
Foi realizado o isolamento do vírus da gripe em cultura celular (MDCK e MDCK-Siat1) e efetuada a caracterização antigénica e genética dos vírus em circulação no presente inverno, provenientes do PNVG e da RPLDG. Os vírus isolados foram caracterizados antigénicamente pela reação de inibição da hemaglutinação. A caracterização genética foi realizada através da sequenciação da região que codifica a subunidade HA1 do gene da hemaglutinina dos vírus influenza.

Resultados

Vigilância clínica e laboratorial da gripe

No inverno de 2014/2015 a atividade gripal foi considerada elevada e o maior número de notificações foi observado nos meses de janeiro e início de fevereiro. O período epidémico ocorreu entre as semanas 1/2015 e 8/2015, à semelhança da época anterior (4), com um valor máximo de incidência de 148 casos de SG por 100000 habitantes na semana 4/2015 (gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição semanal dos casos de gripe detetados por RT-PCR em tempo-real, por tipo/subtipo do vírus influenza e segundo a semana de início da doença, na época 2014/2015, entre a semana 38/2014 (15 de setembro de 2014) e a semana 12/2015 (20 de março de 2015).



Inclui taxas de incidência semanais de SG por 100000 habitantes, com indicação do limite superior do IC a 95% da área de atividade basal.

Na época 2014/2015, entre 15 de setembro de 2014 e 20 de março de 2015, foram enviados ao LNRVG 887 exsudados da nasofaringe, 400 dos quais provenientes dos médicos de família que integram a Rede Médicos-Sentinel e do Projeto EuroEVA e 487 dos Serviços de Urgência e Obstetria.

A análise laboratorial permitiu a identificação do vírus influenza em 491 (55%) casos de síndrome gripal (gráfico 2). No total, foram identificados 325 (37%) casos de infeção por influenza B (linhagem Yamagata), 146 (16%) casos por influenza A(H3) e 20 (2%) casos por influenza A(H1)pdm09 (gráfico 2).

Os vírus influenza B, A(H3) e A(H1)pdm09 co-circularam durante a época 2014/2015, sendo que o vírus do tipo B foi detetado em maior percentagem em todas as semanas, à excepção da semana 6, em que o vírus influenza A(H3) foi o mais frequente (gráfico 3).

Gráfico 2: Diagnóstico laboratorial da gripe nos casos de SG na época de 2014/2015, entre a semana 38/2014 (15 de setembro de 2014) e a semana 12/2015 (20 de março de 2015).

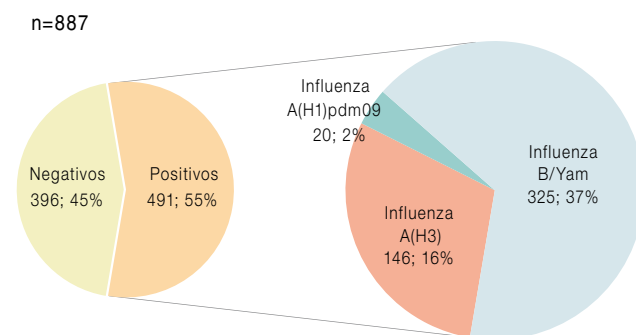
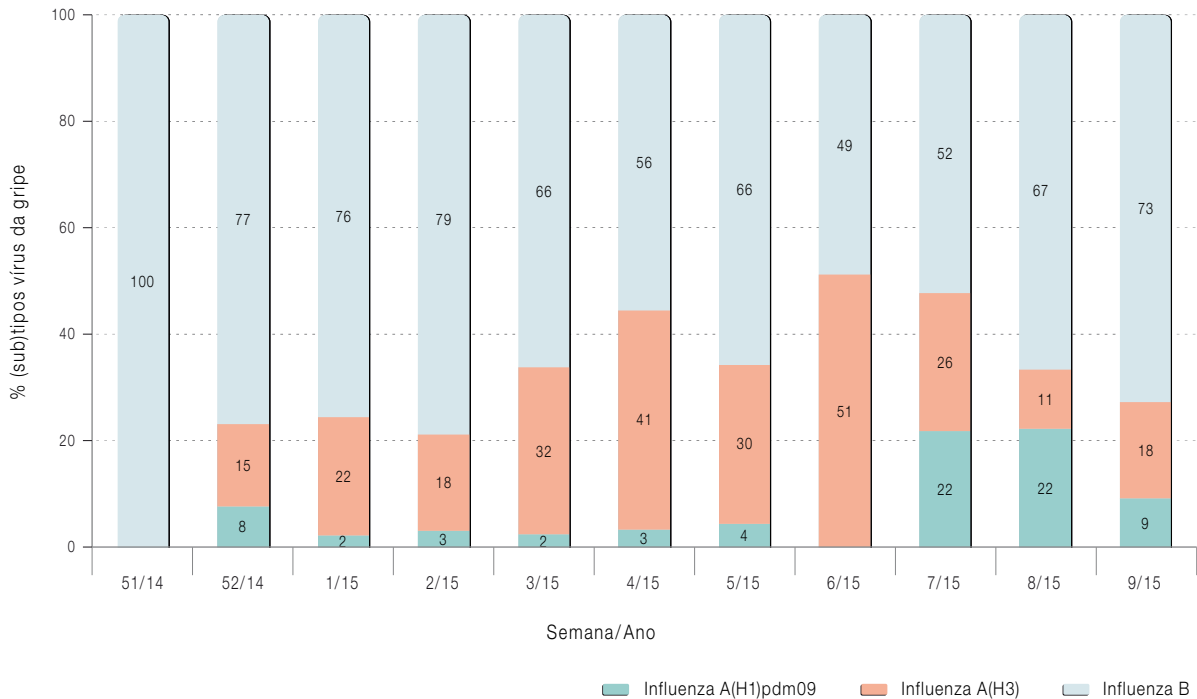


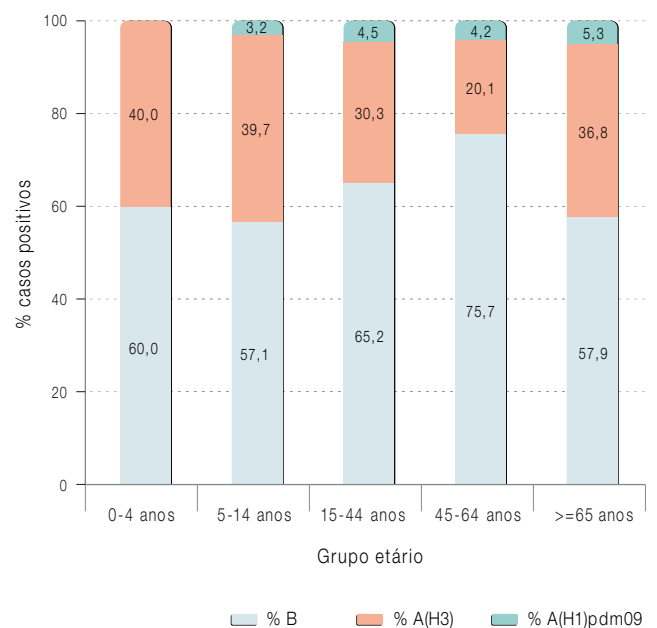
Gráfico 3: Diagnóstico laboratorial da gripe nos casos de SG na época de 2014/2015, entre a semana 51/2014 (15 de dezembro de 2014) e a semana 9/2015 (1 de março de 2015).



A distribuição dos casos de síndrome gripal por grupo etário, mostra que a maior frequência de casos positivos para gripe foi em crianças dos 5 aos 14 anos (66%; 63/96), seguida dos adolescentes e jovens adultos dos 15 aos 44 anos (58%; 201/346).

O vírus influenza B foi o mais frequente em todos os grupos etários, no entanto atingiu percentagens mais elevadas nos grupos etários 45-64 anos (75,7%) e 15-44 anos de idade (65,2%) (gráfico 4). Os casos de infeção pelo vírus influenza A(H3) foram observados principalmente nas crianças (0 aos 4 anos: 40,0% e 5 aos 14 anos: 39,7%) e nos adultos com mais de 65 anos (36,8%). A frequência do vírus influenza A(H1)pdm09 variou entre 3,2% e 5,3% nos indivíduos com idade superior a 5 anos.

Gráfico 4: Casos de gripe por grupo etário, na época de 2014/2015, entre a semana 38/2014 (15 de setembro de 2014) e a semana 12/2015 (20 de março de 2015).



Foram excluídos da análise 17 casos, por falta de informação sobre a idade.



artigos breves_ n. 6

Caraterização do vírus da gripe

Até à semana 12/2015 foram analisados antígenicamente 95 vírus influenza [88 vírus influenza B/Yamagata, 5 vírus influenza A(H1)pdm09 e 2 vírus influenza A(H3)]. A análise genética foi efetuada a 67 vírus influenza [40 influenza B/Yamagata, 26 influenza A(H3) e 1 A(H1)pdm09].

Dos 88 vírus B caraterizados antígenicamente apenas 2 eram semelhantes à estirpe vacinal da presente época (B/Massachusetts/2/2012) (5). A maioria (64) foi semelhante à estirpe vacinal selecionada para 2015/2016, B/Phuket/3073/2013 (6). Os restantes 22 vírus influenza B foram fracamente reconhecidos pelos antisoros específicos de ambas as estirpes vacinais. Todos os vírus da gripe tipo B caraterizados geneticamente pertencem ao grupo filogenético 3 da linhagem Yamagata, representado por B/Phuket/3073/2013 e apresentam as substituições de aminácidos caraterísticas da maioria dos vírus deste grupo: K48R, A108P, N116K, S150I, N165Y, A181T, N202S, G229D, K298E e E312K. Este grupo filogenético revelou-se heterogéneo quanto à antigenicidade dos vírus que o integram.

Todos os vírus A(H1)pdm09 isolados e caraterizados mantêm-se semelhantes à estirpe vacinal A/California/7/2009 (6). O único vírus influenza A(H1)pdm09 sequenciado até à semana 12/2015 integra o grupo genético 6B, representado pela estirpe A/South Africa/3626/2013, com as substituições de aminoácidos D97N, K163Q, S185T, A256T e K283E na hemaglutinina viral.

A caraterização antigénica dos vírus influenza do subtipo A(H3) foi dificultada, uma vez que a maioria destes vírus perdeu a sua capacidade hemaglutinante dos glóbulos vermelhos. No entanto, foi possível caraterizar 2 estirpes A(H3) isoladas que se revelaram diferentes da estirpe incluída na vacina em 2014/2015 (A/Texas/50/2012) (6). Estas estirpes influenza A(H3) são semelhantes a A/Switzerland/9715293/2013 (estirpe vacinal para 2015/2016) (7).

Por sua vez, os 26 vírus influenza A(H3) sequenciados distribuíram-se por dois subgrupos genéticos: 20 vírus do subgrupo 3C.2a (representado por A/Hong Kong/5738/2014) e 6 vírus do subgru-

po 3C.3 (representado por A/Samara/73/2013). Os vírus A(H3) detetados em todo o mundo e que pertencem ao subgrupo 3C.3 são semelhantes antígenicamente à estirpe contemplada na vacina antigripal 2014/2015 (A/Texas/50/2012) (6) e apresentam as substituições caraterísticas deste subgrupo: Q33R, T128A, R142G, N145S e N278K. No entanto, a maioria dos vírus influenza A(H3) por nós sequenciados pertencem ao subgrupo 3C.2a, que a nível global integra vírus antígenicamente diferentes da estirpe vacinal 2014/2015 e semelhantes a A/Switzerland/9715293/2013, a estirpe escolhida para integrar a vacina antigripal para o hemisfério norte em 2015/2016 (6). Os vírus do subgrupo 3C.2a apresentaram as seguintes substituições na hemaglutinina: L3I, N144S, F159Y, K160T, N225D e Q311H.

_Discussão e conclusões

Na época de vigilância 2014/2015, a atividade gripal foi elevada, com taxas de incidência de casos SG superiores às da época anterior, num período epidémico de igual duração. O vírus influenza do tipo B foi predominante durante todo o inverno, em co-circulação com o subtipo A(H3). Foram detetados casos esporádicos do vírus influenza A(H1)pdm09. O vírus influenza B foi detetado em todos os grupos etários, com maior expressão nos indivíduos adultos. Em contrapartida, o vírus influenza A(H3) foi essencialmente detetado nos indivíduos mais jovens. A análise antigénica e genética dos vírus influenza do tipo B e subtipo A(H3) circulantes mostrou diferenças relativamente às estirpes vacinais da época 2014/2015 (6). Os vírus do sub-tipo A(H1)pdm09 mantêm-se semelhantes à estirpe vacinal. Os vírus detetados no presente inverno são semelhantes às estirpes recomendadas para a vacina da próxima época gripal 2015/2016 (7). No entanto, a constante e rápida mutação do vírus da gripe dificulta a antevisão da semelhança total das estirpes vacinais selecionadas com as que virão a circular.

Agradecimentos

À Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe, aos Médicos-Sentinelas, aos Serviços de Urgência e de Obstetrícia e aos participantes no estudo EuroEVA. À Inês Batista pelo apoio logístico prestado à Rede Médicos-Sentinelas. À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.



artigos breves_ n. 6

Referências bibliográficas:

- (1) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza Case Definitions [Em linha]. Sweden: ECDC. [consult. 7/5/2015]. [LINK](#)
- (2) Wu LT, Thomas I, Curran MD, et al. Duplex molecular assay intended for point-of-care diagnosis of influenza A/B virus infection. J Clin Microbiol. 2013;51(9):3031-8. [LINK](#)
- (3) WHO information for molecular diagnosis of influenza virus in humans – update August 2011. Geneva: World Health Organisation, 2011. [LINK](#)
- (4) Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2013/2014 (versão não editada). Lisboa, outubro 2014. [LINK](#)
- (5) Direção-Geral da Saúde. Orientação n° 012/2013 de 25/09/2013. Vacinação contra a gripe com a vacina trivalente para a época 2013/2014. [LINK](#)
- (6) World Health Organisation. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014-2015 northern hemisphere influenza season (February 2014). Geneva: WHO, 2014. [LINK](#)
- (7) World Health Organisation. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015-2016 northern hemisphere influenza season (February 2015). Geneva: WHO, 2015. [LINK](#)



Doseamento de vitamina D em produtos lácteos consumidos em Portugal

Diana Parreira¹, Maria Celeste Serra², Maria Graça Dias¹

m.graca.dias@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

(2) Centro de Investigação em Engenharia Química e Biotecnologia. Área Departamental de Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.

Introdução

Em muitos países desenvolvidos tem-se verificado um crescimento da suplementação em vitamina D em vários produtos alimentares. Este facto está relacionado com a crescente deficiência desta vitamina, devido a fatores, como, alterações dos hábitos alimentares, estilo de vida com menos exposição solar, utilização de vestuário que cobre uma grande percentagem de pele, utilização de protetores solares, cor de pele (quantidade de melanina) e idade (1).

A deficiência em vitamina D pode originar inúmeros distúrbios na saúde, nomeadamente deformações na estrutura óssea, como raquitismo em crianças, redução da capacidade do organismo no combate a infeções e agravamento de doenças autoimunes (2, 3).

A escassez de fontes alimentares naturais de vitamina D, nomeadamente em determinadas dietas, tem levado a indústria a suplementar alguns dos produtos de maior consumo com o objetivo de possibilitar a ingestão da dose diária recomendada (DDR), 5 µg/dia (4). Produtos lácteos, cereais e pão enriquecidos em vitamina D estão disponíveis no mercado em algumas áreas geográficas, como nos Estados Unidos da América e no norte da Europa, fazendo parte de uma política de prevenção da saúde (5, 6).

Objetivo

O presente trabalho apresentou como objetivo a determinação do teor de vitamina D em produtos lácteos disponíveis no mercado português de modo a contribuir para a avaliação da ingestão desta vitamina e estabelecer comparações com os valores apresentados nos respectivos rótulos.

Materiais e métodos

O procedimento de determinação da vitamina D baseou-se na norma EN 12821, que apresenta um método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com quantificação através do método de padrão interno (7).

Os compostos de vitamina D presentes nas várias amostras foram extraídos da matriz recorrendo a saponificação, extração líquido-líquido e concentração, e em seguida, isolados através de um método de HPLC semi-preparativa de fase normal. Para posterior identificação e quantificação foi utilizado um método de HPLC analítico de fase reversa, com deteção a um comprimento de onda de 265 nm e quantificação através do método do padrão interno. Os teores obtidos laboratorialmente foram comparados com os rotulados tendo em consideração as incertezas dos resultados das medições, avaliadas com base nos dados de validação.

Neste trabalho foram utilizados produtos lácteos existentes no mercado português em que a vitamina D foi adicionada pelos fabricantes (amostras fortificadas). As amostras, cujas características são apresentadas na **tabela 1**, foram adquiridas no ano de 2013 em hipermercados da região de Lisboa.

Cada amostra analisada foi composta a partir de três lotes diferentes do produto, utilizando uma embalagem de cada lote. As amostras foram analisadas em duplicado.

Resultados e discussão

O método analítico utilizado foi previamente validado no laboratório, tendo-se obtido como limite de deteção 0,1 µg/100 g de amostra e como limite de quantificação 0,25 µg/100 g de amostra. Tendo em consideração os baixos teores de vitamina D presentes nos alimentos, nomeadamente nos laticínios, incluindo os fortificados (**tabela 1**), o método foi estudado e validado de forma a conseguir-se um limite de quantificação adequado a este tipo de produtos. É de referir que, apesar dos teores de vitamina D neste grupo de alimentos ser relativamente baixo, são produtos ingeridos em elevadas quantidades, pelo que a sua ingestão contribui significativamente para a dose diária recomendada.

Tabela 1: ↓ Amostras em estudo neste trabalho.

Produto lácteo	Caraterísticas amostras	Vitamina D especificada no rótulo	Teor em vitamina D no rótulo	Teor de vitamina D determinado laboratorialmente (µg/100 g) ± incerteza
A	logurte líquido infantil de vários sabores	D ₃	0,83 µg/100 g	0,60 ± 0,2
B	Queijo fresco tipo "queijinho" de vários sabores – marca 1	D ₃	1,3 µg/100 g	1,5 ± 0,4
C	Queijo fresco tipo "queijinho" de vários sabores – marca 2	D ₃	1,05 µg/100 g	0,39 ± 0,09
D	Leite fermentado probiótico de vários sabores	D ₃	0,75 µg/100 g	0,60 ± 0,2
E	logurte líquido de morango	D ₃	0,75 µg/100 g	0,80 ± 0,2
F	Leite de vaca meio-gordo	D ₃	0,75 µg/100 mL	0,28 ± 0,07
G	Leite achocolatado	D ₃	0,8 µg/100 mL	0,60 ± 0,2

As amostras, A, C, D, F e G apresentaram desvios negativos em relação à rotulagem, 33, 63, 20, 62 e 21%, respetivamente enquanto as amostras B e E apresentaram desvios positivos em relação ao rotulado, 13 e 4%.

Tendo em consideração a incerteza expandida dos resultados da medição, 26%, os produtos C e F apresentaram um teor de vitamina D significativamente inferior ao rotulado (intervalo de confiança, 95%).

Com base nas determinações efetuadas e tendo como referência a DDR, o consumo diário de 200 g de produtos lácteos do tipo dos analisados poderá fornecer entre 12% e 60% da necessidade diária de vitamina D.

Conclusões

Das amostras analisadas, cinco apresentaram um teor de vitamina D concordante com o rotulado e duas amostras um teor significativamente inferior ao referido na embalagem.

O consumo de produtos lácteos constitui uma fonte importante de vitamina D, contribuindo para se atingir a DDR e, desta forma, para a prevenção da deficiência em vitamina D, particularmente nas crianças que apreciam este tipo de alimentos.

Referências bibliográficas:

- (1) Wimalawansa SJ. Vitamin D in the new millennium. *Curr Osteoporos Rep.* 2012;10(1):4-15.
- (2) Chesney RW. Vitamin D and The Magic Mountain: the anti-infectious role of the vitamin. *J Pediatr.* 2010;156(5):698-703.
- (3) Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, et al. Vitamin D supplementation: a promising approach for the prevention and treatment of strokes. *Curr Drug Targets.* 2011;12(1):88-96. [LINK](#)
- (4) Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Decreto-Lei 54/2010, de 28 de maio. Diário da República, 1.ª série, n.º 104, 28 de maio de 2010, p. 1847. Anexo I - Vitaminas e minerais que podem ser declarados e respectiva dose diária recomendada (DDR) [LINK](#)
- (5) Holick MF. Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem.* 2003;88(2):296-307.
- (6) Mason RS, Sequeira VB, Gordon-Thomson C. Vitamin D: the light side of sunshine. *Eur J Clin Nutr.* 2011;65(9):986-93.
- (7) EN 12821:2000. Foodstuffs. Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography. Measurement of cholecalciferol (D3) and ergocalciferol (D2). Ireland,UK: Comite Europeen de Normalisation, 2000.



Aplicação do Seis Sigma na avaliação da inexatidão (*Bias*) dos resultados laboratoriais do parâmetro cortisol sérico, 2012-2014

Ana Gaspar¹, Ana Faria², José Requeijo¹, Helena Correia², Ana Cardoso², Cristina Brito², Deolinda Madureira³

ana.gaspar@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Engenharia Mecânica e Gestão Industrial. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa.

(2) Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade. Unidade de Avaliação Externa da Qualidade. Departamento de Epidemiologia, INSA

(3) Grupo de Estudos de Laboratório de Endocrinologia, Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo.

Introdução e objetivo

Na prática laboratorial, é crescente a preocupação com a obtenção de resultados fidedignos, que possam apoiar corretamente os profissionais de saúde no diagnóstico, tratamento e controlo de patologias nos utentes (1,2).

Outra questão que requer especial controlo, é a variabilidade dos resultados analíticos entre diferentes laboratórios, para um determinado parâmetro de medição (3). A trabalhar neste sentido, o Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) tem como missão a promoção, organização e coordenação de programas de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ), e o objetivo de avaliar o desempenho interlaboratorial dos laboratórios participantes.

É objeto de estudo, os resultados dos laboratórios participantes obtidos pelo PNAEQ, no programa de Endocrinologia, para o parâmetro Cortisol Sérico, entre os anos de 2012 e 2014, de forma a detetar problemas e causas para a variabilidade entre laboratórios na medição do mesmo lote de amostra.

O Cortisol Sérico, é a hormona esteroide mais abundante na circulação sanguínea, e é importante no controlo de diversas patologias, como o síndrome de *Cushing* (sobreprodução), a doença de *Addison* (subprodução), hipopituitarismo (diminuição da secreção de hormonas pela hipófise), a hiperplasia (aumento de volume de um órgão pela multiplicação celular) e o carcinoma supra-renal. Por isso, é importante assegurar a determinação de concentrações exatas.

Material e métodos

No tratamento dos dados, utilizou-se o algoritmo A referenciado na norma ISO 13528, que é um método robusto, pois corrige valores absurdos (*outliers*), em vez de os eliminar do tratamento estatístico.

Visto que se está a tratar de variabilidade interlaboratorial, ou seja, inexatidão, os resultados laboratoriais foram transformados em percentagem do *bias*, dado pela seguinte fórmula:

$$Bias = | \text{valor do laboratório} - \text{valor alvo} | / \text{valor alvo}.$$

Foi necessário verificar, quanto à diferença dos métodos utilizados na determinação do Cortisol pelos laboratórios, e das concentrações das amostras de controlo em cada ensaio realizado, no período determinado. Para tal construiu-se uma tabela ANOVA. Teve de ser garantida a normalidade dos dados, utilizando o teste de *Kolmogorov-smirnov* para a sua verificação, e a transformação de *Box-Cox*, nos casos em que os valores não seguem uma distribuição normal. Este processo poderia ter sido evitado, caso o número de resultados fosse igual ou superior a 30 por cada ensaio.

Recorreu-se ao Seis Sigma enquanto metodologia e métrica, suportadas pela aplicação do ciclo DMAIC (*Define, Measure, Analyze, Improve, Control*).

Resultados e discussão

Depois de tratados os dados pelo algoritmo A, de transformados em percentagem do *bias*, e de ser garantida a sua normalidade, construiu-se a tabela ANOVA (4), representada pela **tabela 1**. Tendo em conta as estatísticas de teste e os resultados da tabela ANOVA (Análise de Variância), verifica-se, estatisticamente, que os métodos analisados não são significativamente diferentes, ao passo que as concentrações são significativamente diferentes, como era já esperado. A interação métodos-concentração não influencia os resultados da medição. Assim, a avaliação do desempenho laboratorial, é realizada por concentração/ensaio de avaliação externa da qualidade, evitando-se a estratificação por métodos. Desta maneira, será obtido um conjunto de 12 valores, ordenados cronologicamente (resultados de 4 ensaios por ano, durante 3 anos), para a avaliação global de desempenho laboratorial, que neste caso é o nível sigma.

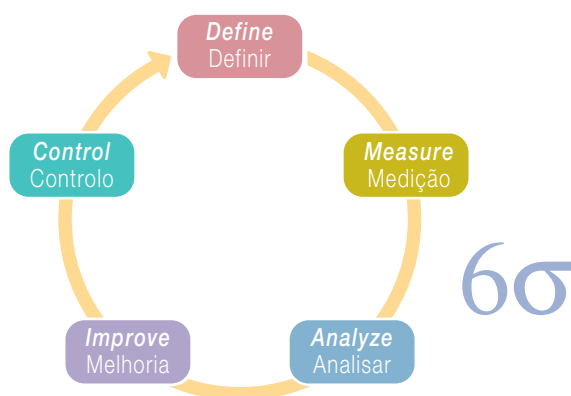
Tabela 1: Tabela ANOVA.

FV	SS	U	MS	F ₀	F _{crítico}
A	1,77	11	0,16	3,05	1,83
M	0,11	2	0,05	1,04	3,03
AM	1,00	22	0,05	0,88	1,59
Erro	12,20	231	0,05		
Total	15,10	266			

FV – Fatores de Variação; A – Concentração para cada ensaio;
M – Métodos utilizados nas medições; AM – Interação Concentração - Método;
SS – Variação dos fatores; U - Graus de liberdade; MS = SS/U;
F₀ = MS/M_{Erro}; F_{crítico} – Tabelado (distribuição Fisher);
Se F₀ > F_{crítico} o fator é significativamente diferente e influencia a medição.

Focando a atenção na fase *Measure* (medição) do ciclo DMAIC, representado pela **figura 1** (5), em que foi efetuado a análise estatística de resultados, chegou-se a um nível sigma médio de 2,82, variando entre 2,09 e 3,91, como se pode verificar pelo gráfico da **figura 2**. A especificação da qualidade utilizada neste cálculo, foi a referida no CLIA (*Clinical Laboratory Improvement Amendments*) para o parâmetro cortisol (25%- valor máximo admissível para o valor do *bias*).

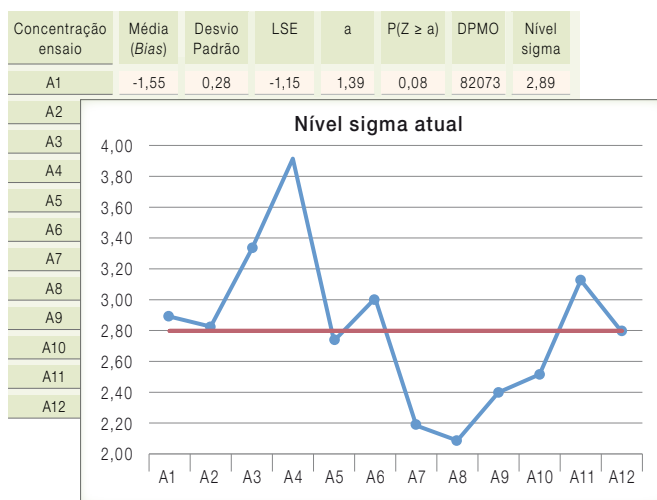
Figura 1: Fases do ciclo DMAIC.



Conclusões

Pelo resultado obtido para o nível de desempenho laboratorial, e sabendo que o nível sigma ideal seria de 6 Sigma, existe claramente uma oportunidade de melhoria da qualidade. Elevar o nível sigma, significa reduzir a variabilidade das medições entre laboratórios.

Figura 2: Nível da qualidade sigma para cada ensaio, com amostras de controlo de diferentes concentrações.



LSE – Limite Superior de Especificação; a = (LSE – Média (Bias))/Desvio padrão (Bias); P (Z ≥ a) – Tabela Distribuição Normal Reduzida; DPMO = P (Z ≥ a) * 10⁶; Nível sigma – Tabelado em função do DPMO.

Para isso, é necessário identificar as causas da variabilidade (problema), determinar soluções e estabelecer uma meta real a atingir.

Sendo possível implementar ações de melhoria, o objetivo final é a verificação do efeito das mesmas, através do cálculo do novo nível sigma, após esta etapa. Assim, espera-se um nível sigma superior ao calculado anteriormente, com a consequente diminuição da variabilidade laboratorial e eliminação de erros, aumentando o desempenho das metodologias utilizadas na determinação do cortisol, com benefício direto para o utente, no diagnóstico de patologias.

O descrito anteriormente, será um tema para abordar posteriormente, juntamente com o aprofundamento das outras fases do ciclo DMAIC.

Referências bibliográficas:

- (1) Jansen RT P. The quest for comparability: Calibration 2000. *Accred Qual Assur.* 2000;5:363-66.
- (2) Panteghini M, Forest JC. Standardization in laboratory medicine: new challenges. *Clin Chim Acta.* 2005;355(1-2):1-12.
- (3) Plebani M. The clinical importance of laboratory reasoning. *Clin Chim Acta.* 1999;280(1-2):35-45.
- (4) Pereira ZL, Requeijo J G. Qualidade: Planeamento e Controlo Estatístico de Processos. 2ª ed. Lisboa: FCT-UNL/Prefácio, 2012.
- (5) Werkema C. Criando a cultura Seis Sigma. 3ª ed. Belo Horizonte: Editora Werkema, 2004. (Seis Sigma; vol.1).



notícias_

4º Congresso Ibérico de Cianotoxinas

Lisboa, INSA, 8-10 julho 2015 - alteração de local

A Comissão organizadora do 4º Congresso Ibérico de Cianotoxinas (CIC) informa da alteração do local do evento para o auditório do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Informa-se ainda da extensão dos prazos de participação:

Submissão de resumos: até 31 de maio

Resultado da apreciação dos resumos: até 14 de junho

Inscrições: até 30 de junho

O 4º CIC debaterá sobre episódios tóxicos no ambiente e seus efeitos na saúde humana e animal, discutindo estratégias de deteção, prevenção, tratamento e remediação de situações de risco e a abordagem a novos compostos bioativos. Serão analisadas as novas tendências de investigação e desenvolvimento tecnológico nesta área em Portugal e em Espanha, tendo em vista a promoção da qualidade da água, dos ecossistemas e da saúde das populações.

António Quesada, especialista internacional na área das cianotoxinas, será um dos oradores no congresso. A propósito, falou recentemente sobre o que são as cianotoxinas, o seu impacto na saúde humana e no ambiente, e sobre a importância deste encontro.

Leia aqui a entrevista [LINK](#)

4º CONGRESSO IBÉRICO DE CIANOTOXINAS
www.4cic2015.pro-insa.pt



A Comissão organizadora: Paulo Pereira, Arminda Vilares, Carina Menezes, Catarina Churro, Elisabete Valério, Elsa Dias

Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia. Departamento de Saúde Ambiental, INSA

Página web/incrções: www.4cic2015.pro-insa.pt

Contacto: 4cic2015@insa.min-saude.pt

2ª Reunião TORCHnet

Rede Nacional de Vigilância Laboratorial e Clínica de Infecções Congénitas

Lisboa, INSA, 29 junho 2015

No âmbito das Jornadas de Doenças Infeciosas 2015, o INSA realiza dia 29 junho a 2ª Reunião TORCHnet.

Este encontro irá debater: Vigilância epidemiológica: situação em Portugal e na Europa – SINAVE / TESSy; Atividades de vigilância laboratorial do INSA para os diferentes agentes: *Toxoplasma gondii*, VIH; *Treponema pallidum*; Vírus da Rubéola e Vírus Varicela - Zoster; CMV; Parvovírus B19 e HSV; TORCHnet: apresentação e funcionamento da plataforma informática e otimização e funcionamento da Rede.

Programa e mais informações brevemente disponíveis em www.insa.pt

2ª Reunião JA CHRODIS – 2015

Joint Action on Chronic Diseases and Promoting Healthy Ageing Across the Life Cycle

Colónia, 26 maio 2015

No âmbito da JA-CHRODIS, cujo principal objetivo é a prevenção de doenças crónicas e a promoção do envelhecimento saudável na população europeia ao longo do ciclo de vida, vai reunir-se no próximo dia 26 de maio, em Colónia (Alemanha), o grupo de trabalho (WP5) sobre “Boas Práticas em promoção da saúde e prevenção da cronicidade”.

Esta reunião de trabalho centra-se na:

1. apresentação e discussão dos critérios propostos pelo Painel de peritos em “Promoção da Saúde” para a identificação das “Boas Práticas” e dos resultados obtidos pelos vários parceiros associados na escolha de três exemplos representativos das mesmas, a nível nacional.
2. análise e debate dos resultados das atividades realizadas recentemente em cada uma das áreas de trabalho definidas, nomeadamente a nível da organização das iniciativas de divulgação e do planeamento das visitas de estudo a realizar.

O encontro realiza-se na sequência da primeira reunião do WP5 em 2015, decorrida a 20 de fevereiro, passado o primeiro ano de trabalho, onde o INSA contribuiu na discussão e apresentação do relatório síntese sobre a visão global das intervenções em promoção da saúde e prevenção primária realizadas em Portugal, nas áreas da doença cardiovascular, do acidente vascular cerebral e da diabetes tipo 2.

O Instituto Ricardo Jorge será representado pela investigadora Luciana Costa, do Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis.

Para além desta área de trabalho, o INSA participa no desenvolvimento da Plataforma sobre as doenças crónicas na Europa (WP 4).

Saiba mais sobre o projeto em <http://www.chrodis.eu/>

Contacto: luciana.costa@insa.min-saude.pt

2ª Reunião TORCHnet
Rede Nacional de Vigilância
Laboratorial e Clínica
de Infecções Congénitas



TORCHnet

Jornadas de Doenças Infeciosas 2015



ficha técnica

_Título: Boletim Epidemiológico Observações

_Periodicidade: Trimestral

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

_Numeração: 2ª série

Volume 4, número 12
Abril - Junho 2015

_Diretor

Fernando de Almeida, Presidente do INSA

_Editores

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

_Conselho Editorial Científico

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

_Revisão Científica

Cristina Furtado, Doenças Infecciosas | Manuela Cano, Saúde Ambiental
Sílvia Viegas, Composição de Alimentos

_Coordenação técnica Elvira Silvestre, Biblioteca da Saúde

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

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

Reprodução autorizada desde que a fonte seja citada, exceto para fins comerciais.
Isento de Registo na ERC ao abrigo do Decreto-Regulamento 8/99 de 9 de junho, artº 12º nº 1a).

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

Tel.: (+351) 217 519 200

Fax: (+351) 217 529 400

E-mail: info@insa.min-saude.pt

www.insa.pt